



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
Departamento de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



NAIARA CÁSSIA GANCEDO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE ESPÉCIES DE *Limonium* Mill. E DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DO RIZOMA DE *Limonium brasiliense* EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE PRÓSTATA

MARINGÁ

2023

NAIARA CÁSSIA GANCEDO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE ESPÉCIES DE *Limonium* Mill. E DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DO RIZOMA DE *Limonium brasiliense* EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE PRÓSTATA

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

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

MARINGÁ

2023

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

G195a

Gancedo, Naiara Cássia

Avaliação do potencial biológico de espécies de *Limonium* Mill. e da atividade antiproliferativa de substâncias isoladas do rizoma de *Limonium brasiliense* em linhagens celulares de câncer de próstata / Naiara Cássia Gancedo. -- Maringá, PR, 2023.
120 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, 2023.

1. Plumbaginaceae (*Limonium* Mill.). 2. Citotoxicidade. 3. *Limonium brasiliense*. 4. Fitoquímica. 5. Câncer de próstata. 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 23.ed. 615.4

NAIARA CÁSSIA GANCEDO


AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DE ESPÉCIES DE *Limonium* Mill. E DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DO RIZOMA DE *Limonium brasiliense* EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE PRÓSTATA

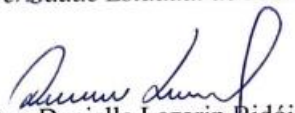
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

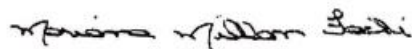
Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Aprovada em 24 de fevereiro de 2023

BANCA EXAMINADORA

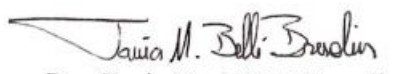

Dr. João Carlos Palazzo de Mello
Universidade Estadual de Maringá


Dra. Danielle Lazarin Bidóia
Universidade Estadual de Maringá



Dra. Mariana Millan Fachi
Universidade Federal do Paraná


Dr. Norberto Pepporine Lopes
Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP


Dra. Tania Mari Bellé Bresolin
Universidade do Vale do Itajaí

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Farmacêutica (PALAFITO, bloco K80 e bloco T22) (Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello), Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos (bloco B08) (Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura) e Complexo de Centrais de Apoio a Pesquisa (COMCAP, bloco B08) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), e em parceria com a Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) (Profa. Dra. Andreia Cristina Conegero Sanches), Centro Universitário Ingá (UNINGÁ) (Profa. Dra. Daniela Cristina de Medeiros Araújo e Profa. Dra. Danielly Chierrito de Oliveira Tolentino), Universidade Federal do Paraná (UFPR) (Dra. Fernanda Stumpf Tonin) e Universidade do Porto (Prof. Dr. Fernando Fernandez-Llimos).

Partes deste trabalho foram apresentadas nos seguintes eventos:

GANCEDO, N.C.; OLIVEIRA, N.C.; ISOLANI, R.G.; ARAÚJO, D.C.M.; CHIERRITO, D.; MELLO, J.C.P. Chemical characterization of epigallocatechin-3-*O*-gallate isolated of *Limonium brasiliense* rhizome. IV International Meeting of Pharmaceutical Sciences, XII Seminário Anual do PCF, II Seminário Anual do PROFAR, Universidade Estadual de Maringá, 2022.

GANCEDO, N.C.; ISOLANI, R.G.; OLIVEIRA, N.C.; MEDEIROS, D.C.; TONIN, F.S.; SANCHES, A.C.C.; FERNANDEZ-LLIMOS, F.; CHIERRITO, D.; MELLO, J.C.P. Main characteristics of anticancer bioassays of *Limonium* species. II International Symposium on Drug Delivery Systems: innovation, technology, and pharmacometrics (SISLIF), Universidade Estadual de Maringá, 2021.

GANCEDO, N.C.; OLIVEIRA, N.C.; ISOLANI, R.G.; BORGES, A.S.; FERREIRA, S.B.; MEDEIROS, D.C.; MELLO, J.C.P. Phytochemical characterization of *Limonium brasiliense* rhizome. 13th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto, 2021.

GANCEDO, N.C.; CHIERRITO, D.; OLIVEIRA, N.C.; ISOLANI, R.G.; NAKAMURA, C.V.; MELLO, J.C.P. Citotoxicidade de compostos isolados do rizoma de *Limonium brasiliense*. XIII Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 2021.

GANCEDO, N.C.; OLIVEIRA, N.C.; ISOLANI, R.G.; PAULA, M.N.; ARAÚJO, D.C.M.; CHIERRITO, D.; MELLO, J.C.P. Chemical characterization of phenolic compounds of *Limonium brasiliense* by UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS. XI Seminário Anual do PCF, Universidade Estadual de Maringá, 2021.

Artigo publicado:

GANCEDO, N.C.; ISOLANI, R.; OLIVEIRA, N.C.; NAKAMURA, C.V.; MEDEIROS ARAÚJO, D.C.; SANCHES, A.C.C.; TONIN, F.S.; FERNANDEZ-LLIMOS, F.; CHIERRITO, D.; MELLO, J.C.P. Chemical Constituents, Anticancer and Anti-Proliferative Potential of *Limonium* Species: A Systematic Review. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 2, 293, 2023 (**Fator de Impacto:** 5,215; **Qualis CAPES:** A1).

A Deus,
À minha família pelo amor, auxílio e incentivo,
Aos meus pais Ailton e Maria,
Aos meus avós maternos Antônio e Elza e paternos Alzira e Manoel (*in memoriam*),
Ao meu noivo, Leonardo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, saúde, força, resiliência e por nunca ter me abandonado durante esta longa caminhada na busca pelo conhecimento. Os desafios foram muitos, mas foi graças a Ele, a minha família, professores e amigos, que consegui superá-los.

Aos meus queridos pais, Ailton e Maria, pelo amor, carinho, auxílio, compreensão, e por sempre me incentivarem a estudar e a nunca desistir dos meus sonhos, acreditando na minha capacidade e dando suporte nos momentos mais difíceis, sendo a minha força e refúgio.

À minha irmã Samara e meu cunhado Vinicius, pela torcida e por estarem sempre presentes.

A toda a minha família e, em especial, aos meus avós maternos Antônio e Elza, e paternos Alzira e Manoel (*in memoriam*), pelo carinho, apoio e orações.

Ao meu noivo, Leonardo, que mesmo com toda a distância física sempre se fez presente, dando força, conselhos, incentivo e apoio.

Aos meus amigos, pelo carinho e motivação.

Ao professor João, pela orientação, amizade, ensinamentos, paciência, confiança, apoio e por sempre acreditar na minha capacidade. Serei eternamente grata pelas oportunidades e por tudo que me proporcionou, desde o segundo ano de graduação do curso de Farmácia até hoje (2013-2023), como orientador e, atualmente, como colega de trabalho no Departamento de Farmácia (DFA) da UEM. Muito obrigada!

Às professoras Andreia Cristina Conegero Sanches (UNIOESTE), Danielly Chierrito de Oliveira Tolentino (UNINGÁ) e Daniela Cristina de Medeiros Araújo (UNINGÁ), ao professor Fernando Fernandez-Llimos (Universidade do Porto), Dra. Fernanda Stumpf Tonin (UTFPR), doutoranda Raquel Isolani (UEM) e a acadêmica Natalia Castelhana de Oliveira (UEM), pela parceria e por colaborarem com o desenvolvimento de parte deste trabalho.

Ao Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, em especial ao professor Celso Vataru Nakamura, pelo apoio e parceria. Muito obrigada!

Agradeço a todos os membros do Laboratório de Biologia Farmacêutica, Palafito (UEM), pela ajuda, amizade, conversas, experiências e desafios compartilhados, e ao técnico do laboratório, Admir Arantes, por todo auxílio e apoio.

À profa. Dra. Maria Auxiliadora Milaneze-Gutierrez, pela parceria nos trabalhos desenvolvidos ao longo destes dez anos de amizade.

À profa. Dra. Suzane Virtuoso da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) e prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), pelas sugestões e correções na etapa de qualificação deste trabalho. Muito obrigada!

À profa. Dra. Catarina Segreti Porto da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), por ter cedido uma das linhagens celulares de câncer de próstata utilizada nas análises *in vitro* e à Dra. Carolina Meloni Vicente (UNIFESP) pela disponibilidade e experiência compartilhada.

Ao prof. Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas (UEM) pelo auxílio na execução da análise de dicroísmo circular.

Ao prof. Dr. Fernando Batista da Costa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP), Campus da USP Ribeirão Preto e aos membros do Laboratório AsterBioChem: técnico Mauro, técnico João Gabriel e doutorando Álvaro, pela recepção e acolhimento durante o estágio realizado no laboratório em 2022.

Ao prof. Dr. Flávio da Silva Emery e técnico Murilo do Laboratório de Química Heterocíclica e Medicinal (QHETEM) da FCFRP - USP Ribeirão Preto, por gentilmente ter permitido a realização de análises de RMN.

À profa. Dra. Hosana Maria Deboni e técnica Dani do Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho (NPPNS), por ter prontamente permitido a realização da análise de polarimetria.

À secretaria do PCF, Francisca Helena Mesquita de Carvalho, por estar sempre à disposição, nos socorrendo sempre que preciso. Sua dedicação demonstra todo o amor e carinho que tem pelo PCF. Muito obrigada!

À Universidade Estadual de Maringá (UEM), pelo suporte fornecido.

Ao Departamento de Farmácia (DFA) da UEM pelo apoio e incentivo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PCF) da UEM pelo suporte e por ofertar aos alunos uma pós-graduação de excelência.

Aos professores do PCF por todo conhecimento compartilhado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

E a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a vencer este grande desafio, os meus sinceros agradecimentos!

"Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer".

(Albert Einstein)

BIOGRAFIA



Naiara Cássia Gancedo nasceu no dia 5 de setembro de 1994 em Dourados/MS. Filha de Ailton Valdir Gancedo e Maria Aparecida Motta Gancedo. Aos 5 anos de idade mudou com a família para Terra Boa/PR, onde cursou o ensino fundamental na Escola Estadual Professor Léo Kohler (2005-2008) e o ensino médio no Colégio Estadual Helena Kolody (2009-2011). Em 2012 ingressou no curso de Farmácia da Universidade Estadual de Maringá (UEM), concluindo-o em 2016. Durante a graduação participou de projetos de extensão na Farmácia Ensino (2012-2014) e no Museu Dinâmico Interdisciplinar (MUDI) da UEM (2013). Atuou como monitora no ambiente Plantas Medicinas do MUDI (2013), sob orientação da Profa. Dra. Maria Auxiliadora Milaneze-Gutierrez. Participou de projetos de iniciação científica no Laboratório de Biologia Farmacêutica, Palafito, da UEM (2013-2016), sob orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello e coorientação da Profa. Dra. Maria Auxiliadora Milaneze-Gutierrez. Entre 2015 e 2016 foi membro do grupo Conselho Regional de Farmácia Junior (CRF-Jr) da UEM. Em 2017 iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UEM, sob orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, concluindo-o em 2019. O projeto de pesquisa resultou na dissertação intitulada “Avaliação etnofarmacológica da casca caulinar de *Croton floribundus*”. Atualmente, é doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UEM, sob orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello (2019-2023). Desde agosto de 2021 é professora assistente (colaboradora) do Departamento de Farmácia (DFA) da UEM, ministrando as disciplinas de Farmacognosia; Obtenção e Controle de Qualidade de Insumos Fitoterápicos; Química Farmacêutica Medicinal; Estágio Supervisionado em Farmácia Comunitária e Atenção Farmacêutica e Estágio Curricular Supervisionado em Indústria Farmacêutica e Afins. É coorientadora de projetos de iniciação científica (PIC e PIBIC) de membros do Laboratório Palafito, e orientadora de Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC) de graduandos de Farmácia do DFA da UEM. É associada da Sociedade Brasileira de Farmacognosia (2017-atual) e da Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas (2020-atual). Atua como revisora no *Journal Vitae*.

GANCEDO, N.C., 2023. Avaliação do potencial biológico de espécies de *Limonium* Mill. e da atividade antiproliferativa de substâncias isoladas do rizoma de *Limonium brasiliense* em linhagens de câncer de próstata. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 120p.

RESUMO

Limonium Mill., Plumbaginaceae, é considerado um gênero cosmopolita e nativo de regiões de clima temperado e subtropical. No Brasil, este gênero é representado pela espécie *L. brasiliense*, conhecida como “baycuru, guaycuru ou guaycurá”, e utilizada na medicina popular para o tratamento de diversas patologias. Este estudo objetivou sintetizar os aspectos gerais e específicos relacionados ao potencial anticancerígeno de espécies de *Limonium* Mill. por meio de um estudo de revisão sistemática (capítulo 1), além de realizar a análise fitoquímica e do potencial antiproliferativo de substâncias isoladas dos rizomas de *L. brasiliense* (capítulo 2). Para isso, uma busca sistemática foi realizada nas bases de dados eletrônicas PubMed/MEDLINE, Scopus e Scielo, e manualmente. Os estudos que avaliaram a atividade anticancerígena *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* ou *in silico* de extratos brutos, frações, subfrações ou substâncias isoladas de espécies de *Limonium* foram incluídos. Para o estudo fitoquímico do rizoma de *L. brasiliense* diferentes técnicas cromatográficas e de espectroscopia foram utilizadas, incluindo cromatografia em coluna, cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia líquida de ultra eficiência, espectroscopia de ressonância magnética nuclear, polarimetria, dicroísmo circular e espectrometria de massas. A atividade antiproliferativa das substâncias isoladas foi avaliada em linhagens celulares de câncer de próstata (PC-3 e LNCaP) e normal (RWPE-1), pelo método de MTT. No estudo de revisão sistemática, um total de 942 estudos foram identificados e 33 foram incluídos para leitura na íntegra, sendo 17 estudos considerados elegíveis para a síntese qualitativa dos dados. Destes, 14 (82,35%) referem-se a ensaios *in vitro*, um (5,88%) a *in vivo* e dois (11,76%) foram designados como ensaios *in vitro* e *in vivo*. Diferentes substâncias e seus impactos na viabilidade celular de uma série de linhagens cancerígenas foram avaliadas. No capítulo 2 foi possível confirmar que os resultados obtidos a partir dos rizomas de *L. brasiliense* estavam dentro dos limites definidos em estudos prévios para a espécie, comprovando a qualidade da matéria-prima. A cromatografia em coluna da fração acetato de etila permitiu o isolamento e identificação da substância epigalocatequina-3-*O*-galato (EGCG) com grau de pureza satisfatório. Os resultados dos estudos *in vitro* reforçam o potencial de *L. brasiliense* como fonte de substâncias com atividade antiproliferativa contra linhagens celulares de câncer de próstata, incluindo a samarangenina B e EGCG, além de servir de base para futuros estudos relacionados ao possível mecanismo de ação destas substâncias.

PALAVRAS-CHAVE: Citotoxicidade, Fitoquímica, Revisão Sistemática, Plumbaginaceae

GANCEDO, N.C., 2023. Biological potential evaluation of species of *Limonium* Mill. and the anti-proliferative activity of compounds isolated from the rhizome of *Limonium brasiliense* in prostate cancer cell lines. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 120p.

ABSTRACT

Limonium Mill., Plumbaginaceae, is a cosmopolitan genus native to temperate and subtropical regions. In Brazil, this genus is represented by *L. brasiliense* species, known as “baycuru, guaycuru or guaycurá”, and used in folk medicine for the treatment of various pathologies. This study aimed to synthesize the general and specific aspects related to the anticancer potential of *Limonium* Mill. species through a systematic review study (chapter 1), in addition to performing a phytochemical analysis and the anti-proliferative potential of compounds isolated from *L. brasiliense* rhizomes in prostate cancer cell lines (chapter 2). Thus, a systematic search was performed in the electronic databases PubMed/MEDLINE, Scopus and Scielo, and manually. Studies that evaluated *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* or *in silico* anticancer activity of crude extracts, fractions, subfractions or compounds isolated from *Limonium* species were included. For the phytochemical study of *L. brasiliense* rhizome, different chromatographic and spectroscopy techniques were used, including column chromatography, thin layer chromatography, high-performance liquid chromatography, ultra-performance liquid chromatography, nuclear magnetic resonance spectroscopy, polarimetry, circular dichroism, and mass spectrometry. The anti-proliferative activity of the isolated compounds was evaluated in normal (RWPE-1) and prostate cancer (PC-3 and LNCaP) cell lines, using the MTT method. In the systematic review study, a total of 942 studies were identified, and 33 were included for full reading, with 17 studies considered eligible for qualitative data synthesis. Of these, 14 (82.35%) refer to *in vitro* assays, one (5.88%) to *in vivo* assays, and two (11.76%) were designated as *in vitro* and *in vivo* assays. Different compounds and their impacts on the cell viability of a range of cancer cell lines were evaluated. In chapter 2 was possible to confirm that the results obtained from *L. brasiliense* rhizomes were within the limits defined in previous studies for the species, proving the quality of the plant material. Column chromatography of the ethyl acetate fraction allowed the isolation and identification of the compound epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG) with a satisfactory degree of purity. The results of *in vitro* studies reinforce the potential of *L. brasiliense* as a source of compounds with anti-proliferative activity against prostate cancer cell lines, including samaragenin B and EGCG, in addition to serving as a basis for future studies related to the possible mechanism of action of these compounds.

KEYWORDS: Cytotoxicity, Phytochemistry, Systematic Review, Plumbaginaceae

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Distribuição mundial de espécies de <i>Limonium</i> Mill.	19
2	Aspecto geral do <i>habitat</i> de <i>Limonium vulgare</i> Mill. (A) e <i>Limonium binervosum</i> (G.E.Sm.) C.E.Salmon (B). Detalhe da inflorescência de <i>Limonium sinuatum</i> (L.) Mill. (C) e <i>Limonium bonduellei</i> (T.Lestib.) Kuntze (D).	19
3	Aspecto geral da morfologia de <i>Limonium brasiliense</i> . Rizoma longo e espesso (setas fechadas) (A) com ramos laterais delgados e circundados por bases de pecíolo avermelhadas (setas abertas) (B). Detalhes da periderme (C) e dos tecidos internos (D).	20
4	Potencial biológico de <i>Limonium</i> Mill.	21
5	Estruturas químicas das substâncias isoladas de <i>Limonium</i> Mill. relacionadas com as atividades biológicas descritas na literatura.	24
6	Representação espacial das taxas ajustadas de incidência de neoplasia maligna da próstata por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2020, segundo Unidade da Federação.	27

LISTA DE QUADROS

Quadro		Página
1	Exemplo de pergunta elaborada de acordo com o acrônimo PICOS	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT - Alanina aminotransferase
AST - Aspartato aminotransferase
5-AR - 5 α -redutase
CC - Cromatografia em coluna
CCD - Cromatografia em camada delgada
CCl₄ - Tetracloreto de carbono
CI₅₀ - Concentração inibitória de cinquenta por cento
CIM - Concentração inibitória mínima
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
CLUE - Cromatografia líquida de ultra eficiência
DCF - 2',7'-Diclorofluoresceína
DCFH-DA - 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína
DPPH - 2,2-Difenil-1-picrilidrazila
EB - Extrato bruto
EGCG - Epigallocatequina-3-*O*-galato
EM - Espectrometria de massas
EROs - Espécies reativas de oxigênio
EUA - Estados Unidos da América
FAE - Fração acetato de etila
FAQ - Fração aquosa
FeCl₃ - Cloreto férrico
IES - Ionização por *electrospray*
IS - Índice de seletividade
MMP - Metaloproteinase de matriz
MTT - Brometo de [3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio]
n-BuOH - *n*-Butanol
O₂⁻ - Ânion superóxido
OH - Hidroxila
OH[•] - Radical hidroxila
PBE - Prática baseada em evidência
PDE - Prodelfinidina
RMN - Ressonância magnética nuclear

UV - Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 <i>Limonium</i> Mill.	19
2.2 FITOQUÍMICA E POTENCIAL BIOLÓGICO DE <i>Limonium</i> Mill.	20
2.2.1 Fitoquímica e potencial biológico de <i>Limonium brasiliense</i> (Boiss.) Kuntze.....	25
2.3 CÂNCER.....	26
2.3.1 Câncer de próstata	26
2.3.1.1 Tratamentos disponíveis.....	28
2.4 ESPÉCIES MEDICINAIS E A DESCOBERTA DE NOVAS MOLÉCULAS ANTICÂNCER.....	29
2.5 CULTURA DE CÉLULAS NO DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS CONTRA O CÂNCER.....	29
2.6 PRÁTICA BASEADA EM EVIDÊNCIA	30
2.6.1 Revisão Sistemática.....	31
3 OBJETIVOS.....	34
3.1 OBJETIVO GERAL	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4. CAPÍTULO 1.....	36
5. CAPÍTULO 2.....	74
6. CONCLUSÃO GERAL	115
REFERÊNCIAS	116

1 INTRODUÇÃO

Limonium Mill. possui ampla distribuição mundial e representa um dos dois gêneros da família Plumbaginaceae encontrados no Brasil (FUNEZ, 2023a). Uma representante desse gênero no país é a espécie *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, Plumbaginaceae. *L. brasiliense* é definida como uma erva terrícola, nativa, não endêmica do Brasil, popularmente conhecida por “baycuru, guaycuru ou guaycurá” e que ocorre na vegetação de Mangue e Restinga dos estados da região Sul e no Rio de Janeiro (DIAS DA SILVA, 1920; FUNEZ, 2023b). A composição química dos rizomas dessa espécie inclui a presença de metabólitos secundários da classe dos ácidos fenólicos, taninos hidrolisáveis, proantocianidinas, sitosterol, saponinas triterpênicas, flavonoides (ROSITO, 1975; BLAINSKI, 2016; CALEARE, 2017; ISOLANI, 2019).

O rizoma de *L. brasiliense*, por vezes erroneamente designado como raízes, conforme comprovado por Antonelli-Ushirobira et al. (2015a), são utilizados na medicina popular pelo fato de apresentarem um amplo espectro de atividades, como ação antimicrobiana (ROSITO, 1975), para regularizar os períodos menstruais (LIFCHTZ, 1981), como anti-inflamatório (MOURA et al., 1985), para tratar inflamações do útero e ovário, dismenorreia e corrimentos (MENTZ; SCHENKEL, 1989) e pela capacidade antioxidante (MURRAY et al., 2004). Devido ao potencial biológico desta espécie, Antonelli-Ushirobira et al. (2015b) comprovaram, com a análise de toxicidade aguda e avaliação da segurança a longo prazo, que o extrato bruto dos rizomas de *L. brasiliense* apresentaram baixa ou nenhuma toxicidade em ratos e camundongos, conferindo-lhes um possível potencial de utilização como fitoterápico e fonte de substâncias biologicamente ativas.

Neste contexto, ressalta-se a busca de novas moléculas para o tratamento do câncer, doença caracterizada pelo crescimento descontrolado e pela disseminação de células anormais (ACS, 2022). Apesar do progresso nos tratamentos disponíveis, tanto a quimioterapia e a radioterapia causam efeitos colaterais desagradáveis, prejudicando a qualidade de vida do paciente. Uma fonte extremamente valiosa na busca por substâncias ativas que proporcionem tratamentos mais seletivos e intervenções terapêuticas com menores efeitos colaterais são os produtos naturais. Portanto, este estudo representa uma oportunidade de aprofundar os conhecimentos do potencial biológico de espécies de *Limonium*, incluindo *L. brasiliense*, espécie da biodiversidade brasileira.

Dessa forma, este estudo objetivou sintetizar os aspectos gerais e específicos relacionados ao potencial anticancerígeno de espécies de *Limonium* Mill. por meio de um estudo de revisão sistemática (capítulo 1), além de realizar a análise fitoquímica e do potencial antiproliferativo de substâncias isoladas dos rizomas de *L. brasiliense*, em linhagens celulares de câncer de próstata (capítulo 2).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Limonium* Mill.

Limonium Mill. representa um dos 22 gêneros de Plumbaginaceae Juss. (POWO, 2023a) e inclui 603 espécies aceitas, além de seis sinônimos. É considerado um gênero cosmopolita, especialmente distribuído na região mediterrânea e na Ásia Central, e nativo de regiões de clima temperado e subtropical (Figura 1). O gênero inclui espécies na forma de ervas ou de pequenos arbustos, folhas usualmente dispostas em roseta na região da base e flores organizadas em inflorescência do tipo panícula (Figura 2) (POWO, 2023b). No Brasil, o gênero é representado por duas espécies, *L. brasiliense* e *Limonium sinuatum* (L.) Mill., sendo a primeira nativa (Figura 3) e a segunda cultivada no país (FUNEZ, 2023c).

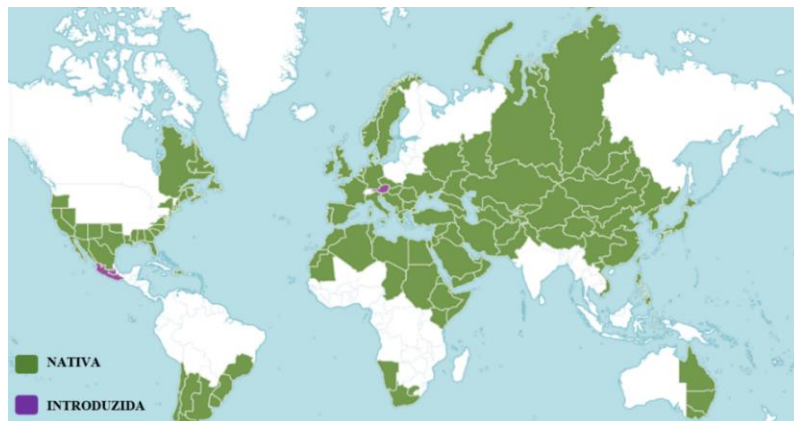


Figura 1. Distribuição mundial de espécie de *Limonium* Mill. **Fonte:** Adaptado de POWO (2023b).



Figura 2. Aspecto geral do habitat de *Limonium vulgare* Mill. (A) e *Limonium binervosum* (G.E.Sm.) C.E.Salmon (B). Detalhe da inflorescência de *Limonium sinuatum* (L.) Mill. (C) e *Limonium bonduellei* (T.Lestib.) Kuntze (D). **Fonte:** Adaptado de POWO (2021b).



Figura 3. Aspecto geral da morfologia de *Limonium brasiliense*. Rizoma longo e espesso (setas fechadas) (A) com ramos laterais delgados e circundados por bases de pecíolo avermelhadas (setas abertas) (B). Detalhes da periderme (C) e dos tecidos internos (D). **Fonte:** Antonelli-Ushirobira et al. (2015a).

As espécies de *Limonium* são consideradas halófitas, ou seja, plantas que sobrevivem em ambientes com a concentração de sal que mataria 99% de outras espécies. Um dos mecanismos relacionados ao controle da concentração de íons nestas espécies é a presença de glândulas de sal, estruturas secretoras, que contribuem para a estabilidade da pressão osmótica e aumento da tolerância à salinidade (FLOWERS; COLMER, 2008). Tais glândulas foram observadas e descritas durante a análise anatômica das folhas de *L. brasiliense* (GANCEDO et al., 2018). Além disso, espécies de plantas halófitas podem se adaptar as condições de salinidade do ambiente pela ativação de processos fisiológicos e bioquímicos, levando ao aumento da atividade enzimática e da produção de metabólitos com ação antioxidante. Isso pode explicar a grande diversidade química e as propriedades biológicas descritas para o gênero *Limonium* (BAKHSHI; ABBASPOUR; SAEIDISAR, 2018; GONZÁLEZ-ORENGA et al., 2021).

2.2 FITOQUÍMICA E POTENCIAL BIOLÓGICO DE *Limonium* Mill.

A fitoquímica de espécies de *Limonium* inclui a presença de diferentes metabólitos primários e secundários, sendo os representantes deste último grupo, principalmente substâncias fenólicas, como ácidos fenólicos, flavonoides, taninos condensados, entre outros.

Apesar de grande parte dos estudos descritos na literatura serem sobre os aspectos botânicos e agrônômicos deste gênero, como verificado durante esta revisão de literatura, muitas espécies de *Limonium* são utilizadas popularmente em diferentes países, devido ao seu amplo potencial biológico (Figura 4).

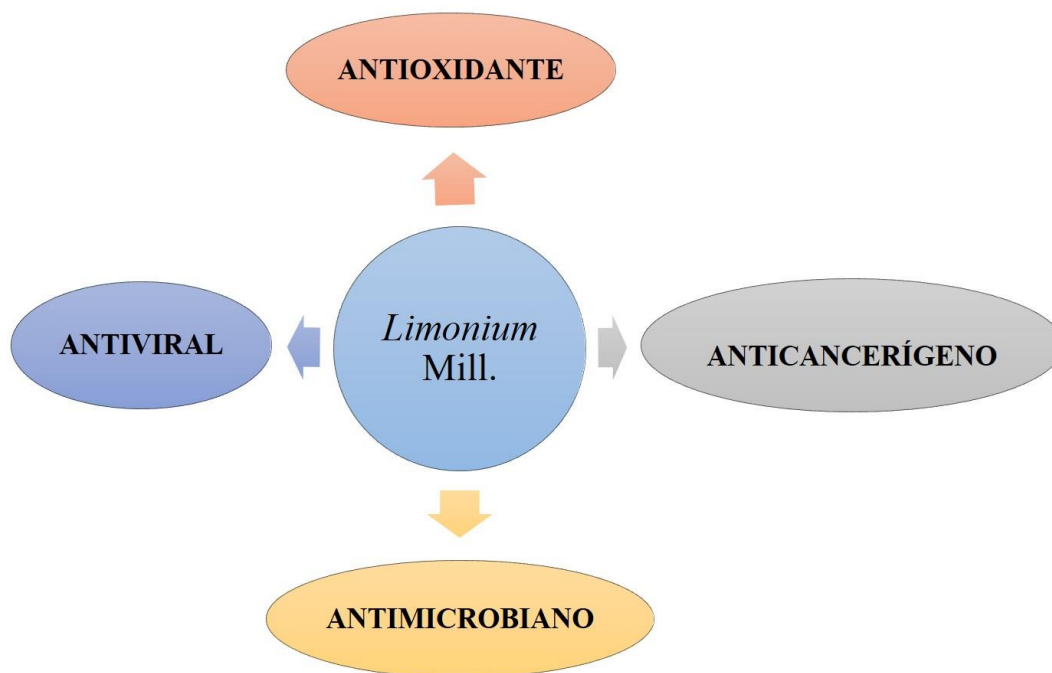


Figura 4. Potencial biológico de *Limonium Mill.*

Para contemplar a diversidade das atividades biológicas deste gênero, alguns estudos foram selecionados e descritos. Todas as estruturas químicas dos compostos isolados relacionados com as atividades mencionadas (números em parêntese e destacados em negrito) podem ser visualizados na Figura 5.

Aniya et al. (2002) avaliaram a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de *Limonium wrightii* Kuntze, espécie utilizada pela população das Ilhas Okinawa (Japão) para o tratamento de febres e artrites. O extrato bruto (EB) aquoso de *L. wrightii* demonstrou forte atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH[•]) e ânion superóxido (O₂⁻), e moderada atividade frente ao radical hidroxila (OH[•]). *L. wrightii* também apresentou ação hepatoprotetora ao reduzir significativamente a atividade enzimática dos marcados séricos de injúria hepática, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), após toxicidade induzida pelo composto químico tetracloreto de carbono (CCl₄). A substância isolada do EB aquoso de *L. wrightii* e considerada responsável pela atividade antioxidante foi o ácido gálico (**1**) (ANIYA et al., 2002).

Devido a capacidade antioxidante promissora desta espécie, Yamashiro et al. (2003) analisaram o potencial cardioprotetor de *L. wrightii* contra lesão de isquemia-reperfusão em corações isolados de ratos, demonstrando o efeito cardioprotetor do EB aquoso desta espécie (YAMASHIRO et al., 2003).

A atividade antioxidante de extratos, frações e substâncias isoladas de *Limonium tetragonum* (Thunb.) Bullock foi investigada utilizando a linhagem celular de fibrosarcoma humano (HT-1080, ATCC® CCL-121™). Primeiramente, foi demonstrado que, tanto os extratos e frações, até a concentração de 50 µg/mL, quanto as substâncias isoladas, até a concentração de 100 µM, não afetaram a viabilidade celular pelo método de brometo de [3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio] (MTT). Pelo ensaio fluorimétrico 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) foi observado que as frações de *L. tetragonum* foram capazes de reduzir significativamente de forma tempo e concentração dependente a fluorescência do produto 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). Devido a polaridade, o DCFH não é permeável à célula, diferente do seu éster diacetato, DCFH-DA, que se difunde pela membrana celular e, então, é clivado por esterases intracelulares ao DCFH. A oxidação de dois elétrons desta molécula não fluorescente por espécies reativas de oxigênio (EROs), resulta na formação do produto DCF, substância altamente fluorescente (LEE et al., 2011).

Os resultados obtidos por Lee et al. (2011) demonstraram uma possível atividade inibitória da formação intracelular de EROs pelas frações de *L. tetragonum* ($p < 0,05$), sendo a fração *n*-butanólica (*n*-BuOH) a mais ativa, com taxa de inibição de 88%. Com o fracionamento da fração *n*-BuOH, foram isolados quatro flavonoides glicosilados: miricetina-3-*O*-β-*D*-galactopiranosídeo (**2**), miricetina-3-*O*-α-*L*-ramnopiranosídeo (**3**), quercetina-3-*O*-β-*D*-glucopiranosídeo (**4**) e quercetina-3-*O*-β-*D*-galactopiranosídeo (**5**). Todas as substâncias isoladas apresentaram atividade antioxidante frente aos radicais DPPH' e OH'. Quando comparadas com o grupo controle, inibiram em mais de 30% a formação intracelular de EROs (concentração de 100 µM) e inibiram a peroxidação lipídica de membrana na seguinte ordem e porcentagem: (**5**) (28%) > (**4**) (27%) > (**3**) = (**2**) (21%) e protegeram, de forma satisfatória, os danos mediados por radicais ao DNA (LEE et al., 2011).

Limonium sokotranum (Vierh.) Radcl.-Sm. é utilizado na medicina popular para o tratamento de infecções, câncer e como anti-inflamatório. Al-Madhagi et al. (2019) investigaram o potencial citotóxico e antimicrobiano, além do perfil químico de *L. sokotranum*. A melhor atividade antifúngica foi observada no EB de éter de petróleo para a espécie *Candida albicans*, apresentando uma concentração inibitória mínima (CIM) de 125 µg/mL. Já o extrato metanólico das folhas de *L. sokotranum* exibiu uma maior atividade antibacteriana frente *Micrococcus luteus* (CIM de 15,6 µg/mL), *Staphylococcus aureus* (CIM de 125 µg/mL) e *Pseudomonas aeruginosa* (CIM de 125 µg/mL), quando comparado com o extrato obtido do caule desta espécie (AL-MADHAGI et al., 2019).

Todos os extratos de *L. sokotranum* foram citotóxicos para a linhagem celular de adenocarcinoma humano (MCF-7, ATCC® HTB-22™), com valores da concentração inibitória de cinquenta por cento (CI₅₀) variando entre 8,70 ±0,08 e 21,80 ±1,30 µg/mL. O EB de éter de petróleo das folhas de *L. sokotranum* exibiu a maior atividade antiproliferativa contra a linhagem celular de carcinoma hepático humano (HepG2, ATCC® HB-8065™), com valor de CI₅₀ de 9,97 ±0,79 µg/mL (AL-MADHAGI et al., 2019).

Estudo realizado por Hsu et al. (2015) demonstrou que o EB aquoso e a substância isolada (**1**) de *Limonium sinense* Kuntze apresentaram atividade antiviral contra o vírus da hepatite C ao inibirem, em concentrações consideradas não citotóxicas, a entrada do vírus nos hepatócitos (HSU et al., 2015). Ensaio *in vitro* confirmaram a capacidade do extrato metanólico de *Limonium morisianum* Arrigoni de inibir a interação entre a proteína viral (VP35) e o RNA viral de fita dupla (dsRNA) do vírus Ebola (*Zaire ebolavirus*), com um valor de CI₅₀ de 19,2 ±6,7 µg/mL. Após o fracionamento bioguiado deste extrato foi identificado a substância ativa miricetina (**6**), responsável por inibir a interação VP35-dsRNA (CI₅₀ de 2,7 ±0,9 µM). Estudos de *docking* molecular demonstraram que esta substância interage com a região altamente conservada do domínio de ligação VP35-dsRNA, servindo de base para a otimização estrutural da miricetina e como estratégia para a descoberta de potenciais inibidores dessa interação (DAINO et al. 2018).

Por fim, Hassan et al. (2021) isolaram oito compostos fenólicos do extrato hidroetanólico 70% (v/v) de *Limonium tubiflorum* Kuntze, incluindo os flavonoides miricetina (**6**), miricetina 3-*O*-(2''-galoil)-β-*D*-galactopiranosídeo (**7**), miricetina 3-*O*-(2''-galoil)-α-*L*-ramnopiranosídeo (**8**), miricetina 3-*O*-(3''-galoil)-α-*L*-ramnopiranosídeo (**9**), miricetina 3-*O*-β-*D*-galactopiranosídeo (**2**), apigenina (**10**), e os ácidos fenólicos ácido gálico (**1**) e galato de etila (**11**). Todos os fitoconstituintes isolados foram analisados *in silico* contra a proteína estrutural S (*spike*) e a proteína não estrutural Mpro (*main protease*) do vírus SARS-CoV-2. A presença do grupo galoil levou ao aumento da atividade contra os alvos selecionados, sendo os derivados de miricetina 3-*O*-glicosídeo (**8**) e (**9**) as substâncias mais ativas.

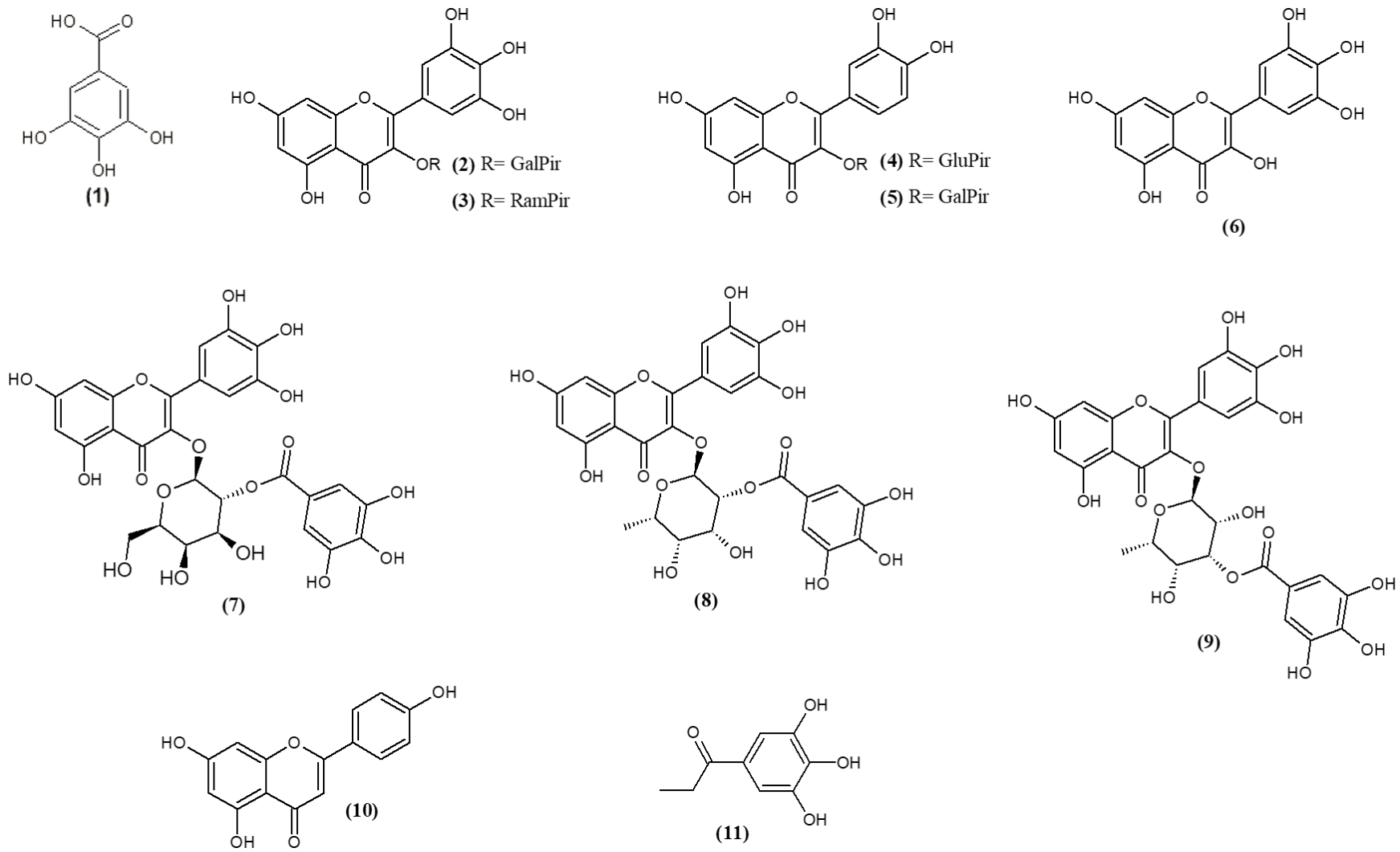


Figura 5. Estruturas químicas das substâncias isoladas de *Limonium* Mill. relacionadas com as atividades biológicas descritas na literatura.

2.2.1 Fitoquímica e potencial biológico de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze

Plumbaginaceae Juss. é uma família com distribuição cosmopolita, composta por 603 espécies e 22 gêneros (POWO, 2023a). Apenas duas espécies da família, *Plumbago scandens* L. e *L. brasiliense*, são encontradas no Brasil (FUNEZ, 2023a).

L. brasiliense é uma erva terrícola, nativa e não endêmica do Brasil, que ocorre na vegetação de Mangue e Restinga dos estados da região Sul do Brasil e no Rio de Janeiro (FUNEZ, 2023b). Popularmente esta espécie é conhecida por “baycuru, guaycuru ou guaycurá” (DIAS DA SILVA, 1920).

Os rizomas de *L. brasiliense*, por vezes erroneamente designado como raízes, conforme comprovado por Antonelli-Ushirobira et al. (2015a) são utilizados na medicina popular por sua ação antimicrobiana (ROSITO, 1975), para regularizar os períodos menstruais (LIFCHTZ, 1981), por ter ação anti-inflamatória (MOURA et al., 1985), para tratar inflamações do útero e ovário, dismenorreia e corrimentos (MENTZ; SCHENKEL, 1989) e por sua atividade antioxidante (MURRAY et al., 2004). Recentemente, Antonelli-Ushirobira et al. (2015b) comprovaram, com a análise de toxicidade aguda e avaliação da segurança a longo prazo, que o extrato bruto dos rizomas de *L. brasiliense* apresentaram baixa ou nenhuma toxicidade para ratos e camundongos, conferindo-lhes um possível potencial de utilização como um novo fitoterápico. Em adição, Caleare et al. (2017), demonstraram que o extrato bruto acetona 70% de *L. brasiliense*, inibiu a adesão de *Porphyromonas gingivalis*, patógeno oportunista relacionado com o desenvolvimento de periodontite. Blainski et al. (2017), avaliaram a atividade antibacteriana *in vitro* de diferentes extratos de *L. brasiliense*, obtendo bons resultados para bactérias Gram-positivas resistentes, tais como *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

A composição química dos rizomas de *L. brasiliense* inclui a presença de taninos hidrolisáveis, ácido 4-*O*-metilgálico, sitosterol, saponinas triterpênicas de estruturas não elucidadas e taninos condensados (ROSITO, 1975). Blainski (2016), confirmou a presença de ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina e prodelfinidinas-galato, na análise por espectrometria de massas e espectroscopia de ressonância magnética nuclear. O estudo fitoquímico dos rizomas de *L. brasiliense*, levou ao 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 (BLAINSKI, 2016).

2.3 CÂNCER

O câncer é caracterizado pelo crescimento descontrolado das células, podendo acometer qualquer parte do corpo, e até mesmo, invadir o tecido circundante, levando a metástases. É considerado um problema mundial de saúde pública, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, além de possuir um impacto econômico elevado. Em 2010, o custo econômico anual total desta doença foi estimado em aproximadamente, US\$ 1,16 trilhão (WHO, 2022).

Uma estimativa mundial realizada em 2012 pelo projeto Globocan/Iarc apontou que, dos 14 milhões de casos novos de câncer, mais de 60% ocorreram em países em desenvolvimento. Para a mortalidade, a situação agrava-se quando se constata que, dos 8 milhões de óbitos previstos, 70% ocorreram nesses mesmos países (INCA, 2015). Dados globais (GLOBOCAN) estimaram que 19,3 milhões de casos novos e 10,0 milhões de mortes por câncer ocorreram em 2020 (SUNG et al., 2021).

A estimativa para o Brasil, no triênio 2023-2025, aponta a ocorrência de 704 mil casos novos de câncer por ano. Sem contar os casos de câncer de pele não melanoma, os tipos mais incidentes em homens brasileiros serão o câncer de próstata (21,0%), cólon e reto (6,4%), pulmão (5,3%), estômago (3,9%) e cavidade oral (3,2%), e nas mulheres, os cânceres de mama (20,3%), cólon e reto (6,5%), colo do útero (4,7%), pulmão (4,0%) e tireoide (3,9%) (INCA, 2023).

2.3.1 Câncer de próstata

O câncer de próstata (CaP) é o segundo mais incidente e a quinta causa de morte entre os homens no mundo, em 2020 (SUNG et al., 2021). Segundo *Prostate Cancer Foundation* (2017), 1 em 8 homens será diagnosticado com CaP em algum momento da sua vida, sendo considerado um câncer da terceira idade, pelo fato de cerca de 75% dos casos ocorrerem a partir dos 75 anos (INCA, 2021) e, menos de 1% ser detectado antes dos 50 anos (INCA, 2015).

No Brasil, o CaP é o segundo mais comum entre os homens (15%), atrás somente do câncer de pele do tipo não melanoma. É o câncer mais incidente entre os homens em todas as regiões do país (INCA, 2017). Para cada ano do triênio 2020-2022, estimaram-se 65.840 casos novos de CaP. Uma representação espacial das taxas ajustadas de incidência de CaP por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2020, segundo Unidade da Federação, pode ser visualizada na Figura 6 (INCA, 2019). Este aumento observado nas taxas de incidência no país, pode ser parcialmente justificada pela evolução dos métodos diagnósticos, pela melhoria na qualidade dos sistemas de informação do país e pelo aumento na expectativa de vida (INCA, 2017).

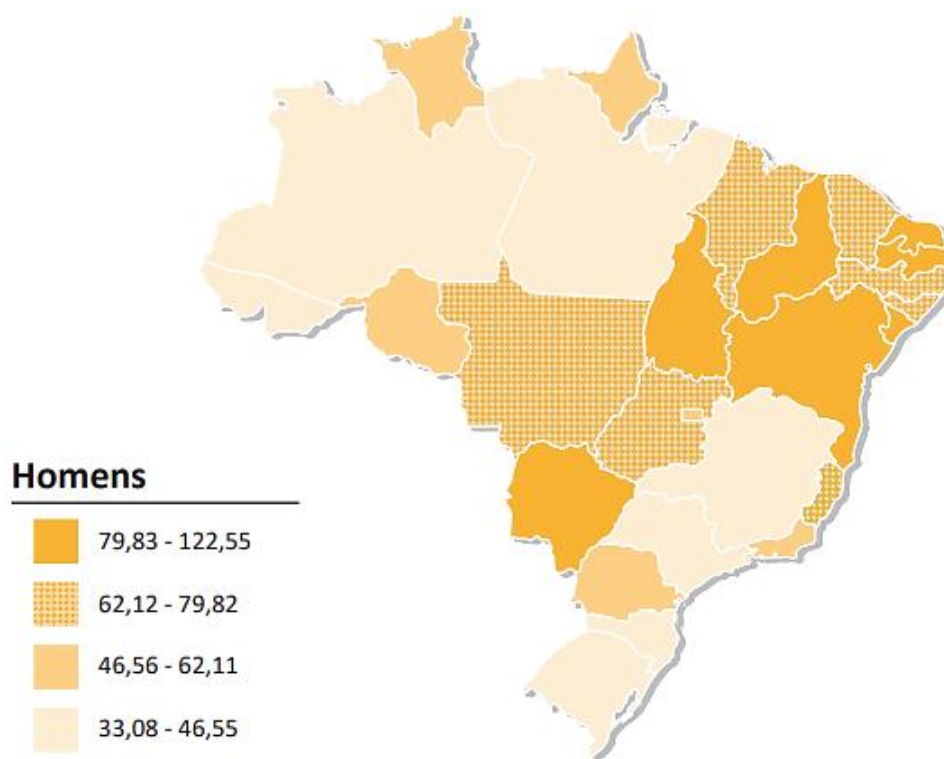


Figura 6. Representação espacial das taxas ajustadas de incidência de neoplasia maligna da próstata por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2020, segundo Unidade da Federação. **Fonte:** INCA (2019).

A etiologia do CaP não está totalmente esclarecida. Suspeita-se que vários fatores como idade, raça, história familiar, níveis hormonais e influências ambientais desempenhem um papel importante no desenvolvimento desta patologia (INCA, 2015). O crescimento e a sobrevivência das células do CaP dependem de andrógenos (incluindo testosterona e di-hidrotestosterona), hormônios produzidos principalmente pelos testículos e uma pequena quantidade na glândula adrenal. Estes se ligam ao receptor de andrógenos (AR) e induzem a expressão de genes pró-crescimento e pró-sobrevivência (EPSTEIN, 2010).

O CaP pode ser assintomático no estágio inicial e muitas vezes tem um curso indolor, e pode exigir pouco ou, até mesmo, nenhum tratamento. No entanto, a queixa mais frequente é a dificuldade em urinar, aumento da frequência e noctúria, sintomas que também podem surgir em casos de hipertrofia prostática. Na fase mais avançada da doença, o paciente pode apresentar retenção urinária e dor nas costas, pois o esqueleto axial é o local mais comum para a metastase óssea. Muitos CaP são detectados com base em níveis plasmáticos elevados de antígeno específico da próstata (PSA >4 ng/mL), uma glicoproteína normalmente expressa pelo tecido da próstata (RAWLA, 2019). No entanto, é possível encontrar homens com PSA elevado e sem o CaP. Nestes casos, pode ser necessário a realização de biópsia de tecido prostático para confirmar a presença do CaP (RAWLA, 2019). Pelo fato de, aproximadamente, 90% de todos os CaP serem detectados nos estágios local e regional da doença, a taxa de cura é considerada alta, quase 100% dos homens diagnosticados neste estágio estarão livres da doença após cinco anos (PCF, 2023).

2.3.1.1 Tratamentos disponíveis

As opções terapêuticas disponíveis para o câncer de próstata localizado, variam conforme a agressividade do tumor e as características do paciente. Incluindo, apenas a observação; vigilância ativa em casos de bom prognóstico ou em pacientes com comorbidades; condutas invasivas, como a prostatectomia radical (ressecção completa da próstata, considerado padrão-ouro) ou radioterapia nos pacientes com tumores de comportamento mais agressivo (CONITEC, 2016).

Quando surgem metástases distantes, a terapia hormonal passa a constituir o principal tratamento, sendo a terapia de privação androgênica o tratamento-padrão de primeira linha, realizado por meio da castração cirúrgica (orquiectomia bilateral) ou castração química (utilizando agonistas ou antagonistas do hormônio liberador de hormônio luteinizante - *Luteinizing Hormone-Releasing Hormone*, LHRH), e como tratamento de segunda linha, tem-se antiandrogênios (ex.: flutamida, nilutamida, bicalutamida, ciproterona), estrógenos e inibidores da esteroidogênese (CONITEC, 2016).

Dentre os agentes quimiopreventivos mais promissores e bem estudados, tem-se a finasterida e a dutasterida, inibidores da 5 α -redutase (5-AR), enzima que converte a testosterona em di-hidrotestosterona, o andrógeno mais prevalente e potente no tecido da próstata, responsável pelo desenvolvimento embriológico e crescimento da próstata, bem como promoção do CaP. Estes medicamentos são utilizados no tratamento da hiperplasia prostática benigna e foram avaliados em ensaios clínicos como potenciais agentes quimiopreventivos do CaP (RAWLA, 2019).

Das opções disponíveis para o tratamento de CaP metastático, refratário à hormônioterapia e sintomático, tem-se a quimioterapia com taxano administrada com prednisona. Os agentes de quimioterapia de taxano aprovados para tratamento de câncer de próstata avançado incluem docetaxel (Taxotere[®]) e cabazitaxel (Jevtana[®]) (BRASIL, 2016; CONITEC, 2016).

2.4 ESPÉCIES MEDICINAIS E A DESCOBERTA DE NOVAS MOLÉCULAS ANTICÂNCER

A Organização Mundial da Saúde reconhece que plantas usadas há séculos são um importante recurso terapêutico, representando uma das fontes mais antigas de medicamentos para o homem, fornecendo substâncias ativas, devido à grande diversidade estrutural de metabólitos produzidos (BRANDÃO, 2017). Segundo Butler (2004), em 2001 e 2002, aproximadamente um quarto das melhores drogas no mundo eram produtos naturais ou derivadas de produtos naturais.

As plantas medicinais apresentam potencial efeito no tratamento de diversas doenças, seja como método alternativo ou complementar, incluindo câncer, síndrome da imunodeficiência adquirida (*Acquired Immunodeficiency Syndrome* - AIDS) e Alzheimer (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Estudo realizado por Vivas et al. (2013) colabora com a hipótese de que, produtos naturais utilizados em combinação com agentes quimioterápicos reduzem a possibilidade de desenvolvimento de resistência pelas células tumorais, minimizando o efeito citotóxico e aumentando a eficácia do tratamento.

De acordo com Kooti et al. (2017) mais de 60% dos compostos anticancerígenos disponíveis são obtidos a partir de fontes vegetais, marinhas e de microrganismos. Alguns exemplos importantes de compostos derivados de plantas com atividade anticâncer, incluem os alcaloides da vinca, vimblastina e vincristina, isolados de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocynaceae), agentes antimetabólicos que impedem a divisão celular durante a metáfase ao se ligar à tubulina, desestabilizando os microtúbulos do fuso mitótico e, causando morte celular por apoptose; o taxano paclitaxel, originalmente isolado de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), agente que promove a agregação dos microtúbulos a partir dos dímeros de tubulina, causando o bloqueio do ciclo celular na fase (G2) e na mitose; o alcaloide camptotecina, isolado das cascas de *Camptotheca acuminata* Decne. (Cornaceae), cujo mecanismo de ação consiste na inibição da enzima altamente expressa em tumores, topoisomerase I, envolvida nos processos de transcrição e replicação do DNA (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

2.5 CULTURA DE CÉLULAS NO DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS CONTRA O CÂNCER

Ensaaios com linhagens celulares são amplamente utilizados para a triagem e descoberta de novas substâncias. Estudos *in vitro*, utilizando modelos tumorais, resultam em testes biologicamente relevantes, além de reduzirem o número de animais necessários em estudos *in vivo* (LOVITT; SHELPER; AVERY, 2014).

As técnicas de cultura celular têm desempenhado um papel fundamental no desenvolvimento de novos fármacos antineoplásicos, permitindo interações das substâncias com os receptores celulares, assim como a absorção e efluxo de drogas, e no metabolismo celular (BAGULEY; HICKS; WILSON, 2002).

A utilização de métodos colorimétricos, entre outros, para quantificar os efeitos antiproliferativos, fornecem a base para o rastreamento em larga escala de drogas citotóxicas e citostáticas. Como exemplo, tem-se o programa do Instituto Nacional do Câncer dos EUA, que já utilizou mais de 60 linhagens para comparar os perfis de inibição de crescimento de novas substâncias, fornecendo informações sobre o mecanismo de ação e atividade antiproliferativa. Em adição, culturas de células podem ser usadas para estudar uma variedade de abordagens na terapia do câncer, incluindo angiogênese tumoral, invasão tumoral e interações de células imunológicas e na ação direta de drogas antitumorais citotóxicas ou citostáticas (BAGULEY; HICKS; WILSON, 2002).

Dessa forma, a avaliação farmacológica primária, utilizando ensaios *in vitro*, fornece dados informativos e úteis na busca de produtos naturais ou sintéticos com atividade anti-inflamatória, imunomoduladora, antineoplásica e antiprotozoária. No caso dos estudos que visam a descoberta de substâncias anticancerígenas, a proliferação de células tumorais pode ser avaliada testando diferentes concentrações da substância teste. Quanto mais eficaz for a substância em matar a célula em cultura ou impedir sua proliferação, maior será seu potencial como fármaco antineoplásico. O uso dessa metodologia, fornece a grande vantagem de diminuir o número de substâncias para testes posteriores em animais, pelo fato destes testes serem agressivos, dependendo da linhagem tumoral inoculada. Assim, os testes em cultura de células auxiliam no direcionamento da substância com atividade biológica mais promissora (HENRIQUES; SAMPAIO, 2002).

2.6 PRÁTICA BASEADA EM EVIDÊNCIA

A Prática Baseada em Evidência (PBE) é a integração entre as melhores evidências científicas com a experiência clínica e a particularidade de cada paciente, a qual surgiu da necessidade clínica diária de informações relevantes e atualizadas, relacionadas ao diagnóstico, prognóstico, terapia e prevenção de doenças (STRAUS et al., 2019). Dessa forma, a PBE busca:

- O desenvolvimento de estratégias eficientes para o rastreo e avaliação de evidências;
- A identificação e aplicação de estratégias eficazes que melhorem o desempenho da prática clínica;
- O envolvimento de outras partes interessadas, incluindo pacientes, a população e gestores de políticas públicas, na busca e aplicação de evidências no cuidado em saúde.

Os recursos utilizados para PBE podem ser classificados como estudos primários e secundários. O primeiro corresponde as investigações originais, incluindo estudos observacionais como relato de caso, série de caso, estudo de coorte e caso-controle, e ensaios clínicos. Já os estudos secundários são estudos que estabelecem conclusões a partir dos estudos primários, incluindo revisão bibliográfica, revisão sistemática com ou sem metanálise, diretrizes, protocolos, entre outros (KLEM; WEISS, 2005; D'SOUZA et al., 2014).

2.6.1 Revisão Sistemática

As revisões sistemáticas são consideradas estudos secundários, cujos dados são fornecidos pelos estudos primários recuperados após uma busca em no mínimo duas bases bibliográficas eletrônicas e por meio de uma busca manual. Dessa forma, esse tipo de estudo pode ser realizado com base em ensaios clínicos randomizados, estudos observacionais, como os de coorte, caso-controle, transversal e estudos experimentais (GALVÃO; PEREIRA, 2014; CHIERRITO et al., 2019).

Os objetivos de um estudo de revisão sistemática incluem a identificação, avaliação e síntese de dados considerados relevantes, presentes nos estudos que atendem aos critérios de inclusão, fornecendo evidências para tomada de uma decisão (análise qualitativa). Ao combinar os resultados de diferentes estudos, pode-se fornecer respostas mais confiáveis e eficazes para uma determinada intervenção, quando comparado com os resultados de um único estudo (CRD, 2008). Quando é possível combinar os dados dos estudos, pode-se utilizar métodos estatísticos e apresentar uma análise quantitativa por meio de metanálise (BRASIL, 2014; GALVÃO; PEREIRA, 2014).

O desenvolvimento de uma revisão sistemática envolve um desenho científico rigoroso, baseado em métodos explícitos, pré-estabelecidos e reprodutíveis. Quando bem executada, este tipo de estudo fornece evidências confiáveis. Além de sintetizar a literatura científica disponível sobre uma determinada intervenção, as revisões sistemáticas também podem demonstrar onde há limitações e lacunas de conhecimento, podendo orientar a necessidade de novas pesquisas ou continuação das já realizadas (CRD, 2008).

A Colaboração Cochrane (HIGGINS et al., 2021) é uma organização internacional que permite o acesso às revisões sistemáticas e que define os critérios sistematizados para a elaboração desse tipo de estudo, os quais podem ser agrupados nas seguintes etapas:

1. Elaboração da pergunta da pesquisa;
2. Busca na literatura e seleção dos estudos;
3. Extração dos dados;
4. Avaliação da qualidade metodológica;
5. Análise e apresentação dos dados;
6. Interpretação dos dados;
7. Aprimoramento e atualização da revisão.

A elaboração da pergunta a ser respondida pela revisão sistemática pode ser baseada no acrônimo PICOS, o qual estabelece a população (P, *population*), intervenção (I, *intervention*), comparador (C, *comparator*), desfecho (O, *outcome*) e desenho de estudo (S, *study design*), que juntos auxiliarão na definição dos critérios de inclusão e exclusão, ou seja, os critérios de elegibilidade da pesquisa (BRASIL, 2014). No Quadro 1, pode-se visualizar um exemplo de pergunta elaborada de acordo com o acrônimo PICOS.

Quadro 1- Exemplo de pergunta elaborada de acordo com o acrônimo PICOS.

Espécies de <i>Limonium</i> possuem atividade anticâncer?
P: animais e cultura de células
I: tratamento com extrato bruto, frações, subfrações ou substâncias isoladas de espécies de <i>Limonium</i>
C: tratamento com extrato bruto, frações, subfrações, substâncias isoladas, placebo ou medicamento
O: desfechos relacionados a atividade antiproliferativa e/ou anticâncer
S: estudos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>

Após estruturação da pergunta, os critérios de elegibilidade (inclusão e exclusão) devem ser definidos (HIGGINS et al., 2021). De acordo com o exemplo do Quadro 1, pode-se definir que serão incluídos estudos experimentais (*in vivo* e *in vitro*) que utilizaram animais e cultura de células para investigação de uma possível atividade anticâncer de espécies de *Limonium*, incluindo o uso de extrato bruto, frações, subfrações ou substâncias isoladas deste gênero. Os estudos que não atenderem a estes critérios serão considerados excluídos.

A busca na literatura deve ser realizada em mais de uma base de dados eletrônica, pelo fato de cada base apresentar abrangência de literatura científica diferente, como por exemplo: PubMed/MEDLINE, é o arquivo digital gratuito do *National Institutes of Health* (NIH) dos EUA e contempla periódicos das áreas de biomedicina e ciências da vida; Lilacs, é uma base cooperativa do Sistema BIREME e reúne dados da Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde, podendo ser acessada via Portal Regional da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS); Web of Science, é uma base de dados do *Institute for Scientific Information* (ISI), que permite a recuperação de trabalhos publicados em importantes periódicos internacionais. Além disso, deve ser realizada busca manual, por meio de referências bibliográficas dos estudos incluídos, revistas não indexadas, bancos de teses, anais e resumos de eventos, bases de registros de protocolo, como o ClinicalTrials.gov (BRASIL, 2014; HIGGINS et al., 2021; NIH, 2022).

O processo de seleção dos estudos engloba a etapa de triagem (*screening*), com a realização da leitura de título e resumo dos estudos recuperados, seguida da leitura na íntegra (elegibilidade) dos estudos selecionados na etapa anterior.

Com os estudos selecionados, tem-se a etapa de extração de dados. Esta etapa é guiada por uma ficha padronizada que pode ser construída pelos pesquisadores em uma planilha eletrônica, a qual permite a coleta dos dados gerais dos estudos de interesse para responder à pergunta de pesquisa. Essas etapas devem ser realizadas de forma independente por dois revisores e em caso de discordâncias resolvidas por um terceiro revisor. A concordância entre os revisores pode ser mensurada pela estatística Kappa de Kohen, sendo que quanto mais próximo de um (1) for o valor encontrado, maior é a concordância entre os revisores (Kappa aceitável $\geq 0,6$) (BRASIL, 2014).

Para avaliar a qualidade metodológica dos estudos incluídos são utilizadas ferramentas específicas de acordo com o desenho de estudo avaliado. No caso de estudos *in vivo* (com animais) tem-se a ferramenta SYRCLE's (*SYstematic Review Centre for Laboratory animal Experimentation*) (HOOIJMANS et al., 2014).

Com o objetivo de registrar todo o processo envolvido na realização de uma revisão sistemática, pode-se elaborar um protocolo descrevendo todas as etapas a serem realizadas, minimizando os riscos de viés. Tais protocolos podem ser registrados em bases de dados públicas, como a base de dados internacionais PROSPERO (*International Prospective Register of Ongoing Systematic Reviews*) (PROSPERO, 2022) ou plataformas de gestão de projetos de pesquisa, como a plataforma OSF (*Open Science Framework*) (OSF, 2022).

Além disso, é disponível na literatura o *checklist* PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses statement*), o qual auxilia no processo de escrita de uma revisão sistemática, uma vez que é composto por itens que podem ser reportados e identificados no desenvolvimento do estudo. Dessa forma, permite que os autores confirmem a realização de todas as etapas recomendadas (PAGE et al., 2021). Nesse sentido, também foi desenvolvido um *checklist* para auxiliar na padronização do reporte de dados metodológicos de pesquisas experimentais com plantas medicinais, ou seja, estudos farmacognósticos, com o objetivo de facilitar a interpretação pelos leitores e favorecer a comparação dos dados de diferentes estudos (Capítulo 1, Tabela S3).

Até o momento, não existe na literatura um estudo que reúna dados sobre o potencial anticâncer de espécies de *Limonium*. Neste contexto, um estudo de revisão sistemática pode ser delineado com o objetivo de responder a seguinte pergunta: “Espécies de *Limonium* possuem atividade antiproliferativa e/ou anticâncer?”.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar aspectos gerais e específicos relacionados ao potencial anticancerígeno de espécies de *Limonium* Mill. e realizar a análise fitoquímica e do potencial antiproliferativo de substâncias isoladas da fração semipurificada obtida do rizoma de *L. brasiliense*, em linhagens celulares de câncer de próstata.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma revisão sistemática de estudos experimentais *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo* e *in silico* e de ensaios clínicos para avaliar o possível uso de espécies de *Limonium* como fontes de substâncias anticancerígenas;
- Definir as principais características dos estudos recuperados, incluindo os aspectos metodológicos e possíveis mecanismos de ação;
- Elaborar um *checklist* com as principais informações que devem ser reportadas nos aspectos metodológicos de estudos de farmacognosia, ou seja, estudos que avaliem o potencial biológico de espécies de plantas medicinais;
- Produzir o extrato bruto (EB) a partir do rizoma de *L. brasiliense*;
- Preparar a fração aquosa (FAQ) e a fração acetato de etila (FAE) a partir do EB de *L. brasiliense*;
- Realizar o controle de qualidade da droga vegetal por meio da análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Realizar a análise fitoquímica por cromatografia em coluna (CC) visando o isolamento dos compostos majoritários presentes na FAE;
- Caracterizar o perfil químico das subfrações provenientes da FAE, por meio de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (EM) e identificar as substâncias isoladas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN);
- Avaliar *in vitro* o efeito antiproliferativo das substâncias isoladas e selecionadas, nas células de câncer de próstata e normais, realizando a técnica de brometo de [3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio] (MTT).

Dessa forma, este trabalho foi dividido em dois capítulos escritos na forma de artigos:

Capítulo 1: Chemical Constituents, Anticancer and Anti-Proliferative Potential of *Limonium* Species: A Systematic Review.

Capítulo 2: Análise fitoquímica e avaliação da atividade antiproliferativa de substâncias isoladas da fração semipurificada obtidas do rizoma de *L. brasiliense*.



4. CAPÍTULO 1

Systematic Review

Chemical Constituents, Anticancer and Anti-Proliferative Potential of *Limonium* Species: A Systematic Review

Naiara Cássia Gancedo ¹, Raquel Isolani ¹, Natalia Castelhana de Oliveira ¹, Celso Vataru Nakamura ², Daniela Cristina de Medeiros Araújo ³, Andreia Cristina Conegero Sanches ⁴, Fernanda Stumpf Tonin ^{5,6}, Fernando Fernandez-Llimos ⁷, Danielly Chierrito ³ and João Carlos Palazzo de Mello ^{1,*}

- ¹ Laboratory of Pharmaceutical Biology, Department of Pharmacy, Universidade Estadual de Maringá, Palafito, Maringá 87020-900, Brazil
- ² Laboratory of Technological Innovation in the Development of Drugs and Cosmetics, Department of Basic Health Sciences, Universidade Estadual de Maringá, Maringá 87020-900, Brazil
- ³ Department of Pharmacy, Centro Universitário Ingá, Maringá 87035-510, Brazil
- ⁴ Department of Medical and Pharmaceutical Sciences, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel 85818-760, Brazil
- ⁵ Pharmaceutical Sciences Post-Graduate Research Program, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 80210-170, Brazil
- ⁶ H&TRC—Health & Technology Research Center, ESTeSL—Escola Superior de Tecnologia da Saúde, Instituto Politécnico de Lisboa, Lisboa 1990-096, Portugal
- ⁷ Laboratory of Pharmacology, Department of Drug Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Porto 4050-313, Portugal
- * Correspondence: mello@uem.br

Citation: Gancedo, N.C.; Isolani, R.; de Oliveira, N.C.; Nakamura, C.V.; de Medeiros Araújo, D.C.; Sanches, A.C.C.; Tonin, F.S.; Fernandez-Llimos, F.; Chierrito, D.; de Mello, J.C.P. Chemical Constituents, Anticancer and Anti-Proliferative Potential of *Limonium* Species: A Systematic Review.

Pharmaceuticals **2023**, *16*, 293.
<https://doi.org/10.3390/ph16020293>

Academic Editor(s): Paulo Santos

Received: 23 December 2022

Revised: 23 January 2023

Accepted: 24 January 2023

Published: 14 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Limonium* species represent a source of bioactive compounds that have been widely used in folk medicine. This study aimed to synthesize the anticancer and anti-proliferative potential of *Limonium* species through a systematic review. Searches were performed in the electronic databases PubMed/MEDLINE, Scopus, and Scielo and via a manual search. *In vivo* or *in vitro* studies that evaluated the anticancer or anti-proliferative effect of at least one *Limonium* species were included. In total, 942 studies were identified, with 33 articles read in full and 17 studies included for qualitative synthesis. Of these, 14 (82.35%) refer to *in vitro* assays, one (5.88%) was *in vivo*, and two (11.76%) were designed as *in vitro* and *in vivo* assays. Different extracts and isolated compounds from *Limonium* species were evaluated through cytotoxic analysis against various cancer cells lines (especially hepatocellular carcinoma-HepG2; n = 7, 41.18%). *Limonium tetragonum* was the most evaluated species. The possible cellular mechanism involved in the anticancer activity of some *Limonium* species included the inhibition of enzymatic activities and expression of matrix metalloproteinases (MMPs), which suggested anti-metastatic effects, anti-melanogenic activity, cell proliferation inhibition pathways, and antioxidant and immunomodulatory effects. The results reinforce the potential of *Limonium* species as a source for the discovery and development of new potential cytotoxic and anticancer agents. However, further studies and improvements in experimental designs are needed to better demonstrate the mechanism of action of all of these compounds.

Keywords: antitumor activity; cytotoxicity; metastasis; phytochemicals; Plumbaginaceae; qualitative synthesis

1. Introduction

In the past years, several reviewed articles have summarized the anti-proliferative activity of different phytochemicals, actively contributing to evidence synthesis and knowledge dissemination and of which findings may guide further *in vitro* and *in vivo* studies [1–7].

According to the literature, nearly 80% of the world's population depends on traditional medicines to manage a range of diseases, including cancer. Among the clinically approved anticancer drugs, over 50% are derivatives of medicinal plants, as these have been recognized as a source of biologically active compounds with therapeutic potential, being historically used to treat, among others, different types of tumors [8–10]. In the United States of America, around 50–60% of oncology patients use agents derived from parts of plants or their nutrients (i.e., complementary and alternative medicines), exclusively or concomitantly with usual therapeutic regimens, such as chemotherapy or radiotherapy. These include curcumin from turmeric, genistein from soybean, polyphenols from green tea, resveratrol from grapes, lycopene from tomato, and gingerol from gingers [1,3].

In this setting, Plumbaginaceae is a family that has 22 accepted genera including *Limonium* Mill., which has 607 accepted species, six of which have been recorded as synonyms [11,12]. Previous phytochemical studies on the *Limonium* species demonstrated the presence of different classes of metabolites, such as anthocyanins, flavonoids, proanthocyanidins, hydrolysable tannins, phytosterol, saponins, phenolic acids, and essential oils [13–15]. Additionally, *Limonium* includes species used in folk medicine that have been associated with a range of biological activities, such as antioxidant activities and free radical-scavenging abilities, antibacterial, antifungal, antimalarial, antileishmanial and neuroprotective effects, and promising cytotoxic activity against cancer cells [16–23].

Although some primary studies evaluated the anticancer activity of *Limonium* species, articles that have systematically synthesized all available evidence on the potential roles of this genus in the oncology field are scarce [24]. Thus, this study aimed to assess the anticancer and anti-proliferative potential of *Limonium* species by means of a broad systematic review of the literature.

2. Results

2.1. Literature Search Results and Main Characteristics of Included Studies

Overall, 942 records were identified in the database after duplicate removal, of which 909 were excluded during screening (based on reading the title and abstract). Of the 33 articles read in full, 16 were eligible for inclusion. One additional record was found during manual searches, resulting in 17 studies for synthesis as shown in Figure 1 [18,22,25–39]. See the list of the studies excluded after full-text reading in the Supplementary Materials (Board S3).

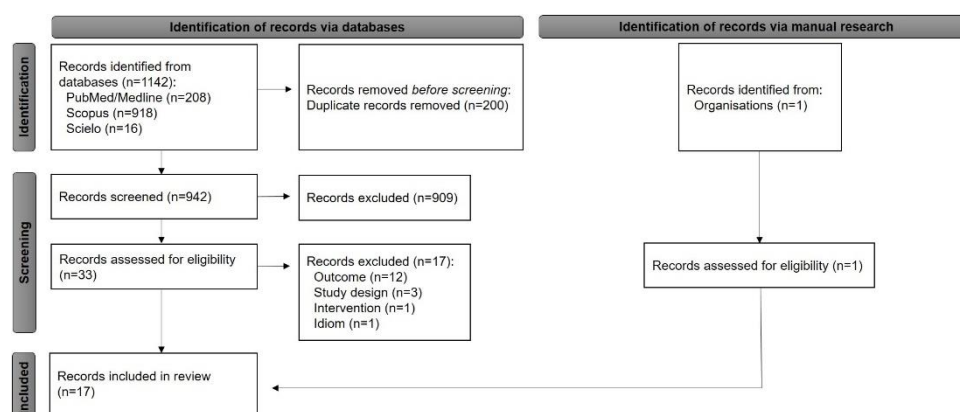


Figure 1. Flow diagram of the systematic review. Fonte: Adapted from Page et al. [40].

The main baseline characteristics of the included studies are depicted in Table 1. Overall, 14 studies (82.35%) were designed as *in vitro* assessments, one study (5.88%) was *in vivo*, and two (11.76%) evaluated both *in vivo* and *in vitro* parameters. No *ex vivo* and *in silico* studies were found. Studies were mostly performed in China (n = 5, 29.41%) and published between 2003 and 2021.

The main reported human cancer cell lines were acute lymphoblastic leukemia (MOLT-4), acute promyelocytic leukemia (HL-60), breast adenocarcinoma (MCF-7), breast carcinoma (T-47D), cervix adenocarcinoma (HeLa), colorectal adenocarcinoma (DLD-1, HT-29, LoVo), colorectal carcinoma (HCT116), chronic myeloid leukemia (K562), diffuse large cell lymphoma or non-Hodgkin's B cell (Toledo), fibrosarcoma (HT-1080), gastric adenocarcinoma (BGC-823), hepatocellular carcinoma (HepG2), lung carcinoma (A549), malignant melanoma (SK-MEL-28), osteosarcoma (U2-OS), and pancreas epithelioid carcinoma (PANC-1); meanwhile, non-human cancer cell lines included Abelson murine leukemia virus-induced tumor (RAW-264.7), mouse melanoma (B16-F10), mouse sarcoma (J774), and rat glioma (C6). For human normal cell lines, studies used embryonic kidney (HEK-293), lung fibroblast (WI-38), primary peripheral blood mononuclear cells (PBMC), and skin fibroblast (WS1); for non-human normal cell lines, mouse bone marrow (S17), mouse microglia (N9), and monkey kidney (Vero) were reported.

The most evaluated *in vitro* cell line was HepG2 for human hepatocellular carcinoma (n = 7, 43.75%). Thirteen studies (76.47%) also evaluated other biological activity of *Limonium* species, such as immunologic effects; antioxidant, anti-diabetic, anti-inflammatory, antimicrobial, and antiviral activities; and anti-migration and anti-clonogenic effects in cells.

Table 1. Main characteristics of all eligible *in vivo* and *in vitro* studies included in the systematic review.

Reference Number	Country	Plant Species	Part of Plant Used	Cell Line	Bioassay/ Model Used	Compound Tested	Positive Control	Time of Treatment (h)	Other Biological Activities
<i>In vivo</i>									
[25]	Germany	<i>L. vulgare</i>	NR	NR	<i>Artemia salina</i> <i>Daphnia magna</i>	EtOH extract	HgCl ₂ solution (1%)	6 24 48	NR
[26]	China	<i>L. sinense</i>	Roots	HepG2	Mice	Crude LSP	Cyclophosphamide Lentinan with 5-fluoracil 5-Fluoracil	312	Immunomodulatory effects
[30]	Portugal	<i>L. algarvense</i>	Flowers	NR	<i>Artemia salina</i>	Aq extract	NR	48	Antioxidant and anti-inflammatory activities
<i>In vitro</i>									
[26]	China	<i>L. sinense</i>	Roots	HeLa HepG2 K562	MTT	Crude LSP	NR	24	Immunomodulatory effects
[28]	China	<i>L. sinense</i>	Roots	HepG2	MTT	LSP11 LSP21 LSP31	5-Fluorouracil	24	NR
[27]	China	<i>L. franchetii</i>	Whole	BGC-823 C6 HepG2	MTT Sulforhodamine B	12 isolated compounds	NR	NR	NR
[18]	Tunisia	<i>L. densiflorum</i>	Leaves	A549 DLD-1 WS1	Resazurin reduction test	DCM extract EtOH extract MeOH extract Hex extract	Etoposide	48	Antioxidant and anti-inflammatory activities
[29]	Korea	<i>L. tetragonum</i>	NR	HT-1080	MTT	DCM fraction	NR	48	Determination of enzymatic activities of MMPs, mRNA expression of MMPs and TIMPs via

									RT-PCR, and detection of immunoreactive proteins via Western blotting
[31]	Korea	<i>L. tetragonum</i>	NR	HT-1080	MTT	DCM extract (Hex fraction and 85% MeOH fraction) Aq extract (BuOH fraction and Aq fraction)	NR	48	Determination of enzymatic activities of MMPs, mRNA expression of MMPs and TIMPs via RT-PCR, and detection of immunoreactive proteins via Western blotting
[34]	Korea	<i>L. tetragonum</i>	NR	B16-F10	Spectrophotometric method	Hex fraction 85% MeOH fraction BuOH fraction Aq fraction	Kojic acid	0,5	DOPA oxidase activity, cellular tyrosinase activity, melanin content, melanogenesis-related mRNA expression via RT-PCR, and detection of TRP via Western blotting
[30]	Portugal	<i>L. algarvense</i>	Flowers	HepG2 N9 S17 RAW-264.7	MTT	Aq extract	NR	72	Antioxidant and anti-inflammatory activities
[38]	Portugal	<i>L. algarvense</i>	Flowers Leaves Peduncles	HEK-293 HepG2 RAW-264.7	MTT	EtOH extract	NR	72	Antioxidant activity
[32]	China	<i>L. bicolor</i>	Flowers	LoVo MCF-7 U-2OS	MTT	15 isolated compounds	5-Fluorouracil	48	NR
[33]	Brazil	<i>L. brasiliense</i>	Rhizome	HepG2 HL-60 K562	MTT	CE Aq fraction	Amsacrine	72	Selectivity index, anti-migration and anti-clonogenic potential, and

				MOLT-4 PANC-1 PBMC SK-MEL-28 T-47D Toledo Vero		EAF Subfractions (A-K) Isolated compounds (SA, SB, EGCG)			immunomodulatory activity
[35]	France	<i>L. virgatum</i>	Leaves Stems	J774 WI-38	MTT	MeOH extract	Camptothecin	72	Antiradical, antimicrobial, and antiviral activity
[22]	Yemen	<i>L. sokotranum</i>	Flowers Leaves Stem	HepG2 MCF-7	Sulforhodamine B	PE extract DCM extract MeOH extract	Doxorubicin	48	Antibacterial and antifungal activity
[36]	Algeria	<i>L. bonduellei</i>	Flowers Leaves	HeLa HT-29	xCELLigence RTCA	BuOH extract	NR	48 72	DNA damage inhibition efficiency
[37]	Algeria	<i>L. duriusculum</i>	Flowers Leaves	HCT116	Calcein-AM Hoechst 33342	BuOH extract Apigenin	NR	48	Measures of relative levels of p53, MDM2, p21, total and p-ERK proteins, and PARP cleavage via western blotting
[39]	China	<i>L. gmelinii</i>	Roots	A549 HeLa MCF-7	MTT	EtOAc extract 19 isolated compounds	Doxorubicin	48	Anti-diabetic and anti- inflammatory activities

Abbreviations: A549: human lung carcinoma; Aq: aqueous; B16-F10: melanoma (mouse); BGC-823: human gastric adenocarcinoma; BuOH: *n*-butanol; C6: brain glioma (rat); Calcein-AM: calcein-acetomethoxy; CE: crude extract; DCM: dichloromethane; DLD-1: human colorectal adenocarcinoma; EAF: ethyl-acetate fraction; EGCG: epigallocatechin-3-*O*-gallate; EtOAc: ethyl-acetate; EtOH: ethanol; HCT116: human colorectal carcinoma; HeLa: human cervix adenocarcinoma; HepG2: human hepatocellular carcinoma; Hex: *n*-hexane; HL-60: human acute promyelocytic leukemia; HT-29: human colorectal adenocarcinoma; HT-1080: human fibrosarcoma; HEK-293: human embryonic kidney (normal cell); J774: sarcoma (mice); K562: human chronic myelogenous leukemia; LoVo: human colorectal adenocarcinoma; LSP: *Limonium sinense* polysaccharide; MMPs: matrix metalloproteinases; MCF-7: human breast adenocarcinoma; MeOH: methanol; MOLT-4: human acute lymphoblastic leukemia; N9: microglia (mice normal cell); NR: not related; PANC-1: human pancreas epithelioid carcinoma; PBMCs: human primary peripheral blood mononuclear cells (normal cells); PE: petroleum ether; p-ERK: phosphorylated ERK; RAW-264.7: Abelson murine leukemia virus-induced tumor (mouse); S17: bone marrow (mouse normal cell); SA: samarangenin A; SB: samarangenin B; SK-MEL-28: human malignant melanoma; T-47D: human breast carcinoma; TIMPs: tissue inhibitor of metalloproteinases; Toledo: human diffuse large cell lymphoma (non-Hodgkin's B cell); TRP: tyrosinase-related proteins; U-2OS: human osteosarcoma; Vero: kidney (monkey normal cell); xCELLigence RTCA: xCELLigence real-time cell analyzes; WI-38: human lung fibroblast (normal cell); WS1: human skin fibroblast (normal cell). Note: The studies were described in chronological order. The same species were described together.

The aerial parts were the most used, followed by the underground plant organs. Only one study (5.88%) used the whole plant, and other four (23.53%) were unclear about the part of the plant used. Most studies (n = 7; 41.18%) analyzed the *in vivo* or *in vitro* activities using only crude extracts, while the other four (23.53%) evaluated just isolated compounds of *Limonium* species. Both crude extracts and fractions of the plant were analyzed in one study (5.88%), while two others (11.76%) assessed only the fractions. The remaining three articles (17.64%) analyzed crude extracts, fractions, and isolated compounds of the plant. The phytochemistry of *Limonium* species included in the systematic review is summarized in Table 2.

Around one-third of studies (n = 5; 29.41%) assessed the potential mechanism of action of the tested compounds. Bae et al. [29] evaluated the matrix metalloproteinase (MMP) enzymatic activities and expression inhibition with *Limonium tetragonum* (Thunb.) Bullock, and Bae et al. [31] further elaborated on this activity, while Lee et al. [34] tested the anti-melanogenic effects of *L. tetragonum* via tyrosinase and tyrosinase-related proteins. Hamadou et al. [37] assessed the pro-apoptotic property of *Limonium duriusculum* (Girard) Kuntze, and Cordeiro et al. [33] used flow cytometry to evaluate the cell death pathway caused by *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze compounds.

Table 2. Phytochemistry of *Limonium* species included in the systematic review.

Reference Number	Plant Species	Class of Metabolite	Compounds	Number of Isolated Compounds Tested <i>In Vitro</i> *
Primary metabolites				
[28]	<i>L. sinense</i>	Polysaccharide	LSP21 (glucose, galactose and mannose)	
		Amino acid	<i>N</i> -acetyl-tryptophan	
			Oxo-tridecanoic acid sulphate	
[38]	<i>L. algarvense</i>	Fatty acids	Trihydroxy-10-octadecenoic acid Trihydroxy-10,15-octadecadienoic acid	
		Polysaccharide	Hex-3-en-olxylopyranosyl-(1-6)- glicopyranoside Sucrose or isomeric structures	
Secondary metabolites				
			Apigenin	(1)
			Dihydrokaempferol	(2)
			Kaempferol-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranoside	(3)
			Luteolin	(4)
			Myricetin	(5)
			Myricetin-3- <i>O</i> -(2''- <i>O</i> -galloyl)- α -L-rhamnopyranoside	(6)
[27]	<i>L. franchetii</i>	Flavonoids	Myricetin-3- <i>O</i> -(3''- <i>O</i> -galloyl)- α -L-rhamnopyranoside	(7)
			Myricetin-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranoside	(8)
			Quercetin	(9)
			Quercetin-3- <i>O</i> -(2''- <i>O</i> -tigloyl)- α -L-rhamnopyranoside	(10)
			Quercetin-3- <i>O</i> -(3''- <i>O</i> -tigloyl)- α -L-rhamnopyranoside	(11)
			Quercetin-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranoside	(12)
[18]	<i>L. densiflorum</i>	Flavonoids	Catechin hydrate Isorhamnetin Myricetin	
		Phenolic acids	Ellagic acid	

		Gallic acid Sinapic acid <i>trans</i> 3-hydroxycinnamic acid
	Flavonoid	Apigenin
		Caffeic acid Coumaric acid Ferulic acid
[30]	Phenolic acids	Gallic acid <i>p</i> -Hydroxybenzoic acid Salicylic acid Syringic acid
	Lignin	Pinoresinol sulphate
		2'-C-methyl myricetin-3-O-rhamnoside-galloyl 4'-methyl eriodictyol-galloyl-rhamnose Apigenin Apigenin derivative Apigenin-O-glucoside Apigenin-O-glucuronide Dihydrokaempferol Epigallocatechin gallate Eriodictyol Eriodyctiol-O-glucoside Isorhamnetin-3-O-rutinoside Licoagroside B Luteolin <i>L. algarvense</i> Luteolin-7-O-glucoside Luteolin-7-O-rhamnoside Methyl licoagroside B Myricetin
[38]	Flavonoids	Myricetin-3-O-(2''-O-galloyl)-glucoside Myricetin-3-O-acetyl-deoxyhexose Myricetin-3-O-acetyl-hexoside Myricetin-3-O-pentoside Myricetin-ethyl acetoacetate-galloyl Myricetin-galloyl-acetyl deoxyhexose Myricetin-O-(galloyl)-deoxyhexose Myricetin-3-O-glucoside Myricetin-3-O-rhamnose Myricetin-3-O-rutinoside Naringenin Naringenin derivative Quercetin Quercetin derivative Quercetin-3-O-rhamnoside Quercetin-hexoside derivative Quercetin-O-galloyl-glucoside Quercetin-O-hexoside Quercetin-tetramethyl ether- - dihydroxyethylfructopyranose

			Rutin	
			Feruloyltyramine	
		Phenolic acids	Glucosyringic acid	
			Syringic acid	
			Digalloyl-hexoside	
		Tannins	Galloylglucoside derivative	
			Galloyl-hexoside	
			Galloylhexoside derivative	
		Phenylpropanoi d	Sinapyl alcohol sulphate	
[31]			Myricetin 3-galactoside	(13)
[34]	<i>L. tetragonum</i>	Flavonoids	Quercetin 3-O-β-galactopyranoside	(14)
			Acacetin	(15)
			Eriodictyol	(16)
			Hesperidin	(17)
			Isorhamnetin	(18)
			Kaempferol	(19)
			Kaempferol-3-O-(6''-O-galloyl)-β-D-glucoside	(20)
			Kaempferol-3-O-α-L-rhamnoside	(21)
[32]	<i>L. bicolor</i>	Flavonoids	Kaempferol-3-O-β-D-glucoside	(4)
			Luteolin	(23)
			Myricetin-3-O-α-L-rhamnoside	(9)
			Quercetin	(24)
			Quercetin-3-O-α-L-rhamnoside	(25)
			Quercetin-3-O-β-D-galactoside	(26)
			Quercetin-3-O-β-D-glucoside	(27)
			Rutin	
			Epigallocatequin-3-O-gallate	(28)
[33]	<i>L. brasiliense</i>	Tannins	Samarangenin A	(29)
			Samarangenin B	(30)
[35]	<i>L. virgatum</i>	Phenolic amide	<i>N-trans</i> -feruloyl tyramine	
[37]	<i>L. duriusculum</i>	Flavonoids	Apigenin	(31)
			Apigenin 7-O-β-D-(6''-methylglucuronide)	(32)
			(2,3- <i>trans</i>)-3-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl)- <i>N</i> -(4-hydroxyphenethyl)-7-[(<i>E</i>)-3-[(4-hydroxyphenethyl)amino]-3-oxoprop-1-en-1-yl]-2,3-dihydrobenzo[<i>b</i>][1,4]dioxine-2-carboxamide	(33)
			Limoniumin F	(34)
			3,3'-demethyl-heliotropamide	(35)
[39]	<i>L. gmelinii</i>	Lignanamides	Limoniumin A	(36)
			Limoniumin B	(37)
			Limoniumin C	(38)
			Limoniumin D	(39)
			6-hydroxy-4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(4-hydroxyphenethyl)-7-methoxy-1 <i>H</i> -benzo(<i>f</i>)isoindole-1,3(2 <i>H</i>)-dione	(40)
			Cannabisin I	(41)
			Limoniumin E	(42)

	Limoniumin G	(43)
	Limoniumin H	(44)
	Limoniumin I	(45)
	Cannabisin D	(46)
	Cannabisin B	(47)
	Cannabisin C	(48)
	Cannabisin A	(49)
	Cannabisin F	(50)
	Thoreliamide B	(51)
Phenolic amide	<i>N-cis-feruloyl tyramine</i>	
	<i>N-trans-feruloyl tyramine</i>	

* Chemical structures of the isolated compounds investigated for their cytotoxicities, numbered in bold, were drawn in the Supplementary Materials (Figure S1).

Other anti-neoplastic drugs were also used as positive controls (*e.g.*, amsacrine, etoposide, camptothecin, cyclophosphamide, doxorubicin, 5-fluorouracil, kojic acid, lentinan). Three of the sixteen *in vitro* studies (18.75%) did not present data on the cell culture conditions; only one *in vitro* study (6.25%) calculated the selectivity index (SI). The SI can be defined as the ratio of the toxic concentration of a sample against its effective bioactive concentration. For evaluating any anti-proliferative activity of a sample, its cytotoxicity against normal and cancer cell lines must be determined in order to calculate the SI value [40].

The treatment time ranged from 24 to 72 h for *in vitro* assays and from 6 to 312 h for *in vivo* assays. The results based on the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of cell proliferation (Table 3) and the main results of *in vivo* and *in vitro* assays of all eligible studies included in this systematic review are summarized in Figure 2.

Table 3. Results of inhibitory concentration of 50% (IC₅₀) of cell proliferation based on eligible studies included in the systematic review.

Reference Number	Cell Line	IC ₅₀ (µg/mL)/Compound Tested	Selectivity Index (SI)/Compound Tested
[18]	A549	29 (DCM extract), >200 (EtOH extract), 110 (MeOH extract), >200 (Hex extract), 10 (Etoposide PC)	
	DLD-1	85 (DCM extract), >200 (EtOH extract), >200 (MeOH extract), >200 (Hex extract), 80 (Etoposide PC)	NR
	WS1	>200 (DCM extract), >200 (EtOH extract), 140 (MeOH extract), >200 (Hex extract), 26 (Etoposide PC)	
[33]	HepG2	>200 (CE), 67.97 (Aq fraction), 59.47 (EAF)	0.48 (CE) 2.94 (AF) 1.27 (EAF)
	HL-60	61.69 (CE), 49.68 (Aq fraction), 17.26 (EAF)	1.56 (CE) 4.02 (AF) 4.39 (EAF)
	PBMC	96.78 (CE), >200 (Aq fraction), 75.82 (EAF)	NR
	T-47D	90.68 (CE), >200 (Aq fraction), 77.70 (EAF)	1.08 (CE) 1.00 (AF) 0.48 (EAF)
	HL-60	53.27 (SFa), 35.48 (SFb), 44.28 (SFc), 41.63 (SFd), 43.62 (SFe), 8.21 (SFf), 7.35 (SFg), 45.58 (SFh), 55.60 (SFi), 54.06 (SFj), 53.32 (SFk), 1.0 (Amsacrine PC)	NR

	K562	43.72 (SFa), 52.21 (SFb), 52.75 (SFc), 43.95 (SFd), 47.79 (SFe), 36.13 (SFf), 40.88 (SFg), 49.91 (SFh), 51.85 (SFi), 50.16 (SFj), 37.77 (SFk), 0.9 (Amsacrine PC)	
	MOLT-4	37.43 (SFa), 34.34 (SFb), 35.99 (SFc), 46.47 (SFd), 45.25 (SFe), 40.42 (SFf), 7.92 (SFg), 20.36 (SFh), 54.92 (SFi), 52.76 (SFj), 9.62 (SFk), NR (Amsacrine PC)	
	PANC-1	>100 (SFa), >100 (SFb), 76.81 (SFc), 45.54 (SFd), >100 (SFe), 58.65 (SFf), >100 (SFg), >100 (SFh), >100 (SFi), >100 (SFj), >100 (SFk), >100(Amsacrine PC)	
	SK-MEL-28	NA	
	Toledo	57.46 (SFa), 57.02 (SFb), 61.29 (SFc), 54.09 (SFd), 55.29 (SFe), 55.29 (SFf), 54.32 (SFg), 57.36(SFh), 60.65 (SFi), 58.68 (SFj), 59.38 (SFk), 0.5 (amsacrine PC)	
	K562	37.04 (28), 29.24 (29), 51.17 (30)	2.69 (28) 3.41 (29) 1.95 (30)
	Vero	>100 (28), >100 (29), >100 (30)	NR
[37]	HCT116	7.60 (BuOH extract), 25.74 * (31), NA (32)	NR
[22]	MCF-7	19.65 and 14.57 (PE extracts), 17.60 and 21.8 (DCM extracts), 8.70 and 17.18 (MeOH extracts), 3.39 (Doxorubicin PC)	NR
	HepG2	9.97 and 16.97 (PE extracts), 20.62 and 11.15 (DCM extracts), 13.90 and 24.86 (MeOH extracts), 7.38 (Doxorubicin PC)	NR
[39]	HeLa	25.25 (EtOAc extract), NA ((2), (7) and (13)), 19.24 * (17), 12.85 * (18), 31.57 * (19), 0.23 * (Doxorubicin PC)	NR
	MCF-7	NA (EtOAc extract), 20.08 (2), 21.58 (7), 43.28 (13), 28.85 (17), 14.14 (18), NA (19)	

Abbreviations: A549: human lung carcinoma; Aq: aqueous; BuOH: *n*-butanol; CE: crude extract; DCM: dichloromethane; DLD-1: human colorectal adenocarcinoma; EAF: ethyl-acetate fraction; HCT116: human colorectal carcinoma; HepG2: human hepatocellular carcinoma; EtOAc: ethyl-acetate; EtOH: ethanol; Hex: *n*-hexane; HL-60: human acute promyelocytic leukemia; MCF-7: human breast carcinoma; MeOH: methanol; MOLT-4: human acute lymphoblastic leukemia; NA: not affected; NR: not related; PANC-1: human pancreas epithelioid carcinoma; PBMCs: human primary peripheral blood mononuclear cells (normal cells); positive control (PC); PE: petroleum ether; RAW-264.7: Abelson murine leukemia virus-induced tumor (mouse); SFs: subfractions; SK-MEL-28: human malignant melanoma; T-47D: human ductal carcinoma; Toledo: human diffuse large cell lymphoma (non-Hodgkin's B cell); Vero: kidney (monkey normal cell); WS1: human skin fibroblast (normal cell). * IC₅₀ in μM. Note: Tested compounds were described in the order of crude extracts, fractions, subfractions, isolated compounds, and positive controls.

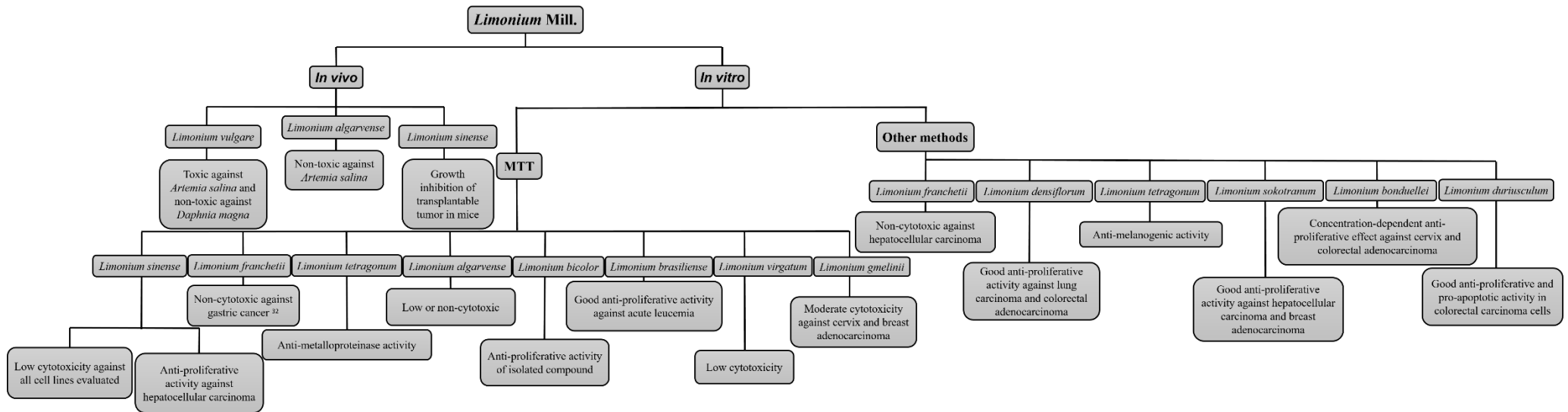


Figure 2. Main results of *in vivo* and *in vitro* assays of eligible studies included in the systematic review. Fonte: Adapted from Medini et al. [18], Al-madhagi et al. [22], Lellau et al. [25], Tang et al. [26,28], Kong et al. [27], Bae et al. [29,31], Chen et al. [32], Cordeiro [33], Lee et al. [34], Sahli et al. [35], Amrani et al. [36], Hamadou et al. [37], Rodrigues et al. [30,38], Tuohongerbieke et al. [39].

2.2. Anticancer and Anti-Proliferative Activities of *Limonium* Species

The toxic activity of *L. vulgare* Mill. ethanolic extract was evaluated using larvae and adults of *Artemia salina* and *Daphnia magna*, respectively. Results showed that this species presented maximum toxicity (>50%) against *A. salina* (both larvae and adults), and the chronic toxicity was considered higher than acute toxicity, as set by Lellau and Liebezeit [25]. For *D. magna* adults, *L. vulgare* reached relative toxicity of around 40%. The authors demonstrated that the *L. vulgare* extract was the second lead sample with the maximum activity for the inhibition of tumor induction based on a potato disc assay [25].

The study of Tang et al. [26] showed that polysaccharides of *Limonium sinense* (Girard) Kuntze (LSP) had no significant growth inhibition effect *in vitro* against HeLa and K562 cell lines. Although LSP could inhibit the growth of HepG2 cells, the maximal inhibition rate of LSP was no more than 30% for the concentration tested of 500 µg/mL. On the other hand, for all three different doses of LSP, *in vivo* tests demonstrated an important anticancer activity on Heps tumor cells. The greatest tumor inhibition rates achieved with 400 mg/kg of LSP were 38.03%. The LSP improved macrophage phagocytosis functions in immune-suppressed mice, suggesting that the anticancer activity of this compound can be related to the regulation of immune functions in mice [26]. Another study from this research group using isolated and purified polysaccharides of *L. sinense* (LSP11, LSP21, LSP31) revealed that LSP21 has the most significant dose-dependent inhibitory effect on the growth of HepG2 tumor cells (inhibitory rate of 48.13%). This isolated compound induced cell body shrinkage, chromatin condensation, and a decrease in the number of tumor cells with normal morphology, which suggested that its cytotoxicity can be related to the inhibition of cell proliferation and induction of cell death [28].

A new flavonoid glycoside isolated from *Limonium franchetii* Kuntze (**1**) had moderate *in vitro* cytotoxic activity against the C6 cell line, with a proliferation inhibition rate of 77.09% (100 µg/mL). However, other isolated compounds had no significant cytotoxic activity against BGC-823 and HepG2 cell lines [27]. The first study on the anti-proliferative activity of *Limonium densiflorum* Kuntze, performed by Medini et al. [18], showed dichloromethane extract as having important cytotoxic activity against A549 and DLD-1 cell lines, with IC₅₀ values of 29 µg/mL and 85 µg/mL, respectively. Furthermore, this extract was not significantly cytotoxic against the normal human WS1 cell line [18].

Bae et al. [29] suggested that the *L. tetragonum* extract was cytocompatible with the human HT-1080 cell lines and inhibited the enzymatic activity and mRNA expression of matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9). In another study, Bae et al. [31] evaluated the anti-metastasis effect of *L. tetragonum* extract against HT-1080 cell lines, focusing on the inhibition of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and the regulation of MMPs by intracellular inhibitors called tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs). The authors demonstrated that 85% methanol and *n*-butanol fractions of the plant had potential antimetastatic effects and can regulate cell proliferation, differentiation, and death through their inhibitory effects on the enzymatic activity of MMPs (MMP-2 and MMP-9), regulation of MMPs and TIMP expression, and suppression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. However, *n*-hexane and 85% methanol fractions exhibit

increased cytotoxicity following high concentrations. All fractions were cytocompatible at concentrations below 50 µg/mL. Similar results were found by Lee et al. [34] who additionally revealed that 85% methanol and *n*-butanol fractions of *L. tetragonum* had antimelanogenic activity due to tyrosinase-inhibitory effects, the prevention of L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) oxidation, and suppression of melanin production [34].

The preliminary toxicity screen of an aqueous extract of *Limonium algarvense* Erben flowers against mammalian cell lines (HepG2, N9, and S17) and brine shrimp eggs (*Artemia salina*) was evaluated by Rodrigues et al. [30]. The *in vitro* study resulted in rates of cellular viability higher than 80% at the concentration of 100 µg/mL, and non-toxic effects were observed at the maximal concentration of 1000 µg/mL against *A. salina*. According to the authors, all ethanolic extracts of *L. algarvense* flowers, peduncles, and leaves had no toxicity against human normal and cancer cell lines, HEK 293 and HepG2 cells, respectively. However, few extracts were able to reduce the viability of the non-human cancer cell line (RAW 264.7), with cellular viabilities ranging from 67.4% to 78.2% [38].

Chen et al. [32] evaluated the anti-proliferative activity of isolated compounds of *Limonium bicolor* Kuntze flowers. Both luteolin (**4**) and quercetin (**9**) were cytotoxic against the LoVo cell line, with rates of 89.10% and 79.78% for cell proliferation inhibition, respectively, at 100 µg/mL. The compounds acacetin (**15**) and eriodictyol (**16**) were cytotoxic against the U-2OS cell line at 100 µg/mL, with cell proliferation inhibition of 96.83% and 82.06%, respectively. Only acacetin was able to inhibit the proliferation of the MCF-7 cell line (97.05% at 100 µg/mL and 68.39% at 20 µg/mL). The authors suggested that the presence of 3-*O*-glycosylation in the isolated flavonoid of *L. bicolor* is not paramount for cytotoxic activity [32].

The cytotoxicity of crude extracts, fractions, subfractions, and isolated compounds (epigallocatechin-3-*O*-galatte (**28**), samaragenin A (**29**), and samaragenin B (**30**)) of *L. brasiliense* rhizome was evaluated by Cordeiro [33]. The values of the SI of aqueous and ethyl-acetate fractions corresponded to a selectivity four times higher for neoplastic cells (HL-60 cell line) compared to that for normal cells (PBMC cell line). The most promising anti-neoplastic activity was against human acute promyelocytic leukemia cells (HL-60) with the subfractions F and G (IC₅₀ = 8.23 ± 0.83; IC₅₀ = 7.35 ± 0.36 µg/mL, respectively). The subfraction G showed an IC₅₀ value of 7.92 ± 0.86 µg/mL against the MOLT-4 cell line, while samaragenin A resulted in an IC₅₀ value of 29.24 ± 17.64 µg/mL for the K562 cell line. According to flow cytometry results, subfraction G required the lowest concentration for cell death mediated by apoptosis induction for K562 cell line (10 µg/mL) and the highest percentage of cell death mediated by late apoptosis (37.8%) and necrosis (24.7%) at 50 µg/mL for the MOLT-4 cell line, after 48 h of treatment. The isolated compound, samaragenin A, did not cause significant cell death (*p* < 0.05) [33].

Sahli et al. [35] evaluated the cytotoxic activity of a methanol crude extract of stems and leaves of *Limonium virgatum* (Willd.) Fourr. The crude extracts were more cytotoxic against the non-human tumor cell line (J774) than against the human non-tumor cell line (WI-38). However, the extracts of the species *Silene succulenta* Forssk. (stem and leaves) and *Cirsium scabrum*

(Poir.) Bonnet & Barratte (leaves) showed the most significant cytotoxic activities when compared with those of *L. virgatum* [35].

According to Al-Madhagi et al. [22], a petroleum ether extract of *Limonium sokotranum* (Vierh.) Radcl.-Sm. leaves and flowers exhibited the highest cytotoxic activity against HepG2 tumor cells, with an IC₅₀ value of 9.97 ± 0.79 µg/mL, which was close to that of the positive control, doxorubicin (7.38 ± 0.11 µg/mL). On the other hand, IC₅₀ values in the test against the MCF-7 cell line ranged from 8.70 ± 0.08 to 21.8 ± 1.30 µg/mL, and the lowest IC₅₀ value was recorded with the methanol extract of *L. sokotranum* leaves and flowers (8.70 ± 0.08 µg/mL) [22].

The anti-proliferative activity of an *n*-butanol extract from aerial parts of *Limonium bonduellei* (T.Lestib.) Kuntze against two human cancer cell lines (HT-29 and HeLa) was evaluated by Amrani et al. [36]. The extract showed a concentration-dependent anti-proliferative effect. Low concentrations showed better activity against the HeLa cell line at 15 h and HT-29 cell line at 30 h, after treatment. The highest concentration of an *n*-butanol extract of *L. bonduellei* (250 µg/mL) showed the highest proliferation inhibition in all cell lines (92.6% in HT-29 and 98.9% in HeLa) [36].

The anti-proliferative and pro-apoptotic activities of an *n*-butanol extract and isolated compounds (apigenin (31) and apigenin7-*O*-β-*D*-(6''-methylglucuronide) (32)) of *L. duriusculum* against the HCT116 cell line were assessed for the first time by Hamadou et al. [37]. The authors showed that the crude extract had an IC₅₀ value of 7.60 µg/mL, while the results for the apigenin IC₅₀ were 25.74 µM. Apigenin7-*O*-β-*D*-(6''-methylglucuronide) did not affect cell proliferation [37].

The cytotoxic activity of the ethyl-acetate extract and isolated lignanamides of *Limonium gmelinii* Kuntze roots against tumor cell lines was evaluated by Tuohongerbieke et al. [39]. The ethyl-acetate extract showed moderate cytotoxicity against the HeLa cell line (IC₅₀= 25.25 µg/mL), and compounds (33) (IC₅₀= 19.24 ± 1.62 µM) and (50) (IC₅₀= 12.85 ± 2.65 µM) and compounds (37), (43), (33), and (50) demonstrated moderate cytotoxicity against the MCF-7 cell line, with IC₅₀ values ranged from 14.14 ± 1.08 to 28.85 ± 2.33 µM. Other lignanamides showed low or no cytotoxicity (IC₅₀ >30 µM).

According to SYRCLE's tool, some *in vitro* studies did not properly describe the conditions of cell culture (n = 3, 18.75%) in the Supplementary Materials. All *in vitro* and *in vivo* studies were unclear about the domain of baseline characteristics, allocation concealment, and incomplete outcome data. It is unclear whether both *in vitro* and *in vivo* studies were free of selective data reporting, especially due to the lack of conflicts of interest or funding statements in some articles. Two-thirds of the articles were unclear about other sources of bias (see Supplementary Materials in Tables S1 and S2).

3. Discussion

This is the first systematic review to gather evidence on the anti-proliferative and anticancer activities of *Limonium* species. This genus includes one of the most interesting halophyte plants that grow under several abiotic stress conditions, and it is responsible for providing molecules with important bioactive properties [23,42,43].

However, despite *Limonium* species having been widely used in folk medicine, there are few studies about the biological potential of this genus, as

observed by Medini et al. [18] and during our literature research. This study included 17 studies, most of which were designed as *in vitro* assays evaluating the cytotoxicity of different extracts, fractions, subfractions, and isolated compounds of the *Limonium* species using a range of cell cultures (both human and non-human cancer cell lines, as well as human and non-human normal cells).

One of the aims of the *in vivo* and *in vitro* screening of natural products is to discover new promising agents, such as those with anticancer activity, and guide the development of new drugs [44]. According to Kuete and Efferth [45] for *in vitro* anticancer screenings of plant extracts, we can consider significant or strong cytotoxicity values of IC₅₀ below 20 µg/mL for extracts and below 10 µM for isolated compounds. Usually, anticancer drugs from natural compounds act by inhibiting DNA synthesis (antimetabolites), damaging DNA (DNA alkylating agents and topoisomerase poisons), or inhibiting the function of the mitotic spindle based on microtubules (e.g., taxanes) [46-48]. In the studies included in this review, the antineoplastic drugs used as positive controls act by inhibiting the enzymes DNA topoisomerase I (camptothecin) and DNA topoisomerase II (amsacrine, doxorubicin, etoposide); damaging DNA as alkylating agents (cyclophosphamide), inhibiting the synthesis of pyrimidine, and thus the formation of DNA (5-fluorouracil); modulating the immune system (lentian); and as melanogenesis inhibitors with potent tyrosinase-inhibitory activity (kojic acid) [49-51].

Most *in vitro* studies were based on the colorimetric assay 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), a cell proliferation assay that measures the activity of mitochondrial dehydrogenase enzymes in living cells, and it is one of the most widely used assays for evaluating the preliminary anticancer activity of natural products [52,53]. Other studies used the colorimetric assay sulforhodamine B or fluorometric assays as resazurin reduction, Hoechst 33342, and calcein-acetomethoxy (Calcein-AM). *In vitro* cell viability and cytotoxicity assays using cultured cells are widely employed for drug screening and have some advantages, such as quick assays, reduced costs, and room for automation. Currently, these assays are also used in anticancer drug development to evaluate the cytotoxicity and tumor cell growth inhibition of different compounds. However, *in vitro* assays are not technically advanced enough to promptly replace animal tests due to the lack of a physiological environment. This is not the case of *in vivo* assays that are able to measure several behavioral and physiological parameters and guide the understanding of the pharmacological activity of the tested compound on the entire organism [54,55].

The toxicity of *Limonium* species was evaluated through bioassays using the organisms *A. salina* and *D. magna*. *A. salina* (brine shrimp) is a highly sensitive crustacean, and it has been extensively used for toxic screening of bioactive compounds since 1956 [56]. *D. magna* was first mentioned by Flückner and Flück (1949) as another organism used in toxicity testing. It is a simple, sensitive, and reproducible laboratory model for the toxicity screening of compounds [57-60]. These bioassays are well correlated with cytotoxicity and are used to screen the potential anti-tumor activity of natural compounds [61]. The ethanolic extract of *L. vulgare* was toxic against *A. salina* and can be

considered a promising candidate for new anticancer compounds [25]. The aqueous extract of *L. algarvense* was non-toxic against *A. salina*, which could explain the lack of toxicity against the human hepatocellular carcinoma cell line [30]. This suggests a good correlation of preliminary toxicological evaluations of plant-derived compounds using *in vitro* mammalian cells and *in vivo* brine shrimp assays.

On the other hand, few ethanolic extracts of different organs of *L. algarvense* have low cytotoxicity against the RAW 264.7 mouse cell line, and all extracts were not toxic against the human normal HEK 293 cell line and the human tumor HepG2 cell line. The authors suggest a possible correlation between the presence of several flavonoids in *L. algarvense* and the *in vitro* and *in vivo* hepatoprotective effect as demonstrated by other literature studies with this class of secondary metabolites [38]. Despite the low anti-proliferative activity of the crude polysaccharides of *L. sinense* against HepG2 tumor cells, this compound inhibited the growth of transplanted mouse tumors and demonstrated a synergistic action when used in association with the anti-neoplastic agent 5-fluorouracil. It was suggested that the anti-cancer effects could be related to the *in vivo* immunomodulatory activity [26].

L. tetragonum, the most evaluated species among the included studies, was shown to be a potential source of bioactive agents with proven anti-MMP activity and anti-melanogenesis properties, including compounds that can prevent hyperpigmentation [29,31,34]. Bae et al. [31] and Lee et al. [34] suggest that the active compounds of *L. tetragonum* include, but are not limited to, flavonoid glycosides (e.g., myricetin 3-galactoside (**13**) and quercetin 3-O- β -galactopyranoside (**14**)). These compounds inhibit the activity of MMP, suppress MAPK associated with MMP upregulation, and act as anti-melanogenic compounds, demonstrating the nutraceutical potential of *L. tetragonum* as a source of anti-MMP compounds [29,31,34]. The dichloromethane extract of *L. densiflorum* demonstrated promising anti-proliferative effects against human lung carcinoma (A549) and human colorectal adenocarcinoma (DLD-1), with results that were similar to those from the positive control etoposide. Furthermore, this extract was not significantly cytotoxic against a human normal cell line (WS1), which suggests the possible selectivity of the extract for cancer cells [18].

The antioxidant, total phenolic content, and anti-inflammatory activity of *L. densiflorum* crude extracts and isolated compounds was investigated. All extracts reduced nitric oxide (NO) production in a concentration-dependent manner, suggesting interesting anti-oxidant activities. These results can be due, in part, to the majority presence of polyphenolic compounds (flavonoids and phenolic acids) that can be related to the anticancer potential of *L. densiflorum* [18]. In addition, evidence suggests that natural antioxidants are able to inhibit oxidative stress and restore cellular homeostasis, preventing damage to normal tissues and inflammation, which can be valuable for the management of different chronic and metabolic conditions, such as cancer [62,63].

Cordeiro [33] demonstrated a greater SI of aqueous and ethyl-acetate fractions of *L. brasiliense* against neoplastic cells (HL-60) vs. normal cells (PBMCs), and the favorable anti-proliferative activity of subfractions F and G against the HL-60 cell line, which can be related to the immunomodulatory activity of crude extracts and fractions of *L. brasiliense*. In the literature, it is

suggested that tumor growth and proliferation can also be restrained by targeting and modulating the immune response. Natural immunomodulators can stimulate humoral and cell-mediated immune responses against the tumor [64,65].

Other important cytotoxic activity, against HepG2 tumor cells, was obtained with the petroleum ether extract of *L. sokotranum* leaves and flowers, which displayed a profile similar to that of the positive control doxorubicin [22]. A methanol extract of this species (leaves and flowers) had the lowest IC₅₀ value against the MCF-7 tumor cells (8.70 ± 0.08 µg/mL). Finally, the isolated compound apigenin (31) of *L. duriusculum* had the lowest IC₅₀ value against the HCT116 cell line (25.74 µM). The *n*-butanol extract and isolated compound apigenin promote apoptosis in HCT116 cancer cells, associated with reduced signaling from MAPK, activation of the p53 response pathway, and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage [37]. The research article produced by Tuohongerbieke et al. [39] is the first report of lignanamides in Plumbaginaceae. The ethyl-acetate extract and isolated lignanamides from *L. gmelinii* roots showed moderate cytotoxicity against the HeLa cell line (25.25 µg/mL). The possible anti-cancer mechanisms of *Limonium* species suggested in the included studies are summarized in Figure 3.

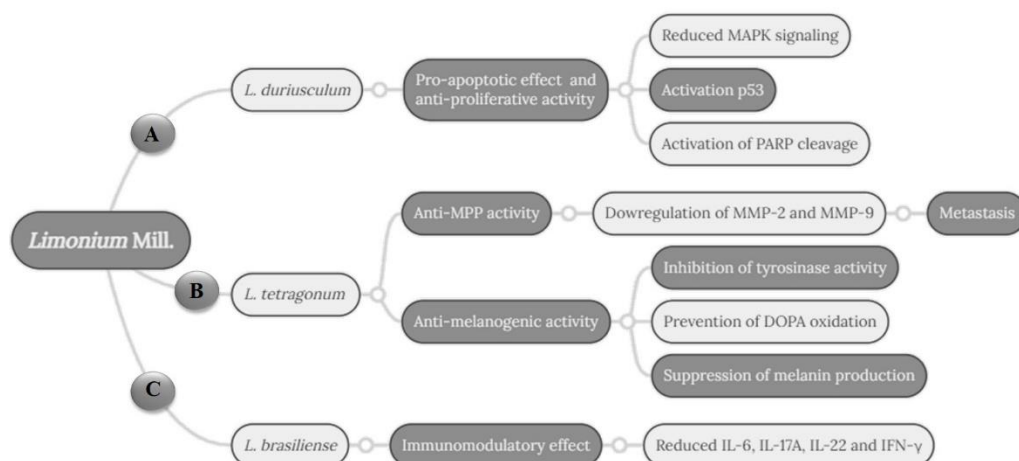


Figure 3. The possible cellular mechanism involved in the anti-cancer activity of *Limonium* species included in the systematic review. (A) Cell proliferation inhibition pathways mediated by *L. duriusculum* extract. (B) Inhibition of matrix metalloproteinases (MMP-2 and 9), Zn dependent endoproteases related to various complications in cancer, such as metastasis, and anti-melanogenic activity linked to inhibition of melanin biosynthesis mediated by bioactive compounds of *L. tetragonum*. (C) Immunomodulatory activity related to reduced of interleukin (IL) 6, 17A, and 22, and interferon-gamma (IFN- γ) mediated by *L. brasiliense* crude extracts and fractions, suggesting an anticancer effect of this species. Note: Adapted from Hamadou et al. [37]; Bae et al. [31]; Lee et al. [34]; Cordeiro [33].

Many isolated or identified compounds, as primary and secondary metabolites, and principally phenolic compounds were described in the literature sourced. The extraction method and solvent polarity were some factors related to the phytochemical diversity observed in the crude extracts, subfractions, fractions, and isolated compounds of *Limonium* species. Several of the compounds have already been described in *Limonium* spp., such as

flavonoids and their glycosides derivatives [32,37,38]. Other compounds were discovered from this genus for the first time (e.g., some lignanamides) [39]. Thus, we suggest that *Limonium* species could be investigated as a source of bioactive phytochemicals, including polyphenolic compounds that might combat oxidative stress, act in cell cycle regulation, and could possibly be used in the nutraceutical field. This can be supported by the fact that *Limonium* spp. are mainly composed of flavonoids, phenolic acids, and tannins (Table 3). These phenolic compounds of *Limonium* spp. can act in the protection of oxidative and inflammatory-related diseases, as suggested by Rodrigues et al. [35] in a comparison study between *L. algarvense* and *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (green tea). The authors demonstrated that *L. algarvense* flowers had similar or higher *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory properties than green tea, based on radical-scavenging activities and the decrease in NO production, respectively [30].

In addition, several studies demonstrated the antioxidant potential of *Limonium* species associated with their high polyphenol content [18,36,66]. Overall, studies suggest that oxidative stress, chronic inflammation, and cancer are closely related [67]. Thus, the antioxidant activity, as well as anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Limonium* species reported in included studies, can contribute to the anticancer effect observed in some of these species. Furthermore, as *Limonium* species are considered halophytes, which means that they can adapt to salinity conditions via physiological and biochemical processes, a consequent increase in the enzyme and antioxidant metabolites may occur depending on the environment [42,68,69]. Based on these correlations, the literature suggested that phenolic compounds with potent antioxidant activity could be evaluated as possible chemo-preventive or chemotherapeutic agents [70].

The assessment of cytotoxicity and other biological activities from plant species, both *in vitro* and *in vivo* studies, should be performed using appropriate and validated methods aimed at obtaining accurate and reliable results that can be reproduced by other studies. However, some of the included studies were unclear or lacked in their reporting of relevant information, such as the correct and accepted species name (e.g., *L. sokotranum* instead of *L. socotranum*; *L. bonduellei* instead of *L. bonduelli*; *L. franchetii* Kuntze instead of *L. franchetii*; *L. densiflorum* Kuntze instead of *L. densiflorum*; *L. bicolor* Kuntze instead of *L. bicolor*), the organ of the plant material used for extraction, the number of plant voucher specimens, culture conditions of cell lines, and the use of positive and negative controls. It was also found that in SYRCLE's tool, the general quality of the articles was moderate. In this scenario, it was suggested that a checklist grounded on pharmacognostic literature of medicinal plants should be completed by researchers and authors prior to publication to standardize the conduction and reporting of studies in this field (see Supplementary Materials, Table S3). It was also encouraged that another checklist published by Chierrito et al. [71] be used for reporting experimental *in vitro* studies, including data on cell culture (e.g., identification of culture type, growth medium used, number of passages, incubation temperature (exact 0.0 °C), atmosphere conditions (exact 0.0% CO₂), and methods used).

This conducted systematic review has some limitations. Although there is extensive literature on *Limonium* species, only a few studies were included

because this field of the anti-proliferative and anticancer effects of this genus is still recent (studies published between 2003 and 2021). Despite the popular use of *Limonium*, few species had their biological potential evaluated. Due to the nature of the data, the differences among *Limonium* species, cell lines, and compounds evaluated, quantitative analyses were not possible.

Limonium species have a wide worldwide distribution, with vast chemical and biological potential, and are popularly used in several countries. The results obtained from this systematic review reinforce these data and bring a new perspective in the search for useful anticancer agents from natural sources, mainly polyphenols. In this context, it is necessary to carry out more *in vitro* studies for a better understanding of the mechanism of action of these compounds and in this way, direct future *in vivo* and clinical studies, reinforcing the use of natural products in the discovery of less toxic, more selective, and effective phytochemicals for the treatment of different types of cancer.

4. Materials and Methods

4.1. Study Design

This systematic review was performed following the recommendations of the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) statement (Supplementary Materials, Board S1), Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions, and The Joanna Briggs Institute (JBI) [40,72-73]. All the steps (i.e., article screening, full-text reading, data extraction, and methodological quality assessment) were conducted by two reviewers, independently. A third reviewer was consulted in the case of discrepancies. This study was registered in the Open Science Framework (OSF) with the registration DOI 10.17605/OSF.IO/WHBNE.

4.2. Systematic Literature Search and Eligibility Criteria

A systematic search was performed based on the electronic databases PubMed/MEDLINE, Scopus, and Scielo with no time or language restrictions (updated on 24 June 2021). The full search strategy is available in the Supplementary Materials (Board S2). A manual search was also conducted for the reference list of the included articles, in ClinicalTrials.gov, and the Brazilian catalog of thesis from the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES).

We included *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo*, or *in silico* experimental studies that evaluated the anticancer or anti-proliferative activity of *Limonium* species (e.g., crude extract, fraction, subfraction, or isolated compounds). Studies evaluating other biological activities of *Limonium* species and with other study designs (e.g., phytochemistry, agronomic perspective, botany, salinity, or cultivation studies) and those published in non-Roman characters were excluded.

4.3. Data Extraction and Reporting Evaluation

A standardized form was used to collect data on the studies' general characteristics (e.g., authors, publication date, country), bioassay type, methodological aspects, and main results. The adapted tool for *in vitro* assays and the Systematic Review Center for Laboratory Animal Experimentation

(SYRCLE) tool were used to assess the studies' risk of bias and methodological quality in the Supplementary Materials (Tables S1 and S2) [71,74].

5. Conclusions

The literature on the potential anticancer effects of *Limonium* species mostly refers to preliminary assessments of the cytotoxicity of different compounds obtained from crude extracts, fractions, subfractions, and isolates and their impact on the viability of a range of cancer cell lines. *Limonium tetragonum* was the most evaluated species, with promising *in vitro* anti-melanogenesis effects. Isolated compounds of the flavonoid class, such as apigenin of *L. duriusculum*, also demonstrated a favorable cytotoxic effect against colorectal cancer, as well as lignanamides of *L. gmelinii* against cervix and breast adenocarcinoma cell lines. However, the complete mechanism of action of all isolated compounds and their effect in *in vivo* models remain unclear for most species.

These findings reinforce the biological potential of *Limonium* spp. as a source for the discovery and development of new potential cytotoxic phytochemicals. However, better planning, experimental designs, and reporting of the results will make future studies more robust and provide better proof to demonstrate the mechanism of action of these compounds.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at : <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ph16020293/s1>, Board S1 PRISMA 2020 Checklist, Board S2: Search Strategies, Table S1: Evaluation of the risk of bias by the adapted SYRCLE's tool for *in vitro* studies, Table S2: Evaluation of the risk of bias by SYRCLE's tool for *in vivo* studies, Board S3: Studies excluded after full reading, Figure S1: Chemical structures of isolated compounds of *Limonium* species drawn using ChemDraw version 14.0.0.118, Table S3: Checklist for reporting data on plant material for pharmacognostic studies.

Author Contributions: N.C.G., R.I., N.C.d.O., C.V.N., D.C.d.M.A., A.C.C.S., F.S.T., F.F.-L., D.C. and J.C.P.d.M. contributed to the study conception and design. N.C.G., D.C., R.I. and N.C.d.O. were involved in the collection, analysis, and data interpretation. N.C.G. and D.C. wrote the original draft, and all authors critically reviewed the content of the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq, DC grant #150413/2020-3; JCPM grant #312309/2018-0) and *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES, NCG grant #88882.448895/2019-01).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data sharing not applicable

Acknowledgments: Thanks to the Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences and the Laboratory of Pharmaceutical Biology (Palafito) at the State University of Maringá, and the efforts of all authors to make this work possible. The authors acknowledge Lucie Conte Herrig for the revision of the English.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Desai, A.G.; Qazi, G.N.; Ganju, R.K.; El-Tamer, M.; Singh, J.; Saxena, A.K.; Bedi, Y.S.; Taneja, S.C.; Bhat, H.K. Medicinal plants and cancer chemoprevention. *Curr. Drug Metab.* **2008**, *9*, 581–591. <https://doi.org/10.2174/138920008785821657>.
2. Pratheeshkumar, P.; Sreekala, C.; Zhang, Z.; Budhraj, A.; Ding, S.; Son, Y.O.; Wang, X.; Hitron, A.; Hyun-Jung, K.; Wang, L.; et al. Cancer prevention with promising natural products: Mechanisms of action and molecular targets. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2012**, *12*, 1159–1184. <https://doi.org/10.2174/187152012803833035>.
3. Wang, H.; Khor, T.O.; Shu, L.; Su, Z.-Y.; Fuentes, F.; Lee, J.-H.; Kong, A.-NT. Plants vs. cancer: A review on natural phytochemicals in preventing and treating cancers and their druggability. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2012**, *12*, 1281–1305. <https://doi.org/10.2174/187152012803833026>.
4. Tariq, A.; Sadia, S.; Pan, K.; Ullah, I.; Mussarat, S.; Sun, F.; Abiodun, O.O.; Batbaatar, A.; Li, Z.; Song, D.; et al. A systematic review on ethnomedicines of anti-cancer plants. *Phytother. Res.* **2017**, *31*, 173–344. <https://doi.org/10.1002/ptr.5751>.
5. Rauf, A.; Imran, M.; Butt, M.S.; Nadeem, M.; Peters, D.G.; Mubarak, M.S. Resveratrol as an anti-cancer agent: A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2018**, *58*, 1428–1447. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1263597>.
6. Khan, Y.H.; Uttra, A.M.; Qasim, S.; Mallhi, T.H.; Alotaibi, N.H.; Rasheed, M.; Alzarea, A.I.; Iqbal, M.S.; Alruwaili, N.K.; Khan, S.-U.-D.; et al. Potential role of phytochemicals against matrix metalloproteinase induced breast cancer; an explanatory review. *Front. Chem.* **2021**, *8*, 592152. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.592152>.
7. Sultana, S.; Munir, N.; Mahmood, Z.; Riaz, M.; Akram, M.; Rebezov, M.; Kuderinova, N.; Moldabayeva, Z.; Shariati, M.A.; Rauf, A.; et al. Molecular targets for the management of cancer using *Curcuma longa* Linn. phytoconstituents: A review. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *135*, 111078. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111078>.
8. Khan, H. Medicinal plants in light of history: Recognized therapeutic modality. *J. Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2014**, *19*, 216–219. <https://doi.org/10.1177/2156587214533346>.
9. Ijaz, S.; Akhtar, N.; Khan, M.S.; Hameed, A.; Irfan, M.; Arshad, M.D.; Ali, S.; Asrar, M. Plant derived anticancer agents: A green approach towards skin cancers. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *103*, 1643–1651. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.113>.
10. Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 770–803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>.
11. Plants of the World Online (POWO). *Plumbaginaceae* Juss. Available online: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30000293-2#children> (accessed on 21 March 2022).
12. Plants of the World Online (POWO). *Limonium* Mill. Available online: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:331722-2#children> (accessed on 21 March 2022).
13. Murray, A.P.; Rodriguez, S.; Frontera, M.A.; Tomas, M.A.; Mulet, M.C. Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Z. Nat. C. J. Biosci.* **2004**, *59*, 477–480. <https://doi.org/10.1515/znc-2004-7-804>.
14. Medini, F.; Fella, H.; Ksouri, R.; Abdely, C. 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.* **2014**, *8*, 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.01.003>.
15. Benmeddour, T.; Laouer, H.; Flamini, G.; Akkal, S. Chemical composition of essential oil of *Limonium bonduellei*. *Chem. Nat. Compd.* **2018**, *54*, 188–190. <https://doi.org/10.1007/s10600-018-2293-3>.
16. 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* **2015**, *104*, 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.05.017>.
17. Geng, D.; Chi, X.; Dong, Q.; Hu, F. Antioxidants screening in *Limonium aureum* by optimized on-line HPLC-DPPH assay. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *67*, 492–497. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.063>.
18. Medini, F.; Bourgou, S.; Lalancette, K.; Snoussi, M.; Mkadmini, K.; Coté, I.; Abdely, 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. *S. Afr. J. Bot.* **2015**, *99*, 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.04.007>.
19. Blainski, A.; Gionco, B.; Oliveira, A.G.; Andrade, G.; Scarminio, I.S.; Silva, B.D.; Lopes, N.P.; Mello, J.C.P. Antibacterial activity of *Limonium brasiliense* (Baicuru) against multidrugresistant bacteria using a statistical mixture design. *J. Ethnopharmacol.* **2017**, *198*, 313–323. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.01.013>.
20. Caleare, A.O.; Hensel, A.; Mello, J.C.P.; Pinha, A.B.; Panizzon, G.P.; Lechtenberg, M.; Petereit, F.; Nakamura, C.V. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Limonium brasiliense* inhibit the adhesion of *Porphyromonas gingivalis* to epithelial host cells by interaction with gingipains. *Fitoterapia* **2017**, *118*, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.03.002>.

21. Sereia, A.L.; Oliveira, M.T.; Baranoski, A.; Marques, L.L.M.; Ribeiro, F.M.; Isolani, R.G.; Medeiros, D.C.; Chierrito, D.; Lazarin-Bidóia, D.; Zielinski, F.; et al. *In vitro* evaluation of the protective effects of plant extracts against amyloid-beta peptide-induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *PLoS One* **2019**, *14*, e0212089. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212089>.
22. Al-madhagi, W.M.; Hashim, N.M.; Ali, N.A.A.; Othman, R. Phytochemical screening, cytotoxic and antimicrobial activities of *Limonium socotranum* and *Peperomia blanda* extracts. *Trop Biomed.* **2019**, *36*, 11–21.
23. Soud, A.; Bellani, L.; Gabriele, M.; Pucci, L.; Smaoui, A.; Abdelly, C.; Hamed, K.B.; Longo, V. Phytochemical and biological activities in *Limonium* species collected in different biotopes of Tunisia. *Chem. Biodivers.* **2019**, *16*, e1900216. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900216>.
24. Tuasha, N.; Petros, B.; Asfaw, Z. Plants used as anticancer agents in the Ethiopian traditional medical practices: A systematic review. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2018**, *18*, 6274021. <https://doi.org/10.1155/2018/6274021>.
25. Lellau, T.F.; Liebezeit, G. Cytotoxic and antitumor activities of ethanolic extracts of salt marsh plants from the lower Saxonian Wadden Sea, Southern North Sea. *Pharm. Biol.* **2003**, *41*, 293–300. <https://doi.org/10.1076/phbi.41.4.293.15668>.
26. 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. *Int. J. Biol. Macromol.* **2012**, *51*, 1134–1139. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.08.037>.
27. Kong, N.-N.; Fang, S.-T.; Wang, J.-H.; Wang, Z.-H.; Xia, C.-H. Two new flavonoid glycosides from the halophyte *Limonium franchetii*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2014**, *16*, 370–375. <https://doi.org/10.1080/10286020.2014.884081>.
28. Tang, X.-H.; Yu, F.; Liu, J.; Gao, J.; Yan, L.-F.; Dong, M.-M. Isolation and identification of anti-tumor polysaccharide LSP21 from *Limonium sinense* (Girard) Kuntze. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *70*, 138–142. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.042>.
29. Bae, M.-J.; Karadeniz, F.; Lee, S.-G.; Seo, Y.; Kong, C.-S. Inhibition of MMP-2 and MMP-9 activities by *Limonium tetragonum* extract. *Prev. Nutr. Food Sci.* **2016**, *21*, 38–43. <https://doi.org/10.3746/pnf.2016.21.1.38>.
30. 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 Chem.* **2016**, *200*, 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.048>.
31. Bae, M.J.; Karadeniz, F.; Oh, J.H.; Yu, G.H.; Jang, M.; Nam, K.; Seo, Y.; Kong, C. MMP-Inhibitory effects of flavonoid glycosides from edible medicinal halophyte *Limonium tetragonum*. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2017**, *2017*, 6750274. <https://doi.org/10.1155/2017/6750274>.
32. Chen, J.; Teng, J.; Ma, L.; Tong, H.; Ren, B.; Wang, L.; Li, W. Flavonoids isolated from the flowers of *Limonium bicolor* and their *in vitro* antitumor evaluation. *Pharm. Mag.* **2017**, *13*, 222–225. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.204566>.
33. Cordeiro, M.F. Avaliação das atividades imunomoduladora, antineoplásica e antibacteriana de rizomas de *Limonium brasiliense*, sementes de *Paullinia cupana* e cascas do caule de *Trichilia catigua*. Tese Ph.D. Thesis, Universidade Federal de Pernambuco: Recife, Brazil; Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. Recife; 2017; pp. 1–142.
34. Lee, S.-G.; Karadeniz, F.; Seo, Y.; Kong, C.-S. Anti-melanogenic effects of flavonoid glycosides from *Limonium tetragonum* (Thunb.) Bullock via inhibition of tyrosinase and tyrosinase-related proteins. *Molecules* **2017**, *22*, 1480. <https://doi.org/10.3390/molecules22091480>.
35. Sahli, R.; Rivière, C.; Neut, C.; Bero, J.; Sahuc, M.-E.; Smaoui, A.; Beaufay, C.; Roumy, V.; Hennebelle, T.; Rouillé, Y.; et al. An ecological approach to discover new bioactive extracts and products: The case of extremophile plants. *J. Pharm. Pharmacol.* **2017**, *69*, 1041–1055. <https://doi.org/10.1111/jphp.12728>.
36. Amrani, A.; Lahneche, A.M.; Benaissa, O.; Boubekri, N.; Demirtas, I.; Benayache, F.; Benayache, S.; Zama, D. *In vitro* antiproliferative and inhibition of oxidative DNA damage activities of n-butanol extract of *Limonium bonduelli* from Algeria. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2019**, *62*, e19170779. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2019170779>.
37. Hamadou, M.H.; Kerkatou, M.; Gatto, P.; Pancher, M.; Bisio, A.; Inga, A.; Menad, A.; Benayache, S.; Benayache, F.; Ameddah, S. Apigenin rich *Limonium duriusculum* (de Girard) Kuntze promotes apoptosis in HCT116 cancer cells. *Nat. Prod. Res.* **2019**, *35*, 2910–2914. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1672070>.
38. Rodrigues, M.J.; Monteiro, I.; Castañeda-Loaiza, V.; Placines, C.; Oliveira, M.C.; Reis, C.; Caperta, A.D.; Soares, F.; Pousão-Ferreira, P.; Pereira, C.; et al. Growth performance, *in vitro* antioxidant properties and chemical composition of the halophyte *Limonium algarvense* Erben are strongly influenced by the irrigation salinity. *Ind. Crops Products.* **2020**, *143*, 111930. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111930>.

39. Tuohongerbieke, A.; Li, J.; Sabir, G.; Xin, X.; Hu, M.; Duan, X.; Liu, L.; Tang, D.; Zhu, J.; Aisa, H.A. Lignanamides from the roots of *Limonium gmelinii* (Willd.) Kuntze and their anti-diabetic, cytotoxic and anti-inflammatory activities. *Phytochemistry* **2021**, *184*, 112648. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112648>.
40. Page, M.J.; McKenzie, J.E.; Bossuyt, P.M.; Boutron, I.; Hoffmann, T.C.; Mulrow, C.D.; Shamseer, L.; Tetzlaff, J.M.; Moher, D. The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *PLoS Med.* **2021**, *18*, e1003583. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003583>.
41. Indrayanto, G.; Putra, G.S.; Suhud, F. Validation of *in vitro* bioassay methods: Application in herbal drug research. *Profiles. Drug Subst. Excip. Relat. Methodol.* **2021**, *46*, 273–307. <https://doi.org/10.1016/bs.podrm.2020.07.005>.
42. Hassan, M.A.; Estrelles, E.; Soriano, P.; López-Gresa, M.P.; Bellés, J.M.; Boscaiu, M.; Vicente, O. Unraveling salt tolerance mechanisms in halophytes: A comparative study on four mediterranean *Limonium* species with different geographic distribution patterns. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1438. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01438>.
43. González-Orenga, S.; Grigore, M.N.; Boscaiu, M.; Vicente, O. Constitutive and induced salt tolerance mechanisms and potential uses of *Limonium* Mill. Species. *Agronomy* **2021**, *11*, 413. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030413>.
44. Dholwani, K.K.; Saluja, A.K.; Gupta, A.R.; Shah, D.R. A review on plant-derived natural products and their analogs with anti-tumor activity. *Indian J. Pharmacol.* **2008**, *40*, 49–58. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.41038>.
45. Kuete, V.; Efferth, T. African flora has the potential to fight multidrug resistance of cancer. *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 914813. <https://doi.org/10.1155/2015/914813>.
46. American Cancer Society (ACS). How Chemotherapy Drugs Work. Available online: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/chemotherapy/how-chemotherapy-drugs-work.html> (accessed on 21 March 2022).
47. Jain, C.K.; Majumder, H.K.; Roychoudhury, S. Natural compounds as anticancer agents targeting DNA topoisomerases. *Curr. Genomics.* **2017**, *18*, 75–92. <https://doi.org/10.2174/1389202917666160808125213>.
48. Lichota, A.; Gwozdziński, K. Anticancer activity of natural compounds from plant and marine environment. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3533. <https://doi.org/10.3390/ijms19113533>.
49. Vardanyan, R.S.; Hruby, V.J. *Synthesis of Essential Drugs*, 1st ed.; Elsevier Science: Amsterdam, Netherlands, 2006; pp.389–418.
50. Ina, K.; Kataoka, T.; Ando, T. The use of Lentinan for treating gastric cancer. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2013**, *13*, 681–688. <https://doi.org/10.2174/1871520611313050002>.
51. Masuda, M.; Itoh, K.; Murata, K.; Naruto, S.; Uwaya, A.; Isami, F. Matsuda, H. Inhibitory effects of *Morinda citrifolia* extract and its constituents on melanogenesis in murine B16 melanoma cells. *Biol. Pharm. Bull.* **2012**, *35*, 78–83. <https://doi.org/10.1248/bpb.35.78>.
52. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **1983**, *65*, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
53. McCauley, J.; Zivanovic, A.; Skropeta, D. Bioassays for anticancer activities. In *Metabolomics Tools for Natural Product Discovery. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, Roessner, U., Dias, D., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2013; pp. 191–205.
54. Cox, P.A. Pharmacology, Biodiversity. In *Encyclopedia of Biodiversity*, 2nd ed.; Levin, S.A., ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2013. pp. 703–715.
55. Aslantürk, Ö.S. *In vitro* cytotoxicity and cell viability assays: Principles, advantages, and disadvantages. In *Genotoxicity—A Predictable Risk to Our Actual World*, Larramendy, M.L., Soloneski, S., Eds.; IntechOpen: London, UK, 2017; pp. 1–17. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71923>.
56. Michael, A.S.; Thompson, C.G.; Abramovitz, M. *Artemia salina* as a test organism for bioassay. *Science* **1956**, *123*, 464. <https://doi.org/10.1126/science.123.3194.464>.
57. Waart, J.; Van Aken, F.; Pouw, H. Detection of orally toxic microbial metabolites in foods with bioassay systems. *Zent. Bakteriolog. Orig. A* **1972**, *222*, 96–114.
58. Adema, D.M.M. *Daphnia magna* as a test animal in acute and chronic toxicity tests. *Hydrobiologia* **1978**, *59*, 125–134. <https://doi.org/10.1007/BF00020773>.
59. Canton, J.H.; Adema, D.M.M. Reproducibility of short-term and reproduction toxicity experiments with *Daphnia magna* and comparison of the sensitivity of *Daphnia magna* with *Daphnia pulex* and *Daphnia cucullata* in short-term experiments. *Hydrobiologia* **1978**, *59*, 135–140. <https://doi.org/10.1007/BF00020774>.
60. Sandbacka, M.; Christianson, I.; Isomaa, B. The acute toxicity of surfactants on fish cells, *Daphnia magna* and fish—A comparative study. *Toxicol. Vitro.* **2000**, *14*, 61–68. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(99\)00083-1](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(99)00083-1).
61. Arcanjo, D.D.R.; Albuquerque, A.C.M.; Melo-Neto, B.; Santana, L.C.L.R.; Medeiros, M.G.F.; Citó, A.M.G.L. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. *Braz. J. Biol.* **2012**, *72*, 505–509. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842012000300013>.

62. Visconti, R.; Grieco, D. New insights on oxidative stress in cancer. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2009**, *12*, 240–245.
63. Arulselvan, P.; Fard, M.T.; Tan, W.S.; Gothai, S.; Fakurazi, S.; Norhaizan, M.E.; Kumar, S.S. Role of antioxidants and natural products in inflammation. *Oxidative Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 5276130. <https://doi.org/10.1155/2016/5276130>.
64. Mohamed, S.I.A.; Jantan, I.; Haque, M.A. Naturally occurring immunomodulators with antitumor activity: An insight on their mechanisms of action. *Int. Immunopharmacol.* **2017**, *50*, 291–304. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.07.010>.
65. Nuzzo, G.; Senese, G.; Gallo, C.; Albiani, F.; Romano, L.; d’Ippolito, G.; Manzo, E.; Fontana, A. Antitumor potential of immunomodulatory natural products. *Mar. Drugs.* **2022**, *20*, 386. <https://doi.org/10.3390/md20060386>.
66. Ruiz-Riaguas, A.; Zengin, G.; Sinan, K.I.; Salazar-Mendías, C.; Llorent-Martínez, E.J. Phenolic profile, antioxidant activity, and enzyme inhibitory properties of *Limonium delicatulum* (Girard) Kuntze and *Limonium quesadense* Erben. *J. Chem.* **2020**, *2020*, 1016208. <https://doi.org/10.1155/2020/1016208>.
67. Reuter, S.; Gupta, S.C.; Chaturvedi, M.M.; Aggarwal, B.B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *49*, 1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>.
68. Hamed, K.B.; Chibani, F.; Abdelly, C.; Magne, C. Growth, sodium uptake and antioxidant responses of coastal plants differing in their ecological status under increasing salinity. *Biologia* **2014**, *69*, 193–201. <https://doi.org/10.2478/s11756-013-0304-1>.
69. Bakhshi, S.; Abbaspour, H.; Saeidisar, S. Study of phytochemical changes, enzymatic and antioxidant activity of two halophyte plants: *Salsola dendroides* Pall and *Limonium reniforme* (Girard) Lincz in different seasons. *Bulg. Chem. Communications.* **2018**, *50*, 374–382.
70. Jafari, S.; Saeidnia, S.; Abdollahi, M. Role of natural phenolic compounds in cancer chemoprevention via regulation of the cell cycle. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2014**, *15*, 409–421. <https://doi.org/10.2174/1389201015666140813124832>.
71. Chierrito, D.; Villas-Boas, C.B.; Tonin, F.S.; Fernandez-Llimos, F.; Sanches, A.C.C.; de Mello, J.C.P. Using cell cultures for the investigation of treatments for attention deficit hyperactivity disorder: A systematic review. *Curr. Neuropharmacol.* **2019**, *17*, 916–925. <https://doi.org/10.2174/1570159X17666190409143155>.
72. Higgins, J.P.T.; Thomas, J.; Chandler, J.; Cumpston, M.; Li, T.; Page, M.J.; Welch, V.A. Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions Version 6.2. 2021. Available online: www.training.cochrane.org/handbook (accessed on 24 October 2021).
73. Joanna Briggs Institute (JBI). Methodology for JBI Scoping Reviews Joanna Briggs Institute. Joanna Briggs Institute Reviewers’ Manual. 2015 ed./Supplement. Australia: Joanna Briggs Institute. 2015. Available online: <https://nursing.lsuhsu.edu/jbi/docs/reviewersmanuals/scoping-.pdf> (accessed on 24 October 2021).
74. Hooijmans, C.R.; Rovers, M.M.; Vries, R.B.; Leenaars, M.; Ritskes-Hoitinga, M.; Langendam, M.W. SYRCLE’s risk of bias tool for animal studies. *BMC Med. Res. Methodol.* **2014**, *14*, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2288-14-43>.

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Supplementary Materials

Board S1 PRISMA 2020 Checklist

Section and Topic	Item #	Checklist item	Location where item is reported
TITLE			
Title	1	Identify the report as a systematic review.	1
ABSTRACT			
Abstract	2	See the PRISMA 2020 for Abstracts checklist.	1
INTRODUCTION			
Rationale	3	Describe the rationale for the review in the context of existing knowledge.	1-2
Objectives	4	Provide an explicit statement of the objective(s) or question(s) the review addresses.	2
METHODS			
Eligibility criteria	5	Specify the inclusion and exclusion criteria for the review and how studies were grouped for the syntheses.	22-23
Information sources	6	Specify all databases, registers, websites, organisations, reference lists and other sources searched or consulted to identify studies. Specify the date when each source was last searched or consulted.	22-23
Search strategy	7	Present the full search strategies for all databases, registers and websites, including any filters and limits used.	22-23; Appendix SB
Selection process	8	Specify the methods used to decide whether a study met the inclusion criteria of the review, including how many reviewers screened each record and each report retrieved, whether they worked independently, and if applicable, details of automation tools used in the process.	22-23
Data collection process	9	Specify the methods used to collect data from reports, including how many reviewers collected data from each report, whether they worked independently, any processes for obtaining or confirming data from study investigators, and if applicable, details of automation tools used in the process.	22-23

Data items	10a	List and define all outcomes for which data were sought. Specify whether all results that were compatible with each outcome domain in each study were sought (e.g. for all measures, time points, analyses), and if not, the methods used to decide which results to collect.	22-23
	10b	List and define all other variables for which data were sought (e.g. participant and intervention characteristics, funding sources). Describe any assumptions made about any missing or unclear information.	22-23
Study risk of bias assessment	11	Specify the methods used to assess risk of bias in the included studies, including details of the tool(s) used, how many reviewers assessed each study and whether they worked independently, and if applicable, details of automation tools used in the process.	22-23; Appendix SC and SD
Effect measures	12	Specify for each outcome the effect measure(s) (e.g. risk ratio, mean difference) used in the synthesis or presentation of results.	-
Synthesis methods	13a	Describe the processes used to decide which studies were eligible for each synthesis (e.g. tabulating the study intervention characteristics and comparing against the planned groups for each synthesis (item #5)).	22-23
	13b	Describe any methods required to prepare the data for presentation or synthesis, such as handling of missing summary statistics, or data conversions.	22-23
	13c	Describe any methods used to tabulate or visually display results of individual studies and syntheses.	22-23
	13d	Describe any methods used to synthesize results and provide a rationale for the choice(s). If meta-analysis was performed, describe the model(s), method(s) to identify the presence and extent of statistical heterogeneity, and software package(s) used.	-
	13e	Describe any methods used to explore possible causes of heterogeneity among study results (e.g. subgroup analysis, meta-regression).	-
	13f	Describe any sensitivity analyses conducted to assess robustness of the synthesized results.	-
Reporting bias assessment	14	Describe any methods used to assess risk of bias due to missing results in a synthesis (arising from reporting biases).	-
Certainty assessment	15	Describe any methods used to assess certainty (or confidence) in the body of evidence for an outcome.	-
RESULTS			
Study selection	16a	Describe the results of the search and selection process, from the number of records identified in the search to the number of studies included in the review, ideally using a flow diagram.	2; Figure 1
	16b	Cite studies that might appear to meet the inclusion criteria, but which were excluded, and explain why they were excluded.	2; Appendix SE

Study characteristics	17	Cite each included study and present its characteristics.	2-19
Risk of bias in studies	18	Present assessments of risk of bias for each included study.	19, Appendix SC and SD
Results of individual studies	19	For all outcomes, present, for each study: (a) summary statistics for each group (where appropriate) and (b) an effect estimate and its precision (e.g. confidence/credible interval), ideally using structured tables or plots.	Table 1 (pp.4-7), Table 2 (pp.9-12), Table 3 (pp.14-15), Figure 2 (p.16) and Figure 3 (p.21)
Results of syntheses	20a	For each synthesis, briefly summarise the characteristics and risk of bias among contributing studies.	-
	20b	Present results of all statistical syntheses conducted. If meta-analysis was done, present for each the summary estimate and its precision (e.g. confidence/credible interval) and measures of statistical heterogeneity. If comparing groups, describe the direction of the effect.	-
	20c	Present results of all investigations of possible causes of heterogeneity among study results.	-
	20d	Present results of all sensitivity analyses conducted to assess the robustness of the synthesized results.	-
Reporting biases	21	Present assessments of risk of bias due to missing results (arising from reporting biases) for each synthesis assessed.	-
Certainty of evidence	22	Present assessments of certainty (or confidence) in the body of evidence for each outcome assessed.	-
DISCUSSION			
Discussion	23a	Provide a general interpretation of the results in the context of other evidence.	19-22
	23b	Discuss any limitations of the evidence included in the review.	22
	23c	Discuss any limitations of the review processes used.	22
	23d	Discuss implications of the results for practice, policy, and future research.	19-22

OTHER INFORMATION			
Registration and protocol	24a	Provide registration information for the review, including register name and registration number, or state that the review was not registered.	23
	24b	Indicate where the review protocol can be accessed, or state that a protocol was not prepared.	23
	24c	Describe and explain any amendments to information provided at registration or in the protocol.	-
Support	25	Describe sources of financial or non-financial support for the review, and the role of the funders or sponsors in the review.	24
Competing interests	26	Declare any competing interests of review authors.	24
Availability of data, code and other materials	27	Report which of the following are publicly available and where they can be found: template data collection forms; data extracted from included studies; data used for all analyses; analytic code; any other materials used in the review.	-

From: Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ* 2021; 372: n71. doi: 10.1136/bmj.n71

For more information, visit: <http://www.prisma-statement.org/>

Board S2 Search Strategies

The following search strategy was used for each electronic database (PubMed, Scopus, and Scielo). The search term used was "*Limonium*".

PubMed	Limonium[TIAB]
Scopus	TITLE-ABS-KEY(Limonium)
Scielo	Limonium

Note: [TIAB]: title/abstract

Table S1 Evaluation of the risk of bias by the adapted SYRCLE's tool for *in vitro* studies

Authors, year	Was the allocation sequence adequately and applied?	Were the groups similar at baseline or were they adjusted for confounders in the analysis?	Was the allocation to the different groups adequately concealed during?	Were the cell culture housed during the experiment?	Were the caregivers and/or investigators blinded from knowledge which intervention each cell culture received during the experiment?	Were culture cell selected for outcome assessment?	Was the outcome assessor blinded?	Were incomplete outcome data adequately addressed?	Are reports of the study free of selective outcome reporting?	Was the study apparently free of other problems that could result in high risk of bias?
Tang et al. 2012	Yes	Unclear	Unclear	Yes	No	Yes	No	Unclear	Unclear	Unclear
Kong et al. 2014	Yes	Unclear	Unclear	No	No	Yes	No	Unclear	Unclear	Unclear
Tang et al. 2014	Yes	Unclear	Unclear	Yes	No	Yes	No	Unclear	Unclear	Unclear
Medini et al. 2015	Yes	Unclear	Unclear	Yes	No	Yes	No	Unclear	Unclear	Unclear
Bae et al. 2016	Yes	Unclear	Unclear	Yes	No	Yes	No	Unclear	Unclear	Yes
Rodrigues et al. 2016	Yes	Unclear	Unclear	Yes	No	Yes	No	Unclear	Unclear	Unclear
Bae et al. 2017	Yes	Unclear	Unclear	Yes	No	Yes	No	Unclear	Unclear	Yes
Chen et al. 2017	Yes	Unclear	Unclear	No	No	Yes	No	Unclear	Unclear	Yes
Cordeiro 2017	Yes	Unclear	Unclear	Yes	No	Yes	No	Unclear	Unclear	Unclear
Lee et al. 2017	Yes	Unclear	Unclear	Yes	No	Yes	No	Unclear	Unclear	Yes

Authors, year	Was the allocation sequence adequately and applied?	Were the groups similar at baseline or were they adjusted for confounders in the analysis?	Was the allocation to the different groups adequately concealed during?	Were the cell culture housed during the experiment?	Were the caregivers and/or investigators blinded from knowledge which intervention each cell culture received during the experiment?	Were culture cell selected for outcome assessment?	Was the outcome assessor blinded?	Were incomplete outcome data adequately addressed?	Are reports of the study free of selective outcome reporting?	Was the study apparently free of other problems that could result in high risk of bias?
Sahli et al. 2017	Yes	Unclear	Unclear	Yes	No	Yes	No	Unclear	Unclear	Unclear
Al-Madhagi et al. 2019	Yes	Unclear	Unclear	No	No	Yes	No	Unclear	Unclear	Unclear
Amrani et al. 2019	Yes	Unclear	Unclear	Yes	No	Yes	No	Unclear	Unclear	Unclear
Hamadou et al. 2019	Yes	Unclear	Unclear	Yes	No	Yes	No	Unclear	Unclear	Unclear
Rodrigues et al. 2020	Yes	Unclear	Unclear	Yes	No	Yes	No	Unclear	Unclear	Yes
Tuohongerbieke et al. 2021	Yes	Unclear	Unclear	Yes	No	Yes	No	Unclear	Unclear	Yes

Evaluation of the risk of bias by the SYstematic Review Centre for Laboratory animal Experimentation (SYRCLE's) tool adapted. The evaluation is done for each study and estimates the possibility of the existence of low or high risk of bias in their results. **Note:** Adapted from Hooijmans et al. (2014); Chierrito et al. (2019).

Table S2 Evaluation of the risk of bias by SYRCLE's tool for *in vivo* studies

Authors, year	Was the allocation sequence adequately and applied?	Were the groups similar at baseline or were they adjusted for confounders in the analysis?	Was the allocation to the different groups adequately concealed during?	Were the animals randomly housed during the experiment?	Were the caregivers and/or investigators blinded from knowledge which intervention each animal received during the experiment?	Were animals selected at random for outcome assessment?	Was the outcome assessor blinded?	Were incomplete outcome data adequately addressed?	Are reports of the study free of selective outcome reporting?	Was the study apparently free of other problems that could result in high risk of bias?
Lellau and Liebezeit 2003	Yes	Unclear	Unclear	Yes	No	Yes	No	Unclear	Unclear	Unclear
Tang et al. 2012	No	Unclear	Unclear	Unclear	No	Yes	No	Unclear	Unclear	Unclear
Rodrigues et al. 2016	Yes	Unclear	Unclear	Yes	No	Yes	No	Unclear	Unclear	Unclear

Evaluation of the risk of bias by the SYSystematic Review Centre for Laboratory animal Experimentation (SYRCLE's) tool. The evaluation is done for each study and estimates the possibility of the existence of low or high risk of bias in their results. **Note:** Adapted from Hooijmans et al. (2014).

Board S3 Studies excluded after full reading

Study (Authors, year)	Title	Reason for exclusion
Kawazoe et al. 2005	A novel drimane-type sesquiterpene from <i>Limonium wrightii</i>	Outcomes (not evaluate anticancer biological activity)
Awadh Ali et al. 2007	Screening of traditionally used endemic soqotraen plants for cytotoxic activity	Outcomes (not evaluate anticancer biological activity)
Kolumbaeva et al. 2007	Mutagenic effect of the rocket fuel component asymmetric dimethylhydrazine on rats of various ages	Outcomes (not evaluate anticancer biological activity)
Daraban et al. 2013	Assessment on bioeconomical potential for medicinal plants in salty meadows from the aradului plain (W. Romania)	Outcomes (not evaluate anticancer biological activity)
Erena et al. 2014	Determination of mutagenic and cytotoxic effects of <i>Limonium globuliferum</i> aqueous extracts by Allium, Ames, and MTT tests	Outcomes (not evaluate anticancer biological activity)
Eren et al. 2015	A mutagenicity and cytotoxicity study of <i>Limonium effusum</i> aqueous extracts by Allium, Ames and MTT tests	Outcomes (not evaluate anticancer biological activity)
Eren et al. 2016	Mutagenic and cytotoxic activities of <i>Limonium globuliferum</i> methanol extracts	Outcomes (not evaluate anticancer biological activity)
Lee et al. 2017	Identification of hepatoprotective constituents in <i>Limonium tetragonum</i> and development of simultaneous analysis method using high-performance liquid chromatography	Outcomes (not evaluate anticancer biological activity)
Lovinskaya et al. 2017	Antigenotoxic activity of biologically active substances from <i>Inula britannica</i> and <i>Limonium gmelini</i>	Outcomes (not evaluate anticancer biological activity)
Eren et al. 2019	Effects of <i>Limonium effusum</i> ethanol extracts on cell proliferation and mutagenicity	Outcomes (not evaluate anticancer biological activity)
Mandrone et al. 2019	Sardinian plants with antimicrobial potential. Biological screening with multivariate data treatment of thirty-six extracts	Outcomes (not evaluate anticancer biological activity)
Hamadou et al. 2021	<i>Limonium duriusculum</i> (de Girard) Kuntze Exhibits Anti-inflammatory Effect Via NF- κ B Pathway Modulation	Outcomes (not evaluate anticancer biological activity)

Study (Authors, year)	Title	Reason for exclusion
Ahmed et al. 1999	An anticancer tannin and other phenolics from <i>Limonium axillare</i> (Fam. Plumbaginaceae)	Study design (notes)
Aniya et al. 2018	Development of bioresources in Okinawa: Understanding the multiple targeted actions of antioxidant phytochemicals	Study design (review)
Kandil et al. 2000	A new flavonoid from <i>Limonium axillare</i>	Study design (notes)
Masuda et al. 2002	Flow cytometric estimation on cytotoxic activity of leaf extracts from seashore plants in subtropical Japan: Isolation, quantification and cytotoxic action of (-)-	Intervention (not evaluate crude extract, fractions, subfractions or isolated substances of <i>Limonium</i> species)
Zhang et al. 2014	Isolation and structural analysis of the polysaccharides of <i>Limonium bicolor</i> and the inhibition to Hela cell	Idiom (Non-Roman characters)

Figure S1 Chemical structures of isolated compounds of *Limonium* species drawn by ChemDraw version 14.0.0.118

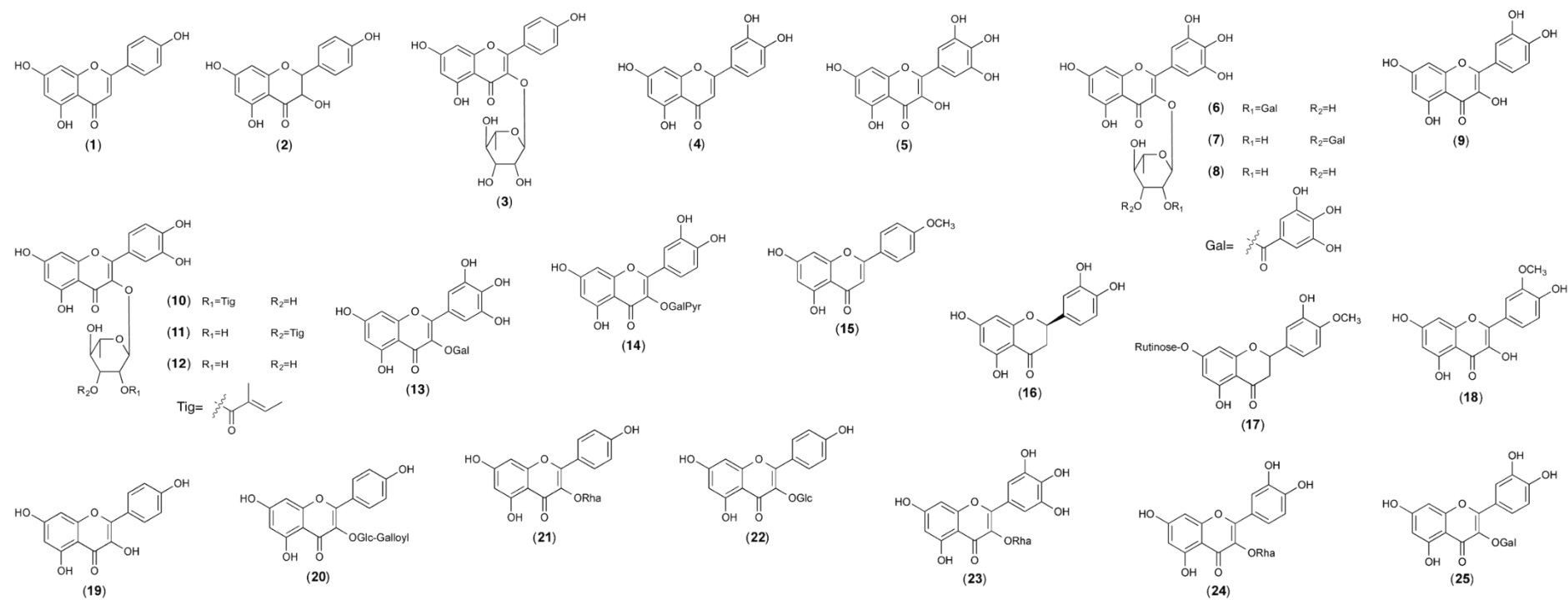


Figure S1 Continued

Figure S1 Continued

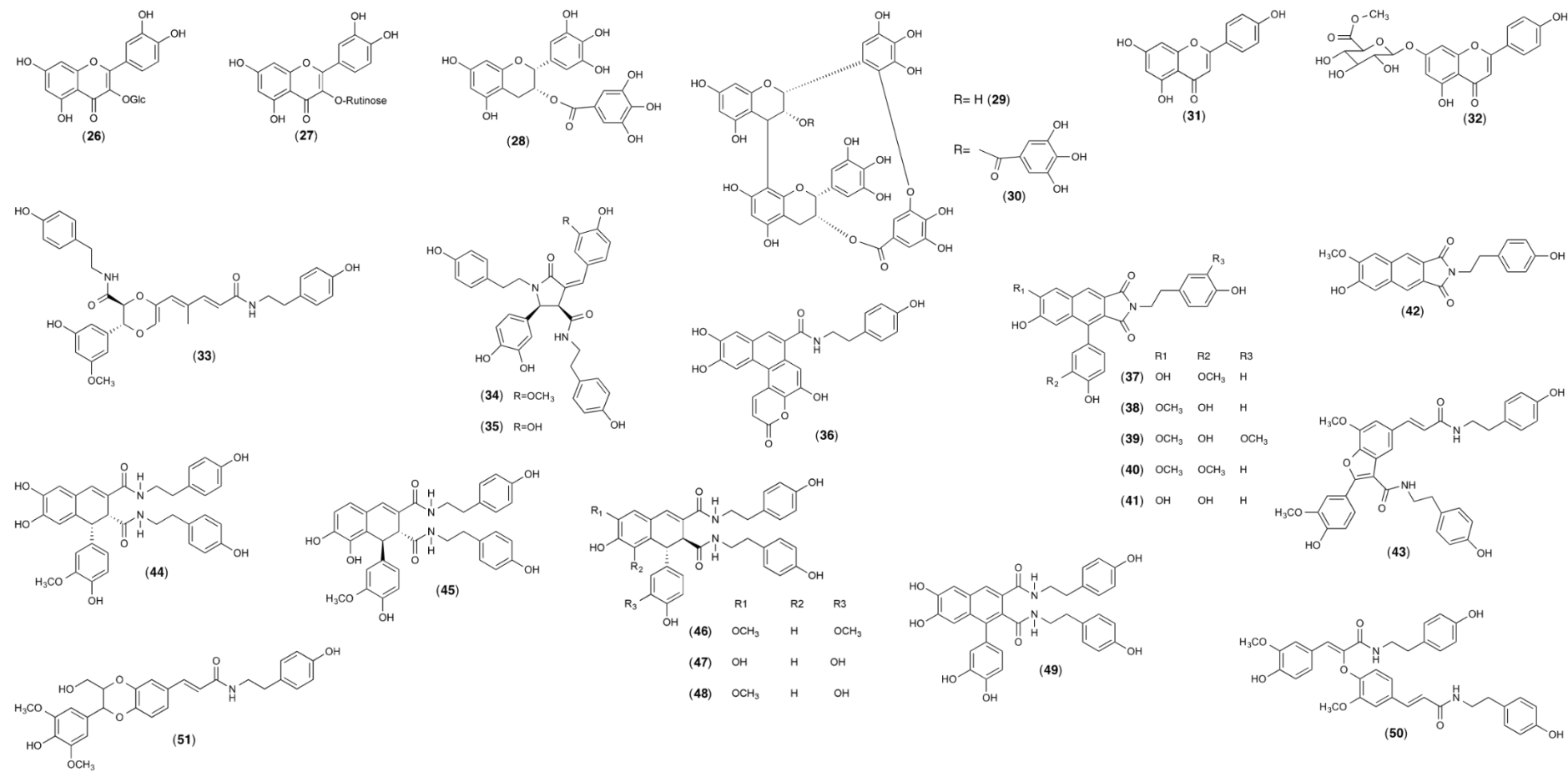


Figure S1 Chemical structures of isolated compounds 1-51 of *Limonium* species investigated for their cytotoxicities.

Table S3 Checklist for reporting data on plant material for pharmacognostic studies.

Checklist Item	Reported on page nº
Plant Material	
Date of plant collection (day, month, year)	
Place of plant collection (City, State, Country)	
Coordinates of plant collection (Latitude and Longitude)	
Voucher specimen number	
Name of the Herbarium code (Index Herbarium)	
Name of the person responsible for the collection and identification of the species	
The complete, correct, and accepted scientific name of the specimen *Suggestion: use of International Plant Names Index (IPNI) site (https://www.ipni.org/); <i>Flora do Brasil</i> (http://floradobrasil.jbrj.gov.br/); Royal Botanic Gardens, Kew (https://powo.science.kew.org)	
Crude Extract Production	
Part of the plant used	
Solvent and volume used	
Plant and solvent proportion (w/v)	
Method of extraction	
Time of extraction	
Temperature of extraction	
Yield of crude extract	
Fraction Production	
Solvent and volume used	
Method of extraction	
Time of extraction	
Temperature of extraction	
Yield of fraction	

5. CAPÍTULO 2

ANÁLISE FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DA FRAÇÃO SEMIPURIFICADA OBTIDA DO RIZOMA DE *Limonium brasiliense*

Phytochemical analysis and evaluation of the anti-proliferative activity of isolated compounds of semi-purified fraction obtained from the *Limonium brasiliense* rhizome

Naiara Cássia Gancedo^a, Natalia Castelhana de Oliveira^a, Raquel Isolani^a, Daniela Cristina de Medeiros Araújo^b, Danielly Chierrito^a, Celso Vataru Nakamura^c, João Carlos Palazzo de Mello^{a,*}

^a*Departamento de Farmácia, Laboratório de Biologia Farmacêutica, Palafito, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil*

^b*Departamento de Farmácia, Centro Universitário Ingá, Maringá, Brasil*

^c*Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil*

*Autor para correspondência. Departamento de Farmácia, Laboratório de Biologia Farmacêutica, Palafito, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, BR-87020-900, Maringá, PR, Brasil.

E-mail: mello@uem.br (J.C.P. de Mello)

RESUMO

Limonium brasiliense (Boiss.) Kuntze, Plumbaginaceae, é uma espécie vegetal conhecida popularmente por “baycuru, guaycuru ou guaycurá”. É uma planta encontrada na região litorânea dos estados do Sul e Sudeste do Brasil, principalmente em terrenos baixos e banhados por águas salinas. O uso popular de *L. brasiliense* tem como farmacógeno os rizomas. O objetivo deste estudo foi realizar a separação, isolamento e identificação de substâncias polifenólicas presentes na fração semipurificada do rizoma de *L. brasiliense*. Para isso, diferentes técnicas cromatográficas e de espectroscopia foram utilizadas, incluindo cromatografia em coluna, cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e ^{13}C), polarimetria, dicroísmo circular e espectrometria de massas. O teor de umidade ($11,82\% \pm 0,0472$, CV% 0,39) da droga vegetal apresentou-se adequado, assim como os rendimentos do extrato bruto (31,25%) e da fração acetato de etila (9,43%). A cromatografia em coluna resultou em 27 subfrações e permitiu a separação de diferentes substâncias fenólicas provenientes da fração acetato de etila de *L. brasiliense*. Os resultados confirmam a eficiência das técnicas utilizadas, a qualidade do material vegetal e o isolamento da substância epigallocatequina-3-*O*-galato (EGCG; pureza $91,45 \pm 0,8357\%$, CV% 0,91), além da presença das substâncias semipurificadas samarangenina A e B. Os resultados dos estudos *in vitro* reforçam o potencial de *L. brasiliense* como fonte de substâncias com atividade antiproliferativa contra linhagens celulares de câncer de próstata, além de servir de base para estudos futuros relacionados a compreensão do possível mecanismo de ação das substâncias samarangenina B e EGCG.

PALAVRAS-CHAVE: Citotoxicidade, Fitoquímica, Métodos Cromatográficos, Polifenóis, Plumbaginaceae.

ABSTRACT

Limonium brasiliense (Boiss.) Kuntze, Plumbaginaceae, is a plant species popularly known as “baycuru, guaycuru ou guaycurá”. It is a plant found in the coastal region of the Southern and Southeastern states of Brazil, mainly in lowlands and bathed by saline water. The popular use of *L. brasiliense* has rhizomes as pharmacogen. The main of this study was to perform the separation, isolation and identification of polyphenolic compounds present in the semi-purified fraction of *L. brasiliense* rhizome. In this way, different chromatographic and spectroscopy techniques were used, including column chromatography, thin layer chromatography, high performance liquid chromatography, nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H and ^{13}C NMR), polarimetry, circular dichroism, and mass spectrometry. The water content ($11.82\% \pm 0.0472$, RSD% 0.39) of the herbal material was adequate as well as the yields of the crude extract (31.25%) and ethyl acetate fraction (9.43%). Column chromatography resulted in 27 subfractions, and allowed the separation of different phenolic substances from the ethyl acetate fraction of *L. brasiliense*. The results confirm the efficiency of the techniques used, the quality of the herbal material, and the isolation of the substance epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG; purity $91.45 \pm 0.8357\%$, RSD% 0.91), in addition to the presence of the semi-purified substances samarangenin A and B. The results of the *in vitro* studies reinforce the potential of *L. brasiliense* as a source of compounds with antiproliferative activity against prostate cancer cell lines, in addition to serving as a basis for future studies related to understanding the possible mechanism of action of samaragenin B and EGCG.

KEYWORDS: Cytotoxicity, Phytochemistry, Chromatographic Methods, Polyphenols, Plumbaginaceae.

1 INTRODUÇÃO

Limonium brasiliense (Boiss.) Kuntze é considerada uma erva terrícola, não endêmica, popularmente conhecida como “baycuru, guaycuru e guaycurá”. A espécie está presente nas regiões Sudeste (Rio de Janeiro) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina), nos domínios fitogeográficos da Mata Atlântica e Pampa, e nas vegetações de Manguezal e de Restinga do Brasil (FUNEZ, 2023).

A espécie foi inicialmente descrita como *Statice brasiliense* Boiss na *Flora Brasiliensis*, produzida entre 1840 e 1906 pelos editores Carl Friedrich Philipp von Martius, August Wilhelm Eichler e Ignatz Urban (FLORA BRASILIENSIS, 2021). Em 1920, o farmacêutico Rodolpho Albino Dias da Silva (1889-1931) descreveu as características botânicas de *L. brasiliense* no primeiro número do “Boletim da Associação Brasileira de Farmacêuticos” e após, na primeira edição da Farmacopeia Brasileira (1929). Por fim, as características morfológicas e anatômicas do rizoma de *L. brasiliense*, por vezes erroneamente designado na literatura como raiz, foram descritas por Antonelli-Ushirobira et al. (2015a), contribuindo com a caracterização do farmacógeno e, conseqüentemente, com o controle de qualidade botânico da espécie. Nesse sentido, para uma melhor descrição, Gancedo et al. (2018) analisaram as principais características morfológicas e anatômicas das folhas desta espécie.

Popularmente, o rizoma de *L. brasiliense* era empregado na forma de decocto e utilizado para diversas finalidades, como antisséptico em infecções genito-urinárias, diurético, antirreumático, no tratamento de artrite, úlceras, na hemorragia intestinal e diarreia crônica (COIMBRA, 1958; REITZ, 1965; CRUZ, 1982; MOURA, 1984; CARDOSO, 1990). Já os extratos brutos (EB) eram recomendados para normalizar os períodos menstruais em mulheres com atraso ou irregularidades na menstruação (LIFCHITZ, 1981). Blainski (2010) e Antonelli-Ushirobira (2015b) determinaram que o EB de *L. brasiliense* apresenta baixa ou inexistente toxicidade, conforme as doses avaliadas em estudo *in vivo*, com provável ação no sistema reprodutor feminino. Outros estudos comprovaram a atividade inibitória do extrato hidroacetônico de *L. brasiliense* contra o principal fator de virulência da bactéria *Porphyromonas gingivalis* (CALEARE et al., 2017), e confirmaram o potencial antibacteriano dos extratos de *L. brasiliense* contra bactérias Gram-positivas resistentes, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) e *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (VRE_{fm}) (BLAINSKI et al., 2017a).

Cardoso (1990), demonstrou que *L. brasiliense* apresentava em sua composição química taninos hidrolisáveis e condensados. Para o extrato metanólico desta espécie foram confirmados a presença de metabólitos com atividade antioxidante, incluindo miricetina-3-*O*- α -raminopiranosídeo, epigalocatequina, ácido gálico, galocatequina e epigalocatequina-3-*O*-galato (MURRAY et al., 2004).

Estudos fitoquímicos isolaram e identificaram de *L. brasiliense* as substâncias ácido gálico, miricetina-3-*O*- α -*L*-ramnosídeo, miricetina-3-*O*- β -*D*-galactosídeo-6"-galato, galocatequina, 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 samarangéninas A e B (BLAINSKI, 2016; CALEARE et al., 2017; BLAINSKI et al., 2017b; ISOLANI, 2019).

Devido os dados da etnofarmacologia, do potencial terapêutico e da diversidade química de *L. brasiliense*, este estudo objetivou realizar a separação, o isolamento e a identificação das substâncias polifenólicas presentes na fração semipurificada do rizoma de *L. brasiliense*, empregando-se diferentes técnicas cromatográficas e espectroscópicas, além de avaliar a atividade antiproliferativa de substâncias isoladas do rizoma de *L. brasiliense*, em linhagens celulares de câncer de prostata.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

O rizoma de *L. brasiliense* foi coletado em fevereiro de 2013, na Ilha dos Marinheiros (31°59'33" S, 52°10'43" W, altitude 9 m), município de Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil. A exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Maringá (HUEM, n° 27725). A coleta foi realizada mediante autorização do IBAMA-SISBIO (n° 11995-3, de 2 de novembro de 2010, com código de autenticação 46367613), sob a responsabilidade de João Carlos Palazzo de Mello. O acesso ao material botânico foi autorizado e licenciado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), registrado sob n°. 010252/2015-0. A identificação, ao nível específico, foi realizada pela Prof. Dra. Lilian Auler Mentz da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

2.1.1 Secagem e Moagem

O material vegetal foi seco em estufa de circulação forçada de ar (37,0 \pm 2 °C), fragmentado em moinho de martelos (Tigre ASN-6), e acondicionado ao abrigo da luz e umidade (BLAINSKI, 2016).

2.2 PREPARO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES

2.2.1 Determinação do teor de umidade: balança por infravermelho

O procedimento foi realizado seguindo a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira (2019). Pesou-se cerca de 1 g da amostra distribuída uniformemente no coletor de alumínio contido dentro do aparelho. Utilizaram-se o tempo de 30 min e a temperatura de secagem de 105 °C. A análise foi realizada em triplicata.

2.2.2 Extrato bruto (EB)

O rizoma de *L. brasiliense* foi submetido ao processo de extração por turbólise (Ultra-Turrax[®], UTC115KT, Ika[®] Works, 3000 rpm, 4 vezes de 5 min, temperatura < 40,0 °C), utilizando-se 1 kg da droga vegetal cominuída e acetona:água (7:3, v/v) na proporção de droga vegetal: líquido extrator (1:10, p/v). O extrato líquido foi filtrado em funil de Büchner, sob pressão reduzida. O filtrado foi concentrado em evaporador rotatório (Büchi[®] R-200), sob pressão reduzida, até eliminação de todo o solvente orgânico. O extrato foi congelado com nitrogênio líquido e liofilizado (Christ[®] alpha 1-2), obtendo-se o EB. A extração foi realizada duas vezes, totalizando 2 kg de droga vegetal (MELLO; PETEREIT; NAHRSTEDT, 1996; BLAINSKI, 2016).

2.2.3 Partição líquido-líquido a partir do extrato bruto

Dissolveram-se 50 g do EB em 500 mL de água destilada, proporção 1:10 (p/v) e, adicionaram-se 500 mL de acetato de etila em funil de separação para a realização da partição. O procedimento foi repetido por duas vezes, durante três dias, totalizando 300 g de EB particionado. Após a primeira extração, a fase acetato de etila foi separada e reservada. A fase aquosa foi retornada ao funil de separação, adicionando-se 500 mL de acetato de etila, repetindo-se este processo por mais nove vezes, totalizando dez extrações. As fases acetato de etila foram reunidas e concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida (Büchi[®] R-200), até eliminação de todo o solvente orgânico. Após, as fases acetato de etila concentradas foram congeladas com nitrogênio líquido e liofilizadas (Christ[®] alpha 1-2), assim como as fases aquosas, obtendo-se a fração acetato de etila (FAE) e a fração aquosa (FAQ) (MELLO; PETEREIT; NAHRSTEDT, 1996; BLAINSKI, 2016).

2.3 ANÁLISE DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Para determinação do perfil químico da FAE, empregou-se o método de CLAE validado por Blainski et al. (2017b). A FAE foi preparada na concentração de 200 µg/mL na mistura de metanol:água (1:1, v/v), homogeneizada e centrifugada por 40 min (2010 x g). A análise por CLAE foi realizada em cromatógrafo Waters, equipamento composto por um sistema de injetor automático, bomba, detector espectrofotométrico de arranjo de diodos (DAD 200-400 nm), desgaseificador e software controlador (*Waters Empower[®] 3*).

A separação foi realizada em coluna C18 (Agilent Zorbax, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm), com vazão de 0,4 mL/min, detecção por ultravioleta (UV) à 210 nm e volume de injeção de 10 µL. Para a fase móvel, utilizaram-se água:ácido fosfórico concentrado (100:0,2, v/v, solvente A) e acetonitrila:ácido fosfórico concentrado (100:0,2, v/v, solvente B), empregando-se o seguinte sistema gradiente de eluição: 0 min 10%

de B; 15 min 15% de B; 35 min 19% de B; 36 min 80% de B; 44 min 80% de ; 45 min 100% de B; 52 min 10% de B e, o gradiente de temperatura: 0 a 18 min 24 °C; 18 a 45 min 35 °C e 45 a 52 min 24 °C (BLAINSKI et al., 2017b).

O método anteriormente descrito foi utilizado com modificações (temperatura isocrática: 25,0 °C e cromatógrafo Ultimate 3000[®] da Thermo Scientific, *software Chromeleon[®]*) para a determinação do teor dos marcadores epigalocatequina-3-*O*-galato, samarangenina A e samarangenina B (ISOLANI, 2019) na FAE de *L. brasiliense*.

2.4 ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS A PARTIR DA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA

2.4.1 Cromatografia em coluna (CC)

A FAE foi fracionada empregando-se uma coluna de vidro (altura: 750 mm e diâmetro: 55 mm) contendo Sephadex[®] LH-20 (Pharmacia) como fase estacionária. Empregou-se a sequência de fases móveis: etanol, metanol e acetona/água (7:3, v/v). A coluna cromatográfica foi previamente limpa e estabilizada com etanol puro.

Com o auxílio de pipeta Pasteur, foram adicionados na coluna 15,0 g de FAE, previamente diluída com 50,0 mL de etanol. Após aproximadamente 3 h, a amostra foi completamente introduzida na fase estacionária e, então, iniciou-se a separação dos componentes utilizando a primeira fase móvel.

As amostras foram coletadas em tubos de ensaio, fluxo de 1 mL/min, no volume de 10 mL/tubo, e simultaneamente monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) (Seção 2.4.2), sendo os perfis semelhantes reunidos. As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida (Büchi[®] R-200) até eliminação total do solvente orgânico, congeladas e liofilizadas (MELLO; PETEREIT; NAHRSTEDT, 1996).

2.4.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A CCD foi realizada em cromatofolhas de alumínio com gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck[®]) com 0,2 mm de espessura, utilizando-se como sistema eluente acetato de etila:ácido fórmico:água (90:5:5; v/v/v) (MELLO; SANTOS, 2017). Após a eluição e secagem, as substâncias aplicadas nas cromatofolhas foram visualizadas sob luz UV a 254 e 365 nm. A revelação química foi realizada com solução de cloreto férrico a 1% em metanol.

2.5 ANÁLISE ESTRUTURAL

2.5.1 Preparo das amostras

As subfrações obtidas a partir da CC (5, 9, 10, 11, 16, 17 e 18) foram preparadas na concentração de 1 mg/mL, dissolvendo-se 1 mg de cada amostra e solubilizando-as na mistura de água:acetonitrila (1:1,

v/v). As amostras solubilizadas foram centrifugadas durante 15 min (2046 x g) em minicentrífuga (K14-0602, Kasvi). O sobrenadante coletado foi utilizado para a análise de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLUE-EM/EM).

2.5.2 Análise de CLUE-IES-QToF-EM/EM

Cada subfração foi injetada no volume de 5 µL e analisada por CLUE (Shimadzu, Nexera X2, Japão) acoplada a um espectrômetro de massas de alta resolução com analisador do tipo quadrupolo acoplado com tempo de voo (Impact II, Bruker Daltonics Corporation, Alemanha) equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (IES).

A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Cortecs T3 C18 (Waters, EUA, 2,7 µm, 3 × 100 mm), acoplada com pré-coluna (Waters, EUA, 2,1 x 5 mm), a uma vazão de 0,2 mL/ min. Para a fase móvel, utilizaram-se água:ácido fórmico concentrado (100:0,1; v/v, solvente A) e acetonitrila:ácido fórmico concentrado (100:0,1; v/v, solvente B), empregando-se o seguinte sistema gradiente de eluição: 0 min 10% de B; 5 min 15% de B; 15 min 19% de B; 16 min 80% de B; 20 min 80% de B; 21 min 10% de B e 25 min 10% de B, na temperatura de 30 °C, sendo os cinco minutos finais destinados à reconstituição da coluna para a próxima análise. O instrumento foi calibrado usando uma solução de formiato de sódio (10 mmol/ L; isopropanol: água; 1:1; vv) contendo 50 µL de ácido fórmico concentrado. A fonte de ionização foi operada no modo de ionização positivo e negativo, e ajustada para 4500 V, com uma extremidade potencial da placa de -500 V. Os parâmetros de gás de secagem foram ajustados para 8 L/min a 200 °C, com uma pressão do gás de nebulização de 4 bar. Os dados foram obtidos na faixa de *m/z* 50 a 1500 com uma taxa de aquisição de 5 Hz. Os 5 íons mais intensos foram selecionados para fragmentação automática (Auto EM/EM). Os dados foram adquiridos pelo software Hystar Application versão 3.2 e Otof Control (Bruker Daltonics Corporation, Alemanha).

Os espectros de massas obtidos foram visualizados através do software DataAnalysis 4.3 (Bruker Daltonics Corporation, Alemanha) e comparados com a literatura. Considerou-se erro de massas inferior a 5 ppm.

2.5.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C (RMN)

Os espectros de RMN unidimensionais (1D) de hidrogênio (¹H) e carbono (¹³C) e bidimensionais (2D) de COSY, HSQC e HMBC foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance III, operando a 300 MHz para hidrogênios e 75 MHz para carbono. A substância isolada (50 mg) foi dissolvida em 750 µL de metanol deuterado (CD₃OD). Os resultados obtidos foram analisados e comparados com dados da literatura.

2.5.4 Polarimetria

A determinação da rotação óptica das amostras (c 1) foi realizada em polarímetro (JASCO®, P200), cubeta de 1 dm de comprimento, usando metanol como solvente a 25 °C e 589 nm. As análises foram realizadas em triplicata no Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho - NPPNS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), coordenado pela Profa. Dra. Hosana Maria Debonsi.

A rotação óptica específica foi calculada a partir da rotação óptica observada para a solução amostra, utilizando a seguinte equação (1):

$$[\alpha]_D^{25^\circ} = 100 \frac{\alpha}{lc} \quad (1)$$

Em que:

α = rotação observada corrigida, em graus, a 25 °C;

l = comprimento do tubo do polarímetro em decímetros (dm);

c = concentração da substância em porcentagem (p/v);

$[\alpha]_D^{25^\circ}$ = rotação óptica específica determinada a 25 °C e 589,3 nm (linha D da luz de sódio) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019).

2.5.5 Dicroísmo Circular

A análise de dicroísmo circular (DC) das amostras foi realizada em equipamento JASCO® (Modelo J-815), cubeta de 5 mm, utilizando metanol como solvente (grau HPLC) a 20 °C e 200-400 nm.

2.6 ATIVIDADE BIOLÓGICA *in vitro*

2.6.1 Cultura de células

Para os ensaios *in vitro* foram utilizadas linhagens epiteliais neoplásicas de próstata, PC-3 (ATCC CRL-1435) e LNCaP (ATCC CRL-1740); e a linhagem normal de próstata RWPE-1 (ATCC CRL-11609).

As células foram cultivadas em garrafas de cultivo celular de 75 cm² (CELLSTAR®), em 10 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute, Gibco®) para as linhagens LNCaP e PC-3, contendo L-glutamina e vermelho fenol, suplementado com 2,0 g/L de bicarbonato de sódio (NaHCO₃, Synth®) e 10% (v/v) de soro bovino fetal (SBF) (Gibco®); em 10 mL de meio de cultura Queratinócito (Gibco®), livre de SBF, suplementado com fator de crescimento epidérmico para a linhagem RWPE-1. Todas as linhagens foram mantidas com 1% (v/v) de solução antibiótico-antimicótico (Gibco®), contendo 10.000 U/mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B, sob condições de incubação de 37,0 °C em atmosfera úmida com 5,0% de CO₂ (CHIERRITO et al., 2019).

2.6.2 Atividade metabólica e viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo método MTT (brometo de [3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio]) (MOSMANN, 1983). Este ensaio se baseia na redução dos sais amarelos de tetrazólio (MTT) por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas, dando origem, intracelularmente, a cristais azuis (Formazan). A redução do MTT ocorre por meio de uma reação enzimática dependente de NADH, realizada principalmente pela enzima succinato desidrogenase.

As células foram tripsinizadas, ressuspensas em meio de cultura contendo 10% de SBF sem antibiótico. Em seguida, 100 µL de cada concentração celular foram transferidos para placa de cultura de 96 poços: LNCaP ($5,0 \times 10^5$ células/mL), PC3 ($2,5 \times 10^5$ células/mL) e RWPE-1 (4×10^5 células/mL), e mantidas por 24 h a 37,0 °C em atmosfera úmida com 5,0% de CO₂.

Decorrido o tempo de estabilização, o meio de cultura foi substituído e a monocamada celular foi tratada com 200 µL de cada substância, samarangenina B e EGCG, em diferentes concentrações (250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90; 1,95 e 0,98 µM), diluídos em meio sem SBF e antibiótico. As placas foram incubadas por 48 h a 37,0 °C em atmosfera úmida com 5,0% de CO₂. Ao término do tempo de tratamento, o sobrenadante foi removido e foram adicionados 200 µL de MTT (0,5 mg/mL). Após 4 h, removeu-se o sobrenadante e os cristais de Formazan foram solubilizados com 100 µL de DMSO/ poço. A absorvância foi mensurada em espectrofotômetro (EPOCH 2) a 570 nm. A porcentagem de destruição celular foi calculada segundo a equação (2):

$$(\%) \text{ de destruição celular} = 1 - (\text{Abs}_{\text{tratamento}} / \text{Abs}_{\text{CN}}) \times 100 \quad (2)$$

Onde: Abs_{Tratamento} é a absorvância do tratamento e Abs_{CN} é a absorvância do controle negativo.

Os valores do controle negativo foram considerados como 100% de viabilidade celular. Os experimentos foram realizados em triplicata e, no mínimo, quadruplicata técnica de cada condição.

2.6.3 Viabilidade celular

Em todos os experimentos foram utilizadas células em fase exponencial de crescimento e com viabilidade celular igual ou superior a 90%, determinada pela técnica de azul de Trypan, em câmara de Neubauer.

2.6.4 Índice de seletividade (IS)

O IS foi determinado realizando a razão da concentração necessária para inibir 50% da proliferação celular (CI₅₀) de cada tratamento entre as linhagens de células normais e neoplásicas, calculados por análise de regressão linear (INDRAYANTO; PUTRA; SUHUD, 2021). A linhagem celular com melhor atividade

antiproliferativa e maior índice de seletividade será considerada a mais promissora para a realização de análises futuras.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise fitoquímica da FAE

O pó do rizoma de *L. brasiliense* apresentou um teor de umidade residual de $11,82 \pm 0,0472\%$ (CV% 0,39), valor considerado adequado para o controle de qualidade da espécie, além de estar de acordo com o teor de $11,9 \pm 0,040\%$ (CV% 0,40) obtido por Blainski (2016). De modo geral, os teores de umidade residual de drogas vegetais podem estar entre 8 e 14%, exceto quando especificado em monografias de espécies descritas na Farmacopeia Brasileira (SOARES; FARIAS, 2017), assegurando a qualidade e a conservação da droga vegetal. Quando em excesso, o teor de umidade propicia o desenvolvimento de microrganismos e de reações de hidrólise, levando a degradação da matéria-prima. Dessa forma, o teor de umidade é uma análise importante para a determinação da qualidade do material vegetal (WHO, 2011; SOARES; FARIAS, 2017).

O rendimento médio do EB hidroacetônico de *L. brasiliense* foi de 31,25%, superior aos 27,6% obtidos por Blainski et al. (2017b). Em adição, a mistura de acetona:água (7:3; v/v) é considerada o melhor solvente de extração para o preparo do EB de *L. brasiliense*, resultando em maior teor de resíduo seco, taninos totais e polifenóis totais, como comprovado por Blainski et al. (2017b). A partir da partição líquido-líquido do EB foram obtidos 258,12 g de FAQ e 28,22 g de FAE, com um rendimento médio de 86% e 9,43%, respectivamente (Figura 1). Os rendimentos se mostraram satisfatórios e efetivos conforme resultados anteriores, com rendimentos médios de 86,2% e 72,4% para a FAQ, e 8,7% e 10,4% para a FAE (CALEARE, 2016; BLAINSKI et al., 2017b).



Figura 1. Partição líquido-líquido do extrato bruto de *Limonium brasiliense*. Partição com acetato de etila:água (1:1, v/v) em funil de separação (A). Concentração da fração acetato de etila em evaporador rotatório (B).

Ao reproduzirmos o método de CLAE definido e validado por Blainski et al. (2017b) foram obtidos o perfil cromatográfico da FAE (λ de 210 nm) e o cromatograma tridimensional (análise por espectro de varredura, λ entre 200-400 nm) (Apêndice A). O perfil cromatográfico da FAE foi semelhante ao obtido por Blainski et al. (2017b), comprovando a alta resolução, eficiência e sensibilidade do método.

A CC utilizando Sephadex[®] LH-20 como fase estacionária, permitiu a separação de diferentes substâncias presentes na FAE de *L. brasiliense*. Algumas amostras apresentaram coloração amarelada, enquanto outras avermelhada, alaranjada e, até mesmo, marrom (Figura 2). No início da separação foi observado a presença de um precipitado branco nos tubos 61-79.

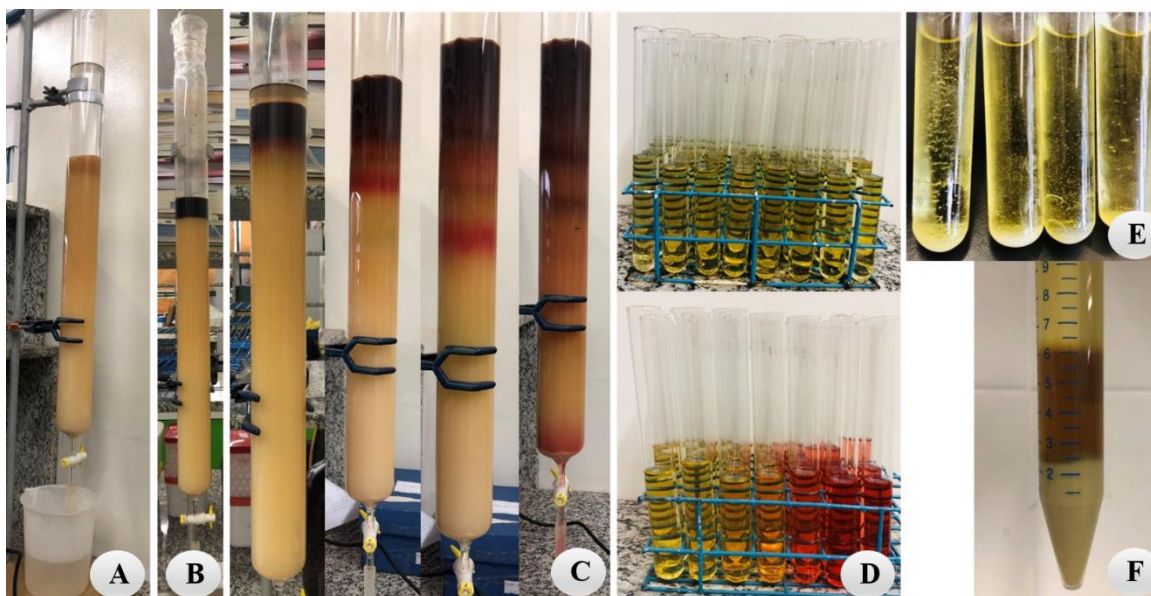


Figura 2. Cromatografia em coluna da fração acetato de etila de *Limonium brasiliense*. Limpeza e estabilização da coluna com etanol (A). Aplicação da amostra (B). Evolução da separação cromatográfica (C). Coloração das substâncias coletadas (D). Precipitado (E) e purificação por centrifugação (F).

O perfil de cada subfração foi analisado por cromatografia em camada delgada (CCD) e comparado com a FAE de *L. brasiliense*. De acordo com o perfil dos cromatogramas obtidos, pode-se sugerir que as subfrações contendo compostos com maior pureza foram: 5, 9, 11, 16, 17 e 18; a subfração 10 (possivelmente se trata de um composto isolado); a subfração 2 (contendo o precipitado) foi visualizada após revelação física em luz UV - λ de 365 nm (Apêndice B).

Ao todo foram coletados 2456 tubos, que após terem seus perfis cromatográficos analisados foram reunidos em 26 subfrações. A subfração 27 foi referente a coleta da fase móvel de limpeza acetona 70%. O rendimento total das 27 subfrações foi de 97,65%. O rendimento de cada subfração está descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Rendimentos das subfrações obtidas por separação cromatográfica da fração acetato de etila de *Limonium brasiliense*.

SUBFRAÇÃO	TUBOS	FASE MÓVEL	FRASCO (g)	FRAÇÃO (g)	RENDIMENTO (%)
1	1 - 60	Etanol	45,8318	0,3049	2,03
2*	61 - 79	Etanol	47,9041	0,0500	0,33
2	61 - 79	Etanol	46,8866	0,0170	0,11
3	80 - 99	Etanol	47,8510	0,3873	2,58
4	100 - 145	Etanol	45,3520	0,4742	3,16
5	146 - 185	Etanol	45,5745	0,7504	5,00
6	186 - 245	Etanol	47,2110	0,1462	0,97
7	246 - 325	Etanol	46,3500	0,3971	2,64
8	326 - 390	Etanol	44,4470	0,1227	0,81
9	391 - 445	Etanol	48,0591	0,3835	2,55
10	446 - 500	Etanol	47,8402	0,8172	5,44
11	501 - 555	Etanol	48,7625	0,2833	1,88
12	556 - 600	Etanol	47,3289	0,0611	0,40
13	601 - 645	Etanol	47,2142	0,0715	0,47
14	646 - 730	Etanol	46,8426	0,2603	2,40
			63,8316	0,1006	
15	731 - 865	Etanol	46,9846	0,5764	4,46
			62,3845	0,0940	
16	866 - 1045	Etanol	60,9703	2,1654	14,43
17	1046 - 1210	Etanol	61,4154	0,7695	5,13
18	1211 - 1460	Etanol	62,5547	0,4214	2,80
19	1461 - 1729	Etanol	62,0226	0,3177	2,11
20	1730 - 1780	Metanol	61,5927	0,1440	0,96
21.1	1781 - 1860	Metanol	60,3466	0,3760	2,50
21.2*	1825 - 1830		60,9346	0,1060	0,70
22	1861 - 1945	Metanol	62,1437	0,4853	3,23
23	1946 - 2120	Metanol	62,8410	0,7044	4,69
24	2121 - 2253	Metanol	64,1075	0,7946	5,29
25	2254 - 2355	Metanol	62,2926	0,3708	2,47
26	2356 - 2456	Metanol	64,2270	0,1964	1,30
27	Frasco único	Acetona 70%	60,8020	2,5221	16,81
TOTAL				14,6713	97,65

A subfração 2* é referente ao precipitado obtido direto da coluna.

A subfração 21.2* é proveniente do reservatório do coletor automático.

3.2 Análise estrutural das subfrações purificadas

As subfrações 5, 9, 10, 11, 16, 17 e 18 foram analisadas por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLUE-EM/EM) e os resultados encontram-se descritos nas Tabelas 1 e 2, respectivamente (Apêndice C). Na subfração 5 foi sugerido a presença de ácido gálico. Nas subfrações 9, 10 e 11 foi possível sugerir a presença de (epi)galocatequina-galato (EGCG), aparentemente pura na subfração 10 (pureza de $91,45 \pm 0,8357\%$, CV% 0,91). Para a subfração 16 foi sugerida a presença das substâncias samarangeninas A e B. Já as subfrações 17 e 18 possivelmente apresentam samarangenina B e dímeros de prodelfinidina. Tais resultados foram condizentes com os perfis de fragmentação e massa molecular das substâncias epigallocatequina-3-O-galato (EGCG), samarangenina

A e B, isoladas e identificadas em trabalhos realizados no Laboratório de Biologia Farmacêutica - Palafito (BLAINSKI, 2016; CALEARE et al., 2017; ISOLANI, 2019), metabólitos secundários de maior interesse neste estudo. Devido ao maior teor de pureza, realizou-se um estudo mais detalhado do perfil de fragmentação da subfração 10.

Na análise de EM da subfração 10, modo positivo de aquisição, pode-se visualizar no tempo de 8,00 min o íon protonado com m/z 459,09 $[M+H]^+$ compatível com a fórmula molecular $C_{22}H_{19}O_{11}^+$ e com a substância sugerida EGCG. A partir da fragmentação deste íon (EM/EM) foram identificados os fragmentos de m/z 289,07 e 139,03. O primeiro, de menor intensidade, foi referente a molécula de (epi)galocatequina. Já o segundo, de maior intensidade, foi originado a partir da fragmentação da (epi)galocatequina. O fragmento de m/z 153,01 foi originado a partir de uma unidade de ácido gálico (Apêndice C).

A EGCG também foi identificada na subfração 9, modo negativo de aquisição, tempo de retenção de 6,91 min e íon desprotonado com m/z 457,07 $[M-H]^-$, compatível com $C_{22}H_{17}O_{11}^-$. A presença da unidade de (epi)galocatequina foi confirmada pela perda do fragmento de 305,06 u . Já o ácido gálico foi sugerido devido a perda dos fragmentos de 169,01 u e 125,02 u , sendo o último originado pela perda de 44 u (CO_2) do ácido gálico (169 u) (Apêndice C).

Os deslocamentos químicos da análise de 1H RMN [δ 4,97 (1H, *s*, H-2), δ 5,53 (1H, *m*, H-3), δ 2,85-2,99 (2H, *dd*, H-4), δ 5,98 (2H, *s*, H-6 e H-8, anel A), δ 6,52 (2H, *s*, H-2' e H-6', anel B) e δ 6,96 (2H, *s*, H-2'' e H-6'', galato)] indicaram que a substância presente na subfração 10 é a epigalocatequina-3-*O*-galato (Figura 3; Figura 9 e Tabela 3, Apêndice D). Os respectivos dados estão de acordo com os publicados por Caleare et al. (2017).

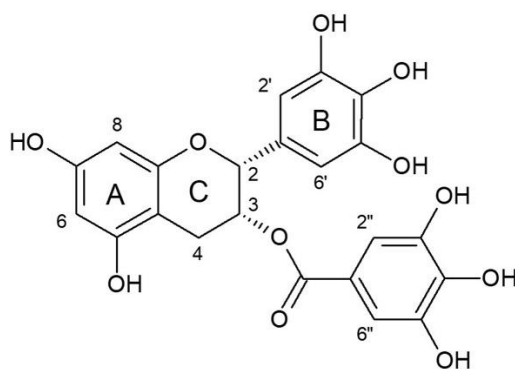


Figure 3. Estrutura química da epigalocatequina-3-*O*-galato.

O espectro de 1H - 1H COSY da substância EGCG (300 MHz, CD_3OD , TMS) confirmou os acoplamentos entre os H_3 e H_{4ax} , H_3 e H_{4eq} , H_3 e H_2 , H_6 e H_8 (anel A), H_2' e H_6' (anel B) e H_2'' e H_6'' (Figura 10 e Tabela 3, Apêndice D). Os deslocamentos químicos da análise de ^{13}C RMN foram [δ 26,8 (C-4), δ 69,9 (C-3), δ 78,5 (C-2), δ 95,9 e 96,5 (C-8 e C-6, anel A), δ 106,9 (C-2' e C-6', anel B), δ 110,2 (C-2'' e C-6'', galato) e δ

167,7 (C-O) (Figura 11 e Tabela 4, Apêndice D). Os resultados dos espectros bidimensionais de correlação de ^{13}C - ^1H HSQC e HMBC confirmam a posição de cada carbono e próton (Figura 12 e 13, Tabela 4, Apêndice D). Os resultados obtidos para EGCG são compatíveis com os dados descritos na literatura (DAVIS et al., 1996; MELLO et al., 1996; BLAINSKI, 2016).

A rotação óptica $[\alpha]_D^{25}$ -136,973 (metanol, c 1) e o espectro de DC (metanol, c 28 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 4) mostraram um efeito Cotton negativo entre 220-240 nm e um efeito Cotton negativo em 280 nm, característico para a configuração 2*R*,3*R* (MELLO, 1995). A substância EGCG representa 9,88% (p/p) da da FAE de *L. brasiliense* (Apêndice E).

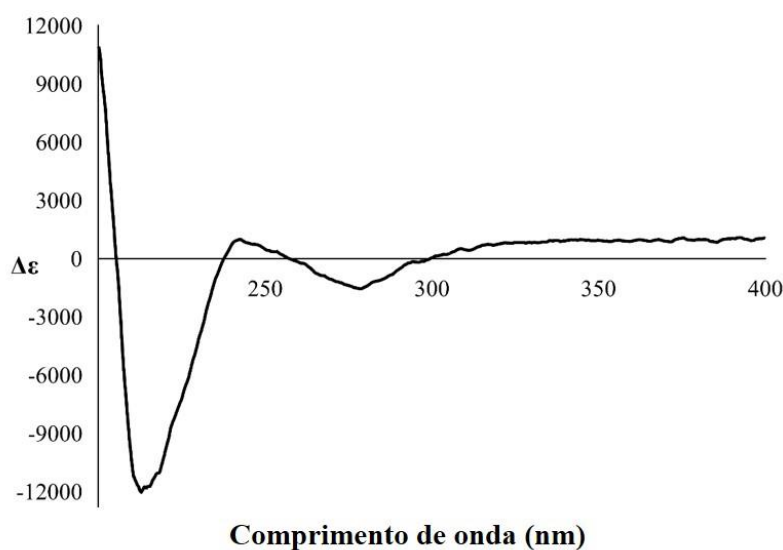


Figure 4. Espectro de dicroísmo circular da epigallocatequina-3-*O*-galato (metanol, c 28 $\mu\text{g/mL}$).

3.3 Citotoxicidade

As substâncias isoladas samarangenina B (ISOLANI, 2019) e EGCG foram avaliadas em relação a atividade citotóxica frente as linhagens celulares de câncer de próstata hormônio dependente (LNCaP) e não hormônio dependente (PC-3), além da linhagem celular normal de próstata (RWPE-1). Os valores de CI_{50} foram determinados e, a partir destes valores, o índice de seletividade (IS) foi calculado (Tabela 5). O IS pode ser definido como a razão entre a concentração citotóxica de uma substância em relação a concentração bioativa efetiva desta mesma substância (INDRAYANTO; PUTRA; SUHUD, 2021).

Tabela 2. Citotoxicidade das substâncias isoladas da fração acetato de etila do rizoma de *Limonium brasiliense*.

SUBSTÂNCIA	CI ₅₀ RWPE-1 (μ M) \pm DP	CI ₅₀ LNCaP (μ M) \pm DP	IS LNCaP	CI ₅₀ PC-3 (μ M) \pm DP	IS PC-3
Samarangenina B	92,45 \pm 7,1493	7,59 \pm 0,7398	12,18	62,80 \pm 1,3992	1,47
Epigallocatequina- 3-O-galato	60,45 \pm 3,5913	19,20 \pm 0,2146	3,15	117,90 \pm 5,4592	0,51

CI₅₀: concentração necessária para inibir 50% da proliferação celular; DP: desvio padrão; IS: índice de seletividade.

A substância samarangenina B apresentou um IS de 1,47 para a linhagem neoplásica PC-3 e foi doze vezes mais ativo para a linhagem neoplásica LNCaP (IS 12,18) do que para a linhagem normal RWPE-1, sendo considerada a mais ativa e seletiva. Além disso, a samarangenina B pode ser considerada uma substância citotóxica promissora para a linhagem neoplásica LNCaP, pois apresentou uma boa atividade citotóxica (CI₅₀ = 7,59 μ M). De acordo com Indrayanto et al. (2021), uma amostra com atividade citotóxica ideal deve apresentar uma concentração tóxica relativamente alta, uma concentração ativa muito baixa e um IS \geq 10. Alguns autores propõem o uso de valores de IS $>$ 2 (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991) e \geq 3 (WEERAPREEYAKUL et al., 2012). Este foi o primeiro estudo que avaliou a atividade antiproliferativa das substâncias isoladas do rizoma de *L. brasiliense*, samarangenina B e EGCG, frente linhagens celulares de câncer de próstata.

Para que os os ensaios *in vitro* sejam considerados promissores, estes devem apresentar como resultado valores de CI₅₀ abaixo de 100 μ g/mL para os extratos e menor que 25 μ M para as substâncias isoladas (COS et al., 2006). Em adição, substâncias isoladas que apresentam atividade citotóxica com valores de CI₅₀ entre 1 e 20 μ M, a atividade antiproliferativa é considerada boa ou muito forte (INDRAYANTO; PUTRA; SUHUD, 2020).

Cordeiro (2017) avaliou a citotoxicidade do extrato bruto, frações, subfrações e substâncias isoladas do rizoma de *L. brasiliense*, incluindo: EGCG, samarangenina A e samarangenina B. Os valores do IS da fração aquosa (FAQ) e acetato de etila (FAE) corresponderam a uma seletividade quatro vezes maior para a linhagem celular de leucemia promielocítica aguda (HL-60), quando comparado com as células normais (célula mononuclear do sangue periférico primário, PBMC). Para a linhagem celular HL-60 a atividade antineoplásica mais promissora foi observada após tratamento com as subfrações F e G (CI₅₀= 8,23 \pm 0,83; CI₅₀= 7,35 \pm 0,36 μ g/mL, respectivamente). A subfração G apresentou um valor de CI₅₀ de 7,92 \pm 0,86 μ g/mL para a linhagem celular de leucemia linfoblástica aguda (MOLT-4), enquanto que a substância isolada samarangenina A resultou em CI₅₀ de 29,24 \pm 17,64 μ g/mL para a linhagem de leucemia mieloide crônica (K562).

Ainda de acordo com os autores, para a análise de citometria de fluxo, uma menor concentração da subfração G (10 μ g/mL) foi necessária para induzir a morte celular por apoptose para a linhagem celular K562. Para a linhagem MOLT-4, as maiores porcentagens de morte celular por apoptose tardia (37,8%) e

necrose (24,7%) foram observadas com a subfração G na concentração 50 µg/mL, após 48 h de tratamento. A substância samarangenina A não ocasionou morte celular significativa nas concentrações analisadas. O possível mecanismo da ação antiproliferativa de extratos e frações de *L. brasiliense* pode estar relacionado com o efeito imunomodulatório, ao reduzir as interleucinas (IL) 6, 17A e 22, e a citocina interferon- γ (IFN- γ) (CORDEIRO, 2017).

Outros estudos que demonstram o potencial anticâncer e citotóxico de espécies de *Limonium* incluem as atividades inibitórias de metaloproteinase de matriz (MPPs) (BAE et al., 2016; BAE et al., 2017) e da melanogênese de *L. tetragonum* (Thunb.) Bullock (LEE et al., 2017). Entre as possíveis substâncias ativas desta espécie que podem inibir MPP, tem-se os flavonoides glicosilados miricetina-3-galactosídeo e quercetina-3-*O*- β -galactopiranosídeo (BAE et al., 2016; BAE et al., 2017; LEE et al., 2017). Al-Madhagi et al. (2019) avaliaram a capacidade citotóxica do extrato de éter de petróleo das folhas e flores de *L. sokotranum* (Vierh.) Radcl.-Sm para a linhagem de carcinoma hepatocelular (HepG2), com o valor de CI_{50} de $9,97 \pm 0,79$ µg/mL, semelhante ao controle positivo doxorrubicina. O extrato metanólico preparado a partir das folhas e flores de *L. sokotranum* apresentou a menor CI_{50} para a linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama (MCF-7).

A substância apigenina isolada de *L. duriusculum* (Girard) Kuntze apresentou o menor valor de CI_{50} para a linhagem celular humana de carcinoma de colorretal (HCT116), com CI_{50} de 25,74 µM. Para esta linhagem celular, o extrato *n*-butanólico e a apigenina promoveram apoptose, associada à sinalização reduzida de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), ativação da via de p53 e clivagem de poli(ADP-ribose) polimerase (PARP) (HAMADOU et al., 2019). O extrato acetato de etila e as linanamidas isoladas de *L. gmelinii* Kuntze apresentaram citotoxicidade moderada para a linhagem de adenocarcinoma cervical (HeLa), com CI_{50} de 25,25 µg/mL. Para a linhagem MCF-7, as substâncias isoladas de *L. gmelinii* apresentaram valores de CI_{50} variando de $14,14 \pm 1,08$ a $28,85 \pm 2,33$ µM (TUOHONGERBIEKE et al., 2021).

Na literatura científica, poucos são os trabalhos que relatam o potencial biológico da substância samarangenina B, estando relacionados com a atividade antiviral frente ao vírus *Herpes simplex* (HSV-1) (LIN; KUO; CHOU, 2000; KUO et al., 2002) e antibacteriana, contra *Porphyromonas gingivalis* (CALEARE et al., 2017). Recentemente, Pilatti et al. (2022) demonstraram que micropartículas de surelease/policarbofila contendo fração acetato de etila (FAE) de *L. brasiliense*, enriquecida com proantocianidinas (samarageninas A ($12,10 \pm 0,07$) e B ($21,05 \pm 0,44\%$), e EGCG ($13,44 \pm 0,27\%$), resultaram em uma redução de até $93 \pm 2\%$ da taxa de infecção por *P. gingivalis*, diminuição da atividade dos fatores de virulência específicos (proteases lisina e arginina-gengipaína) e diminuíram a formação de biofilme de *P. gingivalis* ($97 \pm 2\%$ a 60 µg/mL).

Já para a EGCG são descritos diversos estudos relacionados a atividade anticâncer (SINGH; SHANKAR; SRIVASTAVA, 2011; DU et al., 2012; ALMATROODI et al., 2020; ALAM et al., 2022). Provavelmente, isso ocorre pelo fato da EGCG ser o principal flavan-3-ol ativo presente no chá verde (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), com comprovada ação profilática e curativa de doenças, associada às propriedades antioxidante e anti-inflamatória. Diversos estudos confirmam a atividade anticancerígena da EGCG do chá verde em vários tipos de câncer, atuando por meio da inibição da carcinogênese, modulação de vias de sinalização celular, incluindo regulação da proliferação, apoptose, angiogênese e morte, além de um efeito sinérgico da EGCG com agentes quimiopreventivos, ao reduzir a toxicidade e aumentar os efeitos anticancerígenos. Contudo, apesar da eficácia e segurança da EGCG, comprovada em ensaios clínicos, um desafio para a utilização desta substância na prevenção do câncer está relacionado a baixa biodisponibilidade. Para superar este problema, estudos tem recorrido ao emprego da nanotecnologia, como encapsulamento, lipossoma, micelas, nanopartículas e outras formulações (ALMATROODI et al., 2020).

Neste contexto, as perspectivas futuras para a continuação deste trabalho, inclui a determinação do possível mecanismo de ação das substâncias EGCG e samarangenina B, para a linhagem celular LNCaP, devido aos resultados promissores obtidos a partir da avaliação da citotoxicidade. Para isso, pretende-se avaliar as alterações morfológicas e ultraestruturais das células, pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET); analisar o efeito *in vitro* destas substâncias sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e ânions superóxido mitocondrial; o potencial mitocondrial de membrana; a peroxidação lipídica; a integridade da membrana celular; a exposição de fosfatidilserina e, por fim, o ciclo celular. Dessa forma, após análise dos resultados, pretende-se sugerir o possível mecanismo relacionado com a atividade antiproliferativa das substâncias isoladas do rizoma de *L. brasiliense*.

4 CONCLUSÃO

De acordo com as análises realizadas, pode-se confirmar que os resultados obtidos a partir dos rizomas de *L. brasiliense* estão dentro dos limites definidos em estudos prévios para a espécie, comprovando a qualidade da matéria-prima. Assim como o extrato bruto, a fração acetato de etila e a fração aquosa, provenientes da partição líquido-líquido, apresentaram rendimentos satisfatórios.

A cromatografia em coluna da fração acetato de etila mostrou-se eficaz, separando de forma seletiva as substâncias presentes na amostra. Além disso, permitiu o isolamento e identificação da substância epigallocatequina-3-*O*-galato com grau de pureza satisfatório.

Os resultados promissores dos estudos *in vitro* reforçam o potencial de *L. brasiliense* como fonte de substâncias com atividade antiproliferativa, incluindo a samarangenina B e EGCG, principalmente, para a linhagem celular de câncer de próstata hormônio dependente (LNCaP).

Entretanto, estudos complementares são necessários para uma melhor compreensão do possível mecanismo de ação e toxicidade destas substâncias.

REFERÊNCIAS

ALAM, M.; ALI, S.; ASHRAF, G.M.; BILGRAMI, A.L.; YADAV, D.K.; HASSAN, M.I. Epigallocatechin 3-gallate: From Green Tea to cancer therapeutics. **Food Chemistry**, v. 379, p. 132135, 2022.

AL-MADHAGI, W.M.; HASHIM, N.M.; ALI, N.A.A.; OTHMAN, R. Phytochemical screening, cytotoxic and antimicrobial activities of *Limonium socotranum* and *Peperomia blanda* extracts. **Tropical Biomedicine**, v. 36, p. 11-21, 2019.

ALMATROODI, S.A.; ALMATROUDI, A.; KHAN, A.A.; ALHUMAYDHI, F.A.; ALSAHLI, M.A.; RAHMANI, A.H. Potential therapeutic targets of epigallocatechin gallate (EGCG), the most abundant catechin in Green Tea, and its role in the therapy of various types of cancer. **Molecules**, v. 25, p.3146, 2020.

ANTONELLI-USHIROBIRA, T.M.; BLAINSKI, A., GANCEDO, N.C.; GABURO, F., CARDOSO, K.A.K.; LEITE MELO, E.V.S.; MELLO, J.C.P.; MILANEZE-GUTIERRE, M.A. Morpho-anatomical study of rhizome of *Limonium brasiliense*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 320-327, 2015a.

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

BAE, M.J.; KARADENIZ, F.; LEE, S.; SEO, Y.; KONG, C. Inhibition of MMP-2 and MMP-9 activities by *Limonium tetragonum* extract. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 21, p. 38-43, 2016.

BAE, M.J.; KARADENIZ, F.; OH, J.H.; YU, G.H.; JANG, M.; NAM, K.; SEO, Y.; KONG, C. MMP-Inhibitory effects of flavonoid glycosides from edible medicinal halophyte *Limonium tetragonum*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1-8, 2017.

BLAINSKI, A. **Controle de qualidade farmacognóstico com análise cromatográfica quantitativa, planejamento estatístico de misturas com avaliação antibacteriana e estudos fitoquímicos de *Limonium brasiliense* (Baicuru)**. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, 2016. 152 p.

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

BLAINSKI, A.; GIONCO, B.; OLIVEIRA, A. G.; ANDRADE, G.; SCARMINIO, I. S.; SILVA, B. D.; LOPES, N. P.; MELLO, J. C. P. Antibacterial activity of *Limonium brasiliense* (Baicuru) against multidrugresistant bacteria using a statistical mixture design. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, p. 313-323, 2017a.

BLAINSKI, A.; ANTONELLI-USHIROBIRA, T.M.; GODOY, G.; LEITE-MELLO, E.V.S.; MELLO, J.C.P. Pharmacognostic evaluation, and development and validation of a HPLC-DAD technique

for gallic acid and epigallocatechin in rhizomes from *Limonium brasiliense*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n. 2, v. 27, p. 162-169, 2017b.

CALEARE, A.O.; HENSEL, A.; MELLO, J.C.P.; PINHA, A.B.; PANIZZON, G.P.; LECHTENBERG, M.; PETEREIT, F.; NAKAMURA, C.V. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Limonium brasiliense* inhibit the adhesion of *Porphyromonas gingivalis* to epithelial host cells by interaction with gingipains. **Fitoterapia**, v. 118, p. 87-93, 2017.

CARDOSO, M.L.C. **Limonium brasiliense (Boiss.) Kuntze, Plumbaginaceae (Baicuru): Desenvolvimento galênico de extratos**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1990. 101 f.

CHIERRITO, D.; VILLAS-BOAS, C.B.; TONIN, R.S.; FERNANDEZ-LLIMOS, F.; SANCHES, A.C.C.; MELLO, J.C.P. Using cell cultures for the investigation of treatments for Attention Deficit Hyperactivity Disorder: systematic review. **Current Neuropharmacology**, v. 17, n. 10, p. 916-925, 2019.

CORDEIRO, M.F. Avaliação das atividades imunomoduladora, antineoplásica e antibacteriana de rizomas de *Limonium brasiliense*, sementes de *Paullinia cupana* e cascas do caule de *Trichilia catigua*. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. Recife; 2017. 142 f.

COS, P.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 290-302, 2006.

COIMBRA, R. Notas de Fitoterapia. 2.ed. Rio de Janeiro: Silva Araújo, 1958. p. 63.

CRUZ, G.L. Dicionário das Plantas úteis do Brasil. 2.ed. Rio de Janeiro: DIFEL, 1982. p. 94.

DAVIS, A.L.; CAI, Y.; DAVIES, A.P.; LEWIS, J.R. ¹H and ¹³C NMR assignments of some green tea polyphenols. **Magnetic resonance in chemistry**, v. 34, p.887-890, 1996.

DIAS DA SILVA, R.A. Plantas Medicinaes do Brasil, O Guaycurú. Boletim da Associação Brasileira de Pharmaceuticos, v. 1, p. 4-14, 1920.

DU, G.-J.; ZHANG, Z.; WEN, X.-D., YU, C.; CALWAY, T.; YUAN, C.-S.; WANG, C.-Z. Epigallocatechin gallate (EGCG) is the most effective cancer chemopreventive polyphenol in Green Tea. **Nutrients**, v. 4, n. 11, p. 1679-1691, 2012.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, DF. Brasil. 2019.

FLORA BRASILIENSIS. Disponível em: <<http://florabrasiliensis.cria.org.br/index>>. Acesso em: 22 dez. 2021.

FOODB. Epigallocatechin 3-gallate. Disponível em: <https://foodb.ca/spectra/ms_ms/62149> Acesso em: 01 fev. 2022a.

FOODB. Epigallocatechin 3-gallate. Disponível em: <https://foodb.ca/spectra/ms_ms/118822> Acesso em: 01 fev. 2022b.

FUNEZ, L.A. 2020. *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. In: **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12938>>. Acesso em: 31 jan. 2023.

GANCEDO, N.C.; MEDEIROS, D.C.; MILANEZE-GUTIERRE, M.A.; MELLO, J.C.P. Morpho-anatomical characters of *Limonium brasiliense* leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, n. 5, v. 28, p. 513-519, 2018.

HAMADOU, M.H.; KERKATOU, M.; GATTO, P.; PANCHER, M.; BISIO, A.; INGA, A.; MENAD, A.; BENAYACHE, S.; BENAYACHE, F.; AMEDDAH, S. Apigenin rich *Limonium duriusculum* (de Girard) Kuntze promotes apoptosis in HCT116 cancer cells. **Natural Products Research**, v. 35, n. 17, p. 2910-2914, 2019.

INDRAYANTO, G.; PUTRA, G.S.; SUHUD, F. Validation of *in vitro* bioassay methods: Application in herbal drug research. In: AL-MAJED, A.A. (Ed.). Profiles of drug substances, excipients and related methodology, v. 46, 2021. p. 273-307.

ISOLANI, R.G. Avaliação da atividade de extratos e das substâncias isoladas de *Limonium brasiliense* contra Herpes Simplex Tipo I. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, 2019. 54 p.

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. 2854-2864, 2002.

LEE S., KARADENIZ F., SEO Y., KONG C. Anti-melanogenic effects of flavonoid glycosides from *Limonium tetragonum* (Thunb.) Bullock via inhibition of tyrosinase and tyrosinase-related proteins. **Molecules**, v. 22, p. 1-10, 2017.

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.

LIFCHITZ, A. **Plantas medicinales: Guia practico de Botânica Medicinal**. Buenos Aires: Kier, 1981.

MELLO, J.C.P. Untersuchung zur struktur der flavan-3-ole und proanthocyanidine aus der rinde von *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Mimosaceae). Inaugural-dissertation zur erlangung des doktorgrades der naturwissenschaften im fachbereich chemie der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster. 1995. 254 p.

MELLO, J.C.P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and prodelfinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 41, p.807-813, 1996.

MELLO, J.C.P.; SANTOS, S.C. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 235-248.

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

MOURA, T.F.A.L. **Sobre o *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, Plumbaginaceae, o baicuru da Farm. Bras. I**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1984. 146 f.

MURRAY, A.P.; RODRIGUEZ, S.; FRONTERA, M.A.; TOMAS, M.A.; MULET, M.C. Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. Zeitschrift fur Naturforschung. C, **Journal of Biosciences**, v. 59, p. 477-480, 2004.

PHARMACOPEIA BRASILEIRA. 1. ed., São Paulo: Nacional. 1929.

PILATTI, F.; ISOLANI, R.; VALONE, L.; PAULA, M.N.; CALEARE, A.O.; FERREIRA, S.B.S.; BRUSCHI, M.L.; ARAÚJO, D.C.M.; GUEDES, T.A.; HENSEL, A.; MELLO, J.C.P. Microstructured polymer system containing proanthocyanidin-enriched extract from *Limonium brasiliense* as a prophylaxis strategy to prevent recurrence of *Porphyromonas gingivalis*. **Planta Medica**, 2022.

REITZ, P.R. Plumbaginaceas. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí, 1965. p. 2-7.

SINGH, B.N.; SHANKAR, S.; SRIVASTAVA, R.K. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n. 12, p. 1807-1821, 2011.

SOARES, L.A.L.; FARIAS, M.R. Qualidade de insumos farmacêuticos ativos de origem natural. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R (Org.). **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 83-105.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays for Bioactivity. In: HOSTETTMANN, K. Methods in Plant Biochemistry. London: Academic Press. 1991.

SPACIL, Z.; NOVAKOVA, L.; SOLICH, P. Comparison of positive and negative ion detection of tea catechins using tandem mass spectrometry and ultra high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v.123, p. 535-541, 2010.

WEERAPREEYAKUL, N.; NONPUNYA, A.; BARUSRUX, S.; THITIMETHAROCH, T.; SRIPANIDKULCHAI, B. Evaluation of the anticancer potential of six herbs against a hepatoma cell line. **Chinese Medicine**, v. 7, n.1, p. 1-15, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Quality control methods for herbal materials. 2011. p. 33

MATERIAL SUPLEMENTAR

APÊNDICE A. ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA

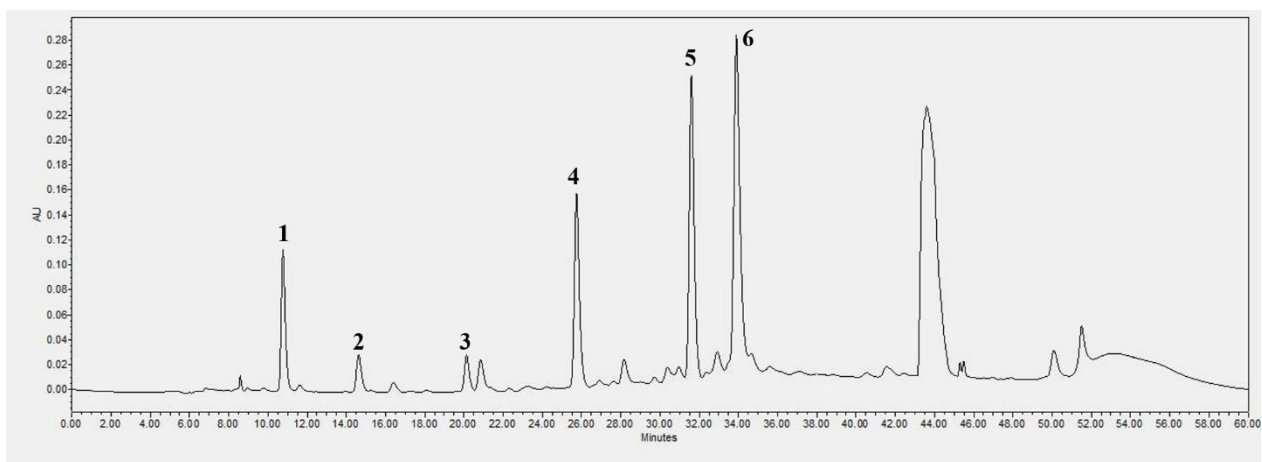


Figura 1. Perfil cromatográfico da fração acetato de etila de *Limonium brasiliense* pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência em 210 nm. 1. Ácido gálico. 2. Galocatequina. 3. Epigalocatequina. 4. Samarangenina A. 5. Epigalocatequina-3-*O*-galato. 6. Samarangenina B. Condições: coluna C18 (Agilent Zorbax, 250 mm x 4,6 mm, 5 μ m), vazão de 0,4 mL/min, tempo de análise de 60 min.

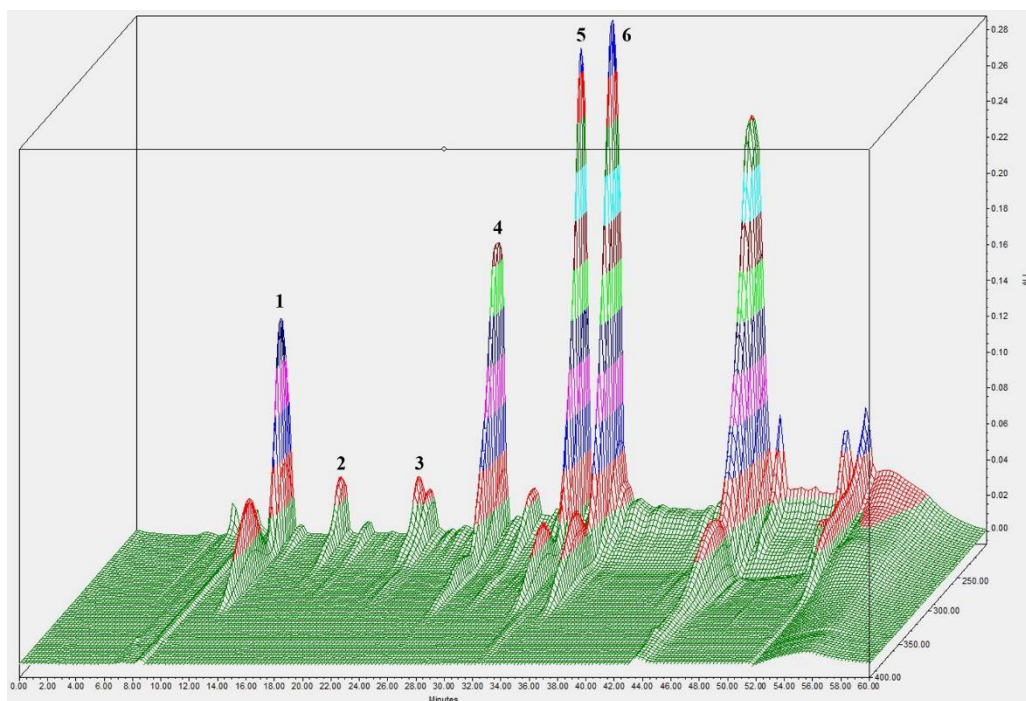


Figura 2. Perfil cromatográfico tridimensional da fração acetato de etila de *Limonium brasiliense* na faixa de comprimento de onda entre 200-400 nm. 1. Ácido gálico. 2. Galocatequina. 3. Epigalocatequina. 4. Samarangenina A. 5. Epigalocatequina-3-*O*-galato. 6. Samarangenina B.

APÊNDICE B. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS SUBFRAÇÕES

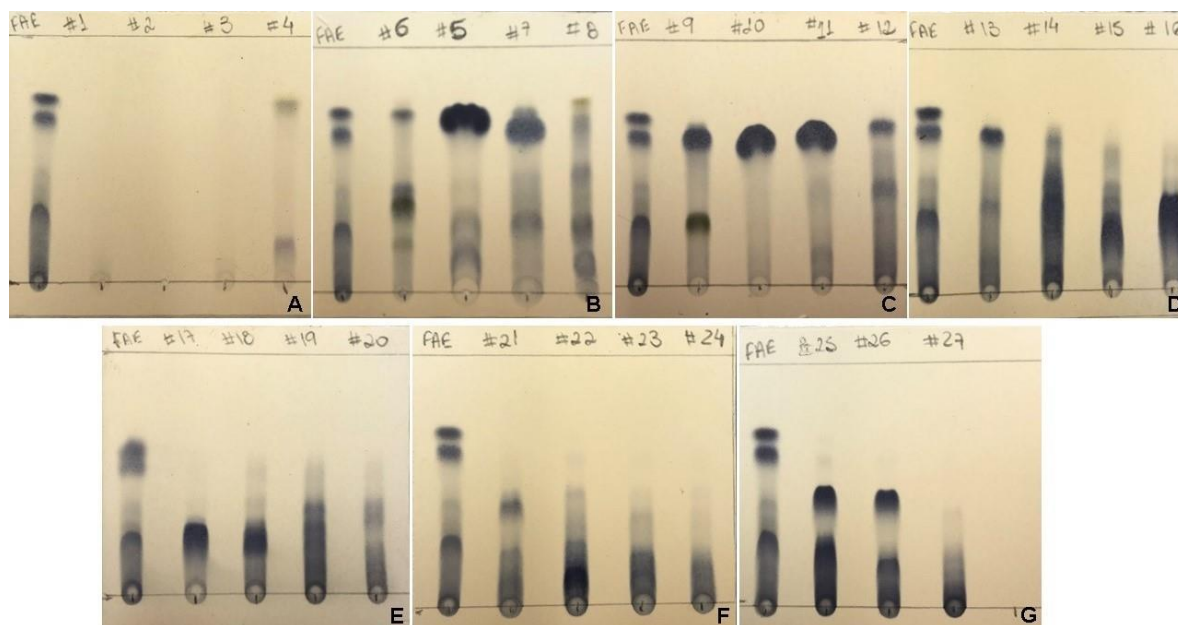


Figura 3. Perfil por cromatografia em camada delgada das subfrações provenientes da cromatografia em coluna da fração acetato de etila de *Limonium brasiliense*. FAE, 1, 2, 3 e 4 (A). FAE, 6, 5, 7 e 8 (B). FAE, 9, 10, 11 e 12 (C). FAE, 13, 14, 15 e 16 (D). FAE, 17, 18, 19 e 20 (E). FAE, 21, 22, 23 e 24 (F). FAE, 25, 26 e 27 (G). Revelação: solução a 1 % FeCl_3 hexa-hidratado em metanol (p/v).

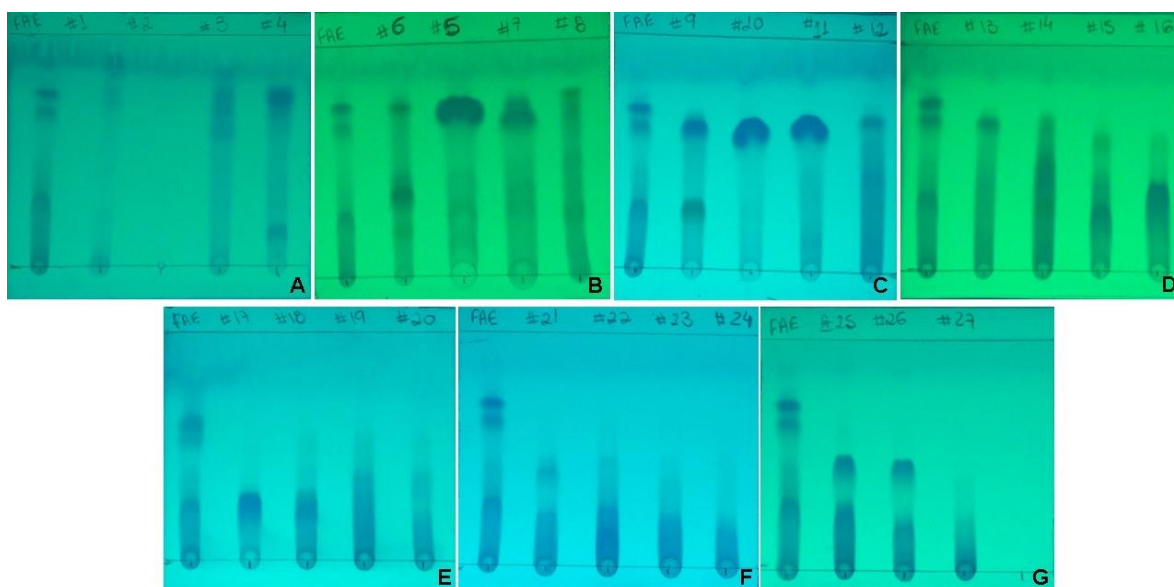


Figura 4. Perfil por cromatografia em camada delgada das subfrações provenientes da cromatografia em coluna da fração acetato de etila de *Limonium brasiliense*, reveladas sob luz a 254 nm. FAE, 1, 2, 3 e 4 (A). FAE, 6, 5, 7 e 8 (B). FAE, 9, 10, 11 e 12 (C). FAE, 13, 14, 15 e 16 (D). FAE, 17, 18, 19 e 20 (E). FAE, 21, 22, 23 e 24 (F). FAE, 25, 26 e 27 (G).

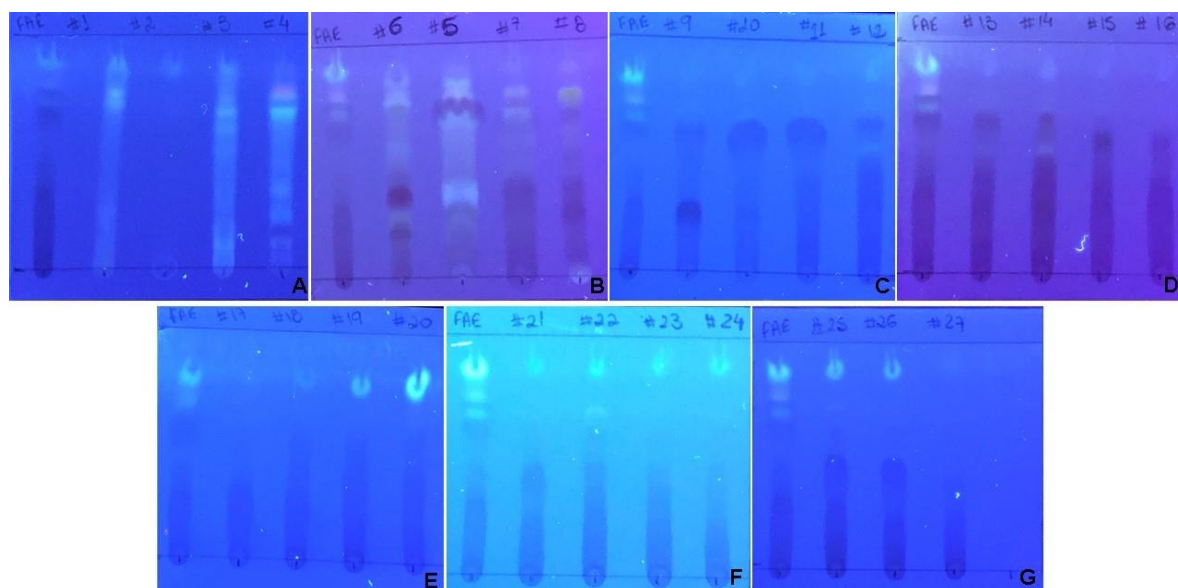


Figura 5. Perfil por cromatografia em camada delgada das subfrações provenientes da cromatografia em coluna da fração acetato de etila de *Limonium brasiliense*, reveladas sob luz a 365 nm. FAE, 1, 2, 3 e 4 (A). FAE, 6, 5, 7 e 8 (B). FAE, 9, 10, 11 e 12 (C). FAE, 13, 14, 15 e 16 (D). FAE, 17, 18, 19 e 20 (E). FAE, 21, 22, 23 e 24 (F). FAE, 25, 26 e 27 (G).

APÊNDICE C. ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Tabela 1 - Caracterização dos compostos sugeridos pela análise de CLUE-IES-Q-TOF-EM/EM (modo positivo) das subfrações semipurificadas do rizoma de *Limonium brasiliense*.

Subfração	Composto Sugerido	T _R (min)	Fórmula Molecular	[M+H] ⁺ (m/z)	Aduto	EM/EM (m/z)	Erro (ppm)	Literatura
5	Ácido gálico	2,05	C ₇ H ₇ O ₅ ⁺	171,02	[M+H] ⁺	153,01	4,9	Ácido gálico (CALEARE, 2016)
9	(Epi)galocatequina-galato	6,96	C ₂₂ H ₁₉ O ₁₁ ⁺	917,17	[2M+H] ⁺	459,09 289,06 139,03	-0,8	Epigalocatequina-3- <i>O</i> -galato (BLAINSKI, 2016; CALEARE, 2016; ISOLANI, 2019)
		7,35		459,09	[M+H] ⁺	139,03	-3,5	
		7,41		481,07	[M+Na] ⁺	289,06 139,03	3,3	
10	(Epi)galocatequina-galato	7,00	C ₂₂ H ₁₉ O ₁₁ ⁺	917,17	[2M+H] ⁺	459,09 289,06 139,03	0,1	Epigalocatequina-3- <i>O</i> -galato (BLAINSKI, 2016; CALEARE, 2016; ISOLANI, 2019)
				481,07	[M+Na] ⁺	289,06	1,7	
				459,09	[M+H] ⁺	289,06 139,03	-4,4	
				1375,25	[3M+H] ⁺	459,09 289,06 151,03 139,03	1,7	
				7,1	459,09	[M+H] ⁺	289,07 153,01 139,03	

Subfração	Composto Sugerido	T _R (min)	Fórmula Molecular	[M+H] ⁺ (m/z)	Aduto	EM/EM (m/z)	Erro (ppm)	Literatura
11	(Epi)galocatequina-galato	6,86 6,90	C ₂₂ H ₁₉ O ₁₁ ⁺	917,17	[2M+H] ⁺	917,17	0,5	Epigalocatequina-3- <i>O</i> -galato (BLAINSKI, 2016; CALEARE, 2016; ISOLANI, 2019)
16	PDE-PDE-B-galato	1,96	C ₃₇ H ₃₁ O ₁₈ ⁺	763,14	[M+H] ⁺	425,08 287,05 153,01	1,7	PDE-PDE-B-galato (BLAINSKI, 2016)
	Samarangenina A	5,79	C ₃₇ H ₂₉ O ₁₈ ⁺	761,13	[M+H] ⁺	617,09 425,08 347,03 289,07 179,03 139,03	4,5	Samarangenina A (CALEARE, 2016; ISOLANI, 2019)
	Samarangenina B	7,49	C ₄₄ H ₃₃ O ₂₂ ⁺	913,14	[M+H] ⁺	743,12 617,08 455,05 305,02 139,03	0,5	Samarangenina B (BLAINSKI, 2016; CALEARE, 2016; ISOLANI, 2019)

Subfração	Composto Sugerido	T _R (min)	Fórmula Molecular	[M+H] ⁺ (m/z)	Aduto	EM/EM (m/z)	Erro (ppm)	Literatura
17	PDE-PDE-B-galato	1,95	C ₃₇ H ₃₁ O ₁₈ ⁺	763,14	[M+H] ⁺	595,10 425,08 287,05 179,03 139,03	1,4	PDE-PDE-B-galato (BLAINSKI, 2016)
	PDE-PDE-B-di-galato	4,56	C ₄₄ H ₃₅ O ₂₂ ⁺	915,15	[M+H] ⁺	595,10 425,08 287,05 153,01	0,1	PDE-PDE-B-di-galato (BLAINSKI, 2016)
	Samarangenina B	7,34	C ₄₄ H ₃₃ O ₂₂ ⁺	913,13	[M+H] ⁺	743,11 617,08 455,05 305,02 139,03	-0,8	Samarangenina B (BLAINSKI, 2016; CALEARE, 2016; ISOLANI, 2019)
18	PDE-PDE-B-galato	1,97	C ₃₇ H ₃₁ O ₁₈ ⁺	763,14	[M+H] ⁺	595,10 425,08 287,05 179,03 139,03	1,6	PDE-PDE-B-galato (BLAINSKI, 2016)
	PDE-PDE-B-di-galato	4,60	C ₄₄ H ₃₅ O ₂₂ ⁺	915,15	[M+H] ⁺	595,10 425,08 287,05 153,01	-1,2	PDE-PDE-B-di-galato (BLAINSKI, 2016) Samarangenina B (BLAINSKI, 2016; CALEARE, 2016; ISOLANI, 2019)
	Samarangenina B	7,58	C ₄₄ H ₃₃ O ₂₂ ⁺	913,14	[M+H] ⁺	743,12 617,08 455,05 305,02 139,03	0,7	

PDE: prodelfinidina.

Tabela 2. Caracterização dos compostos sugeridos pela análise de CLUE-IES-Q-TOF-EM/EM (modo negativo) das subfrações semipurificadas do rizoma de *Limonium brasiliense*.

Subfração	Composto Sugerido	T _R (min)	Fórmula Molecular	[M-H] ⁻ (m/z)	Aduto	EM/EM (m/z)	Erro (ppm)	Literatura
5	Ácido gálico	1,94	C ₇ H ₅ O ₅ ⁻	169,01	[M-H] ⁻	125,02	1,2	Ácido gálico (CALEARE, 2016)
9	PDE B	1,99	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃ ⁻	593,12	[M-H] ⁻	423,07 305,06 161,03 125,02	-1,5	Prodelfinidina B3 (Galocatequina-catequina)
	(Epi)galocatequina-galato	6,91	C ₂₂ H ₁₇ O ₁₁ ⁻	457,07	[M-H] ⁻	305,06 169,01 125,02	-2,4	Epigalocatequina-3-O-galato (BLAINSKI, 2016; CALEARE, 2016; ISOLANI, 2019)
16	PDE-PDE-B-galato	1,94	C ₃₇ H ₂₉ O ₁₈ ⁻	761,13	[M-H] ⁻	761,13	2,0	PDE-PDE-B-galato (BLAINSKI, 2016)
	Samarangenina A	5,69	C ₃₇ H ₂₇ O ₁₈ ⁻	759,11	[M-H] ⁻	759,11	-0,1	Samarangenina A (CALEARE, 2016; ISOLANI, 2019)
	Samarangenina B	7,65	C ₄₄ H ₃₁ O ₂₂ ⁻	911,12	[M-H] ⁻	911,12	-0,5	Samarangenina B (BLAINSKI, 2016; CALEARE, 2016; ISOLANI, 2019)

Subfração	Composto Sugerido	T _R (min)	Fórmula Molecular	[M-H] ⁻ (m/z)	Aduto	EM/EM (m/z)	Erro (ppm)	Literatura
17	PDE-PDE-B-galato	1,96	C37H29O18 ⁻	761,13	[M-H] ⁻	591,11 423,07 303,04 177,01	-3,3	PDE-PDE-B-galato (BLAINSKI, 2016)
	PDE-PDE-B-di-galato	4,61	C44H33O22 ⁻	913,14	[M-H] ⁻	743,12 573,10 423,07 285,03 169,01	2,1	PDE-PDE-B-di-galato (BLAINSKI, 2016)
	Samarangenina B	7,74	C44H31O22 ⁻	911,13	[M-H] ⁻	911,13	-0,1	Samarangenina B (BLAINSKI, 2016; CALEARE, 2016; ISOLANI, 2019)
18	PDE-PDE-B-galato	1,96	C37H29O18 ⁻	761,13	[M-H] ⁻	591,11 423,07 303,04 177,01	-1,6	PDE-PDE-B-galato (BLAINSKI, 2016)
	PDE-PDE-B-di-galato	4,85	C44H33O22 ⁻	913,14	[M-H] ⁻	743,12 573,10 423,07 285,03	-2,2	PDE-PDE-B-di-galato (BLAINSKI, 2016)
	Samarangenina B	7,82	C44H31O22 ⁻	911,12	[M-H] ⁻	911,12	-1,2	Samarangenina B (BLAINSKI, 2016; CALEARE, 2016; ISOLANI, 2019)

PDE: prodelfinidina.

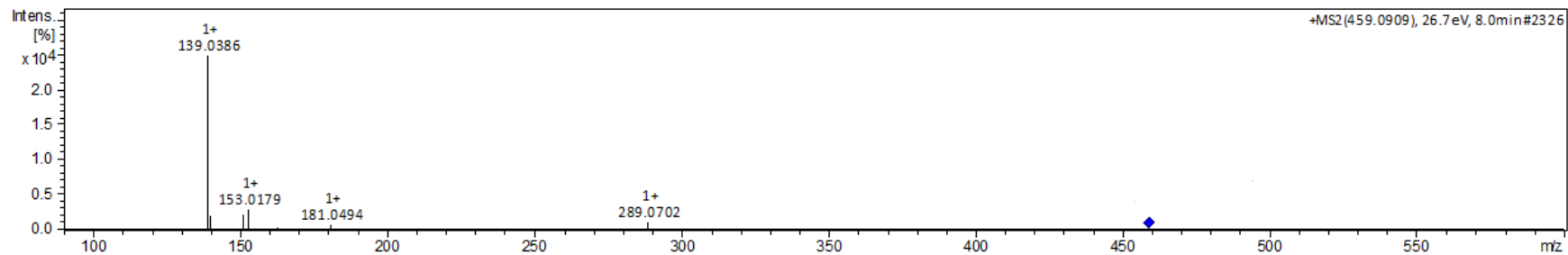


Figura 6. Perfil de fragmentação sugerido pela análise de espectrometria de massas, modo positivo, para a substância epigallocatequina-3-*O*-galato (subfração 10).

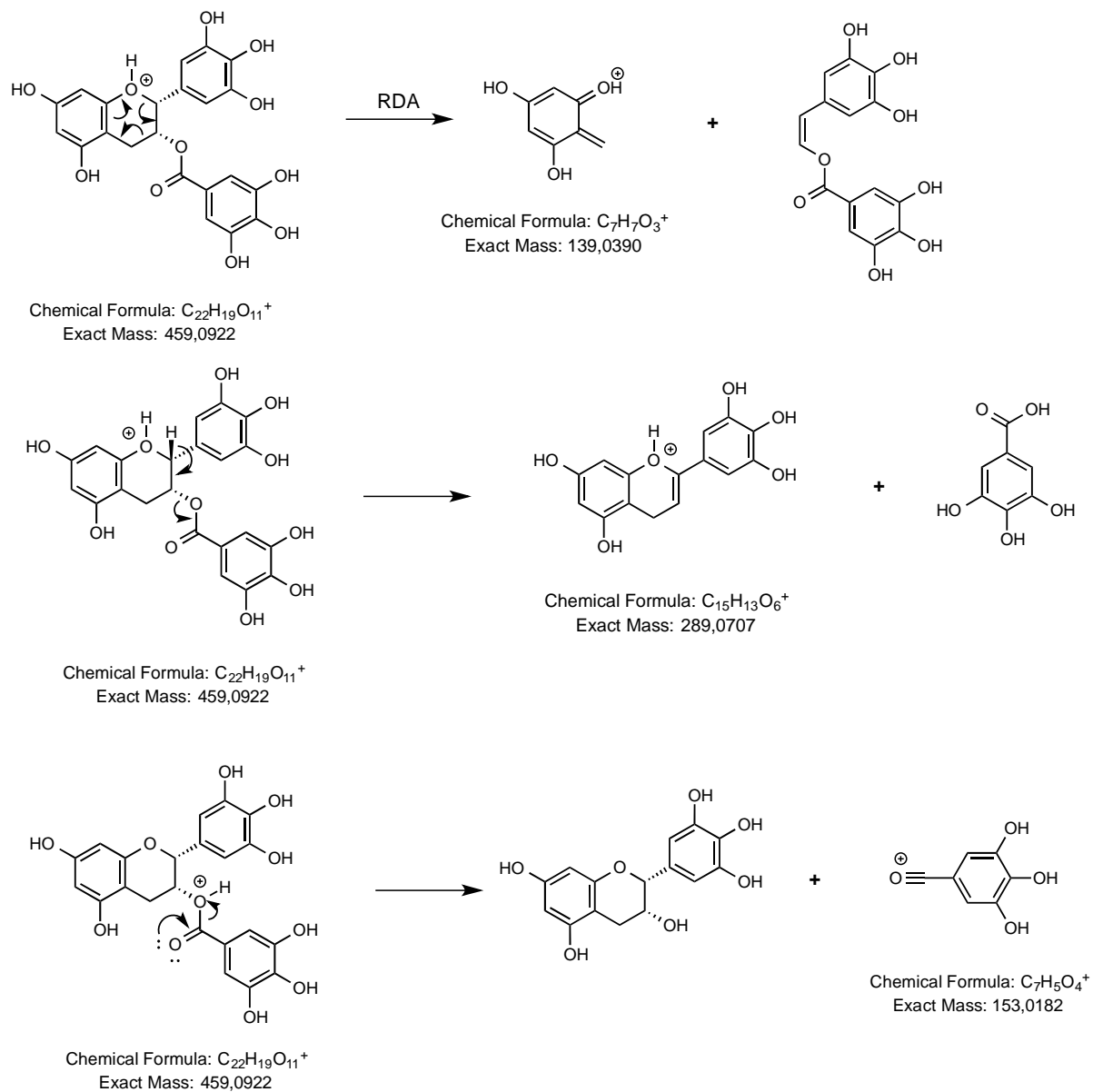


Figura 7. Perfil de fragmentação sugerido pela análise de espectrometria de massas, modo positivo, para a substância epigallocatequina-3-*O*-galato (subfração 10).

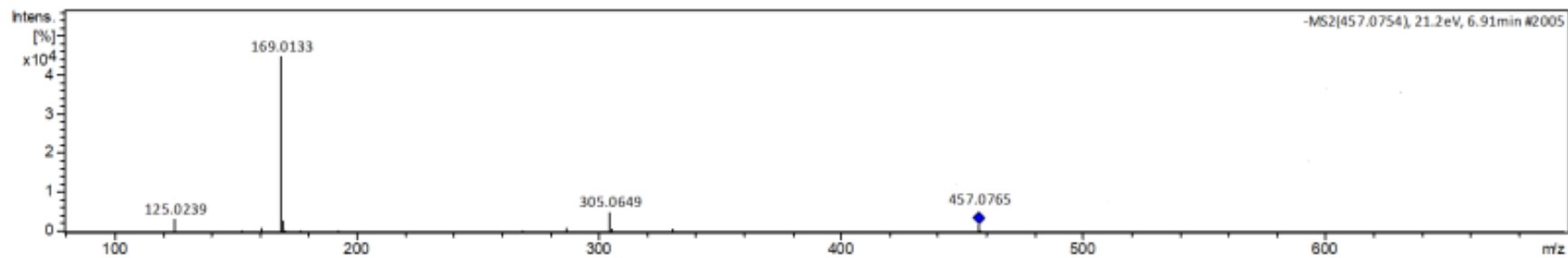


Figura 8. Perfil de fragmentação sugerido pela análise de espectrometria de massas, modo negativo, para a substância epigallocatequina-3-*O*-galato (subfração 9).

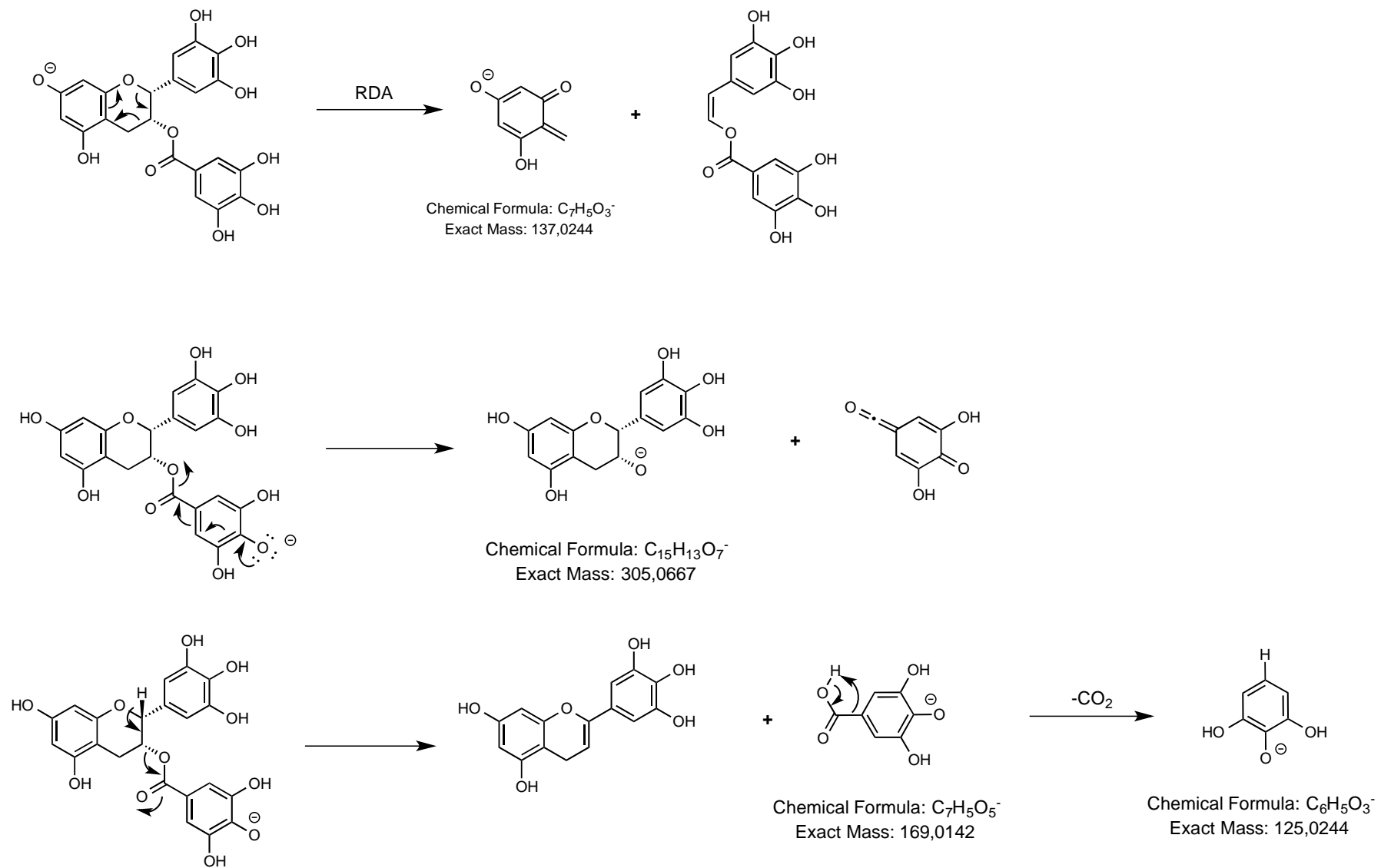


Figura 9. Perfil de fragmentação sugerido pela análise de espectrometria de massas, modo negativo, para a substância epigallocatequina-3-O-galato (subfração 9).

APÊNDICE D. ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

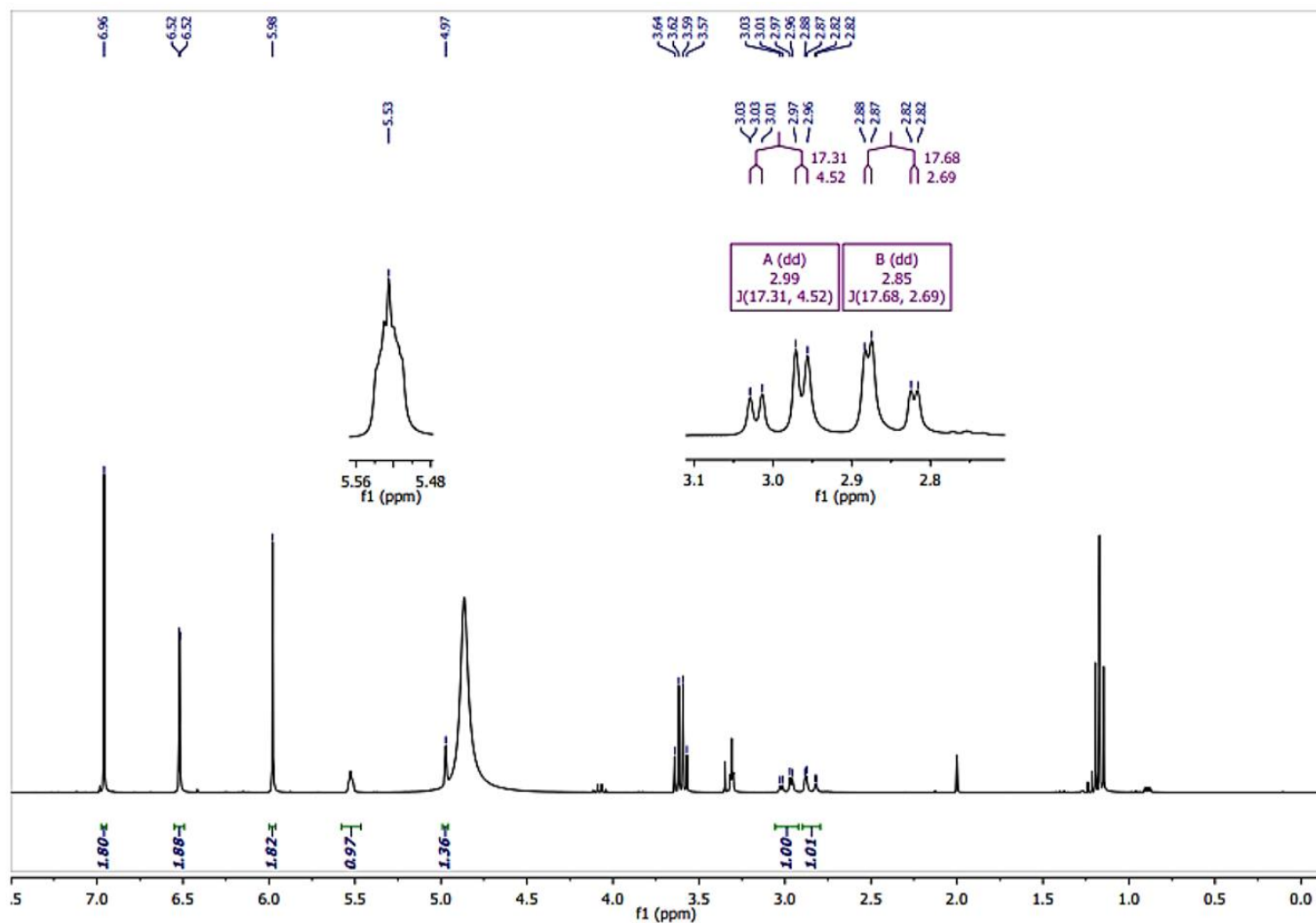


Figura 10. Espectro de RMN de ^1H da epigalocatequina-3-*O*-galato (300 MHz, CD_3OD , relativo ao TMS).

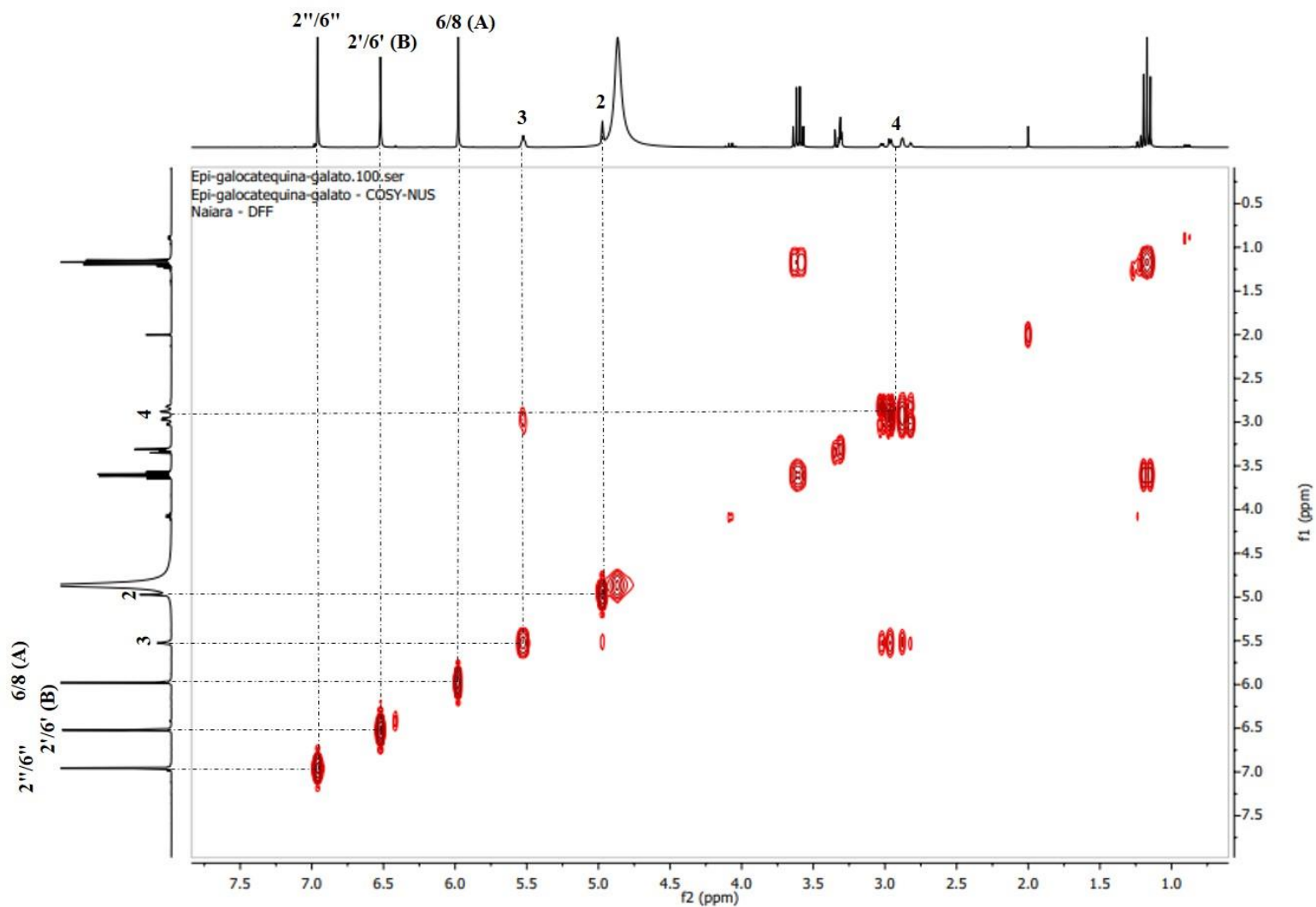


Figura 10. Espectro de RMN de ^1H - ^1H COSY da epigalocatequina-3-*O*-galato (300 MHz, CD_3OD , relativo ao TMS).

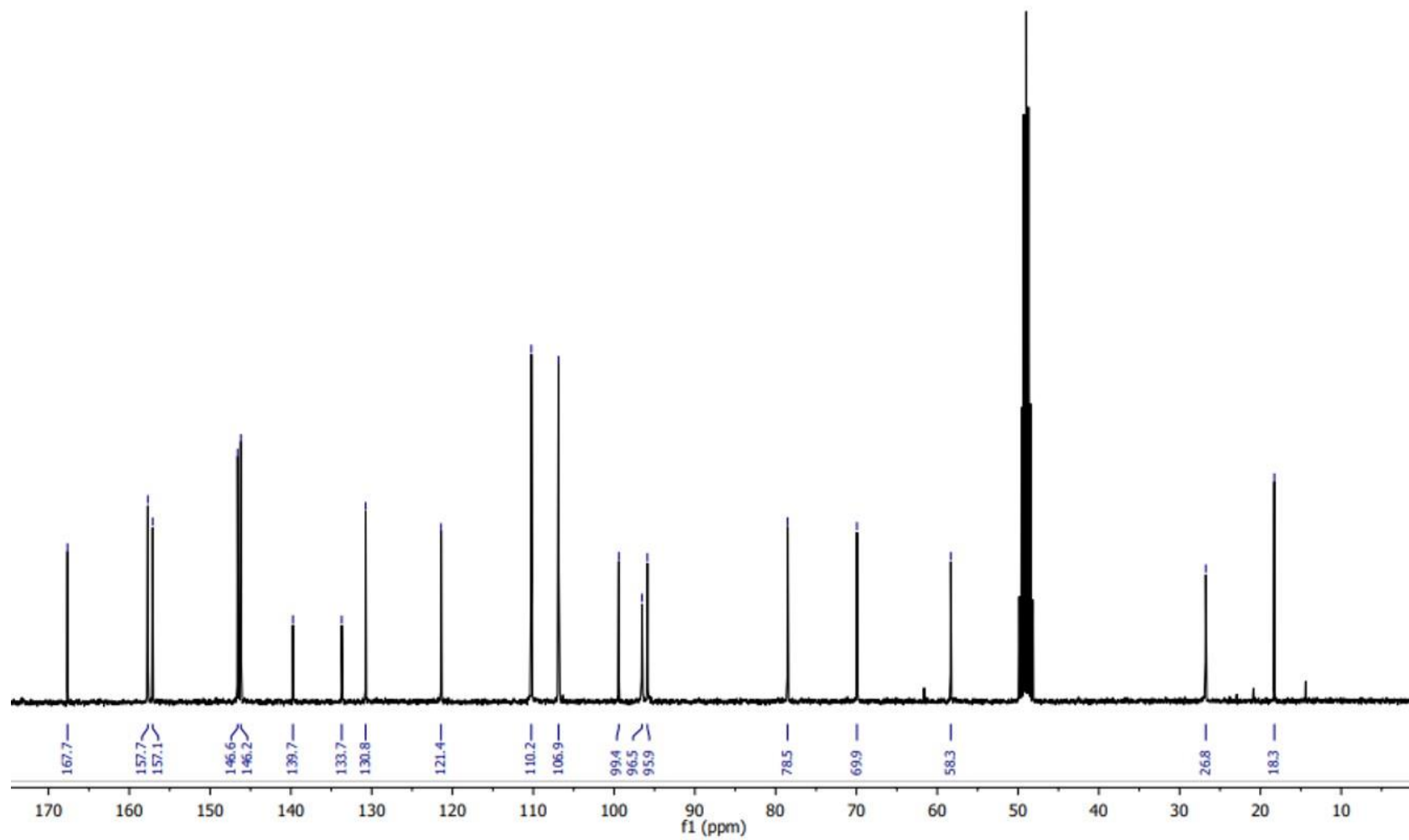


Figura 11. Espectro de RMN de ^{13}C da epigallocatequina-3-*O*-galato (75 MHz, CD_3OD , relativo ao TMS).

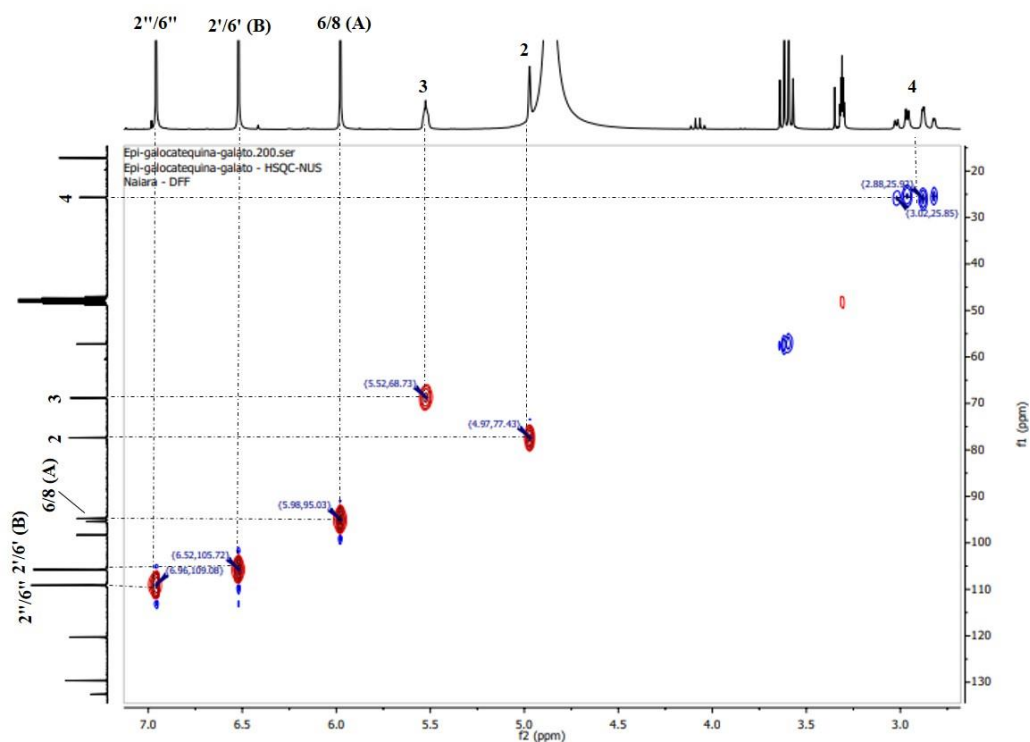


Figura 12. Espectro de RMN de ^{13}C - ^1H HSQC da epigallocatequina-3-*O*-galato (300 MHz, CD_3OD , relativo ao TMS).

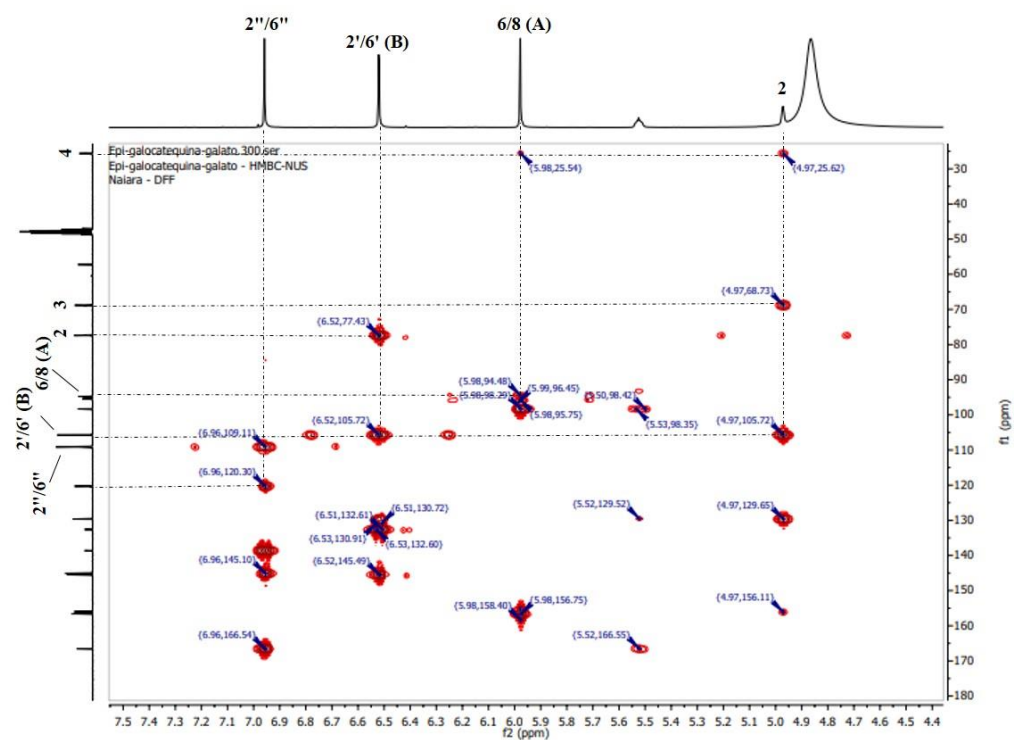


Figura 13. Espectro de RMN de ^{13}C - ^1H HMBC da epigallocatequina-3-*O*-galato (300 MHz, CD_3OD , relativo ao TMS).

Tabela 3 - Dados obtidos da análise de ressonância magnética nuclear de ^1H e correlação observada no espectro de ^1H - ^1H COSY da substância epigalocatequina-3-*O*-galato (300 MHz, CD_3OD , relativo ao TMS).

H (anel)	^1H δ (ppm)	Multiplicidade <i>J</i> (Hz)	Integral	^1H - ^1H COSY
2 (C)	4,97	<i>s</i>	1,36	H-3
3 (C)	5,53	<i>m</i>	0,97	H-2
4 _{ax} (C)	2,85	<i>dd</i>	1,01	H-4 H-3
4 _{eq} (C)	2,99	<i>dd</i>	1,00	H-4 H-3
6 (A)	5,98	<i>s</i>	1,82	H-8
8 (A)	5,98	<i>s</i>	1,82	H-6
2' (B)	6,52	<i>s</i>	1,88	H-6'
6' (B)	6,52	<i>s</i>	1,88	H-2'
H-6"	6,96	<i>s</i>	1,80	H-6"
H-2"	6,96	<i>s</i>	1,80	H-2"

Tabela 4 - Dados obtidos da análise de ressonância magnética nuclear de ^{13}C da substância epigalocatequina-3-*O*-galato (75 MHz, CD_3OD , relativo ao TMS).

C (anel)	^{13}C δ (ppm)	HSQC ^1H δ (ppm)	^{13}C - ^1H HMBC
C-O	167,7		
2 (C)	78,5	4,97 (<i>s</i>)	H-4 _{ax} /4 _{eq} H-2'/6'
3 (C)	69,9	5,52 (<i>m</i>)	H-2 H-4 _{ax} /4 _{eq}
4 (C)	26,8	2,88 (<i>dd</i>) 3,02 (<i>dd</i>)	H-2 H-6/8
6 (A)	96,5	5,98 (<i>s</i>)	H-8
8 (A)	95,9	5,98 (<i>s</i>)	H-6
2'/6' (B)	106,9	6,52 (<i>s</i>)	H-2 H-2'/6'
2"/6"	110,2	6,96 (<i>s</i>)	H-2"/6"

APÊNDICE E. PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA

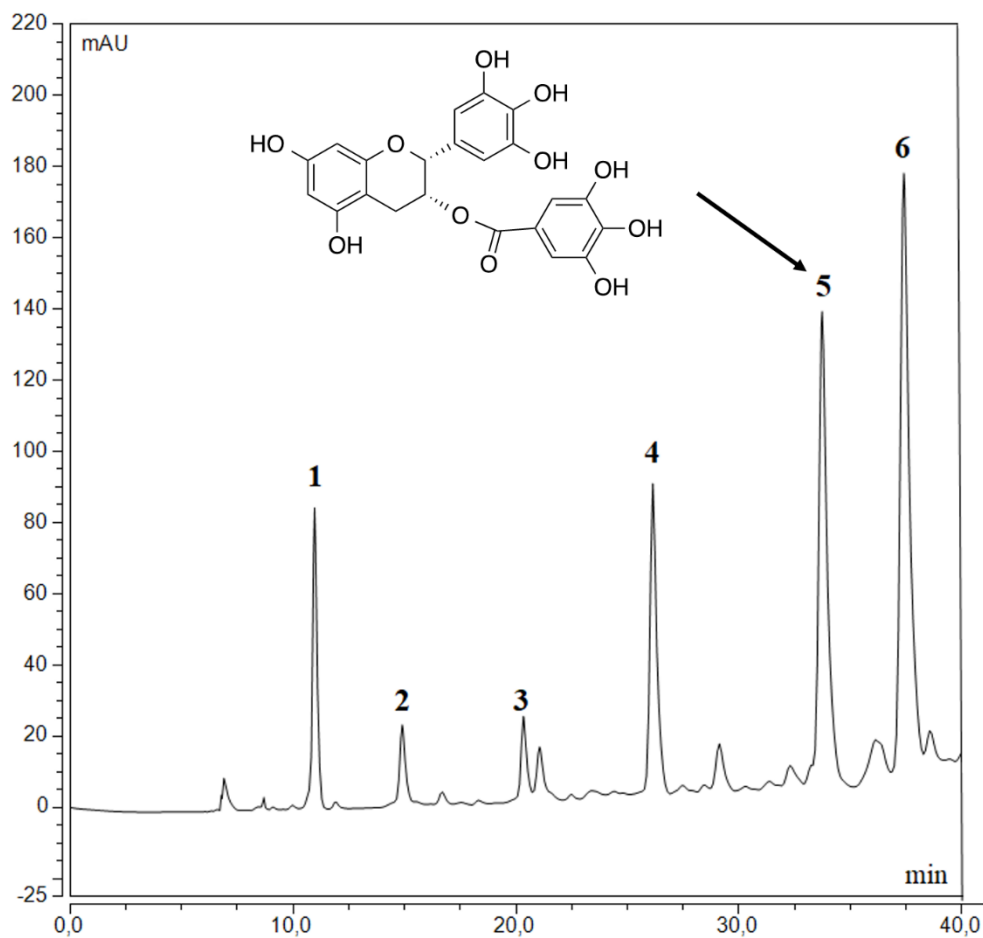


Figura 14. Cromatografia líquida de ultra eficiência da fração acetato de etila de *Limonium brasilense* (tr min). 1. Ácido gálico (10,97). 2. Galocatequina (14,90). 3. Epigallocatequina (20,33). 4. Samarangenina A (26,13). 5. Epigallocatequina-3-O-galato (33,72). 6. Samarangenina B (37,39).

6. CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho é a primeira revisão sistemática da literatura a reunir evidências sobre a capacidade anticancerígena e antiproliferativa de *Limonium* spp. A maioria dos estudos incluídos foram ensaios *in vitro*, baseados no método de MTT, os quais utilizaram a linhagem de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) e foram publicados entre 2003 e 2021.

O possível mecanismo de ação sugerido para a atividade antiproliferativa de espécies de *Limonium* inclui efeitos citotóxicos, anti-melanogênico, antimetastático e imunomodulador. *L. tetragonum* foi a espécie mais avaliada entre os estudos incluídos e apresentou atividade anticancerígena promissora. O *checklist* sugerido poderá auxiliar no reporte de informações consideradas importantes para a escrita de estudos em farmacognosia.

Por fim, a análise fitoquímica de *L. brasiliense* permitiu o isolamento e identificação da substância epigalocatequina-3-*O*-galato, a qual apresentou, juntamente com a samarangenina B, atividade antiproliferativa promissora para a linhagem celular LNCaP. Demais estudos *in vitro* são necessários para a determinação do possível mecanismo de ação das substâncias isoladas de *L. brasiliense* (em andamento).

REFERÊNCIAS

AL-MADHAGI, W.M.; HASHIM, N.M.; ALI, N.A.A.; OTHMAN, R. Phytochemical screening, cytotoxic and antimicrobial activities of *Limonium socotranum* and *Peperomia blanda* extracts. **Tropical Biomedicine**, v. 36, p. 11-21, 2019.

AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). What is cancer? Disponível em: <<https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/6041.00.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2022.

ANIYA, Y.; MIYAGI, C.; NAKANDAKARI, A.; KAMIYA, S.; IMAIZUMI, N.; ICHIBA T. Free radical scavenging action of the medicinal herb *Limonium wrightii* from the Okinawa islands. **Phytomedicine**, v. 9, p. 239-244, 2002.

ANTONELLI-USHIROBIRA, T.M.; BLAINSKI, A., GANCEDO, N.C.; GABURO, F., CARDOSO, K.A.K.; LEITE MELO, E.V.S.; MELLO, J.C.P.; MILANEZE-GUTIERRE, M.A. Morpho-anatomical study of rhizome of *Limonium brasiliense*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 320-327, 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-safety evaluation of the crude extract from rhizomes of *Limonium brasiliense* in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.174, p.293-298, 2015b.

BAGULEY, B.C.; HICKS, K.O.; WILSON, W.R. Tumor cell cultures in Drug development. In: BAGULEY, B.C.; KERR, D.J. Anticancer drug development. Academic Press: USA, p. 269-284, 2002.

BAKHSHI, S.; ABBASPOUR, H.; SAEIDISAR S. Study of phytochemical changes, enzymatic and antioxidant activity of two halophyte plants: *Salsola dendroides* Pall and *Limonium reniforme* (Girard) Lincz in different seasons. **Bulgarian Chemical Communications**, v. 50, p. 374-382, 2018.

BALUNAS, M.J.; KINGHORN, D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.

BLAINSKI, A. Controle de qualidade farmacognóstico com análise cromatográfica quantitativa, planejamento estatístico de misturas com avaliação antibacteriana e estudos fitoquímicos de *Limonium brasiliense* (Baicuru). Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, 2016. 152 f.

BLAINSKI, A.; GIONCO, B.; OLIVEIRA, A.G.; ANDRADE, G.; SCARMINIO, I.S.; SILVA, B.D.; LOPES, N.P.; MELLO, J.C.P. Antibacterial activity of *Limonium brasiliense* (Baicuru) against multidrugresistant bacteria using a statistical mixture design. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, p. 313-323, 2017.

BRANDÃO, M.G.L. Importância dos registros históricos na investigação e utilização de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, p. 29-37, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. Diretrizes metodológicas: elaboração de revisão sistemática e metanálise de estudos observacionais comparativos sobre fatores de risco e prognóstico. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 132 p.

BRASIL. Portaria nº 498, de 11 de maio de 2016. Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Adenocarcinoma de Próstata. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à saúde. 2016. 42 p.

BUTLER, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004.

CALEARE, A.O.; HENSEL, A.; MELLO, J.C.P.; PINHA, A.B.; PANIZZON, G.P.; LECHTENBERG, M.; PETEREIT, F.; NAKAMURA, C.V. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Limonium brasiliense* inhibit the adhesion of *Porphyromonas gingivalis* to epithelial host cells by interaction with gingipains. **Fitoterapia**, v. 118, p. 87-93, 2017.

CENTRE FOR REVIEWS AND DISSEMINATION (CRD). Systematic Reviews. CRD's guidance for undertaking reviews in health care. University of York, 2008.

CHIERRITO, D.; VILLAS-BOAS, C.B.; TONIN, R.S.; FERNANDEZ-LLIMOS, F.; SANCHES, A.C.C.; MELLO, J.C.P. Using cell cultures for the investigation of treatments for Attention Deficit Hyperactivity Disorder: systematic review. **Current Neuropharmacology**, v. 17, n. 10, p. 916-925, 2019.

COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIAS NO SUS (CONITEC). Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Adenocarcinoma de Próstata. Ministério da Saúde, 66 p., 2016.

D'SOUZA, P.; GEORGE, A.; NAIR, S.; NORONHA, J.; UNNIKRISSHANN, V.R.B.; BHATT, S. Resources for Evidence-Based Health Care: Accessibility and Availability. **Journal of Education and Practice**, v. 5, n. 7, p. 65-72, 2014.

DAINO, G. L.; FRAU, A.; SANNA, C.; RIGANO, D.; DISTINTO, S.; MADAU, V.; ESPOSITO, F.; FANUNZA, E.; BIANCO, G.; TAGLIALATELASCAFATI, O.; ZINZULA, L.; MACCIONI, E.; CORONA, A.; TRAMONTANO, E. Identification of myricetin as Ebola virus VP35-dsRNA interaction inhibitor through a novel fluorescence-based assay. **Biochemistry**, v. 57, n. 44, p. 6367-6378, 2018.

DIAS DA SILVA, R.A. Plantas Medicinaes do Brasil, O Guaycurú. Boletim da Associação Brasileira de Pharmaceuticos, v.1, p. 4-14, 1920.

EPSTEIN, J.I. O Trato Urinário Inferior e Sistema Genital Masculino. In: KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N.; ASTER, J.C. Patologia, bases patológicas das doenças. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 1001-1010, 2010.

FLOWERS, T.J.; COLMER, T.D. Salinity tolerance in halophytes. **New Phytologist**, v. 179, p. 945-963, 2008.

FUNEZ, L.A. *Plumbaginaceae* Juss. In: **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB192>>. Acesso em: 31 jan. 2023a.

FUNEZ, L.A. 2020. *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. In: **Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12938>>. Acesso em: 31 jan. 2023b.

FUNEZ, L.A. *Limonium* Mill. In: **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB12937>>. Acesso em: 31 jan. 2023c.

GALVÃO, T.F.; PEREIRA, M.G. Revisões sistemáticas da literatura: passos para sua elaboração. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, n. 1, p. 183-184, 2014.

GANCEDO, N.C.; MEDEIROS, D.C.; MILANEZE-GUTIERRE, M.A.; MELLO, J.C.P. Morpho-anatomical characters of *Limonium brasiliense* leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 28, n. 5, p. 513-519, 2018.

GONZÁLEZ-ORENGA, S.; GRIGORE, M.-N.; BOSCAIU, M.; VICENTE, O. Constitutive and induced salt tolerance mechanisms and potencial uses of *Limonium* Mill. species. **Agronomy**, v. 11, n. 413, p. 1-23, 2021.

HASSAN, A.R.; SANAD, I.M.; ALLAM, A.E.; ABOUELELAB, M.E.; SAYED, A.M.; EMAMA, S.S.; EL-KOUSYD, S.M.; SHIMIZUE, K. Chemical constituents from *Limonium tubiflorum* and their *in silico* evaluation as potential antiviral agents against SARS-CoV-2. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 11, p. 32346-32357, 2021.

HENRIQUES, M.G.M.O.; SAMPAIO, A.L.F. Alternativas para animais de laboratório: sistemas *in vitro*. In: ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S., orgs. Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 339-343, 2002.

HIGGINS, J.P.T.; THOMAS, J.; CHANDLER, J.; CUMPSTON, M.; LI, T.; PAGE, M.J.; WELCH, V.A. (Eds.). **Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions version 6.2 (updated February 2021)**. Cochrane, 2021. Disponível em: <www.training.cochrane.org/handbook>. Acesso em: 24 out. 2021.

HOOIJMANS, C.R.; ROVERS, M.M.; DE VRIES, R.B.; LEENAARS, M.; RITSKES-HOITINGA, M.; LANGENDAM, M.W. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. **BMC Medical Research Methodology**, v. 14, p. 1-9, 2014.

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.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: INCA, 2015. 122 p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: INCA, 2017. 128 p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: INCA, 2019. 120 p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Detecção precoce do câncer. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: INCA, 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: INCA, 2022. 162 p.

ISOLANI, R.G. Avaliação da atividade de extratos e das substâncias isoladas de *Limonium brasiliense* contra Herpes Simplex Tipo I. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, 2019. 54 p.

KLEM, M.L.; WEISS, P.M. Evidence-based Resources and the role of librarians in developing Evidence-based practice curricula. **Journal of professional Nursing**, v. 21, n. 6, p. 380-387, 2005.

KOOTI, W.; SERVATYARI, K.; BEHZADIFAR, M.; ASADI-SAMANI, M.; SADEGHI, F.; NOURI, B.; MARZOUNI, H. Z. Effective Medicinal Plant in Cancer Treatment, Part 2: Review Study. **Journal of evidence based complementary & alternative medicine**, v. 22, n. 4, p. 982-995, 2017.

LEE, J.I.; KONG, C.-S.; JUNG, M.E.; HONG, J.W.; LIM, S.Y.; SEO, Y. Antioxidant activity of the halophyte *Limonium tetragonum* and its major active components. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, p. 992-999, 2011.

LIFCHTZ, A. Plantas medicinales; **Guia practico de Botânica Medicinal**. Buenos Aires: Kier. 1981.

LOVITT, C.J.; SHELPER, T.B.; AVERY, V.M. Advanced cell culture techniques for cancer drug discovery. **Biology**, v. 3, p. 345-367, 2014.

MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P. Plantas medicinais: a coerência e a confiabilidade das indicações terapêuticas. **Caderno de Farmácia**, v.5, p.93-119, 1989.

MOURA, T.F.A. L.; SCHENKEL, E.P.; SCHAPOVAL, E.E.S.; SIMÕES, C.M.O.; SANTOS, R.I.D. Estudos farmacológicos preliminares das raízes do *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze - Plumbaginaceae (Baicuru). **Caderno de Farmácia**, v.1, p.45-54, 1985.

MURRAY, A.P.; RODRIGUEZ, S.; FRONTERA, M.A.; TOMAS, M.A.; MULET, M.C. Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.59, p.477-480, 2004.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIH). Clinical Trials. Disponível em: <<https://clinicaltrials.gov/>>. Acesso em: 20 jan. 2022.

OSF: Open Science Framework. Disponível em: <<https://osf.io/>>. Acesso em: 25 jan. 2022.

PAGE, M.J.; MCKENZIE, J.E.; BOSSUYT, P.M.; BOUTRON, I.; HOFFMANN, T.C.; MULROW, C.D.; SHAMSEER, L.; TETZLAFF, J.M.; MOHER D. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. **PLoS Medicine**, v. 18, p. 1-15, 2021.

PLANTS OF THE WORLD ONLINE (POWO). *Limonium* Mill. Disponível em: <<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:331722-2>>. Acesso em: 22 dez. 2021b.

PLANTS OF THE WORLD ONLINE (POWO). Plumbaginaceae Juss. Disponível em: <<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30000293-2>>. Acesso em: 31 jan. 2023a.

PLANTS OF THE WORLD ONLINE (POWO). *Limonium* Mill. Disponível em: <<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:331722-2>>. Acesso em: 31 jan. 2023b.

PROSPERO: International prospective register of systematic reviews. Disponível em: <<https://www.crd.york.ac.uk/prospero/>>. Acesso em: 25 jan. 2022.

PROSTATE CANCER FOUNDATION (PCF). Prostate Cancer: A comprehensive resource on diagnosis, treatment, side effects, and risk factors for patients and families with a history of prostate cancer. Prostate cancer foundation, 70p, 2017.

PROSTATE CANCER FOUNDATION (PCF). About Prostate Cancer. How curable is prostate cancer? Disponível em: <<https://www.pcf.org/about-prostate-cancer/>>. Acesso em: 01 fev. 2023.

RAWLA, P. Epidemiology of Prostate Cancer. **World Journal of Oncology**, v. 10, n. 2, p. 63-89, 2019.

ROSITO, J.F. Contribuição à análise das raízes de *Limonium brasiliense* (Boiss.). 1975. In: MOURA, T. F. A. L.; SCHENKEL, E. P.; SCHAPOVAL, E. E. S.; SIMÕES, C. M. O.; SANTOS, R. I. (Eds.). **Estudos farmacológicos preliminares das raízes de Limonium brasiliense (Boiss.) Kuntze - Plumbaginaceae (Baicuru)**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Farmácia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1975. 37 p.

STRAUS, S.E.; GLASZIOU, P.; RICHARDSON, W.S.; HAYNES, R.B. Evidence-Based Medicine. How to Practice and Teach EBM. 5ª Ed. Elsevier, 2019. 496 p.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R.L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, p. 209-249, 2021.

VIVAS, J.; SOJO, F.; CHÁVEZ, K.; SUÁREZ, A.I.; ARVELO, F. Cytotoxic effects of the monomer and dimer of 3, 4-seco-ent-kaurene from *Croton Micans* and their interaction with antitumoral drugs on cellular line of human prostate câncer. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 10, p. 683-688, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1>. Acesso em: 18 jan. 2022.

YAMASHIRO, S.; NOGUCHI, K.; MATSUZAKI T.; MIYAGI, K.; NAKASONE, J.; SAKANASHI, M.; SAKANASHI, M.; KUKITA, I.; ANIYA, Y.; SAKANASHI, M. Cardioprotective effects of extracts from *Psidium guajava* L. and *Limonium wrightii*, Okinawan medicinal plants, against ischemia-reperfusion injury in perfused rat hearts. **Pharmacology**, v. 67, p. 128-135, 2003.