

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓSGRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Metabolômica e redes moleculares no Rastreamento de Substâncias Bioativas
de espécies vegetais: Uma Abordagem Estratégica para a Leucemia Mieloide**

Suni Liu

CAMPO GRANDE - MS
2025

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓSGRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Metabolômica e redes moleculares no Rastreamento de Substâncias Bioativas
de espécies vegetais: Uma Abordagem Estratégica para a Leucemia Mieloide**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul como
requisito para a obtenção do título de
Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Denise
Brentan da Silva

CAMPO GRANDE - MS

2025

RESUMO

As plantas medicinais apresentam uma longa história de utilização na medicina popular tradicional, destacando-se pela diversidade de propriedades benéficas à saúde humana. Elas constituem importantes alvos para a busca de substâncias bioativas com potenciais atividades anticancerígenas, anti-inflamatórias, antibacterianas, entre outras. Os biomas brasileiros Pantanal e Cerrado, possuem uma ampla biodiversidade, abrigando inúmeras espécies de plantas medicinais, cujas propriedades químicas e biológicas permanecem pouco exploradas cientificamente. Neste contexto, ferramentas avançadas, como a metabolômica e redes moleculares, têm sido empregadas com sucesso para acelerar a descoberta e redução o tempo necessário para identificação de compostos bioativos. O presente estudo teve como objetivo principal avaliar a atividade citotóxica de extratos obtidos de dezoito espécies de plantas coletadas nos biomas Cerrado e Pantanal Sul-Mato-Grossense frente às linhagens celulares leucêmicas Kasumi-1, KG-1 e K562, além de aplicar ferramentas de análises estatísticas de dados metabolômicos juntamente com redes moleculares para a determinação dos possíveis compostos bioativos. As amostras vegetais (18 espécies diferentes), foram extraídas por extração acelerada com solvente utilizando etanol e água na proporção 7:3 (v/v) e foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos e um espectrômetro de massas de alta resolução (HPLC-DAD-MS) para as análises de todos os extratos. A citotoxicidade dos extratos foram avaliados por ensaio de Alamar Blue e a indução de apoptose foi determinada por citometria de fluxo com anexina V e iodeto de propídio, visando identificar células em apoptose precoce e tardia. As análises metabolômicas, complementadas por análises estatísticas e redes moleculares, permitiram uma abordagem abrangente dos metabólitos presentes nos diferentes extratos estudados, permitindo também a anotação de alcaloides esteroidais e aporfínicos como alvos prioritários. Os resultados revelaram que os extratos de *Sesbania virgata*, *Aeschynomene denticulata*, *Erythroxylum anguifugum*, *Psidium guineense*, *Astronium fraxinifolium*, *Coccoloba ochreolata*, *Solanum glaucophyllum* e *Paullinia pinnata* demonstraram significativa inibição da viabilidade celular da linhagem leucêmica K-562 (aproximadamente 70% a 100 µg/mL), enquanto *Ocotea diospyrifolia* apresentou 35% de inibição para a linhagem KG-1. As frações alcaloídicas isoladas de *S. glaucophyllum* e *O. diospyrifolia* demonstraram valores de EC₅₀ variando de 13,9 a 6,4

µg/mL para as linhagens celulares K-562 e KG-1, induzindo apoptose e danos celulares significativos. O alcaloide boldina apresentou valores de EC₅₀ de 46, 116 e 145 µM para as linhagens Kasumi-1, KG-1 e K-562, respectivamente. Os resultados destacam a importância da integração de análise mais ampla dos dados químicos para identificação dos compostos bioativos, enfatizando os benefícios potenciais na busca por metabólitos contra as células de câncer de leucemia, particularmente alcaloides esteroides e aporfínicos. Portanto, as estratégias metabolômicas e redes moleculares para a anotação e seleção de compostos bioativos se mostrou eficaz, na busca de compostos com atividade antileucêmica.

Palavras-chave: Metabolômica, produtos naturais, alcaloides, redes moleculares, leucemia, aporfínicos, saponinas.

ABSTRACT

Medicinal plants show a long history of use in traditional folk medicine, standing out for the diversity of properties that are beneficial to human health. They constitute important promising targets for the search for bioactive substances with potential anticancer, anti-inflammatory, antibacterial activities, among others. The Pantanal and Cerrado biomes have a wide biodiversity, sheltering numerous species of medicinal plants, whose chemical and biological properties remain little explored scientifically. In this context, advanced tools, such as metabolomics and molecular networks, have been successfully used to accelerate the discovery and reduce the time required to identify compounds of bioactive metabolites. The main objective of this study was to evaluate the cytotoxic activity of extracts obtained from eighteen plant species found in the Cerrado and Pantanal biomes of Mato Grosso do Sul against Kasumi-1, KG-1 and K562 leukemic cell lines, in addition to applying statistical analysis tools of metabolomic data together with molecular networks to determine the possible bioactive compounds. The plant samples (18 different species) were extracted by accelerated solvent extraction (ASE) using ethanol and water in the proportion 7:3 (v/v) and were analyzed by high-performance liquid chromatography coupled to a diode array detector and a high-resolution mass spectrometer (HPLC-DAD-MS) for the analysis of all extracts. The cytotoxicity of the extracts was evaluated by Alamar Blue assay and the induction of apoptosis was determined by flow cytometry with annexin V and propidium iodide, aiming to identify cells in early and late apoptosis. Metabolomic analyses, complemented by statistical analyses and molecular networks, allowed a comprehensive approach of the metabolites present in the different extracts studied, enabling the identification and analysis, allowing the annotation of steroidal and aporphinic alkaloids as priority targets. The extracts from *Sesbania virgata*, *Aeschynomene denticulata*, *Erythroxylum anguifugum*, *Psidium guineense*, *Astronium fraxinifolium*, *Coccoloba ochreolata*, *Solanum glaucophyllum* and *Paullinia pinnata* demonstrated significant inhibition of cell viability of the leukemic cell line K-562 (approximately 70% at 100 µg/mL), while *Ocotea diospyrifolia* showed 35% inhibition for the KG-1 cell line. Alkaloid fractions isolated from *S. glaucophyllum* and *O. diospyrifolia* demonstrated EC₅₀ values ranging from 13.9 to 6.4 µg/mL for the K-562 and KG-1 cell lines, inducing apoptosis and significant cellular damage. The alkaloid boldine presented EC₅₀ values of 46, 116, and 145 µM for the Kasumi-1, KG-1 and K-

562 leukemia cell lines, respectively. The results highlight the importance of integrating broader analysis of chemical data for identification of bioactive compounds, emphasizing the potential benefits in the search for metabolites against leukemia cancer cells, particularly steroid and aporphine alkaloids. Therefore, metabolomic strategies and molecular networks for the effective identification of bioactive compounds, highlighting the potential of Cerrado and Pantanal plants for the development of new antileukemic agents.

Keywords: Metabolomics, natural products, alkaloids, molecular networks, leukemia, aporphines, saponins.

SUMÁRIO

RESUMO.....	3
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUÇÃO	11
2. Revisão bibliográfica.....	13
2.1. Biodiversidade Brasileira	13
2.2. Plantas Medicinais e Etnofarmacologia.....	16
2.3. Plantas medicinais para busca de substâncias bioativas promissoras 20	
2.4. Câncer e leucemia.....	29
2.5. Produtos naturais com propriedades anticâncer.....	31
2.5.1 Produtos naturais com atividade antileucêmica.....	33
2.6. Ferramentas metabolômicas e redes moleculares aplicadas na busca substâncias bioativas.....	34
3. OBJETIVOS	40
3.1. Objetivo geral	40
3.2. Objetivos específicos	40
CAPITULO 2: ARTIGO	41
4. ARTICLE	42
1. INTRODUCTION	44
2. MATERIALS AND METHODS.....	45
2.1 Sample collection.....	45
2.2 Preparation of extracts and fractions.....	46
2.3 Chemical analysis by LC-DAD-MS.....	47
2.4 Statistical processing and analysis of metabolomic data.....	48
2.5 Molecular networking and annotation.....	48
2.6 Cell cultures.....	49
2.7 Cytotoxicity effects on leukemia cell lines.	49
2.8 Annexin V/7-AAD flow cytometry assay.	50
2.9 Intracellular protein labeling.	51
2.10 Statistical analysis.	51

3. RESULTS AND DISCUSSION.....	52
3.1 Cytotoxicity effects on leukemia cell lines of extracts.	52
3.2 Chemical analysis: Metabolomics and molecular networking.....	54
3.3 Cytotoxicity effects of alkaloids from <i>S. glaucophyllum</i> and <i>O.</i> <i>diospyrifolia</i> and flow cytometry	66
4. CONCLUSIONS.....	72
REFERENCES.....	73
SUPPORTING INFORMATION	79
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	112

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AP	<i>aerial parts</i>
ASE	<i>Accelerated Solvent Extractor</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BEPan	Banco de Extratos de plantas do Pantanal
cdf	<i>cognite data fusion</i>
cells/mL	<i>cells per milliliter</i>
CG	cromatografia em fase gasosa
CGMS	Herbário da UFMS - Campo Grande Mato Grosso do Sul
CH	<i>chloroform</i>
CIM	concentração inibitória mínima
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas
CLAE-DAD-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo diodos e espectrômetro de massas
DAD	Detector de arranjo de diodos
DMSO	<i>dimethyl sulfoxide</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
EtOAc	<i>ethyl acetate</i>
EM	Espectrometria de Massas
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
FACFAN	Faculdade de Farmácia, Alimentos e Nutrição
FL	<i>Flower</i>
FR	<i>Fruits</i>
GLASS	<i>Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System</i>
GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
Hx	<i>Hexane</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
INAU	Instituto Nacional de Áreas Úmidas
INBIO	Instituto de Biociências
INCA	Instituto Nacional de Câncer
K-562	<i>chronic myeloid leukemia cell line</i>
Kasumi-1	<i>acute myeloblastic leukemia cell line</i>
KG-1	<i>acute myeloid leukemia cell line</i>
LaPNEM	Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas
LC-DAD-MS	<i>Liquid chromatography coupled to diode array detector and mass spectrometer</i>
LV	<i>Leaves</i>
MeOH	<i>methanol</i>

MF	<i>molecular formula</i>
MIC	<i>minimum inhibitory concentration</i>
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>
<i>m/z</i>	razão massa-carga
NA	<i>non-annotated</i>
NPs	<i>Natural Products</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
ppm	partes por milhão
PTFE	politetrafluoretileno
RO	<i>Roots</i>
RT	<i>retention time</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
TTC	<i>2,3,5 triphenyltetrazolium chloride</i>
UCSD	Universidade da Califórnia, San Diego
UFLC	<i>Ultra Fast Liquid Chromatography</i>
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UNESCO	Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura
UV	Espectro de ultravioleta
v/v	volume/volume
WHO	<i>World Health Organization</i>

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais como fonte de fármacos tem sido descrita desde os tempos remotos, por praticamente todas as culturas ao redor do mundo, sendo elas de grande importância econômica, social e científica. A partir dessas plantas medicinais, diversos produtos naturais têm sido descobertos na terapêutica moderna, e são consideradas fontes valiosas de compostos bioativos com amplo espectro farmacológico e que atualmente há diversos exemplos de suas aplicações na terapêutica (AHAD et al., 2021; BHAT, 2021) .

Entre os principais grupos químicos presentes nos produtos naturais que oferecem uma ampla variedade de compostos químicos encontram-se os alcaloides, flavonoides, terpenoides e polifenóis, os quais possuem propriedades farmacológicas como antioxidante, antimicrobiana e, anticancerígena atuando, por exemplo, na inibição do crescimento de células cancerígenas, indução de morte celular programada e inibição da angiogênese, (SADIKOĞULLARI et al., 2022). Neste cenário, os produtos naturais oriundos de plantas se destacam nas pesquisas por novos compostos com potencial anticâncer, especialmente para câncer como leucemia que possui tratamento mais difícil.

O câncer permanece como uma das principais causas de morbimortalidade em todo o mundo (BRAY et al., 2018). Esta patologia possui como característica comum o crescimento rápido e desordenado de processos de divisão das células e resistência à apoptose celular, possuindo capacidade de invadir tecidos adjacentes e originando tumores (TRONCONE; VIGLIAR, 2021). Segundo a estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2020 houve uma incidência de 19,3 milhões de novos casos de câncer e cerca de 10 milhões de mortes relacionadas ao câncer. Mantendo-se as tendências atuais com relação, a taxa de incidência, é estimado que esse número possa atingir 28,4 milhões de novos casos de câncer diagnosticados em todo o mundo até 2040, representando um aumento de 47% em comparação os 19,3 milhões de casos diagnosticados no ano de 2020 (Cancer (IARC), 2022).

Diversos fatores contribuem para o aumento da incidência e da mortalidade por câncer, incluindo o envelhecimento populacional, mudança nos estilos de vida, a baixa qualidade de alimentação, sedentarismo, fatores econômicos, predisposição genética e exposição a agentes carcinogênicos. A incidência e a mortalidade do

câncer estão aumentando devido a uma série de fatores complexos, e também é uma das principais causas de morte antes da idade de 70 anos, sendo considerado um grave problema de saúde pública (BRAY et al., 2021).

Dessa forma, torna-se indispensável a implementação de estratégias de prevenção, diagnóstico precoce e tratamento do câncer, tais estratégias envolvem políticas de saúde pública, ações educativas voltadas à redução dos fatores de risco, incentivo a estilos de vida saudáveis e acesso a serviços adequados, e sobretudo, investimentos contínuos em pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento contra o câncer (Feng, 2021).

Na atualidade, o câncer é uma das doenças mais estudadas por ser considerado um problema de saúde pública mundial e apresentar relevância pelo perfil epidemiológico, especialmente nos países em desenvolvimento, com isso, o tema tem despertado muito interesse no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de diferentes tipos de cânceres (Santos et al., 2023).

A leucemia é um tipo de câncer, hematológico que afeta e compromete o funcionamento normal dos glóbulos brancos, representando um grande desafio no contexto oncológico devido à sua elevada taxa de mortalidade, a progressão rápida e resistência significativa das células leucêmicas aos tratamentos convencionais. Diante desses desafios, a busca por novos tratamentos, por agentes terapêuticos mais eficazes contra a leucemia tem se tornado cada vez mais relevantes e necessária nas pesquisas, destacando e ganhando espaço na melhoria dos resultados para pacientes (NIU; PENG; LIU, 2022).

Assim, o avanço de métodos analíticos e ferramentas que facilitem a descoberta e identificação de compostos bioativos, especialmente aqueles obtidos de fontes naturais têm sido fundamentais para acelerar as pesquisas. Neste contexto, a metabolômica e as redes moleculares têm se destacando como ferramenta valiosas nesse processo, fornecendo meios para rastrear e anotar substâncias com potencial atividade biológica (ARÉVALO et al., 2023).

Atualmente mais da metade dos agentes antineoplásicos e antitumorais, utilizados na prática clínica, são derivados ou inspirados em produtos naturais, incluindo plantas, organismos marinhos e microrganismos. Alguns exemplos desses agentes anticâncer derivado de produtos naturais são a adriamicina e camptotecinas (KHANAM; PRAKASH, 2021; NEWMAN; CRAGG, 2020).

Neste contexto, a metabolômica e as redes moleculares vêm sendo cada vez mais associadas às pesquisas farmacológicas, visando acelerar essa busca e determinação de metabólitos ativos (DE OLIVEIRA DEMBOGURSKI et al., 2018), o que se alinha com o objetivo principal deste trabalho, utilizar essas ferramentas para descobrir compostos bioativos com propriedades antileucêmicas promissores em plantas coletado em biomas Pantanal e Cerrado.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Biodiversidade Brasileira

O Brasil abriga uma das mais ricas biodiversidades do mundo, distribuindo-se ao longo de um litoral com aproximadamente 8.500 km de extensão (BARBOSA et al., 2022). Além disso, o Brasil é reconhecido como um dos países mais biodiversos do mundo e tem sido classificado entre os 17 países mais biodiversos, apresentando mais de 55 mil espécies de plantas, o que representa aproximadamente 25% de toda a flora global, excluindo algas e plantas aquáticas. Desse total de espécies de plantas, estima-se que cerca de 53% sejam endêmicas dos biomas brasileiros (MARTINS; MARTINELLI; LOYOLA, 2018; SAVI; ALUIZIO; GLIENKE, 2019).

Essa grande biodiversidade brasileira, pode ser atribuída à sua extensa área territorial, constituído por seus seis biomas; Amazônia, Caatinga, Cerrado, Pantanal, Mata Atlântica e Pampas, os quais possuem características ecológicas e ecossistema adaptadas às suas condições ambientais específicas particular de cada bioma (ELLWANGER; NOBRE; CHIES, 2023). Além disso, cada um desses biomas tem seu próprio conjunto único de características muito específicas em termo de paisagem, geomorfologia, solo, fauna e flora, contendo uma rica biodiversidade e abrigando valiosas fontes de diversidade química (ELLWANGER; CHIES, 2023; HOFMANN et al., 2021)

A Amazônia destaca-se como o maior bioma tropical do mundo, com aproximadamente 5 milhões de km², estando 40% dentro do território brasileiro e apresentando uma flora diversificada, com mais de 14 mil espécies de plantas com sementes registradas (CARDOSO et al., 2017). Com essa imensa biodiversidade do bioma Amazônica, estudos usando inventários em parcelas florestais, revelaram que

apenas em um hectare de floresta amazônica pode abrigar mais de 500 espécies de árvores, e essa diversidade está correlacionada com fatores complexos envolvendo os solos e a dinâmica hídrica da bacia amazônica (HOPKINS, 2019; TER STEEGE et al., 2023).

Em contraste, o Cerrado abrange cerca de 2 milhões de km², sendo o segundo maior bioma brasileira. O cerrado é composto por antigos planaltos e vales mais recentes moldados por grandes sistemas fluviais. Os solos são geralmente ácidos e pobres em nutrientes, o que influencia diretamente na vegetação e biodiversidade encontrados na região (COLLI; VIEIRA; DIANESE, 2020). Apesar de sua riqueza diversidade de espécies vegetais, o Cerrado enfrenta grandes desafios na preservação que abrange vários fatores como falta de áreas protegidas estabelecida, expansão acelerado na agricultura e pecuária, urbanização e desenvolvimento de infraestrutura, mudança de padrões de temperatura precipitação que afeta a distribuição de espécies e escassez de pesquisas de conservação e da compreensão da biodiversidade do Cerrado (VIEIRA et al., 2022).

Outro bioma de destaque é a Mata Atlântica, o qual também é importante devido a sua riqueza de biodiversidade. É um dos biomas mais ameaçados no Brasil, uma vez que originalmente tinha uma área de mais de 1,3 milhão de km² que se estendia ao longo do litoral do país, e atualmente restam apenas cerca de 11% de sua cobertura original em florestas isoladas, sendo que a maior parte de suas áreas remanescentes estão em serras como, por exemplo, a Serra de Mar e a Serra da Mantiqueira (VALADARES et al., 2022). A complexidade da Mata Atlântica proporciona uma grande variação de formações vegetais, incluindo restingas, manguezais, araucária, campos de altitude e outros vários ecorregiões, por sua variação de altitude combinados à elevada umidade e à diversidade do relevo, contribuem para esse alto índice de diversidade (MARQUES et al., 2021).

O bioma único exclusivamente brasileiro é a Caatinga, situado no nordeste do país, abrigando a maior e mais contínua extensão de ecossistema florestal tropical. Ele é sazonalmente seco, possuindo aproximadamente 10% do território brasileiro, com um clima semiárido caracterizado por poucas e irregulares chuvas, alta temperatura e radiação solar intensa, o que aumenta a evaporação e dessecação da terra. A Caatinga apresenta dois principais ecossistemas; Caatinga Cristalina com solos de média a alta fertilidade e a Caatinga Sedimentar com solos arenosos e pobres (DE QUEIROZ et al., 2017). Apesar do seu clima semiárido, a Caatinga possui uma

biodiversidade importante onde predomina uma vegetação xerófila, formada por cactos, arbustos espinhosos e bromélia que se adaptam às condições climáticas extremas desse bioma (VALE et al., 2022).

O bioma Pampa é um bioma pequeno em comparação aos demais biomas brasileiros, ocupando aproximadamente 2% de área total do Brasil. Ele está presente principalmente no estado do Rio Grande do Sul e sua vegetação é predominantemente campestre, composta por campos abertos que apresentam uma rica variedade de gramíneas, ciperáceas e diversas espécies de herbáceas. Estima-se que o bioma Pampa abriga mais de 12mil espécies de plantas (MICHEL; OVERBECK, 2024).

Atualmente, o bioma Pampa está cada vez mais ameaçada devido à expansão da agricultura, pecuária e urbanização. A transformação dos ecossistemas nativos em monoculturas e pastagens diminui de maneira significativa a cobertura original do bioma, impactando as espécies do ecossistema, diminuindo a sua biodiversidade (ELLWANGER; ZILIOOTTO; CHIES, 2022).

O Pantanal, em particular, é conhecido por estar entre as maiores planícies inundáveis do mundo, ocorrendo no Brasil, Paraguai e uma pequena porção na Bolívia. No Brasil, o Pantanal ocorre nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Este bioma é bastante reconhecido por estar entre as maiores área úmida tropical do mundo, possuindo um valor inestimável e reconhecido como Patrimônio Natural da UNESCO, devido à sua biodiversidade extraordinária. No entanto, em 2020, o Pantanal enfrentou uma grave crise quando incêndios florestais de proporções sem precedentes assolaram a região, deixando um terço do Pantanal em chamas (BOIN et al., 2019; CORREA et al., 2022).

A vegetação do Pantanal e do Cerrado é abundante em espécies vegetais com propriedades medicinais, empregadas historicamente para uma variedade de finalidades terapêuticas. A partir do bioma do Cerrado, 700 espécies vegetais foram levantadas com relação a sua utilização na medicina tradicional, entretanto ainda há escassez de estudos quando se compara essa biodiversidade, o que ressalta a potencialidade deste bioma para a seleção de espécies a serem estudadas (Santos et al., 2020).

2.2. Plantas Medicinais e Etnofarmacologia

A utilização de plantas para fins medicinais possui uma trajetória histórica longa e milenar, sendo essencial para diversas civilizações ao longo do tempo, estruturando-se como um dos fundamentos da medicina tradicional. Historicamente em diferentes épocas, várias culturas ao redor do mundo utilizavam as propriedades terapêuticas das plantas (SAM, 2019; YANIV, 2014). Desta maneira, desde as sociedades antigas, os tratamentos terapêuticos e a busca de novos fármacos a partir de plantas desempenham um papel essencial no tratamento de doenças e na promoção da saúde e do bem-estar (MIRALDI; BAINI, 2019).

O conhecimento acerca das plantas medicinais tem sido mantido e transmitido por meio de costumes, passando de geração a geração, e tais tradições estabeleceram a base para a farmacologia moderna e associado a diversos fármacos utilizados na terapêutica. O interesse crescente sobre as diversas espécies de plantas para uso terapêutico, estimulou a busca do conhecimento científico em relação a essas plantas, resultando em crescente estudos etnofarmacológicos empenhados não somente a comprovação dos efeitos terapêuticos, mas também servindo de base para a busca de novos candidatos a fármacos, os quais estão relacionados com a presença de metabólitos secundários (ATANASOV et al., 2015; DASGUPTA, 2023; ŠANTIĆ et al., 2017).

A etnofarmacologia desempenha um papel fundamental na descoberta e desenvolvimento de agentes anticancerígenos, utilizando o conhecimento de comunidades e povos tradicionais, conhecimento de medicinal tradicional e produtos naturais, vários estudos destacam o potencial dos produtos naturais derivados de plantas e microrganismos no desenvolvimento de fármacos anticancerígenos. Algumas plantas utilizadas na medicina tradicional têm demonstrado potencial anticancerígeno como, por exemplo, *Anogeissus leiocarpus*, conhecida como bétula africana, a qual é usada na África no tratamento do câncer e outras doenças (de Mesquita et al., 2009; Ferreira et al., 2023; Magalhães et al., 2021).

Neste contexto, o Brasil se destaca como um território promissor devido à riqueza em biodiversidade de plantas medicinais, abrigando biomas únicos com espécies ainda pouco estudadas e que podem ser fontes para a descoberta de substâncias com aplicação farmacológica (ABDALA; CARLOS, 2020).

Os metabólitos secundários são compostos orgânicos produzidos por plantas que não desempenham um papel direto em processos essenciais como crescimento, desenvolvimento ou reprodução, porém esses metabólitos auxiliam na manutenção da espécie no ecossistema como, por exemplo, a ação protetora contra os raios ultravioletas, defesa contra herbívoros e outros. Esses metabólitos, associados a propriedades terapêuticas e farmacológicas, têm sido alvo de diversos estudos, incluindo ações analgésicas, antimaláricas, estimulantes, anti-inflamatórios e outras (Chaachouay et al., 2023b).

As zonas de transição entre os biomas se distinguem por uma grande variedade de espécies de plantas que se adaptaram às condições ambientais únicas dessas regiões. O Pantanal e o Cerrado são dois biomas brasileiros que estão em uma zona de transição com uma grande variedade de espécies vegetais. Diversas plantas medicinais do bioma Pantanal e Cerrado apresentaram propriedades terapêuticas e aplicação na medicina popular, uma vez que muitas dessas espécies mostraram ter propriedades antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias e antitumorais. Como exemplo, pode-se citar as espécies *Baccharis trimera* e *Phaeophleospora vochysiae* com propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas e *Tabebuia aurea* com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (SAVI et al., 2018).

Estudos de Silva e colaboradores (2023) apontaram o potencial citotóxico de algumas plantas coletadas no Cerrado. Essas plantas são pertencentes a cinco distintas famílias (Anacardiaceae, Annonaceae, Fabaceae, Melastomataceae e Siparunaceae) e apresentaram citotoxicidade contra em cinco linhagens celulares de glioma (GAMG, U251-MG, SF188, RES259 E HCB151). Neste estudo, uma atividade citotóxica promissora foi observada na fração de clorofórmio de *Miconia chamissois* com IC₅₀ de 34,31 ± 5,50 (µg/mL) e índice de seletividade 12,1 para a fração de acetato de etila (SILVA et al., 2023).

Além disso, há registros de plantas do Cerrado usadas tradicionalmente devido às suas propriedades medicinais e que apresentam alta citotoxicidade contra células tumorais e baixa toxicidade para células não tumorais. Entre elas, destacam-se *Jacaranda cuspidifolia* Mart., *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers, *Lychnophora pinaster* Mart., *Baccharis dracunculifolia* DC., *Zanthoxylum riedelianum* (Engl.) e *Pouteria torta* (Mart.) Radlk., esta última também é conhecida por sua atividade antimicobacteriana, antidiarreia e no tratamento de vitiligo, tosse, inflamações, dor,

reumatismo, doenças gastrointestinais, verminoses e diversas outras doenças (ROCHA et al., 2022).

A preservação da biodiversidade dos biomas Pantanal e Cerrado é fundamental para manter a diversidade genética vegetal e gerar conhecimento sobre a descoberta dos constituintes químicos, incluindo novas substâncias bioativas (COSTA et al., 2020). Nesse sentido, vale ressaltar a importância da pesquisa com plantas medicinais encontradas em nossa biodiversidade para o desenvolvimento de novos fármacos e outras aplicações na medicina humana e animal, além de auxiliar na busca de soluções sustentáveis e preservação da biodiversidade da fauna e flora.

É fundamental estabelecer áreas de proteção que visem preservar e restaurar o ecossistema, protegendo seus recursos naturais preciosos, como fauna, flora (CORREA et al., 2022). Somente por meio dessas medidas de conservação e do cuidado com o Pantanal, poderemos garantir a continuidade dos valiosos serviços ecossistêmicos que ele proporciona (Gonzaga et al., 2022; Moreira et al., 2022; Moreira et al., 2021; Sonoda et al., 2021).

A necessidade urgente de mecanismos regulatórios sólidos que fomentem a bioprospecção com impactos na conservação tem sido destacada por diferentes autores, esses mecanismos não apenas assegurariam a proteção dos ecossistemas, mais também promoveriam um uso mais ético e responsável dos recursos naturais dos biomas brasileiros, onde também incentiva práticas que respeitem as comunidades locais, suas tradições e seus conhecimentos sobre as plantas, com as implementação de políticas requer um compromisso conjunto entre governos e sociedade, promovendo assim a valorização da pesquisa científica e dos saberes do povo tradicionais, além de impulsionar a bioeconomia. Para isto, é essencial parcerias entre pesquisadores, comunidades e instituições governamentais para garantir que os recursos sejam utilizados de maneira responsável e sustentável (ADADE WILLIAMS; SIKUTSHWA; SHACKLETON, 2020; ANAND; SREEDEVI; SWAPNA, 2023; GAZIZOVA, 2020).

Essas restrições são essenciais para proteger a biodiversidade e os direitos dos grupos indígenas e quilombolas, por exemplo, garantindo que as populações locais obtenham benefícios justos e equitativos da exploração comercial de seus recursos naturais. Além disso, essas estruturas legais são essenciais para proteger as informações de conhecimento tradicional que foram desenvolvidos ao longo de gerações (WILLIAMS et al., 2020).

Estabelecer colaborações entre instituições acadêmicas, órgãos governamentais e comunidades indígenas e quilombolas é crucial para elaborar documentos éticos que promovam práticas sustentáveis na pesquisa de plantas medicinais, enfatizando a abertura e o respeito cultural, onde essas colaborações podem melhorar a eficácia de preservação do bioma, ao mesmo tempo em que desenvolvam inovações para os mercados farmacêutico, alimentício, cosmético e outros (CHECHETTO et al., 2017).

Esta abordagem integrada abrange não apenas em problemas de saúde globais urgentes que enfrentamos atualmente, mas também desempenha um papel fundamental no crescimento das comunidades locais, permitindo que elas preservem o bioma para as gerações futuras. Ao fortalecer significativamente seu envolvimento ativo nas áreas críticas de preservação e na gestão sustentável de recursos, garantindo o conhecimento medicinal e biodiversidade de recursos biológicos (KADAM; PAWAR, 2020; WILLY; JOHN; KARATU, 2023).

Diversas pesquisas têm descrito compostos biologicamente ativos a partir de várias espécies nativas dos biomas do Pantanal e do Cerrado. Estes compostos possuem uma gama de propriedades farmacológicas que têm potencial de desafiar as limitações aos crescentes problemas de resistência a medicamentos, revelando resultados promissores que podem oferecer soluções inovadoras para o desenvolvimento de novos fármacos e ao mesmo tempo diminuir os efeitos colaterais comumente associado com os medicamentos utilizados na terapêutica, enfatizando a importância da preservação dessa rica biodiversidade brasileira uma vez que ainda não conhecemos química e biologicamente um grande número de espécies brasileiras (CAROLINE et al., 2016; DE O. RIBEIRO et al., 2018, 2018; RIBEIRO NETO et al., 2020; RODRIGUES et al., 2019).

Apesar de não existir uma quantificação precisa de espécies de plantas medicinais reconhecidas exclusivamente no Pantanal, pesquisas apontam que essa área apresenta uma flora abundante e variada. A espécie *Heteropterys afrodisíaca*, O, Mach., denominada "nó-de-cachorro", é tradicionalmente utilizada por suas propriedades afrodisíacas, sendo reconhecida por seus potenciais efeitos na saúde reprodutiva masculina, particularmente na melhora da função sexual e fertilidade. Estudos a partir da infusão desta espécie, combinado com exercícios físicos, mostrou influência em diversos parâmetros para função testicular, espermatogênese, estímulo de produção de testosterona e potencialização das funções androgênicas, o que

sugere ser um agente promissor para melhorar a saúde reprodutiva masculina, podendo ser um alvo para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da infertilidade masculina (GOMES; DOLDER, 2011).

É importante destacar que o uso sustentável de espécies vegetais, deve sempre está associado com cuidado com a natureza e com a preservação da biodiversidade, no avanço e desenvolvimento de novos fármacos, para garantir benefício à saúde humana e valorizando os recursos naturais dessas regiões. A promoção das plantas medicinais brasileiras apresenta um grande potencial para impulsionar a bioeconomia do país, considerando sua ampla diversidade vegetal, os conhecimentos tradicionais e os abundantes recursos naturais. No entanto, é essencial um planejamento estratégico, aliado a investimentos adequados, para enfrentar os desafios de gestão de forma eficiente e sustentável. Além disso, é fundamental fomentar iniciativas que fortaleçam as economias locais de menor escala (KÖNIG; PINSKY, 2023; LINDBERG et al., 2023).

2.3. Plantas medicinais para busca de substâncias bioativas promissoras

Os produtos naturais (PNs) têm uma longa história como fontes de compostos bioativos e de importância como matéria prima em aplicações nutraceuticas e farmacêuticas, principalmente com foco nos metabólitos secundários como terpenos, alcaloides, cumarinas, fenólicos, taninos, lignanas, flavonoides e outros. Entre os anos 1981 e 2019, mais do que 50 % dos fármacos são produtos naturais ou derivados desses, o que demonstra a grande importância desses compostos no desenvolvimento de novos candidatos a fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2020). Assim, nesse artigo de revisão dos pesquisadores Newman & Cragg (2022) são apresentados dados sobre os candidatos a fármacos desenvolvidos e enfatizam a importância da descoberta deles a partir de produtos naturais, uma fonte valiosa de novos agentes terapêuticos, salientando a necessidade de investimentos contínuos nessa área.

Os produtos naturais (PNs) têm uma longa história como fontes de compostos bioativos e de importância como matéria prima em aplicações nutraceuticas e farmacêuticas, principalmente com foco nos metabólitos secundários

como terpenos, alcaloides, cumarinas, fenólicos, taninos, lignanas, flavonoides e outros. Entre os anos 1981 e 2019, mais do que 50 % dos fármacos são produtos naturais ou derivados desses, o que demonstra a grande importância desses compostos no desenvolvimento de novos candidatos a fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2020). Assim, nesse artigo de revisão do pesquisador Newman (2022) são apresentados dados sobre os candidatos a fármacos desenvolvidos e enfatizam a importância da descoberta deles a partir de produtos naturais, uma fonte valiosa de novos agentes terapêuticos, salientando a necessidade de investimentos contínuos nessa área.

Os produtos naturais apresentam grande variedade de estruturas químicas, incluindo substâncias estruturalmente complexas e com promissoras propriedades farmacológicas. Muitas plantas têm sido estudadas como possíveis fontes de novos candidatos a fármacos, uma vez que os produtos naturais ainda demonstram serem um excelente ponto de partida para essas pesquisas (MAJOLO et al., 2019).

Segundo Varghese e Dalvi (2021), plantas medicinais são espécies vegetais essenciais para a manutenção da saúde em geral, sendo utilizadas com fins terapêuticos, paliativos ou profiláticos de diversas enfermidades humanas e animais, possuindo uma grande variedade de compostos químicos. Assim, a biodiversidade brasileira tem grande destaque, uma vez que é rica em espécies de plantas medicinais e fornece uma valiosa fonte de novos compostos com propriedades como antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana, entre outras (FONGANG FOTSING et al., 2021).

Diversas classes de metabólitos secundários podem ser destacadas neste contexto como alcaloides, fenólicos, glucosinolatos e terpenoides, por exemplo o taxol obtido de *Taxus brevifolia* e a halicondrina B da esponja marinha *Halichondria okadai* com propriedades anticancerígenas (EKIERT; SZOPA, 2020; HANNAN et al., 2021; VARGHESE; DALVI, 2021). Outros alcaloides de destaque no arsenal terapêutico de combate ao câncer são os alcaloides da vinca (vincristina e vimblastina), podofilotoxinas e análogos da camptotecina, os quais são produtos naturais de grande destaque utilizados na terapêutica (BANI; SAHOO, 2020).

Com avanços na biologia molecular para a síntese de compostos líderes, com foco na reconstrução e otimização de vias biossintéticas, tem-se avançado sobre a questão da obtenção de produtos naturais com potencial terapêutico, o que poderá representar cada vez mais uma estratégia para contornar os problemas relacionados

à obtenção e escalonamento de novos fármacos advindos de produtos naturais. Tais desafios também incluem a escassez de recursos naturais, bem como as estruturas químicas complexas dos produtos naturais que inviabilizam rotas sintéticas para sua obtenção, dificuldade na caracterização estrutural e alto custo de purificação da matéria prima, bem como obstáculos dos processos de extração, desconhecimento de etapas biossintéticas não replicáveis, além da necessidade de garantir e preservar o ecossistema (BANERJEE; BANERJEE; MONDAL, 2022; QIN et al., 2020).

Esses desafios têm impulsionado o avanço da biotecnologia, permitindo que mais estudos científicos busquem alternativas sustentáveis e eficientes para o desenvolvimento de novos fármacos como o cultivo de microrganismos, ao mesmo preservando a biodiversidade e promovendo o uso mais sustentável e responsável dos recursos naturais. Além disso, as técnicas inovadoras de biotecnologia e farmacogenômica são ferramentas que otimizam e abrem mais possibilidades para transformar a produção de compostos bioativos de maneira mais rápida, econômica e sustentável minimizando o impacto ambiental associado com o extrativismo tradicional (ATA; NAZ; FRIESEN, 2022; MUDUNURU et al., 2023; TALEBI; SPARREBOOM; COLACE, 2022).

Os alcaloides da vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don, Apocynaceae) são compostos de destaque, sendo está uma rica fonte com mais de 90 compostos alcaloides identificados, incluindo notáveis substâncias como a vincristina, vinblastina, vinorelbina e vindesina, os quais mostraram potentes atividades anticancerígena e antimetabólica. Os inibidores mitóticos impedem a divisão celular, sendo utilizado em terapia combinada para o tratamento de vários tipos de câncer. A vincristina é utilizada no tratamento de leucemia linfocítica aguda, linfossarcoma, linfogranulomatose, linfoma não-Hodgkin e tratamento paliativo do linfoma linfocítico, formas nodular e difusa (diferenciado ou indiferenciado), enquanto que a vinblastina é utilizada contra tumores testiculares, carcinoma de mama, coriocarcinoma, sarcoma de Kaposi e distúrbio de Letterer-Siwe (BARRALES-CUREÑO et al., 2019; HORESCU; ARTENE, 2020; ŠKUBNÍK et al., 2021).

Adicionalmente, pode-se citar as epotilonas (**Figura 1**) que são substâncias bioativas derivadas de fontes naturais. Essas substâncias têm atraído atenção na pesquisa farmacêutica devido a suas propriedades anticâncer, sendo um potencial promissor para tratamentos convencionais. As epotilonas, obtidas a partir da espécie *Sorangium cellulosum* (Brockman) da família Polyangiaceae, possuem efeitos

inibitórios estabilizando microtúbulos de forma semelhante ao paclitaxel, porém com menor sensibilidade no mecanismo de resistência. Desta maneira, poderiam ser utilizados em tratamentos de tumores resistentes, incluindo o câncer de mama triplo-negativo (BRAHMACHARI, 2021; LONG; YANG; HUANG, 2020; VILLEGAS et al., 2023).

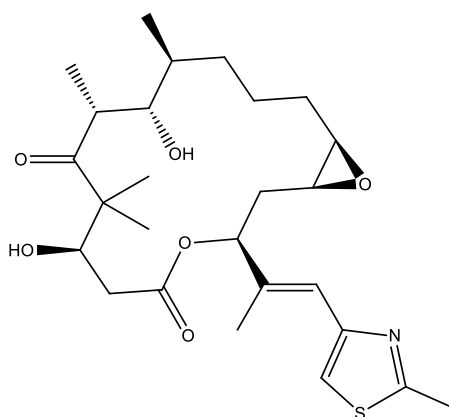


Figura 1. Estrutura molecular de epotilona

Outra importante classe são as tanshinonas, como aquelas obtidas de *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Lamiaceae). Essas substâncias exibem propriedades citotóxicas contra diversas linhagens de células tumorais humanas, incluindo leucemia, câncer de pulmão, carcinoma hepatocelular, carcinoma gástrico, câncer colorretal, glioma, osteossarcoma, câncer cervical, câncer de ovário, câncer de mama e próstata (Fang et al., 2020; Hu et al., 2021; Huang et al., 2021; Lin et al., 2021). A tanshinona II inibe o estresse oxidativo no carcinoma hepatocelular ao modular as vias de sinalização PI3K/akt e Nrf2/HO-1, reduzindo o dano hepático e promovendo as defesas antioxidantes (Fang et al., 2021). A partir de estudos sobre o mecanismo das tanshinonas I, IIA e criptotanshinona (**Figura 2**) em células de câncer de próstata, observou-se uma inibição de STAT3 impedindo o crescimento e proliferação celular, bem como a disseminação e a resistência, agindo no bloqueio do ciclo celular na fase G2/M, induzindo apoptose, reduzindo e prevenindo a metástase, além de preservar a estabilidade genética aumentando a eficácia da quimioterapia (LI et al., 2022). Em avaliações em ensaio de CCK-8, a tanshinona II mostrou inibição na proliferação das linhagens de osteossarcoma MG-36 e U2-OS (30 μ M), inibindo o mecanismo dependente da quinase Src. Desta maneira, esta substância regula o nível de

expressão de expressão de Bcl-2/Bax, assim reduzindo o crescimento e a metástase do osteossarcoma, consequentemente reduz a proliferação e migração das células tumorais e modulando sua progressão (HU et al., 2021).

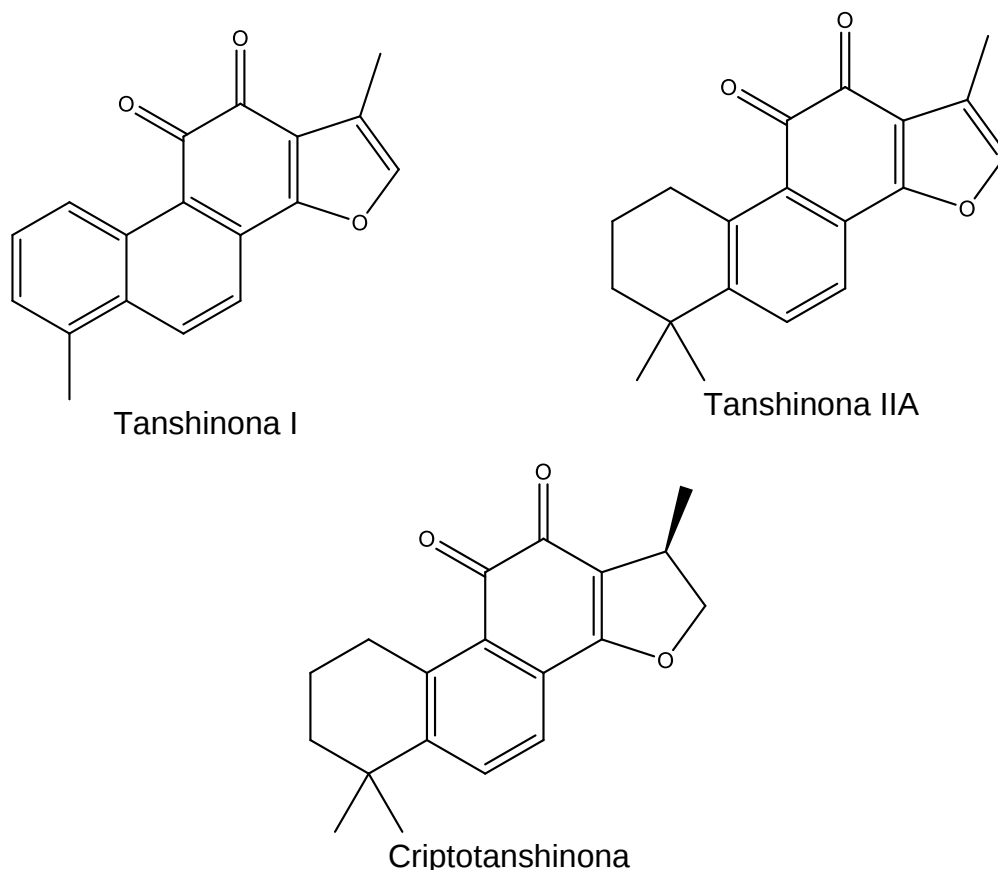


Figura 2 – Estruturas químicas de tanshinonas I, IIA e criptotanshinona.

O topotecano, derivado da *Camptotheca acuminata* Decne. (Nyssaceae), é um fármaco utilizado na terapêutica para tratar câncer, sendo ele um inibidor da topoisomerase que impede a replicação do DNA e a divisão celular, assim como taxol que é um inibidor mitótico e impede a divisão celular por meio da estabilização dos microtúbulos (MARTINO et al., 2017).

O estilbenoide combretastatina A4 (**figura 3**), isolado de *Combretum caffrum* kuntze (Combretaceae), é um agente desregulador vascular que destrói os vasos sanguíneos que fornecem nutrientes ao tumor. Enquanto que o flavopiridol (Figura 4), obtido de *Dsoxylum binectarigerum*, é outro quimioterápico usado como

inibidor da quinase dependente de ciclina que previne a divisão celular por inibir a atividade das quinases dependentes de ciclina (DRAGOI; ALEXANDRU, 2021).

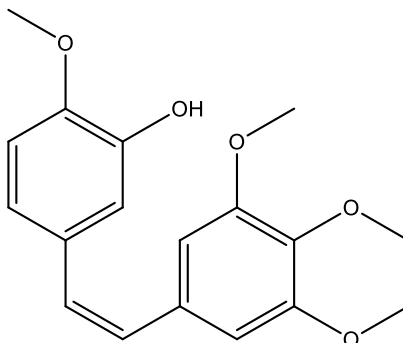


Figura 3. Estrutura da combretastatina A4

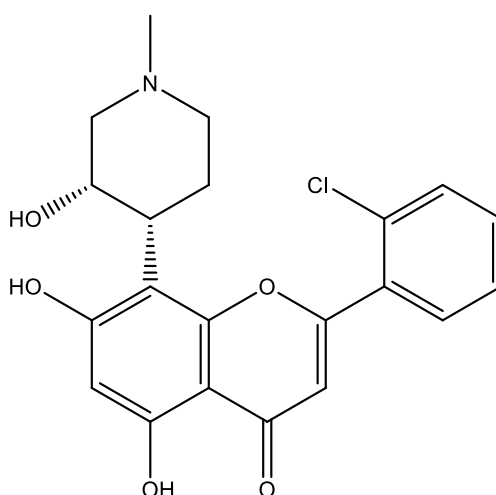


Figura 4. Estrutura de flavopiridol

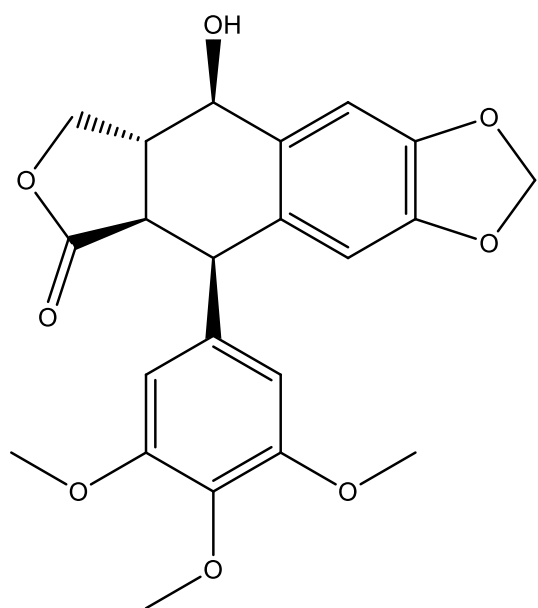
O uso de plantas medicinais como fonte para a busca de compostos bioativos é uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos fármacos. Entretanto, para avançar nessa área, é necessário aprofundar os estudos na anotação desses compostos e sua atividade biológica, além da necessidade de avaliar a segurança e eficácia por meio de ensaios clínicos (PIRINTSOS et al., 2022).

Atualmente, nosso grupo de pesquisa possui um projeto, advindo de uma necessidade do INAU (Instituto Nacional de Áreas Úmidas), que consta de um banco de extratos de plantas do Pantanal (BEPan) para o desenvolvimento da pesquisa no estado e valorização da flora local. Diversas espécies já foram extraídas a partir de métodos padronizados de extração com um extrator acelerado por solvente e constam

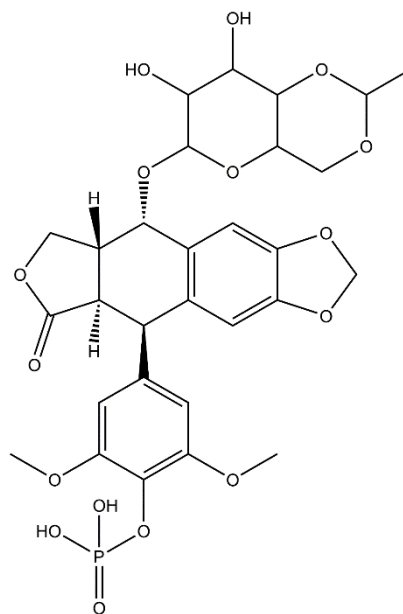
no BePan, as quais algumas já foram utilizadas na busca de substâncias bioativas e produziram alguns artigos científicos e uma patente (VERÇOSA et al. 2011; BORGES et al., 2019; BRITO et al., 2021). O BePAN contém extratos de mais de 200 espécies de plantas, as quais estão todas depositadas no Herbário CGMS da UFMS. Este projeto vem beneficiando um grande número de pesquisadores, desde a área da química de produtos naturais até a farmacologia. Neste trabalho utilizamos extratos depositados na extratoteca BePan.

Outro exemplo da utilização dos extratos depositados no BePAN, foram as pesquisas realizadas por Borges e colaboradores (2019) que avaliaram atividade ovicida de extratos etanólicos, obtidos por extração acelerada com solvente, de 17 plantas coletadas no Pantanal do estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Diversos extratos do BePAN foram avaliados contra *Haemonchus placei* e por meio da metabolômica foi possível detectar e sugerir os compostos ativos desses extratos vegetais.

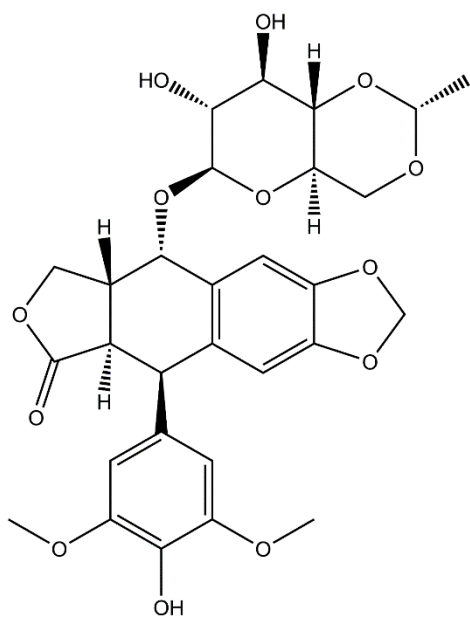
Outro estudo realizado com extratos de plantas do Pantanal, foram analisadas 20 espécies de plantas do Pantanal para analisar suas atividades antifúngica, buscando os valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) contra cepas de *Candida*. Foi observado que os extratos de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers (Fabaceae), *Polygala molluginifolia* A. St-Hil. & Moq (Polygalaceae) e *Cantinoa mutabilis* (Rich.) Harley & J.F.B.Pastore (Lamiaceae) e suas frações obtidas em clorofórmio e acetato de etila (AcOEt) apresentaram mais elevadas atividades contra cepas de *Candida*. A fração EtOAc de *P. molluginifolia*, mostrou inibição do crescimento contra as cepas de *C. parapsilosis* e *C. krusei* com concentrações fungicidas mínimas (CFM) de 125 e 62,5 µg/mL, respectivamente. Também foi possível a identificação de compostos bioativos com potencial antifúngico a partir da fração AcOEt de *P. molluginifolia*, sendo esses derivados da podofilotoxina (**Figura 5**). Também foram identificados derivados glicosilados de megastigmanos, incluindo blumenol (**Figura 6**) dihidroblumenol (**Figura 7**) e alguns flavonoides (BRITO et al., 2021).



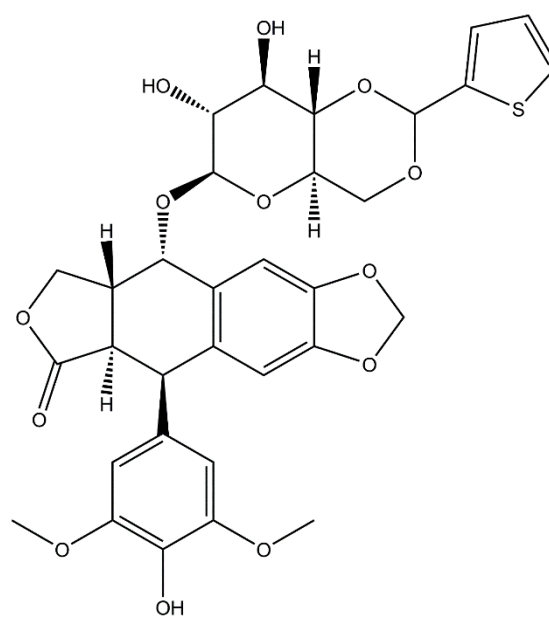
A



B



C



D

Figura 5. Estrutura da podofilotoxina(A), etopofos(B), etoposídeo(C) e teniposido(D).

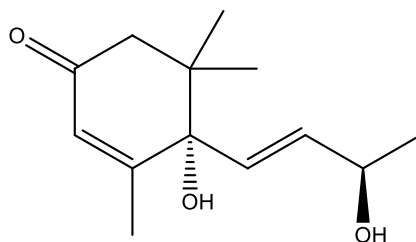


Figura 6. Estrutura do blumenol A

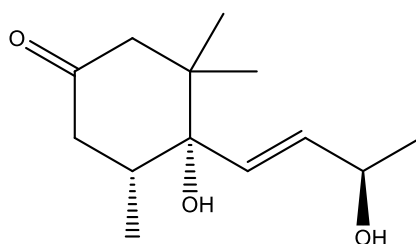


Figura 7. Estrutura do diidroblumenol A

Recentes avanços tecnológicos e científicos têm impulsionado a descoberta de fármacos derivados de produtos naturais, possibilitando e viabilizando seu desenvolvimento e aprimoramento de tecnologia na pesquisa de novos candidatos terapêuticos. Alguns dos principais desafios na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos incluem a triagem para isolamento de compostos bioativos, sua caracterização estrutural e funcional, como também a otimização de suas propriedades farmacológicas. Além disso, a obtenção de informações detalhadas é essencial para facilitar a identificação e exploração de novos produtos naturais com potencial terapêutico (TAUTERMANN, 2020).

Os desenvolvimentos em várias técnicas cromatográficas e espectrométricas revolucionaram o processo de descoberta de novos candidatos a fármacos a partir de produtos naturais (Singh et al., 2020). As técnicas cromatográficas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia em fase gasosa (CG), juntamente com a espectrometria de massas (EM) são técnicas úteis que permitem a anotação das substâncias presentes nos extratos sem uma etapa prévia de isolamento. Assim, essas técnicas permitiram o avanço dos estudos para a determinação de compostos líderes, sugestão de possíveis bioativos em combinação com as avaliações biológicas e facilitação no monitoramento do isolamento de compostos líderes (KHAJAVINIA et al., 2023; PATEL et al., 2021).

Desta maneira, as técnicas acopladas citadas anteriormente têm viabilizado a anotação de novos compostos e a caracterização detalhada de suas estruturas, o que tem impulsionado a descoberta de uma série de novos fármacos com potencial terapêutico. A capacidade de separação, detecção e elucidação estrutural oferecida por essas técnicas tem sido fundamental para a compreensão dos constituintes químicos presentes em plantas, microrganismos e outras fontes naturais, abrindo caminho para o desenvolvimento de terapias inovadoras e a exploração de novos compostos bioativos (ARA et al., 2021).

Além das ferramentas analíticas aprimoradas, os métodos de triagem e fracionamento de alto rendimento têm sido usados para pré-fracionar extratos brutos em subfrações, tornando-os mais adequados para sistemas de gerenciamento com processos automatizados, aumentando significativamente o número de compostos identificados em comparação com o uso de extratos brutos, permitindo um monitoramento mais eficiente dos compostos promissores (ATANASOV et al., 2021; AYON, 2023).

2.4. Câncer e leucemia

O câncer, uma das principais causas de morte no mundo, é uma doença caracterizada pelo crescimento e disseminação descontrolados de células anormais por todo o corpo (BRAY et al., 2021). Devido ao crescente número de mortes precoces por causa do câncer, as políticas governamentais têm sido desenvolvidas no intuito de promover estratégias para diagnóstico precoce, além de investimentos em saúde para promover tratamentos melhores e mais eficazes, como também financiamento para o desenvolvimento de novos fármacos anticancerígenos com maior eficácia e reduzidos efeitos colaterais (Singh et al., 2019).

De acordo com Sung et al., (2021), o câncer é bastante reconhecido como uma síndrome metabólica, e prevê-se que haverá cerca de 28,4 milhões de casos em todo o mundo até o ano de 2040, indicando um aumento substancial de 47% em comparação com os números registrados em 2020.

O aumento crescente de casos de câncer pode ser atribuído principalmente a mudanças na demografia da população, sendo um efeito maior nos países em transição, de 64% para 95%, em oposição àqueles que já concluíram o processo de

transição (de 32% para 56%). A crescente incidência de câncer nos países em desenvolvimento pode ser agravada pelos crescentes fatores de risco ligados à globalização e à economia em expansão, observa-se um aumento na proporção de idosos, devido a melhores condições de vida e bem-estar e assim com o aumento dessa população, que são mais suscetíveis a doenças, incluindo câncer, pode levar uma maior demanda por tratamentos mais eficazes e preventivas para lidar com essas condições (Santos et al., 2023).

Além disso, os processos de envelhecimento, juntamente com as alterações do hábito de vida mais sedentário, a mudança de comportamento e fatores ambientais, incluindo mudanças estruturais das cidades, que influenciam coletivamente na mobilidade, os hábitos alimentares e a suscetibilidade contaminantes e poluentes ambientais, favorecem o aumento da incidência e da mortalidade por câncer (SUNG et al., 2021).

No Brasil segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer, estima-se um número aproximadamente de 11.540 novos casos de leucemia no triênio 2023-2025, sendo 6.250 em homens e 5.290 em mulheres. Estes valores representam um risco equivalente a 5,33 por 100 mil habitantes, 5,90 novos casos por 100 milhões de homens e 4,78 por 100 milhões de mulheres (INCA; Santos et al., 2023).

A leucemia é um distúrbio oncológico que afeta o processo normal de formação de células sanguíneas, levando à multiplicação anormal de glóbulos brancos. É patologia de natureza complexa que implica em modificações nas células hematopoiéticas e no seu microambiente, ocasionando a disfunção na gênese de diferentes tipos de células sanguíneas. As neoplasias do sistema hematopoiético se caracterizam pela proliferação anormal descontrolada e bloqueio da maturação das células-tronco hematopoiéticas e as leucemias neoplásicas podem se acumular na medula óssea e/ou sangue periférico (KASAI et al., 2020; KIWUMULO et al., 2021).

As leucemias podem ser classificadas em mielóide e linfóide, dependendo se da linhagem afetada. Além disso, essa subdivisão das leucemias também é classificada como aguda ou crônica com base no estágio de maturação das células afetadas, conforme mencionado por Brown, (2021). No contexto das neoplasias, as células mieloides são importantes para diagnóstico e para a definição melhor estratégia terapêutica, em que estão envolvidas na fagocitose e na apresentação de antígenos às células T, estabelecendo uma ponte entre a imunidade inata e adaptada,

por outro lado, as células linfoides envolve a identificação de mutações genéticas específicas para compreensão da progressão da doença (BROWN, 2021).

A leucemia linfoblástica se manifesta predominantemente em pacientes pediátricos, embora também possa se manifestar em adultos, tendo origem nas células B ou T, e distingue-se pela existência de células precursoras imaturas pertencentes a ambas as linhagens (LUCA, 2021). A categorização das neoplasias linfoblásticas B baseia-se principalmente em descobertas genéticas e moleculares, embora esta não seja a situação para as neoplasias originárias de células linfóides T, com a presença de anormalidades citogenéticas recorrentes nessas neoplasias tem implicações significativas tanto para o prognóstico quanto para o tratamento (MALARD; MOHTY, 2020).

A leucemia mieloide aguda é um distúrbio hematológico fenotípico e genético, originando-se de alterações genéticas que ocorrem em células blásticas na medula óssea e no sangue periférico, sendo caracterizada pela presença de anormalidades citogenéticas recorrentes associadas a apresentações clínicas específicas (INFANTE; PIRIS; HERNÁNDEZ-RIVAS, 2018).

As alterações genéticas e epigenéticas são fundamentais para o desenvolvimento e progressão da leucemia mieloide aguda, pois influenciam a forma como os genes são expressos e regulados. Enquanto as alterações genéticas envolvem mudanças na sequência do DNA, as epigenéticas referem-se a modificações que afetam a expressão gênica sem alterar a sequência do DNA em si, frequentemente associadas a fatores ambientais e comportamentais que podem impactar a saúde do indivíduo (GOLDMAN et al., 2019).

Segundo Boyd et al., (2017), o acúmulo de células imaturas, comumente chamadas de blastos, dentro da medula óssea prejudica a produção de células eritroides, linfoides e granulocíticas, além de afetar a produção de plaquetas e isso acomete disfunção na medula óssea e no sangue periférico que pode ocasionar uma suscetibilidade ampliada para infecções.

2.5. Produtos naturais com propriedades anticâncer

Pesquisas para avaliar novos fármacos potenciais anticâncer, depende fortemente de linhagens celulares de câncer humano, que servem como modelos

renováveis para estudar os complexos processos celulares e moleculares envolvidos na carcinogênese, além de ser uma ferramenta *in vitro* vantajosa devido à sua acessibilidade global. Esses modelos são essenciais para rastrear e avaliar a eficácia dos tratamentos e podem fornecer resultados para um screening inicial e informações importantes sobre como as células tumorais reagem a diferentes compostos e concentrações, possibilitando desenvolver métodos mais rápidos para a determinação de novos candidatos a fármacos (KITAEVA et al., 2020; QUENTMEIER et al., 2019; XIE; TEUSCH; MRSNY, 2020).

A complexidade da administração de medicamentos direcionados surge da sua distribuição sistêmica e da ausência de um tumor bem definido, necessitando do desenvolvimento de terapias específicas onde a utilização de abordagens de modelagem e simulação desempenham um papel importante no desenvolvimento de fármacos mais seletivos para a leucemia, pois permite uma compreensão abrangente e tratamento mais eficaz dos distintos problemas associados a esta doença (Kasai et al., 2020)

Vários medicamentos quimioterápicos foram desenvolvidos para o tratamento do câncer, entretanto, o desenvolvimento de resistência a esses fármacos, bem como os efeitos colaterais e a toxicidade associados a eles, são os principais problemas encontrados na terapia clínica (Bimal et al. 2019).

Ao longo da história, a busca por tratamentos eficazes contra o câncer tem sido substancialmente influenciada pelos produtos naturais, sendo que diversas substâncias são conhecidas na farmacologia de quimioterápicos, antineoplásicos e anticancerígenos como, por exemplo, os alcaloides taxanos (paclitaxel e docetaxel), podofilotoxina (etoposídeo), camptotecina (irinotecano) e alcaloides da vinca (vincristina e vimblastina). Essas substâncias são derivadas de plantas e atualmente são utilizadas na terapêutica (Sanz et al., 2019; Doytchinova, 2022). Além dessas também pode-se citar a actinomicina D e a mitomicina C derivadas de microrganismos e a bleomicina derivada de organismos marinhos (AMJAD; CHIDHARLA; KASI, 2023; XIE; CHENG; WEI, 2023).

Os fármacos quimioterápicos são usados para tratar o câncer em combinação ou sozinhos, dependendo do tipo e estágio do câncer, matando ou retardando o crescimento das células cancerígenas. Esses fármacos são classificados de acordo com seu mecanismo de ação, incluindo agentes alquilantes, antimetabólitos e inibidores da topoisomerase (JIANG et al., 2023).

2.5.1 Produtos naturais com atividade antileucêmica

Compostos bioativos derivados de plantas têm demonstrado atividade antileucêmica, inibindo o crescimento dela como, por exemplo, a berberina e coptisina presentes em extratos de *Coptis chinensis* Franch. (Ranunculaceae). Essas substâncias mostraram atividade significativas contra a células de hepatoma e leucemia em ensaio in vitro em várias linhagens celulares HepG2, Hep3B, SK-hap1 e PLC/PRF/5 e células leucêmica K562, U397, P3H1 e Raji. Essas substâncias de *C. chinensis* apresentaram forte inibição na proliferação celular dessas linhagens cancerígenas com valores de IC₅₀ de 1,4 a 15,2 µg/mL para células hepatoma e 0,6 a 14,1 µg/mL para células leucêmicas (LIN et al., 2004).

Outro estudo observou que os isolados de tashinonas totais de *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Lamiaceae), inibiram a proliferação celular e induziram a apoptose em linhagens celulares leucêmicas K562, Kasumi-1 e K562/T315I resistentes com valores de IC₅₀ de 4,11, 3,98 e 4,95 µg/mL, respectivamente. As tanshinonas totais em combinação com imatinibe aumentou a indução da apoptose na concentração de 8,75 µg/mL, exibindo também alterações na expressão de proteínas reguladoras da apoptose e inibição de vias de sinalização relacionadas à proliferação celular. Esses resultados sugerem que as tanshinonas totais têm potencial atividade no tratamento da leucemia mieloide (ZHOU et al., 2024).

Extratos de *Magnolia officinalis* Rehder & E.H.Wilson, *Magnolia obovata* Thunb. LC. e *Magnolia grandiflora* L. plantas tradicionalmente utilizadas na medicina oriental, comumente são aplicados como antioxidantes, sedativos, anti-inflamatórios, antimicrobianos e efeitos espasmódicos. As substâncias honokiol e magnolol foram obtidas dessas espécies vegetais e mostraram redução da viabilidade na linhagem celular NB-4 (leucemia promielocítica aguda) e efeitos paraptose semelhante à morte celular na concentração de 30µM (LIU et al., 2021).

Os estudos realizados por Nishad et al. (2024), avaliaram a substância miricetina, isolada de *Myrica nagi*, em linhagem leucêmica THP-1, apresentando uma diminuição de 79,12 para 12,16% a viabilidade celular na concentração de 25 a 400 µg/mL de miricerina respectivamente, com valor de IC₅₀ de 90,16 µg/mL. Este flavonoide possui atividade antioxidante e propriedades anti-inflamatórias.

O flavonoide diosmetina, obtido de plantas e frutas cítricas (CHOI et al., 2019), tem exibido propriedades que bloqueiam angiogênese em câncer de pele e

indução de apoptose em vários tipos de câncer, incluindo câncer de cólon, próstata e leucemia mieloide aguda (KOOSHA et al., 2019; OAK et al., 2018; ROMA; ROTA; SPAGNUOLO, 2018). A diosmetina mostrou atividade antileucêmica contravárias linhagens como K562, KBM5 e KBM5-T315I exibindo IC₅₀ 8,42, 8,52 e 6,46 µM. Além disso, observou-se que a diosmetina na concentração de 5 µM afeta a via de SKP2/Bcr-Abl, via de interação proteica que desempenha papel crucial na leucemia mieloide crônica (LIU et al., 2020).

As substâncias octadecenamida, estigmasta-5,22-dien-3-ol e umbeliferona, isoladas *Spathodea campanulata* P. Beauv. (Bignoniaceae), apresentaram atividade citotóxica contra células HL-60 (leucemia promielocítica aguda) com valores de IC₅₀ de 35,65 a 80,60 µg/mL (WAGH; BUTLE; RAUT, 2021), demonstrando que os produtos naturais oriundos de plantas podem ser alvos estratégicos na busca por substâncias com atividade antileucêmica.

2.6. Ferramentas metabolômicas e redes moleculares aplicadas na busca substâncias bioativas

A metabolômica é uma das recentes áreas dentro das chamadas ciências “ômicas”, que incluem também a genômica, transcriptômica e proteômica. O objetivo central dessa área de pesquisa é decifrar o metaboloma, que abrange todos os compostos orgânicos de baixo peso molecular presentes em um organismo ou em uma amostra biológica, analisando suas variações. O metaboloma é constituído por todos os metabólitos quantificáveis, sendo altamente complementar a outras ciências “ômicas”, permitindo uma abordagem global da biologia de sistemas (CHENG et al., 2018).

Atualmente, os estudos metabolômicos não direcionados baseados em LC-MS (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas) são os mais comuns. No entanto, a identificação dos metabólitos é frequentemente o principal desafio ao interpretar os dados gerados. De fato, a diversidade do metabolismo é vastíssima, e os metabólitos responsáveis pela discriminação entre grupos amostrais muitas vezes permanecem não identificados. Estima-se que menos de 2% dos espectros de massa em estudos não direcionados possam ser anotados, tornando a

caracterização das estruturas químicas uma das etapas mais desafiadoras do fluxo de trabalho metabolômico (CHALECKIS et al., 2019).

Considerando que cada análise LC-MS gera um grande número de espectros, a identificação manual de cada composto, utilizando ferramentas clássicas de desreplicação e bancos de dados de referência (como NCBI, Metlin, NIST e MassBank), é um processo bastante demorado. Nos últimos anos, foi proposta a rede molecular (MN) MS/MS como uma nova ferramenta para otimizar essa etapa de desreplicação (ALLARD et al., 2016). Essa abordagem se baseia na ideia de que os padrões de fragmentação MS/MS são semelhantes para moléculas com estruturas químicas próximas.

A plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) (<http://gnps.ucsd.edu>) permite a criação de redes moleculares (MNs) nos quais os compostos são agrupados conforme suas relações moleculares (VARGAS et al., 2020). Os MNs resultantes formam clusters compostos por diferentes características espectrais. Esses clusters podem reunir metabólitos pertencentes à mesma família química ou com estruturas químicas intimamente relacionadas (YU et al., 2022).

Desenvolvimentos recentes no estudo de produtos naturais levaram à criação de novos recursos, como a plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) que foi desenvolvido pelo Centro de Espectrometria de Massa Computacional da Universidade da Califórnia, San Diego (UCSD). A ferramenta GNPS é uma plataforma que permite a troca e análise de dados EM de produtos naturais. Desta forma, torna-se possível reconhecer novos compostos e comparar dados em uma variedade de amostras. O programa faz uso de redes moleculares para agrupar compostos comparáveis com base em seus espectros EM/EM, permitindo identificar compostos relacionados em cada cluster e visualizar as interações entre eles (GAUDÊNCIO et al., 2023; QUINN et al., 2017; WANG et al., 2016).

A metabolômica é uma ferramenta baseada na análise do metaboloma (relacionado à descrição dos metabólitos de baixo peso molecular), a qual pode ser utilizada para responder diversos questionamentos químicos e biológicos, auxiliando na comparação e compreensão do funcionamento de sistemas como, por exemplo, os sistemas biológicos. Diversas áreas estão aplicando a metabolômica em seus estudos, incluindo a biotecnologia de plantas, alimentos, microbiologia e nas áreas clínica e pré-clínica, a capacidade de identificar e quantificar metabólito específicos

permite avanços significativos na pesquisa sobre doenças, desenvolver novos tratamentos e melhorar na qualidade dos fármacos (MARCHEV et al., 2021; NALBANTOGLU, 2019; TSOUKALAS et al., 2024).

A metabolômica ainda possui alguns desafios como o processamento de grandes quantidades de dados e, sem dúvida nenhuma, um desafio ainda maior está envolvido nas dificuldades de anotação das substâncias, principalmente associados aos dados obtidos a partir da ionização por eletrospray (ESI, *electrospray ionization*) ou outras técnicas *soft* de ionização (WOLFENDER, 2009; WOLFENDER et al., 2013).

A possibilidade do acoplamento das técnicas cromatográficas a detectores capazes de fornecerem informações estruturais dos constituintes, como a espectrometria de massas, ocasionou um grande avanço não somente na área de química de produtos naturais, mas também em outras. Essa metodologia é muito vantajosa por acelerar a anotação dos compostos, permitir o isolamento de maneira mais racional na busca de novos ativos (CORDELL; SHIN, 1999; KLITGAARD et al., 2014; KUSHWAHA et al., 2022) e da compreensão de variações metabólicas dos indivíduos (ERNST et al., 2015; GITIRANA DE SANTANA et al., 2023; MARTUCCI et al., 2014).

A metabolômica é utilizada também na elucidação das propriedades biológicas de misturas de substâncias (extratos e frações), além de auxiliar na identificação de sinergismos, pró-fármacos e determinação de substâncias bioativas. Por exemplo, o estudo realizado com o gengibre, raiz comestível da família das Zingiberaceae, foi determinada a correlação química e biológica, sendo possível confirmar que a atividade anticâncer dos extratos não está centrada apenas na concentração de gingerol, substância com propriedades biológicas já descritas na literatura, mas está diretamente relacionada aos shogaols (NAM et al., 2020; ZAID et al., 2022).

A metabolômica na pesquisa de produtos naturais envolve análise de metabólitos de baixo peso molecular presentes em matrizes como de plantas, fungos e organismos marinhos. Uma das técnicas utilizadas para aquisição dos dados é a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (CLAE-EM), o que possibilita a anotação e quantificação de compostos bioativos presentes, permitindo também a separação dos compostos em amostras complexas, como extratos vegetais. O espectrômetro de massas realiza a ionização das substâncias e fragmentações, facilitando a anotação das substâncias presentes nas amostras como,

por exemplo, em extratos vegetais. Essas informações podem ser utilizadas para guiar a descoberta e o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos e compostos de interesse (ALSEEKH et al., 2021).

A integração da metabolômica com outras abordagens científicas, como a genômica e a proteômica, permite uma compreensão mais abrangente e aprofundada do metabolismo de um organismo, o que facilita a descoberta de compostos bioativos com potencial terapêutico e esses compostos podem ser explorados no desenvolvimento de novos fármacos à base de produtos naturais destinados a terapia clínica (ATANASOV et al., 2021).

As redes moleculares representam uma abordagem promissora e eficaz para organizar os dados de espectrometria de massas e auxiliar a anotação dos metabólitos contidos em misturas complexas. A metodologia empregada neste estudo envolve o arranjo sistemático de conjuntos de dados intrincados contendo espectros EM/EM, seguidos de pesquisas direcionadas em bancos de dados designados, com o objetivo final de discernir a identidade de um determinado produto natural. A utilização de redes moleculares facilita as análises de grandes quantidades de dados produzidos por espectrometria de massas, levando à geração de numerosos espectros em um curto espaço de tempo (MS), contribuindo na identificação de novos compostos bioativos, permitindo a visualização estruturada e intuitiva de extensos conjuntos de amostras facilitando a compreensão de eventos multifatoriais encontrados na ecologia química, biossíntese, quimiotaxonomia e, particularmente, na desreplcação e na descoberta de entidades químicas bioativas (FANG; DORRESTEIN, 2014; PILON et al., 2021).

A integração da metabolômica com abordagens de rede molecular aprimora significativamente a eficiência na identificação e caracterização desses compostos, facilitando o desenvolvimento de novas terapias anticancerígenas (Wolfender et al., 2019). A rede molecular permite a visualização e análise de dados de espectrometria de massas, agrupando íons com padrões de fragmentação semelhantes, o que facilita a identificação de metabólitos estruturalmente relacionados, mesmo que inéditos.

Por exemplo, Nothias et al. (2018) propuseram o conceito de *bioactive molecular networking*, uma técnica que associa diretamente os perfis de fragmentação de espectros de massa com dados de bioatividade obtidos em ensaios biológicos. Essa abordagem foi eficaz na identificação de compostos ativos em extratos

complexos, sem a necessidade de isolamento prévio, tornando-se um atalho valioso para a descoberta de fármacos naturais. Segundo os autores, essa ferramenta facilita a priorização de metabólitos bioativos com base em evidências químicas e biológicas integradas.

A eficácia dessa abordagem foi demonstrada por Zhang et al. (2023), que utilizaram a plataforma GNPS para analisar extratos de *Terminalia chebula*, resultando na anotação de 22 metabólitos, dos quais 11 metabólitos eram inéditos. Essa análise, realizada por espectrometria de massas de alta resolução, revelou compostos com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, destacando o potencial dessas ferramentas na revelação de novas moléculas terapêuticas.

Essa combinação de metabolômica e rede molecular tem sido particularmente eficaz na busca por agentes farmacêuticos contra o câncer. Por exemplo, a análise do perfil metabólico de *Helichrysum splendidum* revelou uma diversidade química significativa, incluindo flavonoides e terpenoides com interações promissoras com alvos como CDK-2 e CCNB1, associados à progressão do câncer.

A análise metabolômica revelou alterações significativas em metabólitos envolvidos em vias como metabolismo de purina, riboflavina e pentose fosfato, incluindo D-ribose 5-fosfato, xantosina e flavina mononucleotídeo (FMN), em células pulmonares com câncer A549 e NCI-H460 tratadas com extrato hidroetanólico (7:3) de *Pinellia ternata*. A integração com rede farmacológica permitiu identificar 11 compostos bioativos no extrato de *P. ternata*, que interagem com alvos específicos, modulando as vias metabólicas alteradas, e que pode exercer efeitos antitumorais através de uma ação multimodal, envolvendo múltiplos compostos e alvos, o que pode estar relacionado à inibição da proliferação, migração e invasão observada nas células cancerígenas tratadas (FENG et al., 2024).

Casos adicionais de sucesso incluem estudos com extratos de própolis (Sawaya et al., 2009), milho (Pereira-Filho et al., 2017) e algas (Gouiffès et al., 2022), que revelaram metabólitos com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antiproliferativas. Nesses estudos, a integração entre análises químicas e ensaios biológicos fundamentou a triagem de compostos com potencial terapêutico.

Além da busca por novos compostos, a metabolômica também contribui para a identificação de biomarcadores para diagnóstico e monitoramento do câncer (Patti et al., 2012). Alterações no perfil metabólico podem indicar o estágio da doença ou resposta ao tratamento, sendo valiosas em terapias personalizadas.

Adicionalmente, a metabolômica permite avaliar a eficácia e segurança de compostos candidatos a fármacos, ao monitorar alterações metabólicas induzidas pelo tratamento. Essa avaliação facilita a previsão de efeitos adversos e a otimização estrutural dos compostos bioativos (WOLFENDER et al., 2019).

Conforme apontado por Allard et al. (2016), a combinação de estratégias de metabolômica e redes moleculares constitui uma ferramenta poderosa na descoberta racional de novos compostos bioativos. Essas abordagens multidimensionais aceleram a triagem de fármacos e aprofundam a compreensão dos mecanismos moleculares de ação, sendo essenciais para o avanço de terapias eficazes e seguras contra o câncer.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Aplicação de ferramentas metabolômicas para determinação de substâncias bioativas contra células leucêmicas e bactérias patogênicas em espécies vegetais do Pantanal e Cerrado.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a atividade citotóxica em células leucêmicas *in vitro* de dezoito extratos de espécies vegetais, bem como suas frações;
- ✓ Determinar a citotoxicidade de extratos e frações em linhagem de células normais.
- ✓ Determinar a seletividade dos extratos e frações em linhagens de células neoplásicas;
- ✓ Obter os perfis químicos de todos os extratos e frações por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM);
- ✓ Processar os dados químicos a partir de ferramentas metabolômicas;
- ✓ Realizar as análises estatísticas (univariada e multivariada) dos dados metabolômicos e correlacionar estes dados com as atividades anticâncer;
- ✓ Determinar os possíveis componentes bioativos a partir das ferramentas metabolômicas;

CAPITULO 2: ARTIGO

Deciphering Steroidal and Aporphine Alkaloids as Antileukemic Agents by Approaches of Molecular Networking and Metabolomics

Suni Liu, Katyuze Souza Farias, Vanessa Samudio Santos Zanuncio, Geraldo Alves Damasceno Júnior, Flávio Macedo Alves, Edgar J. Paredes-Gamero, Kamylla Fernanda Souza de Souza, Lucas Roberto Pessatto, Heron Fernandes Vieira Torquato, Carlos Alexandre Carollo, Denise Brentan Silva*



Open Access

This article is licensed under [CC-BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

<http://pubs.acs.org/journal/acsodf>

Article

Deciphering Steroidal and Aporphine Alkaloids as Antileukemic Agents by Approaches of Molecular Networking and Metabolomics

Suni Liu, Katyuze Souza Farias, Vanessa Samudio Santos Zanuncio, Geraldo Alves Damasceno Júnior, Flávio Macedo Alves, Edgar J. Paredes-Gamero, Kamylla Fernanda Souza de Souza, Lucas Roberto Pessatto, Heron Fernandes Vieira Torquato, Carlos Alexandre Carollo, and Denise Brentan Silva*



Cite This: <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c10160>



Read Online

ACCESS |



Metrics & More



Article Recommendations



Supporting Information



doi: <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c10160>

Figura 8 - Capa artigo aceito e publicado (LIU et al., 2025)

CAMPO GRANDE - MS
2025

4. ARTICLE

Deciphering Steroidal and Aporphine Alkaloids as Anti-Leukemic Agents by approaches of Molecular Networking and Metabolomics

Suni Liu,¹ Katyuze Souza Farias,¹ Vanessa Samudio Santos Zanuncio,¹ Geraldo Alves Damasceno Júnior,² Flávio Macedo Alves,² Edgar J. Paredes-Gamero,³ Kamylla Fernanda Souza de Souza,^{3,4} Lucas Roberto Pessatto,³ Heron Fernandes Vieira Torquato,³ Carlos Alexandre Carollo,¹ Denise Brentan Silva^{1*}

¹Federal University of Mato Grosso do Sul, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition (FACFAN), Laboratory of Natural Products and Mass Spectrometry (LaPNEM), 79070-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

²Federal University of Mato Grosso do Sul, Laboratory of Botany, Institute of Biosciences (INBIO), 79070-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

³Federal University of Mato Grosso do Sul, Laboratory of Molecular Biology and Cell Cultures, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition (FACFAN), 79070-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

⁴Federal University of São Paulo, Biochemistry Department, 04044-020, São Paulo, SP, Brazil.

Corresponding Author: *Laboratory of Natural Products and Mass Spectrometry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition (FACFAN), Federal University of Mato Grosso do Sul, Av. Costa e Silva, s/nº, 79070-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. E-mail: denise.brentan@ufms.br*

ABSTRACT

The chemodiversity of plants is a valuable resource for drug discovery and its combination with modern approaches can reduce the time-consuming for bioactive metabolites discovery. This study aimed to evaluate the chemical constituents from eighteen plant species of different families against leukemia cancer cells and the application of statistical analysis from metabolomic data and molecular networking for the prediction of bioactive metabolites. The samples, extracted by accelerated solvent extractor using ethanol and water 7:3 (v/v), were analyzed by LC-DAD-MS and evaluated against leukemia cancer cells (Kasumi-1, KG-1, and K562). Chemical data were aligned, analyzed by statistics, and applied to create the molecular network. *Sesbania virgata*, *Aeschynomene denticulata*, *Erythroxylum anguifugum*, *Psidium guineense*, *Astronium fraxinifolium*, *Coccoloba ochreolata*, *Solanum glaucophyllum*, and *Paullinia pinnata* inhibited K562 leukemia cancer cell viability approximately 70% at 100 µg/ml, while *Ocotea diospyrifolia* showed 35% inhibition for KG-1 lineage. Alkaloid fractions from *S. glaucophyllum* and *O. diospyrifolia* revealed EC₅₀ values ranging from 13.9 to 6.4 µg/mL for K-562 and KG-1 cell lines, effectively inducing cell death with apoptotic characteristics, membrane integrity loss, and signs of late apoptosis. The molecular networking was essential and crucial to complement the statistical analysis, which was performed from 430 features and targeted steroidal and aporphine alkaloids. Boldine revealed EC₅₀ of 46, 116, and 145 µM for Kasumi, KG-1, and K-562 cancer cell lines. The findings marked the relevance of a broader chemical data analysis to predict bioactive compounds, emphasizing potential benefits in the search for metabolites against leukemia cancer cells, particularly steroidal and aporphine alkaloids.

1. INTRODUCTION

Leukemia is a hematologic cancer that affects children, adults, adolescents, and elderly.¹ In 2019, the global incidence of new leukemia cases was 643,579, while 474,924 deaths were registered. Additionally, 720,168 new leukemia cases are estimated in 2030.² Leukemia can be described in four main subtypes according to speed (acute or chronic) and blood cell type (myeloid or lymphoid).^{2,3}

Leukemia induces an abnormal increase in leukocytes in the bone marrow or peripheral blood, resulting in cell populations at various differentiation stages, including leukemic stem cells, which exhibit low proliferation rates and quiescent stage. These cells represent a problem for the conventional treatments since the drugs act mainly against cells with high proliferation rates. Furthermore, leukemic stem cells are closely associated with disease recurrence, making them an important target for the development of new drugs, which are highly required.^{4,5}

Natural products are a valuable source for the discovery of new bioactive compounds, representing approximately 50% of approved drug candidates between 1981 and 2019. Notably, among the small compound anticancer drugs approved in this period, 76.7% are derived from natural products that highlight their importance and critical role in the development of new therapeutic agents, for example, the anticancer drugs taxol, vinblastine, and vincristine.⁶

Metabolomics and molecular networking have been successfully applied to suggest bioactive metabolites from natural product samples. These approaches accelerate the search and development of new drug candidates, promoting a rapid annotation of metabolic classes and target prediction.⁷ These strategies provide more holistic chemical information about the composition of extracts and fractions and the

potential bioactive compounds.⁸ Metabolomics and statistical analyses were applied, for example, to determine the bioactive compounds from Brazilian plant species (*Aspidosperma subincanum*, *Copaifera langsdorffii*, *Coussarea hydrangeifolia*, *Guarea guidonea*, and *Tapirira guianensis*) against resistant human melanoma cells. Flavonoids, galloylquinic acid derivatives, and diterpenes were correlated to cytotoxic activity⁹. Although the prediction of bioactive compounds has been done, several phenolic metabolites were identified, which are widely known in the literature and cannot represent a good target for the development of anticancer drugs. In this context, molecular networking can be a valuable tool, organizing the MS and MS/MS data and grouping similar metabolites that further the selection of the bioactive metabolic classes.¹⁰

This study aimed to use metabolomics and molecular networking approaches to determine the chemical composition from extracts of Brazilian plant species and to suggest the bioactive metabolites against leukemia cancer cell lineages (Kasumi-1, KG-11, and K562).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Sample collection.

The plant materials were collected in Mato Grosso do Sul state, Brazil, in the biomes Cerrado and Pantanal. The plant species were taxonomically identified by Flávio Macedo Alves and Geraldo Damasceno Junior. All specimens were deposited in the herbarium (CGMS) of Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS) and the information about the plants is summarized in **Table S1** (Supporting Information). This study was registered in the National Genetic Heritage Management System (SisGen) under the number A63DB37. The parts used for the extraction were fruits (FR), aerial

parts (AP), leaves (LV), and roots (RO). The collected species and their used parts are the following: *Aeschynomene denticulate* Rudd (AP, Fabaceae), *Aspilia latissima* Malme (LV and RO, Asteraceae), *Astronium fraxinifolium* Schott (AP, Anacardiaceae), *Bauhinia mollis* (AP, Fabaceae), *Byttneria filipes* Mart. ex K.Schum. (AP, Malvaceae), *Centratherum punctatum* Cass. (AP, Asteraceae), *Coccoloba ochreolata* Wedd. (AP, Fabaceae), *Diospyros tetrasperma* Sw. (AP, Ebenaceae), *Echinodorus paniculatus* Micheli (AP, Alismataceae), *Erythroxylum anguifugum* Mart. (AP, Erythroxylaceae), *Lantana canescens* Kunth (AP, Verbenaceae), *Melanthera latifolia* (Gardner) Cabrera (AP, Asteraceae), *Ocotea diospyrifolia* (Meisn.) Mez (AP, Lauraceae), *Paullinia pinnata* L. (AP, Sapindaceae), *Psidium guineense* Sw. (AP, Myrtaceae), *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (AP, Fabaceae), *Solanum glaucophyllum* Desf. (FR, Solanaceae), *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K.Schum. (AP, Rubiaceae), and *Vitex cymosa* Bertero ex Spreng. (AP, Lamiaceae). The plants were dried in the circulation oven (40 °C) and powdered in the knife mill.

2.2 Preparation of extracts and fractions.

The dried and powdered plant materials (fruits, aerial parts, leaves, and roots) were extracted by accelerated solvent extractor (ASE 150, Dionex) using ethanol and water 7:3 (v/v) at 100 °C, 1600 psi, single cycle, 5 min of static time, 60% rinse volume, and 50 s of purge time. These plant materials were previously cleaned using hexane and acetone 8:2 (v/v) to remove the wax constituents by ASE. All the extracts were concentrated by a rotatory evaporator and, subsequently, lyophilized, and kept at –20 °C until the biological and chemical evaluations. The hydroethanolic extracts from *O. diospyrifolia* and *S. glaucophyllum* were submitted to alkali-acid extractions to obtain the enriched alkaloid fractions (Alk_fr), as described by Sharma and collaborators,¹¹

and they yielded the fractions with a yield of 0.15 and 0.03%, respectively.

2.3 Chemical analysis by LC-DAD-MS.

The extracts were analyzed by liquid chromatography coupled to a diode array detector and high-resolution mass spectrometer (LC-DAD-MS). A Shimadzu UFLC chromatograph (Tokyo, Japan) equipped with two LC20AD pumps, SIL-20A autoinjector, SPD-M20A diode array detector (DAD), CBM-20A controller, and CTO-20A oven was used. This equipment was also coupled to a MicroTOF-Q III mass spectrometer (Bruker Daltonics) with electrospray ionization (ESI) and QqTOF analyzer (quadrupole and time-of-flight).

For chromatographic analysis, a Kinetex C18 column (2.6 μm , 100 Å, 150 $\times$ 2.1 mm, Phenomenex) was applied, which was kept at 50 °C during the analysis and the flow rate was 0.3 mL/min. The mobile phase was composed of acetonitrile (B) and ultrapure water (A), both containing formic acid 0.1% (v/v). The gradient elution profile was programmed to 0-2 min - 3% B, 2-25 min - 3-25% B, 25-40 min - 25-80% B, and 40-43 min - 80% B. The samples were analyzed in positive and negative ion modes and the MS parameters were the capillary voltage of 2,500 kV and 3,500 kV for positive and negative ion modes, respectively. Nitrogen was applied as nebulizer (4 Bar), drying (9 L/min), and collision gas.

The nineteen polar extracts were solubilized in methanol and water 6:4 (v/v) at a concentration of 2 mg/mL, filtered on 0.22 μm PTFE syringe filters (Millex, Millipore), and 1 μL of each sample was injected into the chromatographic system.

2.4 Statistical processing and analysis of metabolomic data.

The raw data was converted to .cdf and, subsequently, was aligned and reduced by software MetAlign and MSClust, respectively. Univariate and multivariate statistical analyses were performed by the platform Metaboanalyst 6.0. The biological activity data were included in the datasets to correlate the chemical and biological data and to suggest the bioactive compounds. The annotation was based on UV, MS, and MS/MS spectral data compared to literature data, as well as spectral comparison of mass spectrometry data deposited in GNPS (<https://gnps.ucsd.edu>). The molecular formulas of compounds were determined considering errors and mSigma up 8 ppm and 30, respectively.

The data were log-transformed (base 10) and used to obtain Principal Component Analysis (PCA), the hierarchical clustering (dendrogram) was constructed applying Euclidean distance measure and clustering algorithm ward. A volcano plot based on fold change and a p-value threshold of 0.05 was also obtained.

2.5 Molecular networking and annotation.

LC-MS and MS/MS data were converted into mzXML by MsConvert. Subsequently, these data were applied to produce the molecular networking by GNPS platform, and the molecular networking was processed and edited in the Cytoscape 3.9.1.

The molecular networking was constructed considering five fragment ions from MS/MS spectra and the mass tolerances of precursor and fragment ions were considered 0.03 Da and 0.08 Da, respectively. The molecular network was created considering cosine greater than 0.6 and five ions combined. It is available in the GNPS platform at the link

[https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=ab38a049b1314471bf42eea12f88](https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=ab38a049b1314471bf42eea12f88fd31)

[fd31](https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=ab38a049b1314471bf42eea12f88fd31). Additionally, the raw data were processed using MZmine software (version 4.5.0), following a series of steps: mass detection, chromatogram building, chromatogram deconvolution, deisotoping, alignment using the join aligner, blank subtraction from the feature list, feature finding, linear normalization, and spectral library searching. Detailed parameters for each step are provided in the Supporting Information. The MS1 data were exported in .csv format, while the MS2 data were prepared for upload to GNPS platform and to obtain the Feature-Based Molecular Networking (FBMN) (<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=9dc8656aa292409e8337da1d35c4eb82>). Compound annotation was performed using spectral library matching within MZmine, complemented by manual annotation based on spectral data comparisons of literature-reported data.

2.6 Cell cultures.

Human leukemic cell lines (K562, Kasumi-1, and KG-1) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). K562 was maintained in Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) medium (Sigma-Aldrich, Germany) supplemented with 10% FBS. The cells were cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS). The cell lines were grown in media containing 100 U/mL penicillin (Sigma-Aldrich, Germany) and 100 µg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich, Germany) in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂. The passage numbers for all leukemic cell lines ranged between 3 and 6.

2.7 Cytotoxicity effects on leukemia cell lines.

The cytotoxicity assay was performed by Alamar Blue assay method

(AlamarBlue, Biosource, Camarillo, CA, USA)^{12,13}. The extracts, fractions, and boldine (Sigma Aldrich) were evaluated against K562 (chronic myeloid leukemia), KG-1 (acute myeloid leukemia), and Kasumi-1 (acute myeloblastic leukemia) cell lines. The plant extracts and fractions, previously lyophilized and homogenized, were initially evaluated using 10 and 100 µg/mL, besides the alkaloid fractions from *O. diospyrifolia* and *S. glaucophyllum* were evaluated against K562 and KG-1 leukemic cell lines treated with different concentrations (50, 35, 20, and 10 µg/mL).

The samples were resuspended in dimethyl sulfoxide (DMSO), diluted in culture medium (final concentration DMSO 0.4 %), and added to the test plates. Cells (1×10^5 cells/mL⁻¹) were grown in 96-well microplates containing a supplemented medium and different concentrations of the extracts. After the incubation for 24 h, 20 µL of resazurin solution (0.15 mg/mL) was added, and the plates were shaken briefly by a plate shaker. After the incubation for 4 h at 37°C, the assay plates were shaken before measurements. The samples were measured at wavelengths 570 and 600 nm by a microplate reader (Thermo Scientific Varioskan LUX). Each experiment was performed in triplicate. The percentage of growth for each cell line was calculated in the program for graphs and data analysis Prism - GraphPad 8.0.

2.8 Annexin V/7-AAD flow cytometry assay.

An Annexin V-FITC/7-AAD double staining assay was conducted to assess the pro-apoptotic effect of the alkaloid fractions from *O. diospyrifolia* and *S. glaucophyllum*. K562 and KG-1 cells were seeded at a density of 10^5 cells/mL in 96-well plates and treated with alkaloid fractions of *S. glaucophyllum* (13 µg/mL) and *O. diospyrifolia* (6 µg/mL and 13 µg/mL to K562 and KG-1, respectively). After 24 h, the cells were resuspended in annexin binding buffer (0.14 M NaCl, 2.5 mM CaCl₂, 0.01 M HEPES,

pH 7.4) and incubated at room temperature with 1 μ L of Annexin V-FITC (Becton Dickinson, USA) and 5 μ M of DRAQ5 (Cell Signaling, USA) for 30 min. The analysis was carried out using a CytoFLEX flow cytometer (Beckman Coulter, USA) and FlowJo v10 software (Becton Dickinson, USA).

2.9 Intracellular protein labeling.

Cells (10^5 /mL) were treated for 24 h with EC_{50} concentrations of the alkaloid fractions from *O. diospyrifolia* and *S. glaucophyllum*. After treatment, the cells were fixed with BD Cytofix (BD Biosciences, USA) for 15 min, washed with Becton Dickinson Perm/wash buffer, and permeabilized with Perm Buffer III (Becton Dickinson, USA) for 30 min at room temperature. For intracellular protein labeling, the cells were incubated for 1 h with primary antibodies (cleaved-Caspase-3 PE Catalog N.550914, BD Biosciences, USA) and (Phospho-Histone H2A.X #9718, Cell Signaling, USA). Subsequently, an anti-rabbit IgG secondary antibody conjugated with Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, USA) was incubated for 40 min. Fluorescence was then measured using a CytoFLEX flow cytometer (Beckman Coulter, USA), and the data was analyzed using FlowJo v10 software (Becton Dickinson, USA). A total of 40,000 events were collected per sample, and protein analyses were conducted by quantifying the geometric mean (G.m).

2.10 Statistical analysis.

The results obtained in the *in vitro* assay of cytotoxicity effect against the cell lines were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) and compared with the controls by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test (GraphPad Prism 5). The statistically significant p-value < 0.05 was considered as a statistical

difference.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Cytotoxicity effects on leukemia cell lines of extracts.

The cytotoxicity of the extracts was initially evaluated against Kasumi-1, KG-1, and K562 leukemia cell lines; the results are illustrated in **Figure 1**. The extracts were more active against the K562 leukemia cell lineage, and the polar extracts presented approximately a reduction of 60-70% of cell viability at 100 µg/mL were the following: *S. virgata*, *A. denticulata*, *E. anguifugum*, *P. guineense*, *A. fraxinifolium*, *C. ochreolata*, *S. glaucophyllum*, and *P. pinnata* (**Figure 1A**).

The extracts from *P. guineense*, *A. fraxinifolium*, *C. ochreolata*, *S. glaucophyllum*, *P. pinnata*, and *O. diospyrifolia* showed approximately 40% of inhibition on the KG1 leukemia cell line (**Figure 1B**), while the extracts exhibited lower activity against Kasumi-1 leukemia cell lineage than the observed for the other lineages. The most active extracts against Kasumi-1 leukemia cells revealed inhibition about 20% were *S. virgata*, *E. anguifugum*, *A. denticulata*, *D. tetrasperma*, *P. guineense*, *V. cymosa*, *A. fraxinifolium*, *C. ochreolata*, *S. glaucophyllum*, *P. pinnata*, and *O. diospyrifolia* (**Figure 1C**). All the extracts were also evaluated against leukemia cell lines at 10 µg/mL and they were inactive at this concentration except the extracts of *S. glaucophyllum* and *O. diospyrifolia* on Kasumi-1 cell lineage that revealed a cell inhibition of 40% (**Figure S1**, Supporting Information).

Species from Fabaceae, Erythroxylaceae, Myrtaceae, Anacardiaceae, Solanaceae, Sapindaceae, and Lauraceae families demonstrated activity against leukemia cell lines. These findings suggest that these plants can be promising sources

of bioactive compounds for leukemia cells. However, modern approaches to generate comprehensive chemical profiles from samples are crucial to accelerate the identification of bioactive compounds, minimizing the selection of non-promising targets or Pan-Assay Interference Compounds (PAINS).^{9,10}

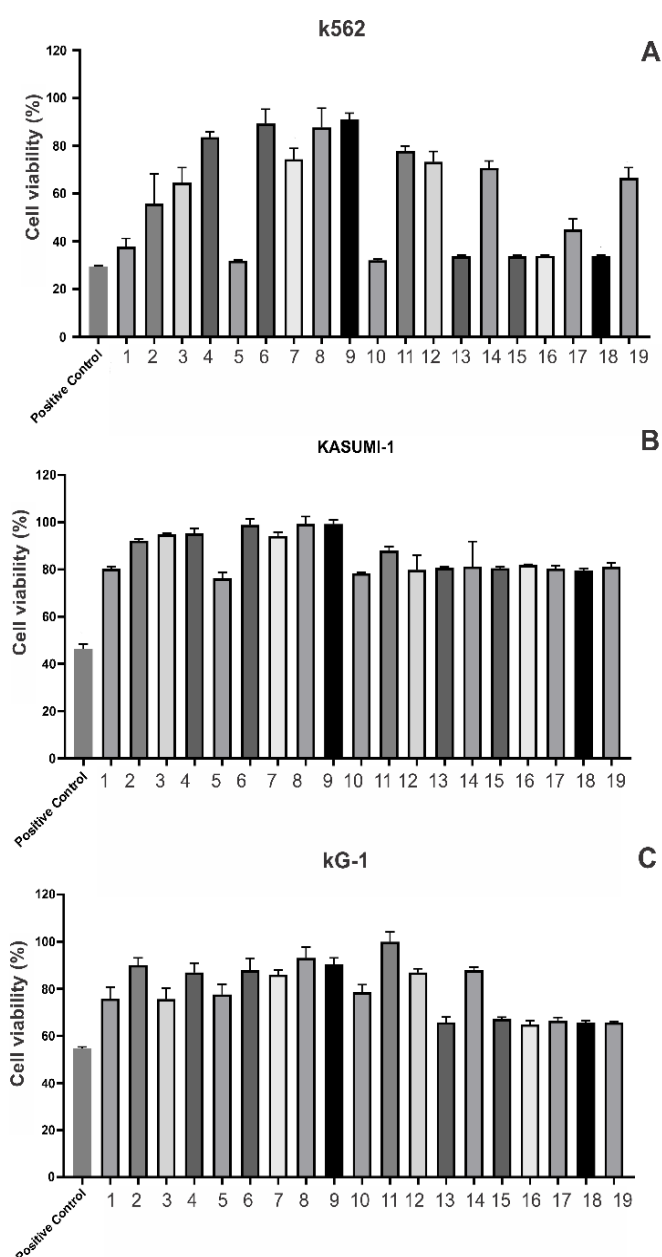


Figure 1. Cell proliferation and cytotoxic screening of the polar extracts on K562 (A), Kasumi-1 (B), and KG-1 (C) leukemia cell lines at 100 $\mu\text{g/mL}$ for 24h. Extracts from the following species: *Sesbania virgata* (1), *Cenetratherum punctatum* (2), *Lantana canescens* (3), *Melanthera latifolia* (4), *Aeschynomene denticulata* (5), *Echinodorus*

paniculatus (6), *Byttemeria filipes* (7), *Aspilia latissima* – aerial parts (AP) (8), *A. latissima* - roots (9), *Erythroxylum anguifugum* (10), *Tocoyena formosa* (11), *Diospyros tetrasperma* (12), *Psidium guineense* (13), *Vitex cymosa* (14), *Astronium fraxinifolium* (15), *Coccoloba ochreolata* (16), *Solanum glaucophyllum* (17), *Paullinia pinnata* (18), and *Ocotea diospyrifolia* (19). were evaluated. Doxorubicin was used as a positive control. Results were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD).

3.2 Chemical analysis: Metabolomics and molecular networking

The extracts were analyzed by LC-DAD-MS and they were categorized into active and inactive extracts according to the cytotoxicity observed on the leukemic cancer cell lines (KG-1, Kasumi-1, and K562). All the chromatograms from the extracts are illustrated in **Figure S2**. The LC-MS data were processed, as described previously, and 480 entrances were listed. Statistical analyses were performed in the Metaboanalyst 6.0 platform.

The PCA explained 5.7 and 14.4% of data variations in PC1 and PC2 (**Figure 2A**), respectively, showing a tendency for the separation of groups relative to active (red) and inactive extracts (green). From hierarchical clustering, a dendrogram was obtained and it showed the active extracts from *C. ochreolata*, *A. fraxinifolium*, *E. anguifugum*, *O. diospyrifolia*, *P. pinnata*, *A. denticulata*, and *S. virgata* grouped in the same cluster that revealed some chemical similarities (**Figure 2B**). Additionally, the active extracts from *P. guineense* and *S. glaucophyllum* were grouped in other clusters.

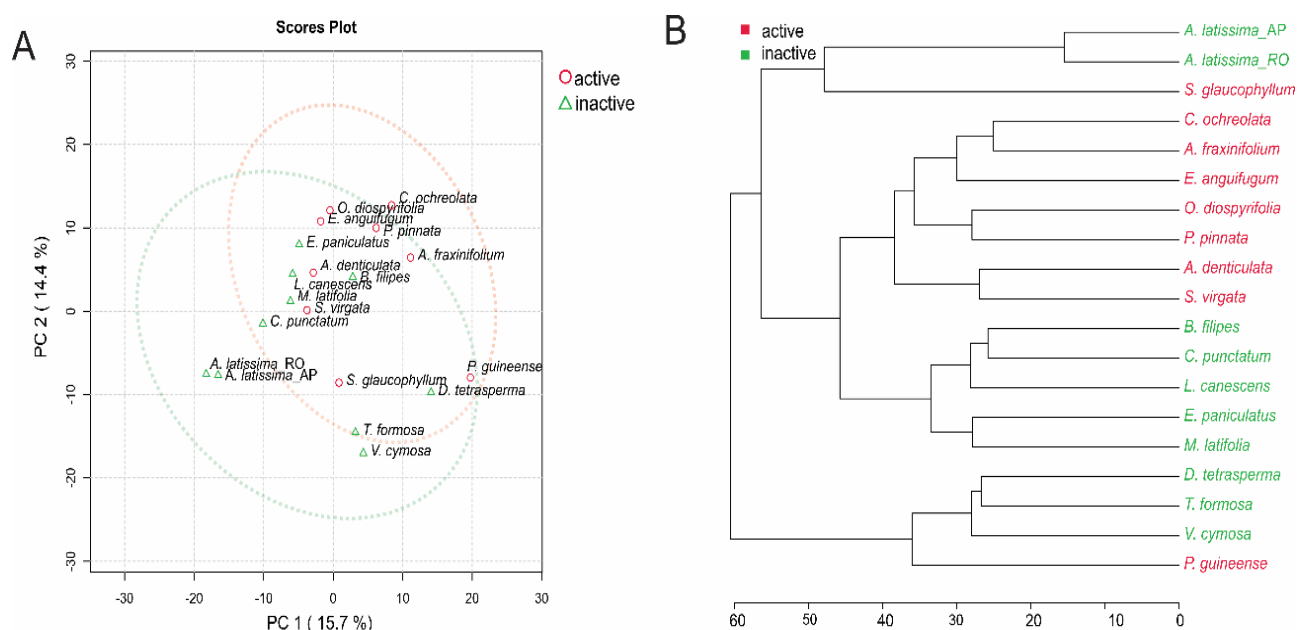


Figure 2. (A) Principal component analysis (PCA) and (B) hierarchical clustering (dendrogram) of the features obtained from LC-MS data of inactive (green) and active (red) extracts.

The heatmap from the active and inactive extracts highlighted the chemical differences from the samples, including the common metabolites in different species (**Figure S3**). The features with statistical significance ($p < 0.05$) and the magnitude of change (fold change) to differentiate the active and inactive extracts were listed from the volcano plot (**Figure S4A**) and some of their box plots were illustrated (**Figure S4B**). Thus, the following compounds were highlighted for the active samples: catechin, epicatechin, steroidal saponin (m/z 741.4426), juribidine (**20**), myricetin, *O*-deoxyhexosyl-hexosyl kaempferol, *O*-deoxyhexosyl kaempferol, *O*-galloyl procyanidin dimer, procyanidin dimer, *O*-pentosyl quercetin, steroidal alkaloid (**17**), and proanthocyanidin (cinnamtannin B₁) (**Figure S4B**).

The results also suggested potential bioactive metabolites against leukemia cells, mainly represented by *O*-glycosylated flavonoids, flavan-3-ols, and

proanthocyanins. These constituents have been widely reported for several biological activities in literature. In addition, polyphenols are also described as possible interference of assays, since they can act as metal chelators and redox cycling readouts.^{14,15} Thus, a molecular networking strategy was applied to organize the MS and MS/MS data, grouping similar compounds, assisting the annotation, and improving the determination of the potential active metabolites, such as alkaloids and saponins.

The blue color features were observed from active extracts in molecular networking, while the orange color features for inactive/inactive extracts against leukemia cell lines (Figure 3). The description of the clusters related to metabolite classes was summarized in Table S2 (Supporting Information). They included, mainly, C-glycosylated flavonoids (cluster 1), chlorogenic acids (cluster 3), procyanidins (type B – cluster 4 and type A-cluster 5), O-glycosylated flavonoids (cluster 6), triterpenes and triterpenoid saponins (clusters 7, 21, and 24), steroidal saponins (clusters 10 and 19), di-C-glycosylated flavonoids (cluster 11), spermidine derivatives (cluster 12), spirostanol steroidal saponins (cluster 13), fatty acids (cluster 14), steroidal alkaloids (cluster 15), sesquiterpene lactones (cluster 16), non-glycosylated flavonoids (cluster 17), aporphine alkaloids (cluster 18), O-glycosyl-phenylpropanoyl/gallolyl flavonols (cluster 20), furostanol steroidal saponins (cluster 22).

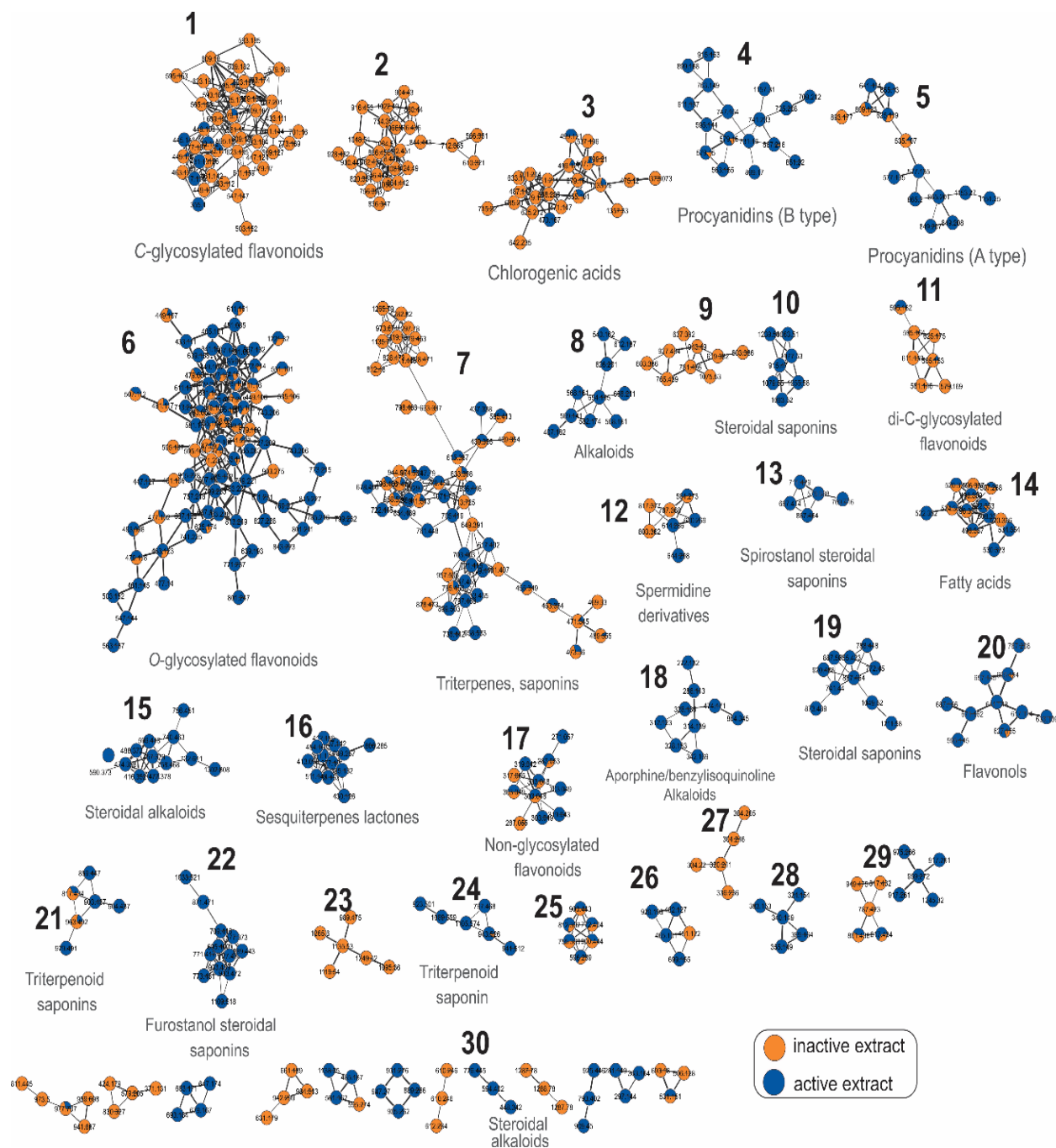


Figure 3. Molecular networking of extracts from all the plant species. Nodes of non-active and active samples are colored orange and blue, respectively. The edge strength is proportional to the cosine values.

Features exclusively present in the active samples (blue) were observed in

some clusters. These metabolites were extensively studied and annotated since they may represent key compounds with potential activity against leukemia cancer cells. The molecular network categorizes similar features into clusters based on their fragmentation profile, facilitating the selection of target compounds to determine the target compounds. Here, this approach yielded additional insights beyond those obtained from the statistical analyses of the chemical data.

From cluster 10, features of *S. glaucophyllum* were grouped and they are described in **Table 1** and **Figure 4**. All the compounds revealed a fragment ion at m/z 431, which is compatible with $C_{27}H_{42}O_4$ and suggested steroidal aglycones. The metabolites revealed 49, 54, or 55 carbons in their structures. In addition, consecutive losses of sugars from these compounds confirmed steroidal saponins.¹⁶ Although steroidal saponins are commonly reported from genus *Solanum*, the saponins grouped in cluster 10 were not found in the literature that suggested new metabolites. Some steroidal saponins from the genus *Solanum* have shown cytotoxic activity against cancer cells that can represent a target group to search for bioactive compounds.¹⁷

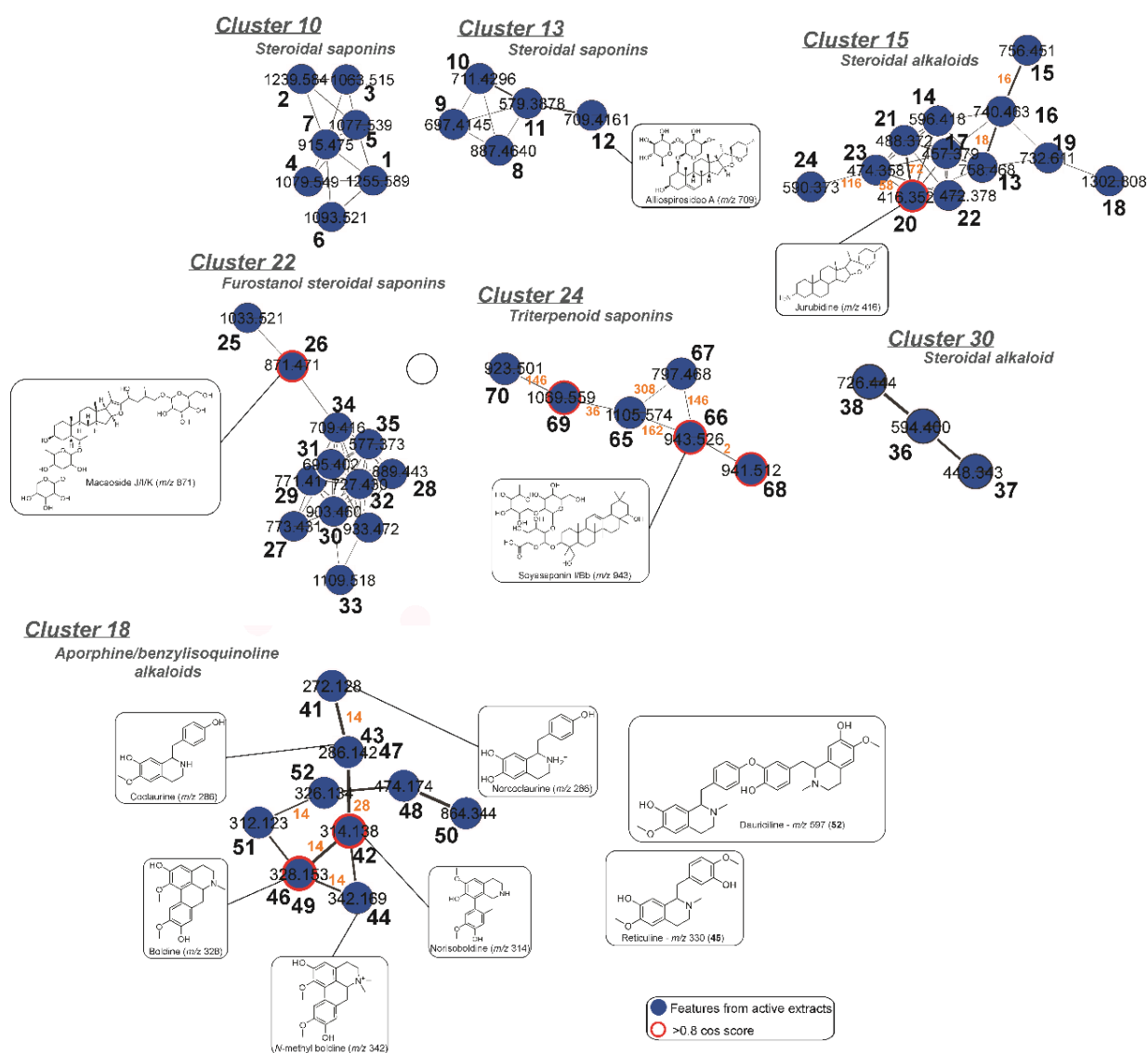


Figure 4. Details of the features from some clusters (10, 13, 15, 18, 22, 24, and 30) and the annotated metabolites detected in *O. diospyrifolia*, *P. pinnata*, and *S. glaucophyllum*.

The metabolites grouped in cluster 13 did not exhibit UV absorption and they revealed consecutive losses of sugars such as 176, 162, 146, and 132 *u*, indicating the presence of glucuronyl, hexosyl, deoxyhexosyl, and pentosyl substituents.^{16,18} These data were similar to the metabolites grouped in cluster 22 (**Table 1**). The aglycones of features from clusters 13 and 22 exhibited the ions at *m/z* 433 (C₂₇H₄₄O₄) and 431 (C₂₇H₄₂O₄) and the consecutive losses of water molecules (18 *u*) from them were observed such as the ions *m/z* 415, 397, 413, and 395, which are compatible to

losses observed for steroidal aglycone. The losses of 144 *u*, yielded by cleavage from the E-ring of steroidal aglycone with subsequent losses of the water molecule, confirmed spirostanol saponin (metabolites from cluster 13) and, additionally, the furostanol saponins (metabolites from cluster 22) were suggested when the losses of 114 *u* were also observed.^{16,18-19} For example, the fragment ions *m/z* 289 [Aglycone(433)+H-144]⁺, 271 [Aglycone(433)+H-144-H₂O]⁺, and 253 [Aglycone(433)+H-144-2xH₂O]⁺ observed for **8-11**. Thus, it was possible to annotate several spirostanol (**8-12**) and furostanol steroidal saponins (**25-35**) and they were detected only from the extract of *S. glaucophyllum*, which was active mainly against k562 leukemia cancer cells.

Table 1. Compounds annotated from cluster 10, 13,15, and 22 by LC-DAD-MS data that were detected from *Solanum glaucophyllum*.

RT (min)	Compound	MF	MS (<i>m/z</i>) [M+H] ⁺	MS/MS (<i>m/z</i>)
Cluster 10				
1 30.6	Steroidal saponin	C ₅₄ H ₉₆ O ₃₃	1255.5788 [#]	1061, 609, 431, 339, 207
2 31.1	Steroidal saponin	C ₅₄ H ₉₆ O ₃₂	1239.5840 [#]	909, 593, 431, 339, 287, 207, 175
3 32.5	Steroidal saponin	C ₅₄ H ₈₀ O ₂₂	1063.5148 [#]	899, 727, 431, 339, 207, 175
4 32.6	Steroidal saponin	C ₅₅ H ₈₄ O ₂₂	1079.5493 [#]	339, 289, 271, 207
5 33.0	Steroidal saponin	C ₅₅ H ₈₂ O ₂₂	1077.5298 [#]	431, 339, 287, 207, 175
6 33.4	Steroidal saponin	C ₅₅ H ₈₀ O ₂₂	1093.5212	871, 731, 609, 465, 431, 339, 289, 253, 207
7 37.9	Steroidal saponin	C ₄₉ H ₇₂ O ₁₆	915.4749	577, 431, 353, 339, 287, 207, 175
Cluster 13				
8 40.6	O-deoxyhexosyl-hexosyl-pentosyl Spirostanol saponin	C ₄₄ H ₆₈ O ₁₈	887.4640	755, 655, 609, 591, 573, 555, 543, 465, 447, 433, 415, 397, 379, 289, 283, 271, 253
9 36.9	Di-O-pentosyl spirostanol saponin (Macaoside D)	C ₃₇ H ₆₀ O ₁₂	697.4145	565, 433, 385, 289, 271, 253
10 37.9	O-pentosyl-deoxyhexosyl spirostanol saponin (Saponin Sc2)	C ₃₈ H ₆₂ O ₁₂	711.4296	579, 433, 415, 397, 289, 271, 253
11 38.0	O-deoxyhexosyl spirostanol saponin (Saponin Sc4)	C ₃₃ H ₅₄ O ₈	579.3878	433, 289, 271, 253
12 38.2	O-deoxyhexosyl-pentosyl spirostanol saponin	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₂	709.4161	577, 431, 413, 395, 287, 269, 251

(Alliospiroside A)

Cluster 15					
13	27.7	di-O-glycosylated steroidal alkaloid (O-hexosyl jurubine)	C ₃₉ H ₆₇ NO ₁₃	758.4679	596, 543, 477, 416, 399, 381, 285, 255, 161
14	28.0	O-glycosylated steroidal alkaloid (jurubine)	C ₃₃ H ₅₇ NO ₈	596.4177	576, 452, 416, 399, 381, 335, 285, 255, 231, 215, 161
15	29.8	Di-O-glycosylated steroidal alkaloid (di-O-hexosyl juripidine)	C ₃₉ H ₆₅ NO ₁₃	756.4514	739, 676, 596, 524, 490, 474, 432, 416, 415, 399, 397, 379, 284, 271, 253, 229, 215, 159
16	29.9	Di-O-glycosylated steroidal alkaloid (di-O-hexosyl juribidine)	C ₃₉ H ₆₅ NO ₁₂	740.4626	676, 578, 416, 399, 381, 272, 255, 231, 181
17	36.1	Steroidal alkaloid (Unknown)	C ₂₉ H ₄₈ N ₂ O ₂	457.3790	416, 399, 381, 353, 285, 273, 255
18	37.0	Steroidal alkaloid (Unknown)	C ₆₄ H ₁₁₉ NO ₂₅	1302.8084	1140, 1086, 887, 416, 339, 285, 273, 255
19	38.2	Steroidal alkaloid (Unknown)	C ₄₅ H ₈₁ NO ₆	732.6111	597, 543, 416, 381, 289, 285, 255, 161
20	36.1	Juribidine*	C ₂₇ H ₄₅ NO ₂	416.3523	399, 381, 285, 255, 235, 215, 161
21	36.5	Steroidal alkaloid (Propionyl-juripidine)	C ₃₀ H ₄₉ NO ₄	488.3722	399, 381, 285, 255, 235, 215, 161
22	36.6	Steroidal alkaloid (Unknown)	C ₃₀ H ₄₉ NO ₃	472.3782	399, 381, 340, 312, 285, 255, 235, 215, 181, 161
23	36.8	Steroidal alkaloid (Acetyl-juripidine)	C ₂₉ H ₄₇ NO ₄	474.3577	441, 416, 399, 381, 298, 285, 273, 255, 231, 187, 161
24	39.7	Steroidal alkaloid (Unknown)	C ₃₃ H ₅₁ NO ₈	590.3730	572, 420, 399, 381, 353, 333, 285, 280, 255, 245, 235, 217, 181, 169, 161
Cluster 22					
25	34.8	Di-O-hexosyl-deoxyhexosyl-pentosyl furostanol Saponin	C ₅₀ H ₈₂ O ₂₃	1033.5208 [#]	709, 565, 431, 287, 269
26	31.0	O-deoxyhexosyl-pentosyl-hexosyl furostanol saponin (Macaoside K/J/I)*	C ₄₄ H ₇₂ O ₁₈	871.4709 [#]	739, 709, 577, 541, 431, 413, 395, 287, 269, 251
27	33.5	Di-O-hexosyl furostanol saponin	C ₃₉ H ₆₄ O ₁₅	773.4315	449, 431, 413, 395, 317, 287, 269, 251, 163
28	35.2	Furostanol saponin (unknown)	C ₄₃ H ₆₈ O ₁₉	889.4430	853, 797, 431, 413, 395
29	35.3	O-deoxyhexosyl-hexosyl furostanol saponin	C ₃₉ H ₆₂ O ₁₅	771.4173	431, 413, 395, 377, 287, 269
30	35.6	O-deoxyhexosyl-pentosyl-hexosyl furostanol saponin	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₉	903.4596	741, 625, 463, 431, 413, 395, 317, 305, 299, 287, 269
31	37.2	Di-O-pentosyl furostanol saponin	C ₃₇ H ₅₈ O ₁₂	695.4002	563, 449, 431, 413, 395, 299, 287, 269, 251
32	38.1	O-pentosyl-deoxyhexosyl furostanol saponin	C ₃₈ H ₆₂ O ₁₃	727.4298	595, 449, 431, 413, 395, 377, 287, 269
33	37.7	Furostanol saponin (Unknown)	C ₅₅ H ₈₀ O ₂₃	1109.5185	449, 431, 413, 395, 339, 305, 287, 207
34	38.2	O-pentosyl-deoxyhexosyl furostanol saponin (Macaoside A)	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₂	709.4161	449, 431, 413, 395, 299, 287, 269, 251
35	38.4	O-deoxyhexosyl furostanol saponin	C ₃₃ H ₅₂ O ₈	577.3731	431, 413, 395, 317, 299, 287, 269, 251
Cluster 30					
36	33.0	O-deoxyhexosyl steroidal alkaloid (O-deoxyhexosyl	C ₃₃ H ₅₅ NO ₈	594.3999	448, 430, 412, 395, 286, 269, 251

37	33.4	esculeogenin A/B)			
		Steroidal alkaloid			
		(Esculeogenin A or B)	C ₂₇ H ₄₅ NO ₄	448.3432	430, 412, 286, 251, 239
38	33.7	O-deoxyhexosyl-pentosyl			
		steroidal alkaloid (O-			
		deoxyhexosyl-pentosyl	C ₃₈ H ₆₃ NO ₁₂	726.4440	594, 576, 558, 540, 490,
		esculeogenin A/B)			472, 448, 430, 412
Other compounds					
39	23.5	<i>N-trans</i> -Coumaroyl tyramine	C ₁₇ H ₁₇ NO ₃	284.1299	147
40	25.0	<i>N-trans</i> -Feruloyl tyramine	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	314.1401	177

RT: retention time; MF: molecular formula. The MF was considered errors up 8 ppm and mSigma 30.

* > 0.8 cos score; # [M+H-H₂O]⁺

The saponin **26**, a furostanol saponin, was putatively annotated as macaoside K/J or I, which has demonstrated EC₅₀ of 14.2-37.6 µg/ml against SK-Lu-1, HepG2, MCF-7, and T24 cancer cell lines.²⁰ These results highlight potential targets to research new compounds against cancer cells since some saponins from this cluster were not evaluated for them or reported in the literature yet, such as **31**, **33**, and **35**.

The metabolites **13-24** (cluster 15) did not exhibit UV absorption, presented nitrogen in their molecular formulae, and revealed losses of glycosides (e.g. hexosyl - 162 u) that indicated steroidal alkaloids, a common metabolite class reported for *Solanum* species.¹⁷ In MS/MS, the aminospirane alkaloids lose an amine (17 u) and the spirostane ring by sequential dehydration and hydrogen rearrangement, which occur by the ring opening with anchimeric assistance, to yield the diagnostic fragment ions.²¹ The metabolite **13** (*m/z* 758.4679 [M+H]⁺), for example, yielded the product ions by losses of hexosyl groups (*m/z* 596 [M+H-162]⁺ and 416 [M+H-2x162-H₂O]⁺), amine (*m/z* 399 [416+H-NH₃]⁺), and the losses relative of spirostane ring (*m/z* 285 and 255). Thus, alkaloid **13** was annotated as *O*-hexosyl jurubine (di-*O*-glycosylated steroidal alkaloid).

The steroidal alkaloids of cluster 15 (**Figure 4**) presented similar fragmentation pathways and the molecular network also showed these similarities and the mass

differences of features. Compound **23** showed a mass difference relative to an acetyl group (-OCOCH₃) compared to metabolite **20** and it was annotated as acetyl juripidine. Additionally, other glycosylated steroidal alkaloids were also annotated, such as jurubine (O-glycosyl steroidal alkaloid) (**14**), di-O-hexosyl-juripidine (**15**), di-O-hexosyl-juribidine (**16**), juribidine (**20**), propionyl-juripidine (**21**), and other unknown steroidal alkaloids (**17** – *m/z* 457.3790, **18** – *m/z* 1302.8084, **19** – *m/z* 732.6111, **22** – *m/z* 472.3782, and **24** – *m/z* 590.3730). The alkaloids from cluster 15 are scarcely studied, but they are an excellent aim to search new cytotoxic compounds since there are several cytotoxic data reported for the metabolite class of the steroidal alkaloids of *Solanum* species.¹⁷

The cluster 18 is composed of benzyloisoquinoline and aporphine alkaloids (**Figure 4**), and the fragmentation pathway of them was similar, such as the losses of 17 (NH₃), 30 (CH₂O), and 15 *u* (•CH₃), which confirmed the absence of methyl group in the nitrogen, the methylenedioxy, and methoxyl substituents (**Figure S5**). For example, the alkaloid **51** showed an intense ion at *m/z* 312.1234 [M+H]⁺ compatible to molecular formula C₁₈H₁₄NO₄. Its fragment ions were observed at *m/z* 295 [M+H-NH₃]⁺, 280 [M+H-NH₃-•CH₃]⁺, 265 [M+H-NH₃-CH₂O]⁺, and 237 [M+H-NH₃-CH₂O-CO]⁺ (**Table 2**). Thus, the alkaloid **51** was annotated as hernangerine/litsferine and the spectral data were compatible with the reported for it.²² In addition, the alkaloid boldine (**46**) was also annotated, which showed a hit with the spectral data deposited in GNPS and it was confirmed by injection of authentic standard. All the alkaloids grouped in cluster 18 are summarized in **Table 2** and they also included the annotated alkaloids norcoclaurine (**41**), norisoboldine (**42**), and *N*-methyl boldine (**44**).

The alkaloid **51**, hernangrine/litseferine, is an aporphinoid alkaloid with a 1,2-methylenedioxy and this group has been related to better cytotoxic activities since

there is better stability of interaction in relation to thermal denaturation of DNA double helix compared to aporphinoids without 1,2 methylenedioxy group, besides they promoted inhibition of topoisomerase I by intercalation into DNA that can explain the cytotoxic properties.²³ Therefore, these alkaloids could be good targets against leukemia cancer cells.

Cluster 20 (**Figure S6**) mainly composed of features of active samples and these metabolites were annotated and summarized on **Table S3**. This cluster is yielded from flavonols linked to glycosides and phenylpropanoids (sinapoyl, feruloyl, or coumaroyl) or galloyl substituents. The aglycones annotated in this cluster were myricetin, quercetin, and kaempferol. Therefore, the annotated flavonols from cluster 20 were the following: *O*-galloyl-hexosyl myricetin (*m/z* 633.1090 [M+H]⁺) (**54**), *O*-galloyl-hexosyl quercetin (*m/z* 617.1141) (**55**), di-*O*-hexosyl quercetin (*m/z* 627.1546) (**56**), *O*-sinapoyl-hexosyl myricetin (*m/z* 687.1564) (**57**), *O*-feruloyl-hexosyl myricetin (*m/z* 657.1448) (**58**), *O*-feruloyl di-hexosyl kaempferol (*m/z* 787.2078) (**59**), *O*-sinapoyl-hexosyl quercetin (*m/z* 671.1621) (**60**), *O*-feruloyl-hexosyl quercetin (*m/z* 641.1481) (**61, 62**), *O*-coumaroyl-hexosyl kaempferol (*m/z* 595.1446) (**63**), and *O*-feruloyl-hexosyl kaempferol (*m/z* 625.1538) (**64**). Additionally, the compounds from cluster 28 were described in **Table S4** and the annotation performed by the comparison of mass spectra library in MZmine were summarized in **Table S5** (Supporting Information).

Table 2. Alkaloids annotated from *O. diospyrifolia* and *P. pinnata* by LC-DAD-MS data.

N°	RT (min)	Compound	UV (nm)	MF	[M+H] ⁺	MS/MS	Sample
41	8.5	Norcoclaurine	280	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃	272.1321	255, 237, 209, 194, 165	<i>O. diospyrifolia</i>
42	11.4	Norisoboldine*	277, 310(sh)	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	314.1390	297, 282, 265, 177	<i>O. diospyrifolia</i> , <i>P. pinnata</i>
43	13.0	Coclaurine	282, 310 (sh)	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	286.1440	269, 254, 237, 219, 209, 194, 191, 178, 175, 166	<i>O. diospyrifolia</i>

44	14.8	N-methyl boldine	280, 310(sh)	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	342.1695	297, 282, 265, 251, 237, 222, 189, 165	<i>O. diospyrifolia</i>
45	15.3	Reticuline	279, 330(sh)	C ₁₉ H ₂₃ NO ₄	330.1694	299, 267, 192, 177	<i>O. diospyrifolia</i>
46	16.4	Boldine*	279, 309(sh)	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	328.1535	297, 282, 265, 250, 237, 233, 205	<i>O. diospyrifolia</i> , <i>P. pinnata</i>
47	17.3	Coclaurine isomer	279, 309(sh)	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	286.1434	269, 254, 237, 219, 209, 194, 178, 175, 165, 163	<i>O. diospyrifolia</i>
48	18.1	Alkaloid (Unknown)	276	C ₃₁ H ₂₃ NO ₄	474.1710	456, 438, 295, 265	<i>O. diospyrifolia</i>
49	18.9	Isoboldine	282, 307	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	328.1543	297, 282, 265, 253, 237, 207	<i>O. diospyrifolia</i>
50	19.0	Alkaloid	278, 307	C ₄₅ H ₅₃ NO ₁₆	864.3447	591, 455, 312, 195, 165	<i>O. diospyrifolia</i>
51	18.8	Hernangerine/litsferine	279, 312(sh)	C ₁₈ H ₁₇ NO ₄	312.1234	295, 280, 265, 250, 237, 222, 205	<i>O. diospyrifolia</i> , <i>P. pinnata</i>
52	19.0	N-methylhermannangerine / N-methylactinodaphnine / Domesticine	282, 307	C ₁₉ H ₁₉ NO ₄	326.1361	311, 295, 280, 265, 250, 237, 222, 205	<i>O. diospyrifolia</i>
53	20.3	Dauriciline	282	C ₃₆ H ₄₀ N ₂ O ₆	597.2958	192, 178	<i>O. diospyrifolia</i>

RT: retention time; MF: molecular formula. The MF was considered errors up 8 ppm and mSigma 30. * > 0.8 cos score in GNPS and MZmine.

The metabolites **65-70** were grouped in cluster 24, which are present only in *A. denticulata* extract (**Figure 4, Table 3**). These constituents did not show UV absorption and their molecular formulas, determined from the accurate MS, revealed 42, 48, or 54 carbons. The fragment ions from aglycones (m/z 441 and 439 [Aglycone+H-H₂O]⁺ - C₃₀H₄₈O₂ and C₃₀H₄₆O₂, respectively) and the losses of glycosides (hexosyl – 162 *u*, deoxyhexosyl – 146 *u*, and glucuronyl – 176 *u*) confirmed triterpenoid saponins, besides losses of water molecules were commonly observed, as cited in the literature.²⁴ The mass differences between the saponins in cluster 24 were highly relevant for the annotation of the saponins, such as for the compounds **65** (m/z 1105.5741) and **66** (m/z 943.5265) that presented a difference of a hexosyl (162 *u*). Thus, the annotated saponins were di-O-hexosyl deoxyhexosyl glucuronyl triterpenoid saponin (abrisaponin SB or D2) (**65**), O-hexosyl deoxyhexosyl glucuronyl triterpenoid saponin (soyasaponin I or Bb) (**66**), O-hexosyl glucuronyl triterpenoid saponin (soyasaponin III or Bb') (**67**), O-hexosyl deoxyhexosyl glucuronyl triterpenoid saponin

(dehydrosoyasaponin I) (**68**), di-O-hexosyl deoxyhexosyl glucuronyl triterpenoid saponin (soyasaponin VI or β g) (**69**), and di-O-hexosyl glucuronyl triterpenoid saponin (soyasaponin γ g) (**70**).

Table 3. Compounds annotated from cluster 24 by LC-DAD-MS data that were detected only from *Aeschynomene denticulata*.

	RT (min)	Compound	MF	[M+H] ⁺	MS/MS (m/z)
65	30.4	di-O-hexosyl deoxyhexosyl glucuronyl triterpenoid saponin (abrisaponin SB/D2)	C ₅₄ H ₈₈ O ₂₃	1105.5741	581, 441, 423, 405, 365, 217
66	34.0	O-hexosyl deoxyhexosyl glucuronyl triterpenoid saponin (Soyasaponin I/Bb)*	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	943.5265	797, 599, 441, 423, 405
67	34.3	O-hexosyl glucuronyl triterpenoid saponin (Soyasaponin III/Bb')	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₄	797.4676	639, 599, 581, 441, 423, 405, 365, 201,
68	34.6	O-hexosyl deoxyhexosyl glucuronyl triterpenoid saponin (Dehydrosoyasaponin I)*	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₈	941.5124	597, 439, 421, 313, 245
69	35.03	di-O-hexosyl deoxyhexosyl glucuronyl triterpenoid saponin (Soyasaponin VI/ β g)*	C ₅₄ H ₈₄ O ₂₁	1069.5589	923, 743, 599, 441, 423, 405, 217, 127
70	35.4	di-O-hexosyl glucuronyl triterpenoid saponin (Soyasaponin γ g)	C ₄₈ H ₇₄ O ₁₇	923.5008	599, 581, 567, 549, 549, 441, 423, 405, 365, 297, 217

RT: retention time; MF: molecular formula. The MF was considered errors up 8 ppm and mSigma 30. * > 0.8 cos score.

3.3 Cytotoxicity effects of alkaloids from *S. glaucophyllum* and *O. diospyrifolia* and flow cytometry

The extracts from *S. glaucophyllum* and *O. diospyrifolia* were submitted to alkali-acid extraction, yielding their respective alkaloid fractions (Alk_fr). These fractions were analyzed by LC-DAD-MS and their chromatogram profiles are illustrated in **Figure 5**. In the Alk_fr of *S. glaucophyllum*, alkaloids **13-14**, **16-17**, **20-21**, **23**, and **34-38** were annotated, while alkaloids **41-49** and **51-53** were detected in the Alk_fr of *O. diospyrifolia*. These classes of alkaloids have shown cytotoxic properties against cancer cell lines, representing an important source for drug discovery.^{25,26}

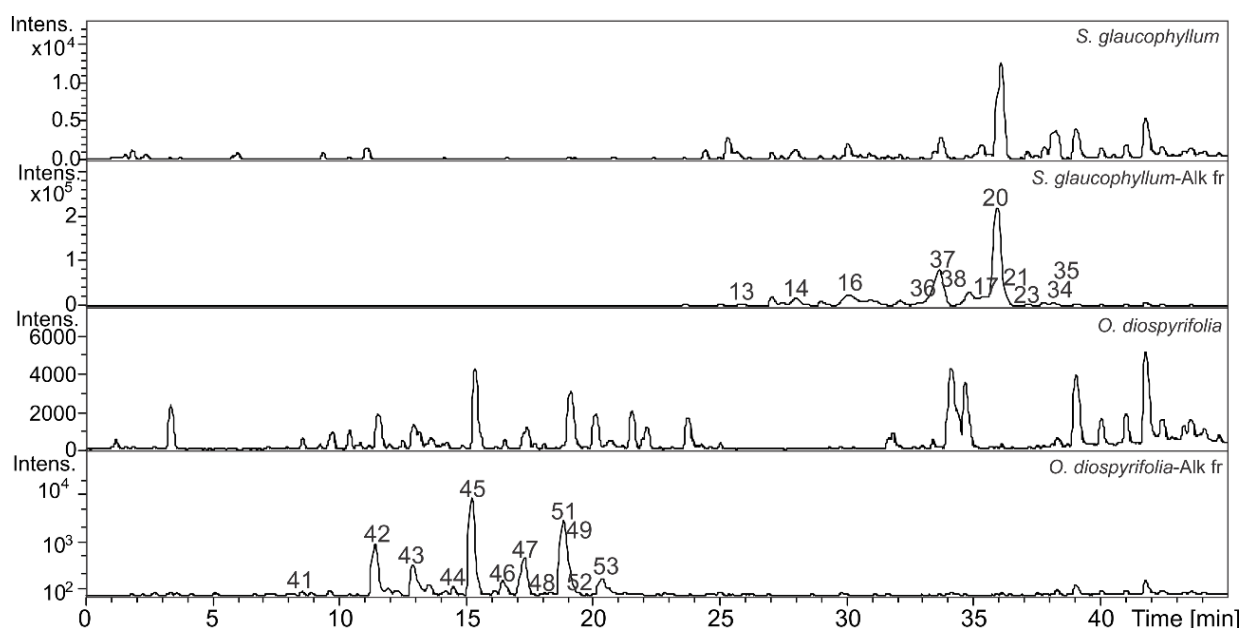


Figure 5. Base peak chromatograms from *S. glaucophyllum* and *O. diospyrifolia* extracts and their alkaloid fractions (Alk_fr).

The K562 cell line demonstrates the highest sensitivity among the leukemia lines evaluated in this study, whereas the KG-1 line showed greater resistance.²⁷ These two cell lines were therefore selected to assess the cytotoxic activity of the alkaloid fractions from *S. glaucophyllum* and *O. diospyrifolia* (**Figure 6**) and EC₅₀ values were calculated (**Table 4**). For the K-562 lineage, the EC₅₀ values of alkaloid fractions from *S. glaucophyllum* and *O. diospyrifolia* were 13.9 and 6.4 µg/mL, respectively, while for the KG-1 lineage, the values were 13.5 and 13.4 µg/mL. The alkaloid fractions exhibited higher cytotoxic activity compared to the crude extracts of *S. glaucophyllum* and *O. diospyrifolia*, suggesting that these alkaloids can contribute to the anti-leukemic activity observed.

Table 4. EC₅₀ of alkaloid fractions (Alk-F) from *S. glaucophyllum* and *O. diospyrifolia* and boldine against leukemia cancer cell lines.

Sample	Cell line (µg/ml)		
	K562	KG-1	Kasumi-1
Alk_F <i>S. glaucophyllum</i>	13.9	13.5	N.D.

Alk_F <i>O. diospyrifolia</i>	6.4	13.4	N.D.
Boldine	145 μ M	116 μ M	46 μ M

N.D.: not determined

Boldine (**46**), a natural aporphine alkaloid, was evaluated at different concentrations against Kasumi, KG-1, and K-562 leukemia cells (**Figures 6A-C**) and revealed EC₅₀ of 46, 116, and 145 μ M, respectively (**Table 4**). This alkaloid has been evaluated against various cancer cell lines, showing EC₅₀ values of 46.5, 50.8, and 160 μ g/ml for MDA-MB231, MDA-MB468, and MCF-7 human breast cancer cells.^{26,28} Additionally, boldine has been reported to induce the activation of caspase-9 and -3/7, and inhibits kappa B factor and breast cancer in vivo at doses 50 or 100 mg/kg in animal models. In addition, this alkaloid did not demonstrate acute toxicity at a dose of 100 mg/kg,²⁸ and it showed activity against U138-MG human glioma cells and increased the cells in the G2/M phase after 24 h.²⁵

The alkaloids norisoboldine (**42**), reticuline (**45**), and hernangerine/litsferine (**51**) were the most intense of peaks in Alk_fr of *O. diospyrifolia*. Hernangrine (**51**) has shown an EC₅₀ of 1.09 (3.5 μ M), 1.53, 2.83, and 2.94 μ g/ml against P388 leukemia, KB-16 nasopharyngeal, A549 nonsmall cell lung, and HT29 colorectal human cancer cell lines, respectively.²⁹ Reticuline has revealed EC₅₀ of 38, 32.1, and 18.3 μ M for SUP-B15 (acute lymphoblastic leukemia), KOPN-8 (acute lymphoblastic leukemia with MLL-MLLt1/ENL fusion), and NALM-06 (non-T/non-B acute lymphoblastic leukemia at relapse with P15INK4B and P16INK4A deletions), respectively.³⁰

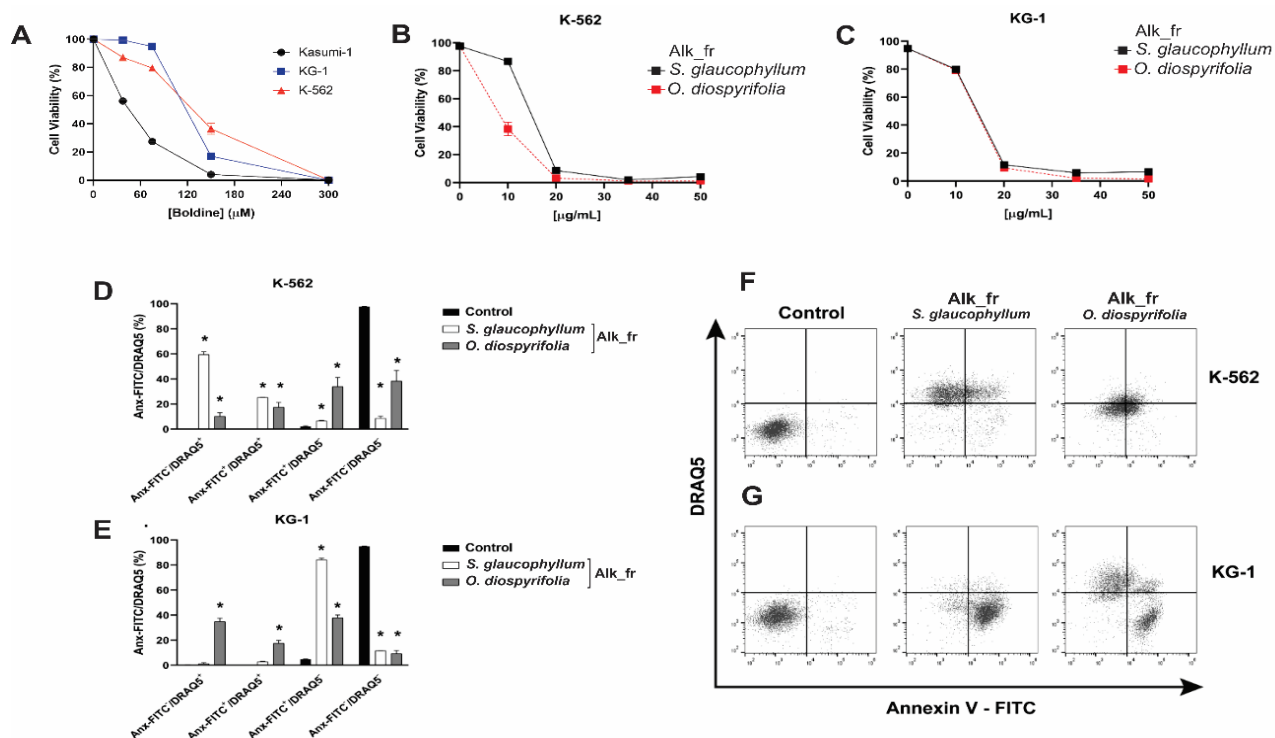


Figure 6. Cell proliferation and cytotoxic profile of boldine on Kasumi-1, K562, and KG-1 cells (A) and alkaloid fractions (Alk_fr) from *S. glaucophyllum* and *O. diospyrifolia* on K562 (B) and KG-1 (C). Cell viability was assessed using a resazurin assay. The cytotoxic activity of Alk_fr from *S. glaucophyllum* and *O. diospyrifolia* (D and E) in K-562 and KG-1 were assessed by analysis of annexin V-FITC/DRAQ5 staining after 24 h with EC₅₀ for 24 h (F-G). The results are the means $\pm$ SEM of three independent experiments performed in triplicate. *P < 0.05. One-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test was used.

The cytotoxic activity induced by alkaloid fractions (Alk_fr) of *S. glaucophyllum* and *O. diospyrifolia* was investigated through Annexin-V and DRAQ5 staining to evaluate the treatments for phosphatidylserine externalization and membrane integrity loss. An Anx+/DRAQ5- response indicates phosphatidylserine externalization and the onset of early apoptosis. In contrast, double staining (Anx+/DRAQ5+) indicates late apoptosis/necrosis-like characterized by both loss of membrane integrity and labeling of phosphatidylserine.³¹ The treatment with the EC₅₀ of the alkaloid fraction of *S. glaucophyllum* on K562 (**Figure 6D** and **6F**) resulted in a significant reduction in cell viability, predominantly due to compromised plasma membrane integrity. In contrast,

the treatment with alkaloid fraction of *O. diospyrifolia* at concentration of EC₅₀ also reduced the cell viability, but it showed relatively less impact on plasma membrane integrity. For KG-1 cells (**Figure 6D and G**), the exposition to alkaloid fraction of *S. glaucophyllum* induced a milder reduction in membrane integrity with cell death displaying apoptotic characteristics, while alkaloid fraction of *O. diospyrifolia* was associated with loss of membrane integrity and the onset of late apoptosis.

Evidence that alkaloid fractions of *S. glaucophyllum* and *O. diospyrifolia* induced apoptosis in K-562 and KG-1 cells prompted an assessment of whether these treatments effectively triggered caspase-3 activation. In both K562 and KG-1 cells, the treatments increased cleaved caspase-3 and the alkaloid fraction of *O. diospyrifolia* induced approximately a threefold increase in both cell lines (**Figure 7A-B**). Caspases are endopeptidases that cleave specific sites on approximately 1,500 substrates and play a crucial role in mediating apoptosis. Among them, caspase-3 is considered the most critical enzyme in this process. The activation of caspase-3 is commonly linked with phosphatidylserine externalization and other morphological changes characteristic of apoptosis.³² Additionally, the phosphorylation of Ser-139 residue in the H2AX histone variant constitutes an early cellular response to the induction of double-strand breaks in DNA. This phosphorylation is regarded as a specific and sensitive molecular marker of DNA damage.³³ In K-562 and KG-1 cells, a significant increase in p-H2AX was observed only for the treatment with the Alk_fr of *O. diospyrifolia*, whereas in KG-1 cells, the Alk_fr of *S. glaucophyllum* caused a decrease of phosphorylation in this protein.

Therefore, our findings are significant and highlight potential anti-leukemic extracts and lead compounds, such as aporphine alkaloids. It is important to note that the inclusion of diverse plant families with various chemical constituents posed

challenges for statistical analysis. However, these analyses were conducted thoroughly and complemented by molecular networking, which assisted the determination of lead compounds. Furthermore, the most representative samples identified in this study can serve as source for future research focusing on specific plant genera or families, mainly involved in alkaloid biosynthesis. In addition to the active extracts from *O. diospyrifolia* and *S. glaucophyllum* that demonstrated efficacy against leukemia cell lines, our study also identified other promising samples. These samples are potential for future research aimed at discovering bioactive metabolites and elucidating their mechanisms of action.

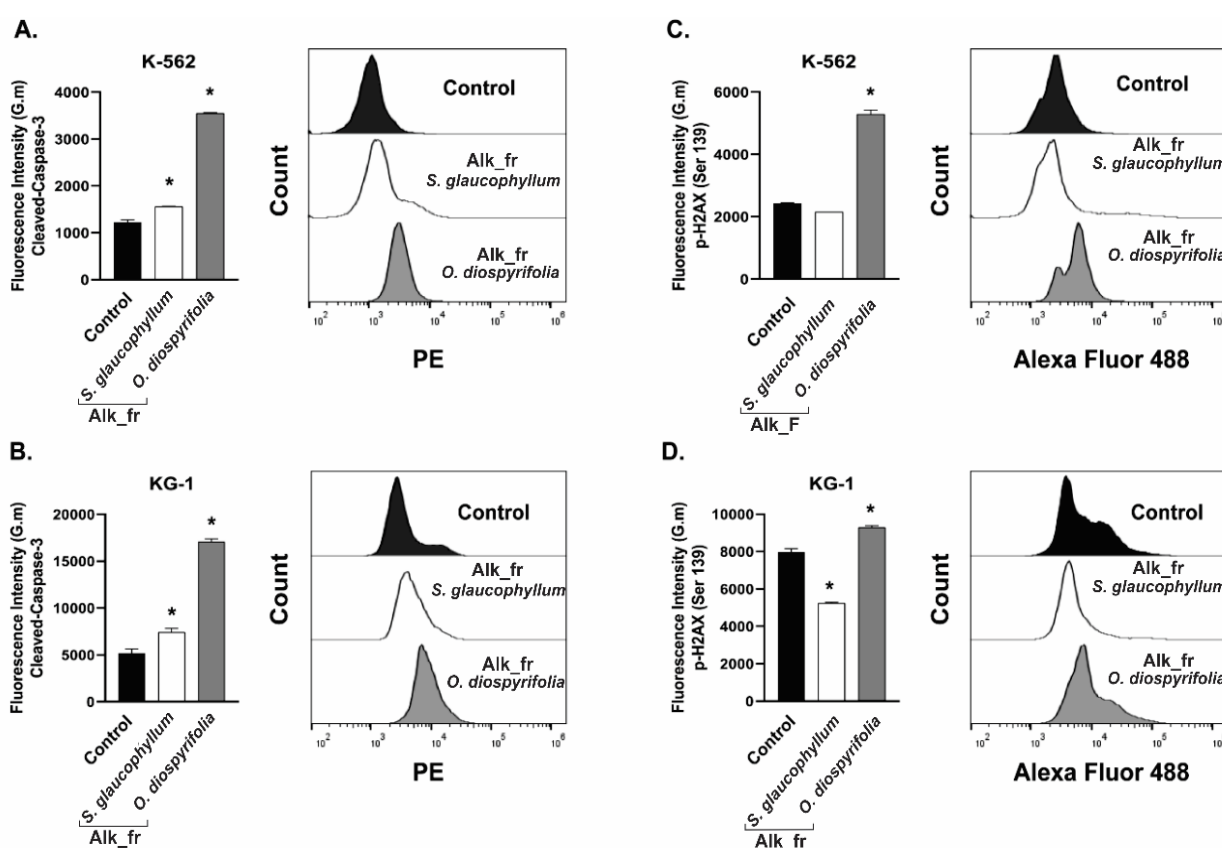


Figure 7. Analysis of apoptosis and DNA damage cell signaling from the alkaloid fractions (Alk_fr) of *S. glaucophyllum* and *O. diospyrifolia*. (A, B) Cleaved-Caspase-3 activation. Activation p-H2AX (Ser 139) in K562 (C) and KG-1 cells after 24 h (D) and typical flow cytometry histograms. The results are the means $\pm$ SEM of three independent experiments performed in triplicate. *P < 0.05. One-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test was used.

4. CONCLUSIONS

Our study highlights the innovative application of metabolomics and molecular networking to identify potential bioactive compounds against leukemia cancer cells. By the integration of advanced statistical analyses and targeted metabolite annotation, we successfully distinguished chemical differences across plant extracts from 14 families. Then, steroidal and aporphine alkaloids were identified as promising candidates for cytotoxic activity, particularly those derived from *Solanum glaucophyllum* and *Ocotea diospyrifolia*, which demonstrated significant pro-apoptotic effects, caspase-3 activation, and DNA damage induction.

The alkaloid fractions exhibited superior cytotoxic activity compared to crude extracts, emphasizing the importance of alkaloids for the activity. Furthermore, the approach of molecular networking enabled the discovery of unique metabolite clusters, including novel steroidal saponins and aporphine alkaloids, which represent valuable leads for anti-leukemic drug development. Therefore, these strategies employed in this study serve as a connection between chemical diversity and targeted bioactivity, providing a robust framework for future investigations into natural products as potential therapeutic agents.

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/>

Table S1 - summarizes the plant species; Tables S2-S5 – spectral data and annotation of the compounds from the selected clusters.

Figure S1 – Cytotoxic activities of the extracts on leukemia cell lines at 10µg/mL; Figure S2 – base peak chromatograms from the extracts; Figure S3-S4 – multivariate statistical analysis; Figure S5- Fragmentation pathway of the metabolites; Figure S6 - clusters of the molecular networking from the chemical data.

Author Contributions

S.L e K.S.F: methodology, investigation, writing – original draft. V.S.S.Z, K.F.S.S, L.R.P e H.F.V.T: methodology, validation, data curation. G.A.D and F.M.A: methodology, sample collection and botanical identification. E.J.P, C.A.C and D.B.S: funding acquisition, conceptualization, methodology, formal analysis, writing – review & editing. KSF and D.B.S.: supervision and writing - review and editing.

Notes

The authors declare no competing financial or personal conflicts interests.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are thankful Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) (Edital FUNDECT 08/2020-PPSUS, process number 71/000.491/2021), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Áreas Úmidas (INAU), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, process number 312194/2023-4).

REFERENCES

- (1) Senft, D.; Jeremias, I. A rare subgroup of leukemia stem cells harbors relapse-inducing potential in acute lymphoblastic leukemia. *Exp. Hematol.* **2019**, 69, 1-10.
- (2) Vos, T.; Lim, S. S.; Abbafati, C.; et al. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the global burden of disease study 2019. *Lancet* **2020**, 3960 (10258), 1204-1222.

- (3) Sharma, R.; Jani, C. Mapping incidence and mortality of leukemia and its subtypes in 21 world regions in last three decades and projections to 2030. *Ann. Hematol.* **2022**, *101* (7), 1523–1534.
- (4) O'Reilly, E.; Zeinabad, H. A.; Szegezdi, E. Hematopoietic versus leukemic stem cell quiescence: Challenges and therapeutic opportunities. *Blood Rev.* **2021**, *50*, 100850.
- (5) van Gils, N.; Denkers, F.; Smit, L. Escape from treatment; the different faces of leukemic stem cells and therapy resistance in acute myeloid leukemia. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 659253.
- (6) 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* (3), 770-803.
- (7) Dong, S. H.; Duan, Z.-K.; Bai, M.; Huang, X.-X.; Song, S.-J. Advanced technologies targeting isolation and characterization of natural products. *Trends Anal. Chem.* **2024**, *175*, 117711.
- (8) Pilon, A. C.; Del Grande, M.; Silvério, M. R. S.; Silva, R. R.; Albernaz, L. C.; Vieira, P. C.; Lopes, J. L. C.; Espindola, L. S.; Lopes, N. P. Combination of GC-MS molecular networking and larvicidal effect against *Aedes aegypti* for the discovery of bioactive substances in commercial essential oils. *Molecules* **2022**, *27* (5), 1588.
- (9) Kato, N. N.; Stavis, V. K.; Boaretto, A. G.; Castro, D. T. H.; Alves, F. M.; Souza, K. P.; Santos, E. L.; Silva, D. B.; Carollo, C. A. Application of the metabolomics approach to the discovery of active compounds from Brazilian trees against resistant human melanoma cells. *Phytochem. Anal.* **2021**, *32* (6), 992-1002.
- (10) Khalil, M. N. A.; Afifi, S. M.; Eltanany, B. M.; Pont, L.; Benavente, F.; El-Sonbaty,

- S. M.; Sedeek, M. S. Assessment of the effect of drying on *Brassica* greens via a multiplex approach based on LC-QTOF-MS/MS, molecular networking, and chemometrics along with their antioxidant and anticancer activities. *Food Res. Int.* **2024**, *180*, 114053.
- (11) Sharma, B.; Salunke, R.; Balomajumder, C.; Daniel, S.; Roy, P. Anti-diabetic potential of alkaloid rich fraction from *Capparis decidua* on diabetic mice. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *127*, 457-462.
- (12) Nakayama, G. R.; Caton, M. C.; Nova, M. P.; Parandoosh, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J. Immunol. Methods* **1997**, *204* (2), 205-208.
- (13) Longhin, E. M.; El Yamani, N.; Rundén-Pran, E.; Dusinska, M. The alamar blue assay in the context of safety testing of nanomaterials. *Front. Toxicol.* **2020**, *4*, 981701.
- (14) Choo, M. Z. Y.; Chai, C. L. L. Promoting GAINs (give attention to limitations in assays) over PAINs Alerts: no PAINs, more GAINs. *Chem. Med. Chem.* **2022**, *17* (7), e202100710.
- (15) Baell, J. B. Feeling Nature's PAINs: Natural products, natural product drugs, and pan assay interference compounds (PAINs). *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 616-628.
- (16) Zheng, W.; Wang, F.; Zhao, Y.; Sun, X.; Kang, L.; Fan, Z.; Qiao, L.; Yan, R.; Liu, S.; Ma, B. Rapid characterization of constituents in *Tribulus terrestris* from different habitats by UHPLC/Q-TOF MS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2017**, *28* (11), 2302-2318.
- (17) Kaunda, J. S.; Zhang, Y. J. The genus *Solanum*: An ethnopharmacological,

- phytochemical and biological properties review. *Nat. Prod. Bioprospect.* **2019**, 9, 77-137.
- (18) Lu, Y.; Luo, J.; Xu, D.; Huang, X.; Kong, L. Characterization of spirostanol saponins in *Solanum torvum* by high-performance liquid chromatography/evaporative light scattering detector/electrospray ionization with multi-stage tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, 22 (16), 2447-2452.
- (19) Kang, L-P.; Yu, K.; Zhao, Y.; Liu, Y-X.; Yu, H-S.; Pang, X.; Xiong, C. Q.; Tan, D-W.; Gao, Y.; Liu, C.; Ma, B-P. Characterization of steroidal glycosides from the extract of *Paris Polyphylla* var. *Yunnanensis* by UPLC/Q-TOF MSE. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, 62, 235-249.
- (20) Cuong, L. C. V.; Nhi, N. P. K.; Ha, T. P.; Anh, L. L.; Dat, T. T. H.; Oanh, P. T. T.; Phuong, N. T. M.; Thu, V. T. K.; Duc, H. V.; Anh, H. L. T. A new steroidal saponin from the aerial parts of *Solanum torvum*. *Nat. Prod. Res.* **2022**, 36 (19), 4892-4897.
- (21) Gazolla, M. C.; Marques, L. M. M.; Silva, M. G.; Araújo, M. T. M. F.; Mendes, R. L.; Almeida, J. R. G. S.; Vessecchi, R.; Lopes, N. P. Characterization of 3-aminospirostane alkaloids from roots of *Solanum paniculatum* L. with hepatoprotective activity. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2020**, 34 (S3), e8705.
- (22) Peng, X.; Luo, Y.; Wang, J.; Ji, T.; Yuan, L.; Kai, G. Integrated analysis of the transcriptome, metabolome and analgesic effect provide insight into potential applications of different parts of *Lindera aggregata*. *Int. Food Res.* **2020**, 138, 109799.
- (23) Liu, Y.; Liu, J.; Di, D.; Li, M.; Fen, Y. Structural and mechanistic bases of the anticancer activity of natural aporphinoid alkaloids. *Curr. Top. Med. Chem.* **2013**, 13

- (17), 2116-26.
- (24) Ha, T. J.; Lee, W. B.; Park, K. H.; Jeong, S. H.; Kim, H. T.; Ko, J. M.; Baek, I. Y.; Lee, J. H. Rapid characterization and comparison of saponin profiles in the seeds of Korean leguminous species using ultra performance liquid chromatography with photodiode array detector and electrospray ionisation/mass spectrometry (UPLC-PDA-ESI/MS) analysis. *Food Chem.* **2014**, *46*, 270-777.
- (25) Rodríguez-Arce, E.; Cancino, P.; Arias-Calderón, M.; Silva-Matus, P.; Saldías, M.; Rodríguez-Arce, E.; Cancino, P.; Arias-Calderón, M.; Silva-Matus, P.; Saldías, M. Oxoisoaporphines and aporphines: versatile molecules with anticancer effects. *Molecules* **2020**, *25*, 108.
- (26) Tomsik, P.; Micuda, S.; Muthna, D.; Cermakova, E.; Havelek, R.; Rudolf, E.; Hroch, M.; Kadova, Z.; Rezacova, M.; Cmielova, J.; Zivny, P. Boldine inhibits mouse mammary carcinoma in vivo and human MCF-7 breast cancer cells in vitro. *Planta Med.* **2016**, *82* (16), 1416–1424.
- (27) Buri, M. V.; Torquato, H. F. V.; Barros, C. C.; Ide, J. S.; Miranda, A.; Paredes-Gamero, E. J. Comparison of cytotoxic activity in leukemic lineages reveals important features of β -hairpin antimicrobial peptides. *J. Cell Biochem.* **2017**, *118* (7), 1764-1773.
- (28) Paydar, M. J.; Amalidehghan, B.; Wong, Y. L.; Wong, W. F.; Looi, C. Y.; Mustafa, M. R. Evaluation of cytotoxic and chemotherapeutic properties of boldine in breast cancer using in vitro and in vivo models. *Drug Des. Devel. Ther.* **2014**, *8*, 719–733.
- (29) Chen, J. J.; Ishikawa, T.; Duh, C-Y.; Tsai, I-L.; Chen, I-S. New dimeric aporphine alkaloids and cytotoxic constituents of *Hernandia nymphaeifolia*. *Planta Med.* **1996**, *62*, 528-533.

- (30) Ling, T.; Lang, W. H.; Maier, J.; Centurion, M. Q.; Rivas, F. Cytostatic and cytotoxic natural products against cancer cell models. *Molecules* **2019**, *24*, 2012.
- (31) Steensma, D. P.; Timm, M.; Witzig, T. E. Flow cytometric methods for detection and quantification of apoptosis. In: Buolamwini, J. K.; Adjei, A. A. (eds). Novel anticancer drug protocols. *Methods Mol. Med.* **2003**, 85.
- (32) Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S.; *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 486-541.
- (33) Mah, L. J.; El-Osta, A.; Karagiannis, T. γ H2AX: A sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* **2010**, *24*, 679-686.

SUPPORTING INFORMATION

Deciphering Steroidal and Aporphine Alkaloids as Anti-Leukemic Agents by approaches of Molecular Networking and Metabolomics

Suni Liu¹, Katyuze Souza Farias¹, Vanessa Samudio Santos Zanuncio¹, Geraldo Alves Damasceno Júnior², Flávio Macedo Alves², Edgar J Paredes-Gamero³, Kamylla Fernanda Souza de Souza^{3,4}, Lucas Roberto Pessatto³, Heron Fernandes Vieira Torquato³, Carlos Alexandre Carollo¹, Denise Brentan Silva^{1,*}

¹Federal University of Mato Grosso do Sul, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition (FACFAN), Laboratory of Natural Products and Mass Spectrometry (LaPNEM), 79070-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

²Federal University of Mato Grosso do Sul, Laboratory of Botany, Institute of Biosciences (INBIO), 79070-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

³Federal University of Mato Grosso do Sul, Laboratory of Molecular Biology and Cell Cultures, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition (FACFAN), 79070-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

⁴Universidade Federal de São Paulo, Biochemistry Department, 04044-020, São Paulo, SP, Brazil.

*Corresponding author: D. B. Silva, Laboratory of Natural Products and Mass Spectrometry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition (FACFAN), Federal University of Mato Grosso do Sul, Av. Costa e Silva, s/nº, 79070-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. Tel.: +55 (67) 3345-7366.

Email: denise.brentan@ufms.br (D.B. Silva).

Summary

Tables

Table S1. Description of species used in the study, botanic family, the used part of the plants, and the number of vouchers deposited in herbarium CGMS of Federal University of Mato Grosso do Sul.

Table S2. Description of the metabolite classes grouped in the molecular networking of figure 1.

Table S3. Compounds annotated from cluster 20 by LC-DAD-MS data.

Table S4. Compounds annotated from cluster 28 by LC-DAD-MS data.

Table S5. Compounds annotated by MZmine from LC-MS/MS data.

Figures

Figure S1. Cell proliferation and cytotoxic screening of the polar extracts on K562 (A), Kasumi-1 (B), and KG-1 (C) leukemia cell lines at 10µg/mL for 24h. Extracts from the following species: *Sesbania virgata* (1), *Cenetratherum punctatum* (2), *Lantana canescens* (3), *Melanthera latifolia* (4), *Aeschynomene denticulata* (5), *Echinodorus paniculatus* (6), *Byttemeria filipes* (7), *Aspilia latissima* – aerial parts (AP) (8), *A. latissima* - roots (9), *Erythroxylum anguifugum* (10), *Tocoyena formosa* (11), *Diospyros tetrasperma* (12), *Psidium guineense* (13), *Vitex cymosa* (14), *Astronium fraxinifolium* (15), *Coccoloba ochreolata* (16), *Solanum glaucophyllum* (17), *Paullinia pinnata* (18), and *Ocotea diospyrifolia* (19). were evaluated. Doxorubicin was used as positive control. Results were expressed as mean ± standard deviation (SD).

Figure S2. Base peak chromatogram obtained in positive ion mode from *Sesbania virgata*, *Cenetratherum punctatu*, *Lantana canescens*, *Melanthera latifolia*, *Aeschynomene denticulata*, *Echinodorus paniculatus*, *Byttemeria filipes*, *Aspilia latissima* – aerial parts, *A. latissima* - roots, *Erythroxylum anguifugum*, *Tocoyena formosa*, *Diospyros tetrasperma*, *Psidium guineense*, *Vitex cymosa*, *Astronium fraxinifolium*, *Coccoloba ochreolata*, *Solanum glaucophyllum*, *Paullinia pinnata*, and *Ocotea diospyrifolia*.

Figure S3. Heatmap and hierarchical clustering (HCA) of ion intensities of the top 100 features. The samples were classified in the groups active (red) and inactive (green) against leukemia cancer cells. AP: aerial parts; RO: roots.

Figure S4. Volcano plot displaying the differences in features between the active (right quadrant) and inactive extracts (left quadrant). The x and y axes represent the fold change (FC) and P values of the features highlighted showed $p \leq 0.05$ and they were illustrated in the box plots below (A). Box plots from the annotated features that revealed $p \leq 0.05$ for the active samples (B).

Figure S5. Fragmentation pathway for tyramine derivatives (A) and aporphine alkaloids (B).

Figure S6. Cluster of O-glycosyl-phenylpropanoyl/gallolyl flavonols (cluster 20). The annotation of features is described in Table S3.

Parameters applied for data Processing by MZmine

Table S1. Description of species used in the study, botanic family, the used part of the plants, and the number of vouchers deposited in herbarium CGMS of Federal University of Mato Grosso do Sul.

Plant species name	Family	Part of the plant	Voucher
<i>Sesbania virgata</i> (Cav.) Pers.	Fabaceae	AP/FR	CGMS 34909
<i>Centratherum punctatum</i> Cass.	Asteraceae	AP/FL	CGMS 34910
<i>Lantana canescens</i> Kunth	Verbenaceae	AP/FL	CGMS 34911
<i>Melanthera latifolia</i> (Gardner) Cabrera	Asteraceae	AP/FL	CGMS 34913
<i>Aeschynomene denticulata</i> Rudd	Fabaceae	AP/FL/FR	CGMS 34916
<i>Echinodorus paniculatus</i> Micheli	Alismataceae	AP/FL	CGMS 34917
<i>Byttneria filipes</i> Mart. ex K.Schum.	Malvaceae	AP/FL	CGMS 34925
<i>Aspilia latissima</i> Malme	Asteraceae	AP	CGMS 34914
<i>Aspilia latissima</i> Malme	Asteraceae	RO	CGMS 34914
<i>Erythroxylum anguifugum</i> Mart.	Erythroxylaceae	AP	CGMS 34948
<i>Tocoyena formosa</i> (Cham. & Schltdl.) K.Schum.	Rubiaceae	AP	CGMS 34946
<i>Diospyros tetrasperma</i> Sw.	Ebenaceae	AP	CGMS 34944
<i>Psidium guineense</i> Sw.	Myrtaceae	AP/FR	CGMS 34942
<i>Vitex cymosa</i> Bertero ex Spreng.	Lamiaceae	AP	CGMS 34940
<i>Astronium fraxinifolium</i> Schott	Anacardiaceae	AP	CGMS 34939
<i>Coccoloba ochreolata</i> Wedd.	Fabaceae	AP	CGMS 34937
<i>Solanum glaucophyllum</i> Desf.	Solanaceae	FR	CGMS 34951
<i>Paullinia pinnata</i> L.	Sapindaceae	AP/FR	CGMS 34953
<i>Ocotea diospyrifolia</i> (Meisn.) Mez	Lauraceae	AP	CGMS 34954

AP: aerial parts; LV: leaves; RO: Root, FL: Flower; FR: fruit

Table S2. Description of the metabolite classes grouped in the molecular networking of figure 1.

Cluster	Metabolite Class	Cluster	Metabolite Class
1	C-glycosylated flavonoids	16	Sesquiterpene lactones
2	Unknown	17	Non-glycosylated Flavonoids
3	Chlorogenic acids	18	Aporphine alkaloids
4	Procyanidins – type B	19	Steroidal saponins
5	Procyanidins – type A	20	O-glycosyl-phenylpropanoyl/gallolyl flavonols
6	O-glycosyated flavonoids	21	Triterpenoid saponins
7	Triterpenes and triterpenoid saponins	22	Furostanol steroidal saponins
8	Alkaloid derivatives	23	Unknown
9	Unknown	24	Triterpenoid saponin
10	Steroidal saponins	25	Unknown
11	di-C-glycosylated flavonoids	26	Flavonoids
12	Spermidine derivatives	27	Unknown
13	Spirostanol steroidal saponins	28	Unknown
14	Fatty acids	29	Saponins
15	Steroidal alkaloids	30	Steroidal alkaloids

Table S3. Compounds annotated from cluster 20 by LC-DAD-MS data.

	RT (min)	Compound	UV (nm)	MF	MS (m/z) [M+H] ⁺	MS/MS (m/z)	MS (m/z) [M-H] ⁻	MS/MS (m/z)	Sample
54	16.2	O-galloyl-hexosyl myricetin	270, 350	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₇	633.1090	319, 153	631.0947	479, 316, 271, 169	<i>Psidium guineense</i>
55	18.4	O-galloyl-hexosyl quercetin	253, 270, 358	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆	617.1141	303, 153	615.0971	463, 300, 169	<i>Psidium guineense</i>
56	22.7	di-O-hexosyl quercetin	265, 350	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	627.1546	465, 303, 267, 163	625.1410	300, 271, 255	<i>Byttneria filipes</i>
57	25.3	O-sinapoyl-hexosyl myricetin	270, 330, 355	C ₃₂ H ₃₀ O ₁₇	687.1564	319, 207, 175	685.1413	479, 316, 271, 205	<i>Psidium guineense</i>
58	25.4	O-feruloyl-hexosyl myricetin	270, 330, 355	C ₃₁ H ₂₈ O ₁₆	657.1448	319, 175	655.1327	316, 271	<i>Psidium guineense</i>
59	25.8	O-feruloyl di-hexosyl kaempferol	270, 330, 355	C ₃₇ H ₃₈ O ₁₉	787.2078	287, 177	785.1948	-	<i>Sesbania virgata</i>
60	27.2	O-sinapoyl-hexosyl quercetin	265, 330, 357	C ₃₂ H ₃₀ O ₁₆	671.1621	509, 491, 303, 207, 175	669.1443	300	<i>Sesbania virgata</i>
61	27.3	O-feruloyl-hexosyl quercetin	270, 330, 355	C ₃₁ H ₂₈ O ₁₅	641.1481	-	639.1348	463, 300, 271, 255	<i>Sesbania virgata</i>
62	27.5	O-feruloyl-hexosyl quercetin	270, 330, 355	C ₃₁ H ₂₈ O ₁₅	641.1499	-	639.1341	63, 300, 271, 255	<i>Sesbania virgata</i>

63	28.7	O-coumaroyl-hexosyl kaempferol	270, 315, 355	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	595.1446	287	593.1316	285	<i>Byttneria filipes</i>
64	29.0	O-feruloyl-hexosyl kaempferol	278, 320, 360	C ₃₁ H ₂₈ O ₁₄	625.1538	287, 177	623.1402	284, 255, 227, 193, 161	<i>Byttneria filipes</i>

RT: retention time; MF: molecular formula. The MF was considered errors up 8 ppm and mSigma 30. * > 0.8 cos score.

Table S4. Compounds annotated from cluster 28 by LC-DAD-MS data.

	RT (min)	Compound	UV (nm)	MF	MS (m/z)		Sample
					[M+H] ⁺	MS/MS (m/z)	
71	11.3	Unknown	292	C ₁₅ H ₂₁ N ₃ O ₆	340.1508	323, 305, 279, 241, 207, 189	<i>O. diospyrifolia</i>
72	13.2	Unknown	280, 307(sh)	C ₁₆ H ₂₂ N ₂ O ₇	355.1507	249, 221, 207, 190	<i>O. diospyrifolia</i>
73	14.0	Unknown	279, 312 (sh)	C ₁₆ H ₂₀ N ₃ O ₇	366.1301	297, 218, 207, 175, 163	<i>O. diospyrifolia</i>
74	15.2	Unknown	278	C ₁₇ H ₂₄ N ₂ O ₇	369.1663	297, 235, 207, 157	<i>O. diospyrifolia</i>
75	17.4	Unknown	279	C ₁₅ H ₂₁ N ₃ O ₅	324.1558	307, 271, 191, 175, 159	<i>O. diospyrifolia</i>

RT: retention time; MF: molecular formula. The MF was considered errors up 8 ppm and mSigma 30. * > 0.8 cos score.

Table S5. Compounds annotated by MZmine from LC-MS/MS data.

id	Compound_name	Adduct	score	MS (m/z)	MS/MS (m/z)	RT (min)	MF	Sample
972	Ellagic Acid	[M+H] ⁺	0.76	303.0136	275, 257, 247, 229, 201	18.5	C ₁₄ H ₆ O ₈	28, 3, 45
2342	Isorhamnetin	[M+H] ⁺	0.78	317.0656	302, 285, 273, 229, 165, 153	30.46	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	26, 30, 43, 45, 6
2037	3-methylquercetin	[M+H] ⁺	0.89	317.0656	302, 274, 245, 229, 153	28.2	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	1, 2, 30, 6
792	Boldine	[M+H] ⁺	0.88	328.1543	297, 282, 265, 250, 237	16.4	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	45, 46
704	Reticuline	[M+H] ⁺	0.73	330.1719	299, 267, 192, 177	15.3	C ₁₉ H ₂₃ NO ₄	45, 46
2513	4',5,7-trihydroxy-3,6-dimethoxyflavone	[M+H] ⁺	0.72	331.0812	316, 315, 273	31.26	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	2, 30
1505	Pelargonidin O-hexoside	[M] ⁺	0.83	433.1124	271	22.32	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	16, 1, 21, 26, 2, 30, 31, 3, 45, 46, 4, 6, 7
1011	Apigenin-8-C-hexoside (vitexin)	[M+H] ⁺	0.78	433.1129	379, 361, 349, 337, 323, 313, 309, 295, 283, 165	25.55	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	16, 1, 26, 24, 28, 2, 30, 31, 33, 4, 4, 6, 7

1011	Apigenin-6-C-glucoside (isovitexin)	[M+H] ⁺	0.78	433.1129	379, 361, 349, 337, 323, 313, 309, 295, 283, 165	23.5 9	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	30, 31, 4, 7
1319	Quercetin O-pentoside	[M+H] ⁺	0.76	435.0920	303	20.5	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	16, 1, 26, 28, 31, 33, 46, 4, 6
1230	Quercetin O-pentoside	[M+H] ⁺	0.94	435.0927	303	20.8	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	16, 1, 26, 28, 31, 33, 46, 4, 6
1270	Quercetin O-pentoside	[M+H] ⁺	0.92	435.0927	303	21.0 7	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	16, 1, 26, 28, 31, 33, 46, 4, 6
1495	Apigenin O-glucuronide	[M+H] ⁺	0.81	447.0922	271	22.2 8	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	16, 22, 2, 30, 31, 3, 6, 7
827	Luteolin 6-C-hexoside	[M+H] ⁺	0.93	449.1078	413, 395, 353, 329, 299	17.3 1	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	16, 1, 26, 24, 28, 2, 30, 31, 33, 31, 45, 4
1301	Luteolin O-hexoside	[M+H] ⁺	0.99	449.1078	287	23.5 3	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	16, 1, 26, 2, 31, 31, 33, 3, 45, 46, 4, 6, 7
1455	Quercetin O-deoxyhexoside	[M+H] ⁺	0.96	449.1084	303	21.8 4	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	16, 1, 21, 22, 26, 28, 2, 30, 31, 33, 45, 46, 6, 7
1301	Kaempferol 3-O-hexoside	[M+H] ⁺	0.99	449.1100	287	21	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	16, 1, 26, 24, 2, 30, 21, 45, 46, 4, 6
876	Myricetin O-pentoside	[M+H] ⁺	0.84	451.0871	319	18.5	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₂	26, 28, 31, 33

604	Isookanin <i>O</i> -hexoside	[M+H] ⁺	0.93	451.1240	289, 271, 163, 153	14.8	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	46, 4
604	Okanin <i>O</i> -hexoside	[M+H] ⁺	0.91	451.1240	289, 271, 243, 163, 153	21.4 5	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	22, 31, 4
2137	Oroxylin <i>O</i> -glucuronide	[M+H] ⁺	0.73	461.1080	285, 270, 242	28.9	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	2, 3
1127	Kaempferol <i>O</i> -glucuronide	[M+H] ⁺	0.91	463.0871	287	19.7 5	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	16, 2, 30, 3, 4, 7
1608	Peonidin <i>O</i> -hexoside	[M] ⁺	0.92	463.1229	301	23.3 6	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁	16, 1, 22, 2, 30, 31, 33, 3, 45, 4, 6, 7
1016	Myricitin <i>O</i> -deoxyhexoside	[M+H] ⁺	0.98	465.1034	319	18.8 9	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	16, 1, 22, 26, 24, 28, 2, 30, 31, 4, 46, 7
1065	Quercetin <i>O</i> -hexoside	[M+H] ⁺	0.99	465.1034	303	19.6 7	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	16, 1, 21, 22, 26, 28, 2, 30, 31, 33, 43, 46
3951	18β-glycyrrhetic acid	[M+H] ⁺	0.72	471.3453	389, 285, 201	38.3 5	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	26, 24, 28, 30
1601	Diosmetin <i>O</i> -glucuronide	[M+H] ⁺	0.95	477.1024	301, 286	23.3 1	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂	2, 30, 3, 7
2218	Cirsimaritin <i>O</i> -hexoside	[M+H] ⁺	0.77	477.1391	315, 300, 269	29.5 6	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₁	1, 28
1008	quercetin <i>O</i> -glucuronide	[M+H] ⁺	0.84	479.0820	303, 229, 163, 153	18.7 2	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	2

1768	Petunidin O-hexoside	[M] ⁺	0.87	479.1179	317, 302	22.1 1	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₂ ⁺	16, 1, 22, 26, 2, 33, 43, 45, 46, 6
777	Myricetin O-hexoside	[M+H] ⁺	0.98	481.0982	319, 273, 263, 245, 217, 165, 153	16.8 7	C ₄ H ₉ NO ₂	16, 1, 28, 31, 33, 45, 7
2200	Afrormosin O-hexoside-malonate	[M+H] ⁺	0.79	547.1443	299, 284, 175, 151	29.4 2	C ₂₆ H ₂₆ O ₁₃	1, 4
1748	O-caffeoyl O-sinapoyl quinic acid	[M+H] ⁺	0.93	561.1603	207, 175, 163	25.8 1	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₃	30, 43
1843	O-caffeoyl O-sinapoyl quinic acid	[M+H] ⁺	0.93	561.1603	207, 179, 175, 163	24.9 6	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₃	16, 30, 43
1020	Isovitexin O-pentoside	[M+H] ⁺	0.77	565.1552	529, 475, 437, 355, 349, 325, 307, 245	18.9	C ₂₆₆ H ₂₈ O ₁₄	16, 45, 4
1099	Isovitexin O-deoxyhexoside	[M+H] ⁺	0.91	579.1708	433, 337, 313, 283, 246	22.3 7	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	24, 31, 45, 4, 7
1044	Vitexin O-deoxyhexoside	[M+H] ⁺	0.87	579.1714	451, 397, 379, 337, 323, 313, 283	19.0 1	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	16, 1, 26, 24, 30, 31, 4, 7
2340	Tricoumaroyl spermidine	[M+H] ⁺	0.81	584.2795	438, 204	30.4 1	C ₃₄ H ₃₇ N ₃ O ₆	28
2104	Luteolin O-coumaroyl O-hexoside	[M+H] ⁺	0.96	595.1446	287.0000	28.6 8	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	16, 01, 24, 2, 30, 3, 46, 4
1832	Apigenin 8-C-hexosy O-hexoside	[M+H] ⁺	0.87	595.1629	475, 415, 397, 379, 313, 163	25.6 8	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	16, 1, 30

1386	Cyanidin O-deoxyhexosyl O-hexoside	[M] ⁺	1.00	595.1652	287	21.4 2	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₅	16, 1, 22, 26, 24, 2, 30, 33, 43, 6, 7
683	Apigenin di-C-6,8-hexoside	[M+H] ⁺	0.86	595.1657	541, 505, 457, 409, 379, 337, 307	15.5 9	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	16, 1, 26, 28, 2, 30, 31, 3, 45, 4, 6
774	Vitexin O-hexoside	[M+H] ⁺	0.88	595.1657	361, 313, 283	16.8 5	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	1, 22, 28, 30, 31, 3, 45, 4, 6
1132	Quercetin di-O-deoxyhexoside	[M+H] ⁺	0.77	595.1657	303, 165, 153	19.8 1	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	16, 1, 22, 26, 28, 30, 33, 3, 45, 46, 4, 6, 7
2078	Datiscetin O-deoxyhexosyl O-hexoside	[M+H] ⁺	0.82	595.1657	287, 165, 147	28.5 2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	16, 1, 24, 2, 30, 46, 6
2175	Kaempferol O-hexosyl-O-deoxyhexoside	[M+H] ⁺	0.90	595.1657	287, 239, 163, 147	29.1 5	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	16, 1, 2, 30, 4
1072	Quercetin O-kexosyl-deoxyhexoside	[M+H] ⁺	0.96	611.1607	465, 303, 255, 153	19.3 7	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	16, 1, 21, 22, 26, 24, 28, 2, 33, 3, 43, 45, 46, 4, 6
1072	Rutin*	[M+H] ⁺	0.96	611.1614	465, 303, 153	18.2 4	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	16, 1, 26, 24, 2, 30, 46
1415	Isorhamnetin O-deoxyhexosyl O-hexoside	[M+H] ⁺	0.84	625.1763	317, 261	22.0 9	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	1, 26, 24, 46, 4, 6
1246	Kaempferol O-hexosyl O-pentosyl-deoxyhexoside	[M+H] ⁺	0.94	727.2080	303	20.6 1	C ₃₂ H ₃₈ O ₁₉	26, 33, 45, 46

1040	Kaempferol O-hexosyl di-O-deoxyhexoside	[M+H] ⁺	0.96	741.2237	287	19.0	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	1, 26, 24, 30, 46
825	Cyanidin di-O-hexosyl-O-pentoside	[M] ⁺	0.74	743.2024	449, 303, 261, 229, 171	17.3 7	C ₃₂ H ₃₉ O ₂₀	26, 33, 45, 6
874	Quercetin di-O-deoxyhexosyl-O-hexoside	[M+H] ⁺	0.89	757.2186	303, 255, 239, 171, 153	17.6 7	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	1, 26, 24, 30, 45, 46, 4
751	Quercetin di-O-hexosyl O-pentoside	[M+H] ⁺	0.87	759.1978	465, 303, 153	16.5 3	C ₃₂ H ₃₈ O ₂₁	45
2938	Triterpenoid saponin /O-glucuronyl O-hexosyl oleanolic acid (calendulose F)	[M+Na] ⁺	0.91	817.4344	641, 623, 439	32.9	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₄	1, 21, 24, 30
3205	Triterpenoid saponin (Soyasaponin I)	[M+H] ⁺	0.94	943.5261	599, 581, 441, 423, 365, 261, 217	33.9 7	C ₄₈ H ₇₈ O ₁₈	1, 24, 33, 45, 4, 6, 7
2851	Triterpenoid saponin (Putranoside C)	[M+Na] ⁺	0.71	963.4924	817, 641, 345, 187	32.6 9	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₈	1, 21, 46
2676	Triterpenoid saponin (calendulose H)	[M+Na] ⁺	0.87	979.4872	817, 439, 249, 191	32.0 6	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉	1, 21

RT: retention time; MF: molecular formula. *confirmed by injection of authentic standard. Samples: 1: *Sesbania virgata*; 2: *Centratherum punctatum*; 3: *Lantana canescens*; 4: *Melanthera latifolia*; 6: *Aeschynomene denticulata*; 7: *Echinodorus paniculatus*; 16: *Byttneria filipes*; 21: *Aspilia latissima*; 22: *Erythroxylum anguifugum*; 24: *Tocoyena formosa*; 26: *Diospyros tetrasperma*; 28: *Psidium guineense*; 30: *Vitex cymosa*; 31: *Astronium fraxinifolium*; 33: *Coccoloba ochreolata*; 43: *Solanum glaucophyllum*; 45: *Paullinia pinnata*; 46: *Ocotea diospyrifolia*

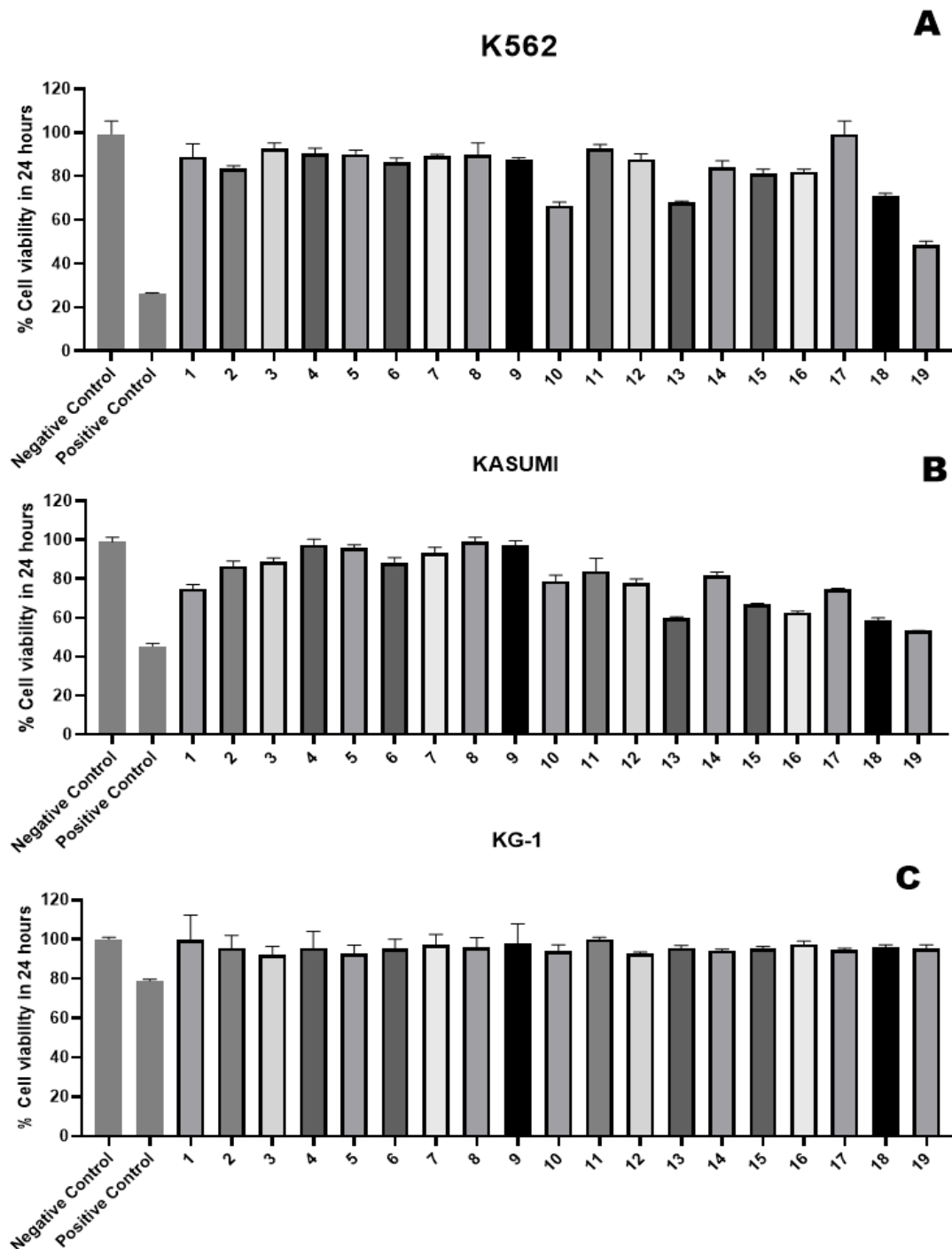


Figure S1. Cell proliferation and cytotoxic screening of the polar extracts on K562 (A), Kasumi-1 (B), and KG-1 (C) leukemia cell lines at 10 μ g/mL for 24h. Extracts from the following species: *Sesbania virgata* (1), *Cenetratherum punctatum* (2), *Lantana canescens* (3), *Melanthera latifolia* (4), *Aeschynomene denticulata* (5), *Echinodorus paniculatus* (6), *Byttemeria filipes* (7), *Aspilia latissima* – aerial parts (AP) (8), *A. latissima* - roots (9), *Erythroxylum anguifugum* (10), *Tocoyena formosa* (11), *Diospyros tetrasperma* (12), *Psidium guineense* (13), *Vitex cymosa* (14), *Astronium fraxinifolium* (15), *Coccoloba ochreolata* (16), *Solanum glaucophyllum* (17), *Paullinia pinnata* (18), and *Ocotea diospyrifolia* (19). were evaluated. Doxorubicin was used as positive control. Results were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD).

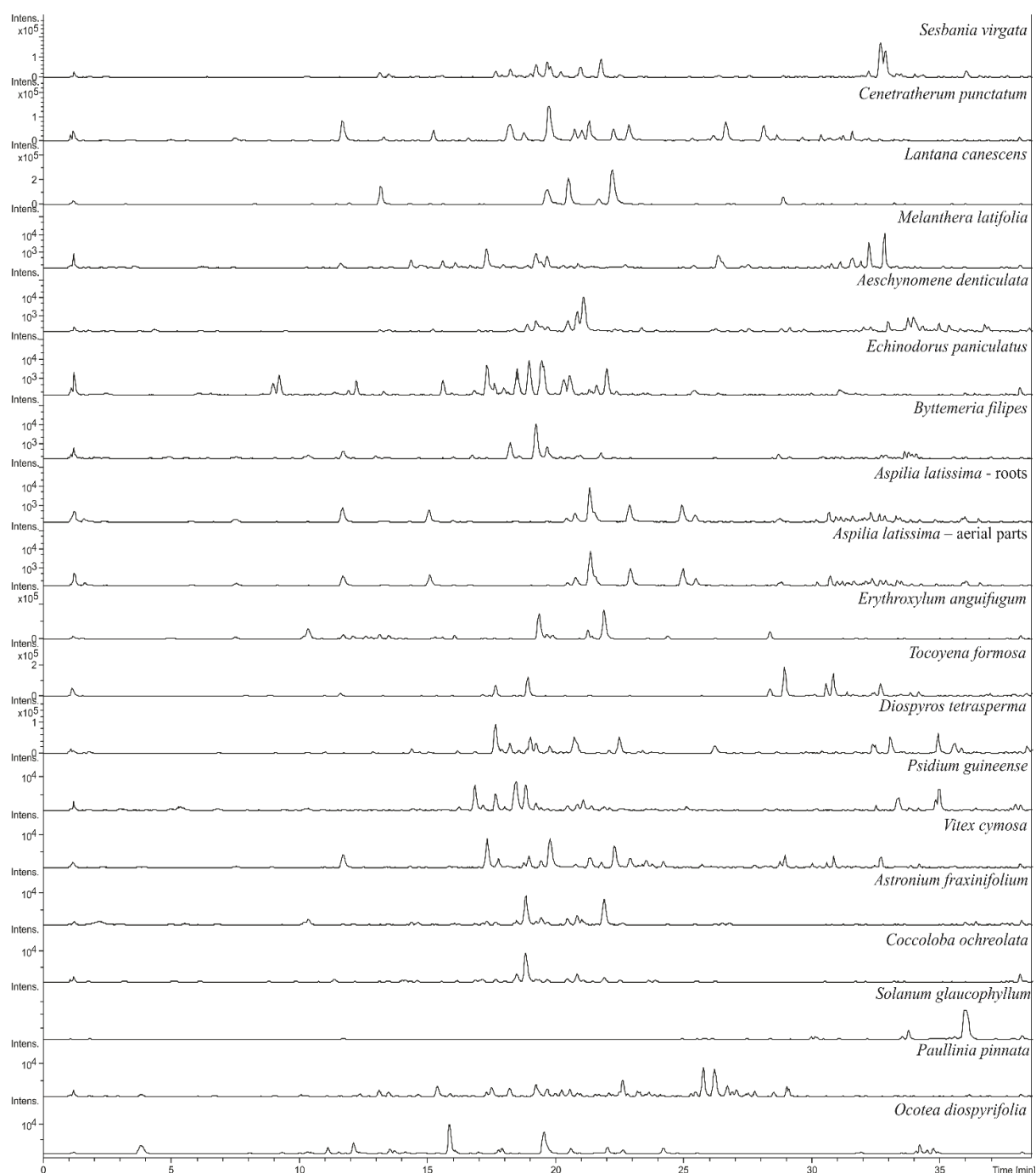


Figure S2. Base peak chromatogram obtained in positive ion mode from *Sesbania virgata*, *Cenetratherum punctatu*, *Lantana canescens*, *Melanthera latifolia*, *Aeschynomene denticulata*, *Echinodorus paniculatus*, *Byttemeria filipes*, *Aspilia latissima* – aerial parts, *A. latissima* - roots, *Erythroxylum anguifugum*, *Tocoyena formosa*, *Diospyros tetrasperma*, *Psidium guineense*, *Vitex cymosa*, *Astronium fraxinifolium*, *Coccoloba ochreolata*, *Solanum glaucophyllum*, *Paullinia pinnata*, and *Ocotea diospyrifolia*.

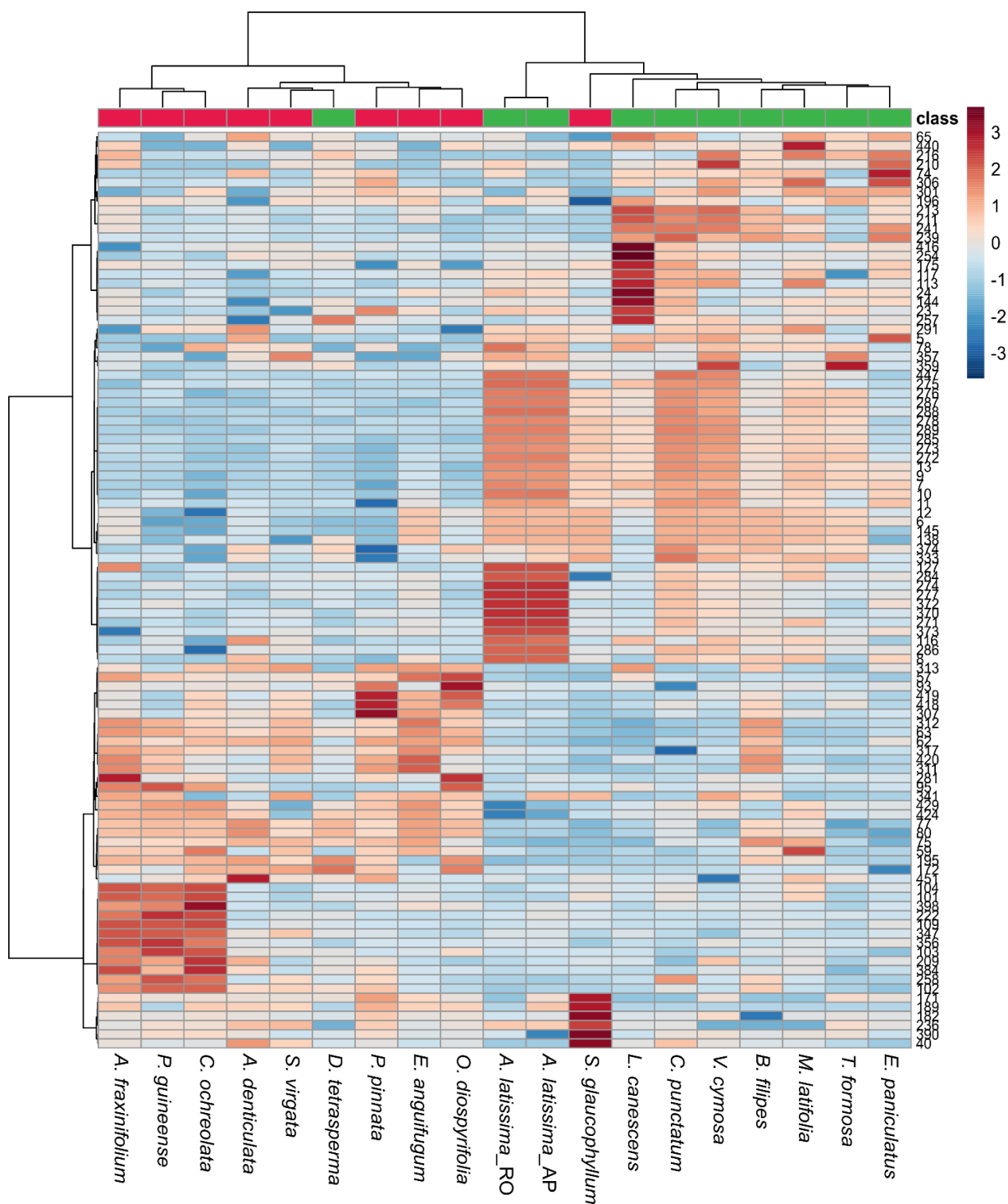


Figure S3. Heatmap and hierarchical clustering (HCA) of ion intensities of the top 100 features. The samples were classified in the groups active (red) and inactive (green) against leukemia cancer cells. AP: aerial parts; RO: roots.

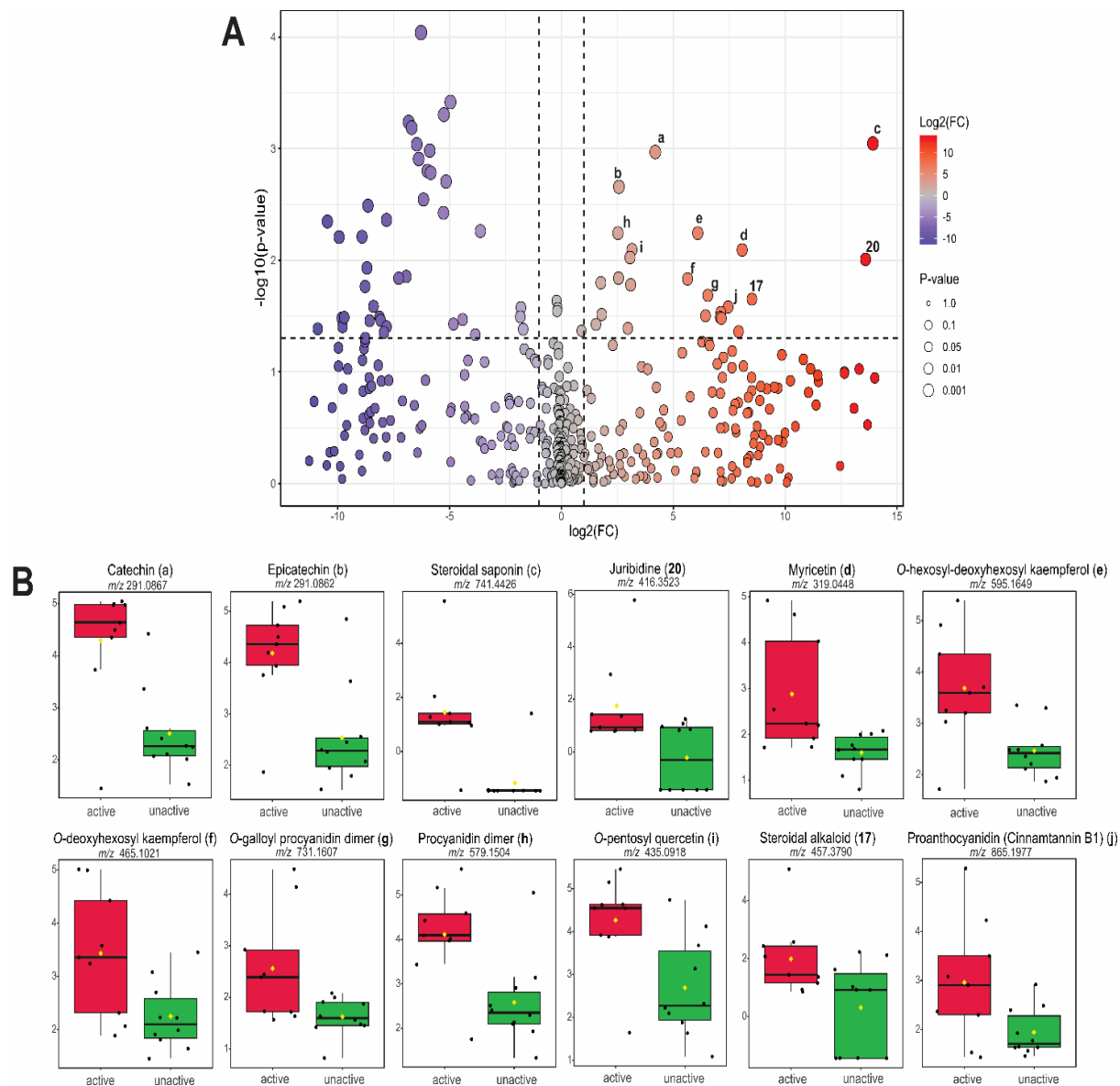


Figure S4. Volcano plot displaying the differences in features between the active (right quadrant) and inactive extracts (left quadrant). The x and y axes represent the fold change (FC) and P values of the features highlighted showed $p \leq 0.05$ and they were illustrated in the box plots below (A). Box plots from the annotated features that revealed $p \leq 0.05$ for the active samples (B).

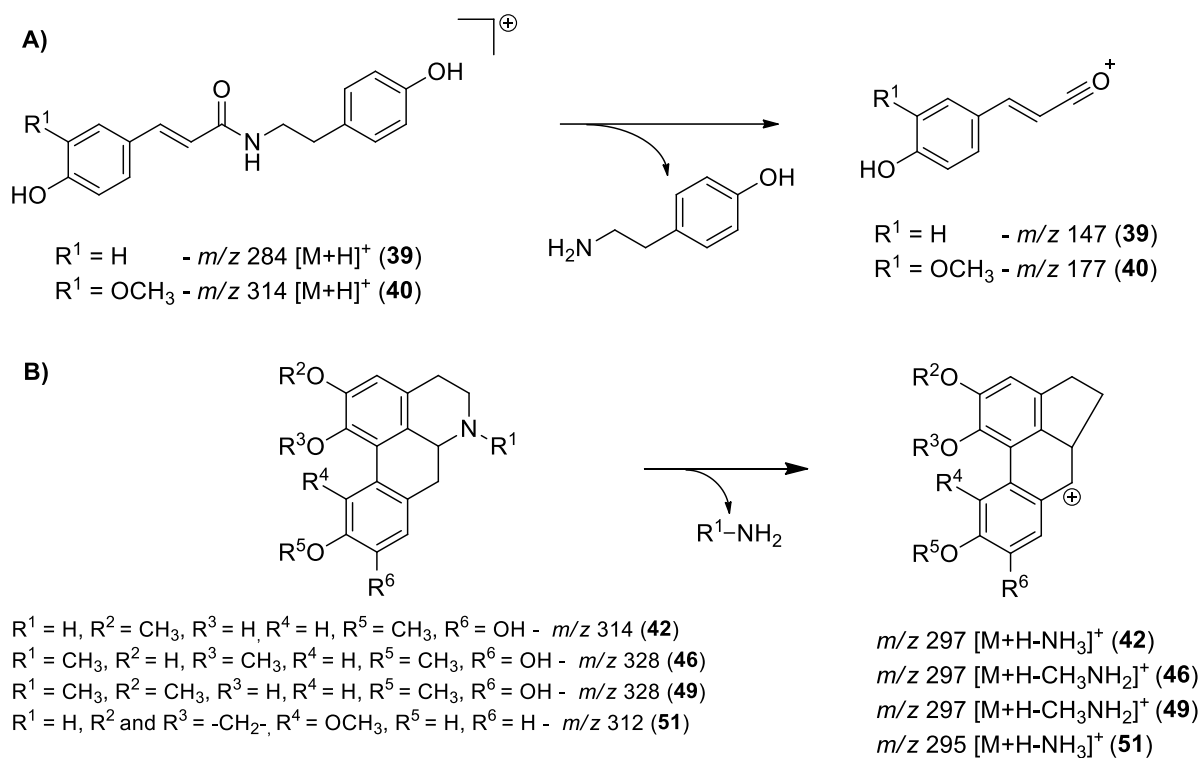


Figure S5. Fragmentation pathway for tyramine derivatives (**A**) and aporphine alkaloids (**B**).

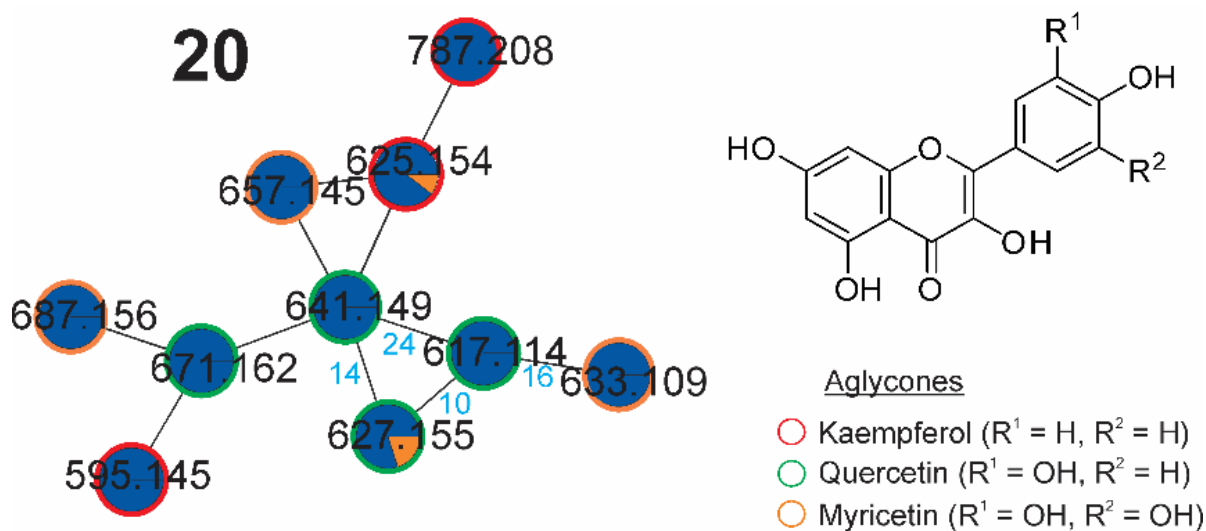


Figure S6. Cluster of O-glycosyl-phenylpropanoyl/gallolyl flavonols (cluster 20). The annotation of features is described in **Table S3**.

Parameters applied for data Processing by MZmine

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?><batch mzmine_version="4.5.0">
  <batchstep
method="io.github.mzmine.modules.io.import_rawdata_all.AllSpectralDataImportMod
ule" parameter_version="1">
    <parameter name="File names">
    </parameter>
    <parameter name="Advanced import" selected="false">
    <parameter name="Scan filters" selected="true">
      <parameter name="Scan number"/>
      <parameter name="Base Filtering Integer"/>
      <parameter name="Retention time"/>
      <parameter name="Mobility"/>
      <parameter name="MS level filter" selected="All MS
levels">1</parameter>
      <parameter name="Scan definition"/>
      <parameter name="Polarity">Any</parameter>
      <parameter name="Spectrum type">ANY</parameter>
    </parameter>
    <parameter name="Crop MS1 m/z" selected="false"/>
    <parameter name="MS1 detector (Advanced)" selected="false"
selected_item="Factor of lowest signal">
      <module name="Factor of lowest signal">
        <parameter name="Noise factor">2.5</parameter>
      </module>
      <module name="Auto">
        <parameter name="Noise level">1000.0</parameter>
      </module>
      <module name="Centroid">
        <parameter name="Noise level"/>
      </module>
    </parameter>
  </batchstep>
</batch>
```

```

<module name="Exact mass">
  <parameter name="Noise level"/>
</module>

<module name="Local maxima">
  <parameter name="Noise level"/>
</module>

<module name="Recursive threshold">
  <parameter name="Noise level"/>
  <parameter name="Min m/z peak width"/>
  <parameter name="Max m/z peak width"/>
</module>

<module name="Wavelet transform">
  <parameter name="Noise level"/>
  <parameter name="Scale level"/>
  <parameter name="Wavelet window size (%)" />
</module>
</parameter>

<parameter name="MS2 detector (Advanced)" selected="false"
selected_item="Factor of lowest signal">
  <module name="Factor of lowest signal">
    <parameter name="Noise factor">2.5</parameter>
  </module>

  <module name="Auto">
    <parameter name="Noise level">1000.0</parameter>
  </module>

  <module name="Centroid">
    <parameter name="Noise level"/>
  </module>

  <module name="Exact mass">
    <parameter name="Noise level"/>
  </module>

```

```

    <module name="Local maxima">
      <parameter name="Noise level"/>
    </module>

    <module name="Recursive threshold">
      <parameter name="Noise level"/>
      <parameter name="Min m/z peak width"/>
      <parameter name="Max m/z peak width"/>
    </module>

    <module name="Wavelet transform">
      <parameter name="Noise level"/>
      <parameter name="Scale level"/>
      <parameter name="Wavelet window size (%)" />
    </module>

  </parameter>

  <parameter name="Denormalize fragment scans (traps)">false</parameter>
</parameter>

<parameter name="Metadata file" selected="false"/>
<parameter name="Sort and color">true</parameter>
<parameter name="Spectral library files"/>
</batchstep>

<batchstep
method="io.github.mzmine.modules.dataprocessing.featdet_massdetection.MassDet
ectionModule" parameter_version="1">

  <parameter name="Raw data files" type="BATCH_LAST_FILES"/>
  <parameter name="Scan filters" selected="true">
    <parameter name="Scan number"/>
    <parameter name="Base Filtering Integer"/>
    <parameter name="Retention time">
      <min>0.01</min>
      <max>46.2</max>
    </parameter>

```

```

<parameter name="Mobility"/>
<parameter name="MS level filter" selected="MS1, level = 1">1</parameter>
<parameter name="Scan definition"/>
<parameter name="Polarity">Any</parameter>
<parameter name="Spectrum type">ANY</parameter>
</parameter>
<parameter name="Scan types (IMS)">All scan types</parameter>
<parameter name="Denormalize fragment scans (traps)">false</parameter>
<parameter name="Mass detector" selected_item="Centroid">
  <module name="Factor of lowest signal">
    <parameter name="Noise factor">2.5</parameter>
  </module>
  <module name="Auto">
    <parameter name="Noise level">1000.0</parameter>
  </module>
  <module name="Centroid">
    <parameter name="Noise level">200.0</parameter>
  </module>
  <module name="Exact mass">
    <parameter name="Noise level"/>
  </module>
  <module name="Local maxima">
    <parameter name="Noise level"/>
  </module>
  <module name="Recursive threshold">
    <parameter name="Noise level"/>
    <parameter name="Min m/z peak width"/>
    <parameter name="Max m/z peak width"/>
  </module>
  <module name="Wavelet transform">

```

```

    <parameter name="Noise level"/>
    <parameter name="Scale level"/>
    <parameter name="Wavelet window size (%)"/>
  </module>
</parameter>
</batchstep>
<batchstep
method="io.github.mzmine.modules.dataprocessing.featdet_massdetection.MassDet
ectionModule" parameter_version="1">
  <parameter name="Raw data files" type="BATCH_LAST_FILES"/>
  <parameter name="Scan filters" selected="true">
    <parameter name="Scan number"/>
    <parameter name="Base Filtering Integer"/>
    <parameter name="Retention time">
      <min>0.01</min>
      <max>46.2</max>
    </parameter>
    <parameter name="Mobility"/>
    <parameter name="MS level filter" selected="MS2, level = 2">1</parameter>
    <parameter name="Scan definition"/>
    <parameter name="Polarity">Any</parameter>
    <parameter name="Spectrum type">ANY</parameter>
  </parameter>
  <parameter name="Scan types (IMS)">All scan types</parameter>
  <parameter name="Denormalize fragment scans (traps)">false</parameter>
  <parameter name="Mass detector" selected_item="Centroid">
    <module name="Factor of lowest signal">
      <parameter name="Noise factor">2.5</parameter>
    </module>
    <module name="Auto">
      <parameter name="Noise level">1000.0</parameter>

```

```

</module>
<module name="Centroid">
  <parameter name="Noise level">100.0</parameter>
</module>
<module name="Exact mass">
  <parameter name="Noise level"/>
</module>
<module name="Local maxima">
  <parameter name="Noise level"/>
</module>
<module name="Recursive threshold">
  <parameter name="Noise level"/>
  <parameter name="Min m/z peak width"/>
  <parameter name="Max m/z peak width"/>
</module>
<module name="Wavelet transform">
  <parameter name="Noise level"/>
  <parameter name="Scale level"/>
  <parameter name="Wavelet window size (%)" />
</module>
</parameter>
</batchstep>
<batchstep
method="io.github.mzmine.modules.dataprocessing.featdet_adapchromatogrambuilder.ModularADAPChromatogramBuilderModule" parameter_version="1">
  <parameter name="Raw data files" type="BATCH_LAST_FILES"/>
  <parameter name="Scan filters" selected="true">
    <parameter name="Scan number"/>
    <parameter name="Base Filtering Integer"/>
    <parameter name="Retention time">
      <min>0.5</min>

```

```

    <max>46.0</max>
  </parameter>
  <parameter name="Mobility"/>
  <parameter name="MS level filter" selected="MS1, level = 1">1</parameter>
  <parameter name="Scan definition"/>
  <parameter name="Polarity">Any</parameter>
  <parameter name="Spectrum type">ANY</parameter>
</parameter>
<parameter name="Minimum consecutive scans">4</parameter>
<parameter name="Minimum intensity for consecutive
scans">400.0</parameter>
<parameter name="Minimum absolute height">200.0</parameter>
<parameter name="m/z tolerance (scan-to-scan)">
  <absolutetolerance>0.002</absolutetolerance>
  <ppmtolerance>10.0</ppmtolerance>
</parameter>
<parameter name="Suffix">chromatograms</parameter>
<parameter name="Allow single scan chromatograms"/>
</batchstep>
<batchstep
method="io.github.mzmine.modules.dataprocessing.featdet_chromatogramdeconvol
ution.minimumsearch.MinimumSearchFeatureResolverModule"
parameter_version="2">
  <parameter name="Feature lists" type="BATCH_LAST_FEATURELISTS"/>
  <parameter name="Suffix">resolved</parameter>
  <parameter name="Original feature list">KEEP</parameter>
  <parameter name="MS/MS scan pairing" selected="true">
    <parameter name="MS1 to MS2 precursor tolerance (m/z)">
      <absolutetolerance>0.02</absolutetolerance>
      <ppmtolerance>10.0</ppmtolerance>
    </parameter>
    <parameter name="Retention time filter" selected="Use feature edges"

```

```

unit="MINUTES">0.2</parameter>
  <parameter name="Minimum relative feature height"
selected="true">0.25</parameter>
  <parameter name="Minimum required signals"
selected="true">1</parameter>
  <parameter name="Limit by ion mobility edges">false</parameter>
  <parameter name="Merge MS/MS spectra (TIMS)">false</parameter>
  <parameter name="Minimum detections in IMS dimension">2</parameter>
  <parameter name="Advanced" selected="false">
    <parameter name="Minimum signal intensity (absolute, TIMS)"
selected="false">250.0</parameter>
    <parameter name="Minimum signal intensity (relative, TIMS)"
selected="true">0.01</parameter>
  </parameter>
</parameter>
<parameter name="Dimension">Retention time</parameter>
<parameter name="Chromatographic threshold">0.85</parameter>
<parameter name="Minimum search range RT/Mobility
(absolute)">0.05</parameter>
<parameter name="Minimum relative height">0.0</parameter>
<parameter name="Minimum absolute height">1000.0</parameter>
<parameter name="Min ratio of peak top/edge">1.7</parameter>
<parameter name="Peak duration range (min/mobility)">
  <min>0.0</min>
  <max>10.0</max>
</parameter>
<parameter name="Minimum scans (data points)">3</parameter>
</batchstep>
<batchstep
method="io.github.mzmine.modules.dataprocessing.filter_isotopegrouper.IsotopeGro
uperModule" parameter_version="1">
  <parameter name="Feature lists" type="BATCH_LAST_FEATURELISTS"/>
  <parameter name="Name suffix">deisotoped</parameter>

```

```

    <parameter name="m/z tolerance (intra-sample)">
      <absolutetolerance>0.001</absolutetolerance>
      <ppmtolerance>8.0</ppmtolerance>
    </parameter>

    <parameter name="Retention time tolerance"
unit="MINUTES">0.04</parameter>

    <parameter name="Mobility tolerance" selected="false"/>
    <parameter name="Monotonic shape">true</parameter>
    <parameter name="Maximum charge">2</parameter>
    <parameter name="Representative isotope">Most intense</parameter>
    <parameter name="Never remove feature with MS2">true</parameter>
    <parameter name="Original feature list">KEEP</parameter>
  </batchstep>

  <batchstep
method="io.github.mzmine.modules.dataprocessing.align_join.JoinAlignerModule"
parameter_version="1">

    <parameter name="Feature lists" type="BATCH_LAST_FEATURELISTS"/>
    <parameter name="Feature list name">Aligned feature list</parameter>
    <parameter name="m/z tolerance (sample-to-sample)">
      <absolutetolerance>0.002</absolutetolerance>
      <ppmtolerance>8.0</ppmtolerance>
    </parameter>

    <parameter name="Weight for m/z">3.0</parameter>
    <parameter name="Retention time tolerance"
unit="MINUTES">0.25</parameter>

    <parameter name="Weight for RT">1.0</parameter>
    <parameter name="Mobility tolerance" selected="false"/>
    <parameter name="Mobility weight">1.0</parameter>
    <parameter name="Require same charge state">false</parameter>
    <parameter name="Require same ID">false</parameter>
    <parameter name="Compare isotope pattern" selected="false">
      <parameter name="Isotope m/z tolerance">

```

```

    <absolutetolerance>0.001</absolutetolerance>
    <ppmtolerance>5.0</ppmtolerance>
  </parameter>
  <parameter name="Minimum absolute intensity">0.0</parameter>
  <parameter name="Minimum score">0.0</parameter>
</parameter>
<parameter name="Compare spectra similarity" selected="false">
  <parameter name="Spectral m/z tolerance">
    <absolutetolerance>0.001</absolutetolerance>
    <ppmtolerance>10.0</ppmtolerance>
  </parameter>
  <parameter name="MS level">2</parameter>
  <parameter name="Compare spectra similarity" selected_item="Weighted
cosine similarity">
    <module name="Weighted cosine similarity">
      <parameter name="Weights">MassBank (mz^2 * I^0.5)</parameter>
      <parameter name="Minimum cos similarity">0.7</parameter>
      <parameter name="Handle unmatched signals">KEEP ALL AND
MATCH TO ZERO</parameter>
    </module>
    <module name="Composite cosine identity (e.g., GC-EI-MS; similar to
NIST search)">
      <parameter name="Weights">MassBank (mz^2 * I^0.5)</parameter>
      <parameter name="Minimum cos similarity">0.7</parameter>
      <parameter name="Handle unmatched signals">KEEP ALL AND
MATCH TO ZERO</parameter>
    </module>
  </parameter>
</parameter>
  <parameter name="Original feature list">KEEP</parameter>
</batchstep>
<batchstep

```

```
method="io.github.mzmine.modules.dataprocessing.filter_blanksubtraction.FeatureListBlankSubtractionModule" parameter_version="1">
```

```
  <parameter name="Aligned feature list"
type="BATCH_LAST_FEATURELISTS"/>
```

```
  <parameter name="Blank/Control raw data files" type="BATCH_LAST_FILES"/>
```

```
  <parameter name="Minimum # of detection in blanks">1</parameter>
```

```
  <parameter name="Quantification">Height</parameter>
```

```
  <parameter name="Ratio type">MAXIMUM</parameter>
```

```
  <parameter name="Fold change increase" selected="false">3.0</parameter>
```

```
  <parameter name="Keep or remove features (of rows) below fold
change">REMOVE - Only keep features above fold change</parameter>
```

```
  <parameter name="Create secondary list of subtracted
features">>false</parameter>
```

```
  <parameter name="Suffix">subtracted</parameter>
```

```
</batchstep>
```

```
<batchstep
```

```
method="io.github.mzmine.modules.dataprocessing.gapfill_peakfinder.multithreaded.
MultiThreadPeakFinderModule" parameter_version="1">
```

```
  <parameter name="Feature lists" type="BATCH_LAST_FEATURELISTS"/>
```

```
  <parameter name="Name suffix">gap-filled</parameter>
```

```
  <parameter name="Intensity tolerance">0.2</parameter>
```

```
  <parameter name="m/z tolerance (sample-to-sample)">
```

```
    <absolutetolerance>0.002</absolutetolerance>
```

```
    <ppmtolerance>8.0</ppmtolerance>
```

```
  </parameter>
```

```
  <parameter name="Retention time tolerance"
unit="MINUTES">0.2</parameter>
```

```
  <parameter name="Minimum scans (data points)">2</parameter>
```

```
  <parameter name="Original feature list">KEEP</parameter>
```

```
</batchstep>
```

```
<batchstep
```

```
method="io.github.mzmine.modules.dataprocessing.norm_linear.LinearNormalizerModule" parameter_version="1">
```

```
  <parameter name="Feature lists" type="BATCH_LAST_FEATURELISTS"/>
```

```

    <parameter name="Name suffix">normalized</parameter>
    <parameter name="Normalization type">Average intensity</parameter>
    <parameter name="Feature measurement type">Area</parameter>
    <parameter name="Original feature list">KEEP</parameter>
</batchstep>

<batchstep
method="io.github.mzmine.modules.dataprocessing.id_spectral_library_match.Spectr
alLibrarySearchModule" parameter_version="3">
    <parameter name="Spectral libraries" type="ALL_IMPORTED"/>
    <parameter name="Feature lists" type="BATCH_LAST_FEATURELISTS"/>
    <parameter name="Merge & select fragment scans"
selected_item="simple_merged">
        <module name="simple_merged">
            <parameter name="Presets">representative_scans</parameter>
            <parameter name="Merging m/z tolerance">
                <absolutetolerance>0.008</absolutetolerance>
                <ppmtolerance>25.0</ppmtolerance>
            </parameter>
        </module>
        <module name="preset_merged">
            <parameter name="Presets">representative_scans</parameter>
            <parameter name="Merging m/z tolerance">
                <absolutetolerance>0.008</absolutetolerance>
                <ppmtolerance>25.0</ppmtolerance>
            </parameter>
            <parameter name="Merge">
                <selected>Across samples</selected>
            </parameter>
            <parameter name="Intensity merge mode">MAXIMUM</parameter>
        </module>
        <module name="input_scans">
            <parameter name="Select input

```

```

scans">most_intense_across_samples</parameter>
  </module>
</parameter>
<parameter name="MS level filter" selected="MS2, level = 2">3</parameter>
<parameter name="Precursor m/z tolerance">
  <absolutetolerance>0.02</absolutetolerance>
  <ppmtolerance>8.0</ppmtolerance>
</parameter>
<parameter name="Spectral m/z tolerance">
  <absolutetolerance>0.0015</absolutetolerance>
  <ppmtolerance>10.0</ppmtolerance>
</parameter>
<parameter name="Remove precursor">true</parameter>
<parameter name="Minimum matched signals">4</parameter>
<parameter name="Similarity" selected_item="Weighted cosine similarity">
  <module name="Weighted cosine similarity">
    <parameter name="Weights">MassBank (mz^2 * I^0.5)</parameter>
    <parameter name="Minimum cos similarity">0.7</parameter>
    <parameter name="Handle unmatched signals">KEEP ALL AND MATCH
TO ZERO</parameter>
  </module>
  <module name="Composite cosine identity (e.g., GC-EI-MS; similar to NIST
search)">
    <parameter name="Weights">MassBank (mz^2 * I^0.5)</parameter>
    <parameter name="Minimum cos similarity">0.7</parameter>
    <parameter name="Handle unmatched signals">KEEP ALL AND MATCH
TO ZERO</parameter>
  </module>
</parameter>
<parameter name="Advanced" selected="false">
  <parameter name="Retention time tolerance" selected="false"/>
  <parameter name="CCS tolerance [%]" selected="false">0.05</parameter>

```

```

    <parameter name="13C deisotoping" selected="false">
      <parameter name="m/z tolerance"/>
      <parameter name="Monotonic shape">false</parameter>
      <parameter name="Maximum charge"/>
    </parameter>
    <parameter name="Min matched isotope signals"
selected="false">3</parameter>
    <parameter name="Crop spectra to m/z overlap">false</parameter>
  </parameter>
</batchstep>
<batchstep
method="io.github.mzmine.modules.io.export_network_graphml.NetworkGraphMLExp
ortModule" parameter_version="1">
  <parameter name="Feature lists" type="BATCH_LAST_FEATURELISTS"/>
  <parameter name="Filename">
    <current_file relative_path="..\..\artigo\ACS
omega\FBN_GNPS.graphml">C:\Users\denis\OneDrive\Documents\Documentos_De
nise\Sun\artigo\ACS omega\FBN_GNPS.graphml</current_file>
<last_file>C:\Users\denis\OneDrive\Documents\Documentos_Denise\Sun\artigo\AC
S omega\FBN_GNPS.graphml</last_file>
  </parameter>
</batchstep>
</batch>

```

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABDALA, K.; CARLOS, S. Bioprospective potential in the traditional use of herbal medicines in an institution in Central Brazil. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 14, n. 8, p. 389–405, 31 ago. 2020.

ADADE WILLIAMS, P.; SIKUTSHWA, L.; SHACKLETON, S. Acknowledging Indigenous and Local Knowledge to Facilitate Collaboration in Landscape Approaches—Lessons from a Systematic Review. **Land**, v. 9, n. 9, p. 331, set. 2020.

AHAD, B. et al. Medicinal Plants and Herbal Drugs: An Overview. Em: AFTAB, T.; HAKEEM, K. R. (Eds.). **Medicinal and Aromatic Plants: Healthcare and Industrial Applications**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 1–40.

ALLARD, P.-M. et al. Integration of Molecular Networking and In-Silico MS/MS Fragmentation for Natural Products Dereplication. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 6, p. 3317–3323, 15 mar. 2016.

ALSEEKH, S. et al. Mass spectrometry-based metabolomics: a guide for annotation, quantification and best reporting practices. **Nature Methods**, v. 18, n. 7, p. 747–756, jul. 2021.

AMJAD, M. T.; CHIDHARLA, A.; KASI, A. Cancer Chemotherapy. Em: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

ANAND, A. V.; SREEDEVI, M. J.; SWAPNA, T. S. Plant Conservation Associated with Traditional Knowledge: Past and Future. Em: SUKUMARAN, S. T.; T R, K. (Eds.). **Conservation and Sustainable Utilization of Bioresources**. Singapore: Springer Nature, 2023. p. 261–290.

ARA, T. et al. MassBase: A large-scaled depository of mass spectrometry datasets for metabolome analysis. **Plant Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 167–171, 2021.

ARÉVALO, C. M. et al. Plant-derived extracts and metabolic modulation in leukemia: a promising approach to overcome treatment resistance. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 10, 13 jul. 2023.

ATA, A.; NAZ, S.; FRIESEN, K. Biosynthesis of Natural Products. Em: **Greener Synthesis of Organic Compounds**. [s.l.] CRC Press, 2022.

ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, 1 dez. 2015.

ATANASOV, A. G. et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 20, n. 3, p. 200–216, mar. 2021.

AYON, N. J. High-Throughput Screening of Natural Product and Synthetic Molecule Libraries for Antibacterial Drug Discovery. **Metabolites**, v. 13, n. 5, p. 625, maio 2023.

BANERJEE, R.; BANERJEE, M.; MONDAL, S. Policies and Issues in Environmental Biotechnology Research. Em: **Emerging Trends in Environmental Biotechnology**. [s.l.] CRC Press, 2022.

BANIK, B. K.; SAHOO, B. M. 19 - Green synthesis and biological evaluation of anticancer drugs. Em: BANIK, B. K. (Ed.). **Green Approaches in Medicinal Chemistry for Sustainable Drug Design**. Advances in Green and Sustainable Chemistry. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 651–712.

BARBOSA, R. DO N. et al. Brazilian Atlantic Forest and Pampa Biomes in the spotlight: an overview of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* (*Eurotiales*) species and the description of *Penicillium nordestinense* sp. nov. **Acta Botanica Brasilica**, v. 36, p. e2021abb0390, 7 out. 2022.

BARRALES-CUREÑO, H. J. et al. Alkaloids of Pharmacological Importance in *Catharanthus roseus*. Em: **Alkaloids - Their Importance in Nature and Human Life**. [s.l.] IntechOpen, 2019.

BHAT, S. G. Medicinal Plants and Its Pharmacological Values. Em: **Natural Medicinal Plants**. [s.l.] IntechOpen, 2021.

BOIN, M. N. et al. Pantanal: The Brazilian Wetlands. Em: SALGADO, A. A. R.; SANTOS, L. J. C.; PAISANI, J. C. (Eds.). **The Physical Geography of Brazil : Environment, Vegetation and Landscape**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 75–91.

BORGES, D. G. L. et al. Discovery of potential ovicidal natural products using metabolomics. **PloS One**, v. 14, n. 1, p. e0211237, 2019.

BOYD, A. L. et al. Acute myeloid leukaemia disrupts endogenous myelo-erythropoiesis by compromising the adipocyte bone marrow niche. **Nature Cell Biology**, v. 19, n. 11, p. 1336–1347, nov. 2017.

BRAHMACHARI, G. Epothilones A and B: The 16-Membered Natural Macrolides as a Fascinating Template for Antibreast Cancer Drug Discovery*. Em: BRAHMACHARI, G. (Ed.). **Discovery and Development of Anti-Breast Cancer Agents from Natural Products**. Natural Product Drug Discovery. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 7–28.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018.

BRAY, F. et al. The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. **Cancer**, v. 127, n. 16, p. 3029–3030, 2021.

BRITO, D. Z. DE et al. Screening of 20 Pantanal Wetland Plants for Anti-Candida Activity using HPLC-DAD-MS/MS and Bioautography to Characterize Active Compounds. **Planta Medica International Open**, v. 8, p. e96–e103, 14 jul. 2021.

BROWN, G. Introduction and Classification of Leukemias. Em: COBALEDA, C.; SÁNCHEZ-GARCÍA, I. (Eds.). **Leukemia Stem Cells: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer US, 2021. p. 3–23.

CANCER (IARC), T. I. A. FOR R. ON. **Global Cancer Observatory**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/>>. Acesso em: 30 ago. 2023.

CARDOSO, D. et al. Amazon plant diversity revealed by a taxonomically verified species list. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 40, p. 10695–10700, 3 out. 2017.

CAROLINE, N. M. et al. Antimicrobial activities and preliminary phytochemical tests of crude extracts of important ethnopharmacological plants from Brazilian Cerrado. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 10, n. 35, p. 612–620, 17 set. 2016.

CHAACHOUAY, N.; AZEROUAL, A.; ZIDANE, L. Taxonomy, Ethnobotany, Phytochemistry and Biological Activities of *Thymus Saturejoides*: A Review. 25 abr. 2023.

CHALECKIS, R. et al. Challenges, progress and promises of metabolite annotation for LC–MS-based metabolomics. **Current Opinion in Biotechnology**, Analytical Biotechnology. v. 55, p. 44–50, 1 fev. 2019.

CHECHETTO, F. et al. Integração de conhecimentos em plantas medicinais na perspectiva de gênero e abordagem transdisciplinar em busca de sustentabilidade: a experiência do arranjo produtivo local de Itapeva. **Revista Fitos**, v. 11, p. 82–91, 25 set. 2017.

CHENG, J. et al. Metabolomics: A High-Throughput Platform for Metabolite Profile Exploration. Em: HUANG, T. (Ed.). **Computational Systems Biology**. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2018. v. 1754p. 265–292.

CHOI, J. et al. Diosmetin inhibits tumor development and block tumor angiogenesis in skin cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 117, p. 109091, 1 set. 2019.

COLLI, G. R.; VIEIRA, C. R.; DIANESE, J. C. Biodiversity and conservation of the Cerrado: recent advances and old challenges. **Biodiversity and Conservation**, v. 29, n. 5, p. 1465–1475, 1 abr. 2020.

CORDELL, G. A.; SHIN, Y. G. Finding the needle in the haystack. The dereplication of natural product extracts. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, n. 6, p. 1089–1094, 30 jun. 1999.

CORREA, D. B. et al. Increased burned area in the Pantanal over the past two decades. **Science of The Total Environment**, v. 835, p. 155386, 20 ago. 2022.

COSTA, F. G. DA et al. Conhecendo o Cerrado: aulas de campo e sua importância para o conhecimento e preservação ambiental. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e1589108201–e1589108201, 21 set. 2020.

DASGUPTA, S. C. Bioactive Compounds from Medicinal Plants and its Therapeutic Uses in the Traditional Healthcare System. Em: JHA, S.; HALDER, M. (Eds.). **Medicinal Plants: Biodiversity, Biotechnology and Conservation**. Singapore: Springer Nature, 2023. p. 525–537.

DE MESQUITA, M. L. et al. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 439–445, 25 jun. 2009.

DE O. RIBEIRO, I. C. et al. Plants of the Cerrado with antimicrobial effects against *Staphylococcus* spp. and *Escherichia coli* from cattle. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, p. 32, dez. 2018.

DE OLIVEIRA DEMBOGURSKI, D. S. et al. Brown propolis-metabolomic innovative approach to determine compounds capable of killing *Staphylococcus aureus* biofilm and *Trichomonas vaginalis*. **Food Research International (Ottawa, Ont.)**, v. 111, p. 661–673, set. 2018.

DE QUEIROZ, L. P. et al. Diversity and Evolution of Flowering Plants of the Caatinga Domain. Em: SILVA, J. M. C. DA; LEAL, I. R.; TABARELLI, M. (Eds.). **Caatinga: The Largest Tropical Dry Forest Region in South America**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 23–63.

DOYTCHINOVA, I. Drug Design-Past, Present, Future. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 5, p. 1496, 23 fev. 2022.

DRAGOI, A.; ALEXANDRU, O. PLANT-DERIVED CHEMOTHERAPEUTICS DRUGS FOR CANCER CHEMOTHERAPY. **Medico Oncology**, v. 1, p. 28–37, 18 maio 2021.

EKIERT, H. M.; SZOPA, A. Biological Activities of Natural Products. **Molecules**, v. 25, n. 23, p. 5769,

jan. 2020.

ELLWANGER, J. H.; CHIES, J. A. B. Brazil's heavy metal pollution harms humans and ecosystems. **Science in One Health**, v. 2, p. 100019, 1 jan. 2023.

ELLWANGER, J. H.; NOBRE, C. A.; CHIES, J. A. B. Brazilian Biodiversity as a Source of Power and Sustainable Development: A Neglected Opportunity. **Sustainability**, v. 15, n. 1, p. 482, jan. 2023.

ELLWANGER, J. H.; ZILLOTTO, M.; CHIES, J. A. B. Protect Brazil's overlooked Pampa biome. **Science**, v. 377, n. 6607, p. 720–720, 12 ago. 2022.

ERNST, M. et al. A metabolomic protocol for plant systematics by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of flight mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 859, p. 46–58, 15 fev. 2015.

FANG, J.; DORRESTEIN, P. C. Emerging mass spectrometry techniques for the direct analysis of microbial colonies. **Current Opinion in Microbiology**, v. 19, p. 120–129, jun. 2014.

FANG, Z. et al. Tanshinone IIA: A Review of its Anticancer Effects. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 14 jan. 2021.

FANG, Z.-Y. et al. Tanshinone IIA: A Review of its Anticancer Effects. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 611087, 2020.

FENG, F. et al. Integrated network pharmacology and metabolomics to reveal the mechanism of *Pinellia ternata* inhibiting non-small cell lung cancer cells. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 24, n. 1, p. 263, 11 jul. 2024.

FENG, L.-S. Development and Advances of Drugs for Cancer Theranostics – PART-III. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 5, p. 347–347, [s.d.].

FERREIRA, P. M. P.; ARCANJO, D. D. R.; PERON, A. P. Drug development, Brazilian biodiversity and political choices: Where are we heading? **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 26, n. 5, p. 257–274, 4 jul. 2023.

FONGANG FOTSING, Y. S. et al. Extraction of Bioactive Compounds from Medicinal Plants and Herbs. Em: [s.l: s.n.].

GAUDÊNCIO, S. P. et al. Advanced Methods for Natural Products Discovery: Bioactivity Screening, Dereplication, Metabolomics Profiling, Genomic Sequencing, Databases and Informatic Tools, and Structure Elucidation. **Marine Drugs**, v. 21, n. 5, p. 308, 19 maio 2023.

GAZIZOVA, A. S. Protection of Traditional Knowledge: The Work and the Role of International Organisations and Conferences. **International Journal of Higher Education**, v. 9, n. 8, p. 95, 30 out. 2020.

GERSTEN, O.; BARBIERI, M. **The Epidemiologic Transition Theory and Evidence for Cancer Transitions in the US, Select European Nations, and Japan**. medRxiv, , 29 nov. 2020. Disponível em: <<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.11.25.20238832v1>>. Acesso em: 30 ago. 2023

GITIRANA DE SANTANA, J. D. et al. *Vernonia polyanthes* Less. (Asteraceae Bercht. & Presl), a Natural Source of Bioactive Compounds with Antibiotic Effect against Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 3, p. 622, 21 mar. 2023.

GOLDMAN, S. L. et al. Epigenetic Modifications in Acute Myeloid Leukemia: Prognosis, Treatment, and Heterogeneity. **Frontiers in Genetics**, v. 10, 1 mar. 2019.

GOMES, M.; DOLDER, M. A. H. **Efeitos da infusão de nó-de-cachorro (Heteropterys aphrodisiaca, O. Mach.) sobre a morfologia e estrutura testicular de ratos Wistar adultos, submetidos a treinamento físico.** 18 fev. 2011. Disponível em: <<https://www.semanticscholar.org/paper/Efeitos-da-infus%C3%A3o-de-n%C3%B3-de-cachorro-%28Heteropterys-Gomes-Dolder/7122533afb7ed96b0f25bf9aed399cda2651d75e>>. Acesso em: 12 mar. 2025

HANNAN, M. A. et al. Black Cumin (Nigella sativa L.): A Comprehensive Review on Phytochemistry, Health Benefits, Molecular Pharmacology, and Safety. **Nutrients**, v. 13, n. 6, p. 1784, 24 maio 2021.

HOFMANN, G. S. et al. The Brazilian Cerrado is becoming hotter and drier. **Global Change Biology**, v. 27, n. 17, p. 4060–4073, set. 2021.

HOPKINS, M. J. G. Are we close to knowing the plant diversity of the Amazon? **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, p. e20190396, 12 set. 2019.

HORESCU, C.; ARTENE, S.-A. THE EFFECT OF BETA - ARRESTIN 1 TRANSFECTION ON PROLIFERATION AND TEMOZOLOMIDE TREATMENT RESPONSE IN HGG CELLS. **Medico Oncology**, v. 1, n. 1, p. 1–9, 2 set. 2020.

HU, C. et al. Tanshinone IIA Inhibits Osteosarcoma Growth through a Src Kinase-Dependent Mechanism. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 2021, p. 5563691, 2021.

HUANG, Y. et al. Tanshinone I, a new EZH2 inhibitor restricts normal and malignant hematopoiesis through upregulation of MMP9 and ABCG2. **Theranostics**, v. 11, n. 14, p. 6891–6904, 2021.

INFANTE, M. S.; PIRIS, M. Á.; HERNÁNDEZ-RIVAS, J. Á. Alteraciones moleculares en leucemia mieloide aguda y sus implicaciones clínicas y terapéuticas. **Medicina Clínica**, v. 151, n. 9, p. 362–367, 9 nov. 2018.

JIANG, Y. et al. Will nanomedicine become a good solution for the cardiotoxicity of chemotherapy drugs? **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, p. 1143361, 2023.

KADAM, S. T.; PAWAR, A. D. CONSERVATION OF MEDICINAL PLANTS: A REVIEW. **International Ayurvedic Medical Journal**, v. 8, n. 7, p. 3890–3895, 18 jul. 2020.

KASAI, F. et al. Kasumi leukemia cell lines: characterization of tumor genomes with ethnic origin and scales of genomic alterations. **Human Cell**, v. 33, n. 3, p. 868–876, 1 jul. 2020.

KHAJAVINIA, A. et al. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of docetaxel-loaded Poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 223, p. 115114, 20 jan. 2023.

KHANAM, S.; PRAKASH, A. An overview of medicinal plants as anticancer agents. **IP International Journal of Comprehensive and Advanced Pharmacology**, v. 6, n. 2, p. 53–62, 15 ago. 2021.

KITAEVA, K. V. et al. Cell Culture Based in vitro Test Systems for Anticancer Drug Screening. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 9 abr. 2020.

KIWUMULO, H. F. et al. A systematic review of modeling and simulation approaches in designing

targeted treatment technologies for Leukemia Cancer in low and middle income countries.

Mathematical Biosciences and Engineering, v. 18, n. 6, p. 8149–8173, 2021.

KLITGAARD, A. et al. Aggressive dereplication using UHPLC–DAD–QTOF: screening extracts for up to 3000 fungal secondary metabolites. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 7, p. 1933–1943, 2014.

KÖNIG, C. C.; PINSKY, V. C. Bioeconomy: Brazilian Potential and Challenges. Em: **Sustainability Challenges of Brazilian Agriculture**. [s.l.] Springer, Cham, 2023. p. 271–291.

KOOSHA, S. et al. Investigation into the Molecular Mechanisms underlying the Anti-proliferative and Anti-tumorigenesis activities of Diosmetin against HCT-116 Human Colorectal Cancer. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 5148, 26 mar. 2019.

KUSHWAHA, M. et al. LC-PDA-MS/MS-Based Dereplication Guided Isolation of a New Optical Isomer of 19,20-Epoxychothalasin-N and Its Cytotoxic Activity. **ACS omega**, v. 7, n. 33, p. 29135–29141, 23 ago. 2022.

LI, W. et al. Molecular Mechanism of Tanshinone against Prostate Cancer. **Molecules**, v. 27, n. 17, p. 5594, jan. 2022.

LIN, C.-C. et al. Cytotoxic effects of *Coptis chinensis* and *Epimedium sagittatum* extracts and their major constituents (berberine, coptisine and icariin) on hepatoma and leukaemia cell growth. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 31, n. 1–2, p. 65–69, 2004.

LIN, C.-Y. et al. Tanshinone IIA Shows Higher Antiproliferative Activities than Sinapic Acid in 4 Cancer Cell Lines and Simultaneously Induces Apoptosis and Necroptosis in Human Lung Cancer A549 Cells. **Natural Product Communications**, v. 16, n. 10, p. 1934578X211050521, 1 out. 2021.

LINDBERG, K. et al. Herbal medicine promotion for a restorative bioeconomy in tropical forests: A reality check on the Brazilian Amazon. **Forest Policy and Economics**, v. 155, p. 103058, 1 out. 2023.

LIU, S. et al. Deciphering Steroidal and Aporphine Alkaloids as Antileukemic Agents by Approaches of Molecular Networking and Metabolomics. **ACS Omega**, 6 mar. 2025.

LIU, X. et al. Honokiol induces paraptosis-like cell death of acute promyelocytic leukemia via mTOR & MAPK signaling pathways activation. **Apoptosis**, v. 26, n. 3, p. 195–208, 2021.

LIU, Y. et al. Targeting SKP2/Bcr-Abl pathway with Diosmetin suppresses chronic myeloid leukemia proliferation. **European Journal of Pharmacology**, v. 883, p. 173366, 15 set. 2020.

LONG, R.; YANG, W.; HUANG, G. Preparation and separation of epothilones with anticancer activity. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 96, n. 2, p. 785–789, 2020.

LUCA, D. C. Update on Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma. **Clinics in Laboratory Medicine, Hematopathology of the Young**. v. 41, n. 3, p. 405–416, 1 set. 2021.

MAGALHÃES, P. K. A. et al. Ethnobotanical and ethnopharmacological study of medicinal plants used by a traditional community in Brazil's northeastern. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, p. e237642, 4 jun. 2021.

MAJOLO, F. et al. Medicinal plants and bioactive natural compounds for cancer treatment: Important advances for drug discovery. **Phytochemistry Letters**, v. 31, p. 196–207, 1 jun. 2019.

MALARD, F.; MOHTY, M. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet (London, England)**, v. 395, n. 10230, p. 1146–1162, 4 abr. 2020.

MARCHEV, A. S. et al. Metabolomics and health: from nutritional crops and plant-based pharmaceuticals to profiling of human biofluids. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 19–20, p. 6487–6503, 2021.

MARQUES, M. C. M. et al. The Atlantic Forest: An Introduction to the Megadiverse Forest of South America. Em: MARQUES, M. C. M.; GRELE, C. E. V. (Eds.). **The Atlantic Forest: History, Biodiversity, Threats and Opportunities of the Mega-diverse Forest**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 3–23.

MARTINO, E. et al. The long story of camptothecin: From traditional medicine to drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 4, p. 701–707, 15 fev. 2017.

MARTINS, E.; MARTINELLI, G.; LOYOLA, R. Brazilian efforts towards achieving a comprehensive extinction risk assessment for its known flora. **Rodriguésia**, v. 69, p. 1529–1537, dez. 2018.

MARTUCCI, M. E. P. et al. Metabolomics as a Potential Chemotaxonomical Tool: Application in the Genus *Vernonia* Schreb. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93149, 15 abr. 2014.

MICHEL, T.; OVERBECK, G. Review of Ecological Restoration in the Brazilian Pampa. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 96, p. e20231283, 15 nov. 2024.

MIRALDI, E.; BAINI, G. MEDICINAL PLANTS AND HEALTH IN HUMAN HISTORY: FROM EMPIRICAL USE TO MODERN PHYTOTHERAPY. **Journal of the Siena Academy of Sciences**, v. 10, n. 1, 5 set. 2019.

MUDUNURU, S. et al. Synthesis of biologically active compounds derived from natural products. **International Journal of Pharmacognosy and Chemistry**, p. 1–6, 16 maio 2023.

NALBANTOGLU, S. Metabolomics: Basic Principles and Strategies. Em: **Molecular Medicine**. [s.l.] IntechOpen, 2019.

NAM, Y. H. et al. Steamed Ginger May Enhance Insulin Secretion through KATP Channel Closure in Pancreatic β -Cells Potentially by Increasing 1-Dehydro-6-Gingerdione Content. **Nutrients**, v. 12, n. 2, p. 324, 26 jan. 2020.

NEWMAN, D. J. Natural products and drug discovery. **National Science Review**, v. 9, n. 11, p. nwac206, 9 nov. 2022.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 27 mar. 2020.

NISHAD, K. et al. Anti-inflammatory potential of myricetin in leukemia cells: in silico and in vitro exploration. **Advances in Traditional Medicine**, v. 24, n. 3, p. 835–844, 1 set. 2024.

NIU, J.; PENG, D.; LIU, L. Drug Resistance Mechanisms of Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 5 jul. 2022.

OAK, C. et al. Diosmetin suppresses human prostate cancer cell proliferation through the induction of apoptosis and cell cycle arrest. **International Journal of Oncology**, v. 53, n. 2, p. 835–843, ago. 2018.

- PATEL, M. K. et al. Plants Metabolome Study: Emerging Tools and Techniques. **Plants**, v. 10, n. 11, p. 2409, nov. 2021.
- PILON, A. C. et al. REDES MOLECULARES: UMA ANÁLISE SOBRE ANOTAÇÕES E DESCOBERTA DE NOVOS ATIVOS. **Química Nova**, v. 44, p. 1168–1179, 8 nov. 2021.
- PIRINTSOS, S. et al. From Traditional Ethnopharmacology to Modern Natural Drug Discovery: A Methodology Discussion and Specific Examples. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 13, p. 4060, 24 jun. 2022.
- QIN, L. et al. Specific Recruitment of Phosphoinositide Species to the Plant-Pathogen Interfacial Membrane Underlies Arabidopsis Susceptibility to Fungal Infection. **The Plant Cell**, v. 32, n. 5, p. 1665–1688, maio 2020.
- QUENTMEIER, H. et al. The LL-100 panel: 100 cell lines for blood cancer studies. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 8218, 3 jun. 2019.
- QUINN, R. A. et al. Molecular Networking As a Drug Discovery, Drug Metabolism, and Precision Medicine Strategy. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 38, n. 2, p. 143–154, fev. 2017.
- RIBEIRO NETO, J. A. et al. Using the plants of Brazilian Cerrado for wound healing: From traditional use to scientific approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 260, p. 112547, out. 2020.
- ROCHA, J. D. et al. Toxic Potential of Cerrado Plants on Different Organisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 7, p. 3413, jan. 2022.
- RODRIGUES, D. A. et al. Phytochemical Profile of Pasture Weeds from the Brazilian Cerrado. **Planta Daninha**, v. 37, p. e019181108, 2019.
- ROMA, A.; ROTA, S. G.; SPAGNUOLO, P. A. Diosmetin Induces Apoptosis of Acute Myeloid Leukemia Cells. **Molecular Pharmaceutics**, v. 15, n. 3, p. 1353–1360, 5 mar. 2018.
- SADIKOĞULLARI, B. et al. An Overview of Natural and Synthetic Phthalides Involved in Cancer Studies: Past, Present, and Future. **ChemistrySelect**, v. 7, 4 out. 2022.
- SAM, D. S. Importance and effectiveness of herbal medicines. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 8, n. 2, p. 354–357, 2019.
- ŠANTIĆ, Ž. et al. The historical use of medicinal plants in traditional and scientific medicine. **Psychiatria Danubina**, v. 29 Suppl 4, n. Suppl 4, p. 787–792, dez. 2017.
- SANTOS, L. D. et al. Medicinal plants of the brazilian cerrado: knowing to preserve. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 2, p. 556–567, 11 fev. 2020.
- SANTOS, M. et al. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, 6 fev. 2023.
- SANZ, M. A. et al. Management of acute promyelocytic leukemia: updated recommendations from an expert panel of the European LeukemiaNet. **Blood**, v. 133, n. 15, p. 1630–1643, 11 abr. 2019.
- SAVI, D. C. et al. Phaeophleospora vochysiae Savi & Glienke sp. nov. Isolated from Vochysia divergens Found in the Pantanal, Brazil, Produces Bioactive Secondary Metabolites. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 3122, 15 fev. 2018.

SAVI, D. C.; ALUIZIO, R.; GLIENKE, C. Brazilian Plants: An Unexplored Source of Endophytes as Producers of Active Metabolites. **Planta Medica**, v. 85, p. 619–636, 11 fev. 2019.

SILVA, V. A. O. et al. Bio-Prospecting of Crude Leaf Extracts from Thirteen Plants of Brazilian Cerrado Biome on Human Glioma Cell Lines. **Molecules**, v. 28, n. 3, p. 1394, jan. 2023.

SINGH, I. P. et al. Natural Products: Drug Discovery and Development. Em: [s.l: s.n.].

SINGH, R. R. et al. Genomic profiling in pancreatic ductal adenocarcinoma and a pathway towards therapy individualization: A scoping review. **Cancer Treatment Reviews**, v. 75, p. 27–38, 1 maio 2019.

ŠKUBNÍK, J. et al. Vincristine in Combination Therapy of Cancer: Emerging Trends in Clinics. **Biology**, v. 10, n. 9, p. 849, 31 ago. 2021.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

TALEBI, Z.; SPARREBOOM, A.; COLACE, S. I. Pharmacogenomics in Cytotoxic Chemotherapy of Cancer. Em: YAN, Q. (Ed.). **Pharmacogenomics in Drug Discovery and Development**. New York, NY: Springer US, 2022. p. 63–94.

TAUTERMANN, C. S. Current and Future Challenges in Modern Drug Discovery. Em: HEIFETZ, A. (Ed.). **Quantum Mechanics in Drug Discovery**. New York, NY: Springer US, 2020. p. 1–17.

TER STEEGE, H. et al. Mapping density, diversity and species-richness of the Amazon tree flora. **Communications Biology**, v. 6, n. 1, p. 1–14, 8 nov. 2023.

TRONCONE, G.; VIGLIAR, E. Histopathology of the Tumors. Em: RUSSO, A. et al. (Eds.). **Practical Medical Oncology Textbook**. Cham: Springer International Publishing, 2021. p. 33–41.

TSOUKALAS, D. et al. Metabolomics. Em: WEXLER, P. (Ed.). **Encyclopedia of Toxicology (Fourth Edition)**. Oxford: Academic Press, 2024. p. 161–170.

VALADARES, R. T. et al. Floristic inventory and conservation of one of the most striking coastal mountains in the Brazilian Atlantic Forest. **Acta Botanica Brasilica**, v. 36, p. e2021abb0038, 15 abr. 2022.

VALE, J. D. V. et al. Plantas da Caatinga: contextualizando os conteúdos de botânica. **ForScience**, v. 10, n. 1, p. e01012, 10 ago. 2022.

VARGAS, F. et al. Protocol for community-created public MS/MS reference spectra within the Global Natural Products Social Molecular Networking infrastructure. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 34, n. 10, p. e8725, 2020.

VARGHESE, R.; DALVI, Y. B. Natural Products as Anticancer Agents. **Current Drug Targets**, v. 22, n. 11, p. 1272–1287, 2021.

VIEIRA, L. T. A. et al. Reviewing the Cerrado's limits, flora distribution patterns, and conservation status for policy decisions. **Land Use Policy**, v. 115, p. 106038, 1 abr. 2022.

VILLEGAS, C. et al. Epothilones as Natural Compounds for Novel Anticancer Drugs Development. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 7, p. 6063, jan. 2023.

WAGH, A.; BUTLE, S.; RAUT, D. Isolation, identification, and cytotoxicity evaluation of phytochemicals from chloroform extract of *Spathodea campanulata*. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 1, p. 58, 4 mar. 2021.

WANG, M. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828–837, 9 ago. 2016.

WILLIAMS, C. et al. Conservation Policy: Helping or hindering science to unlock properties of plants and fungi. **PLANTS, PEOPLE, PLANET**, v. 2, n. 5, p. 535–545, set. 2020.

WILLY, K. C.; JOHN, K. M.; KARATU, K. Sociocultural conservation strategies of prioritized medicinal plants, their historical context and space for integration. **African Journal of History and Culture**, v. 15, n. 1, p. 11–21, 31 maio 2023.

WOLFENDER, J.-L. HPLC in natural product analysis: the detection issue. **Planta Medica**, v. 75, n. 7, p. 719–734, jun. 2009.

WOLFENDER, J.-L. et al. Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 1056–1090, 2013.

WOLFENDER, J.-L. et al. Accelerating Metabolite Identification in Natural Product Research: Toward an Ideal Combination of Liquid Chromatography-High-Resolution Tandem Mass Spectrometry and NMR Profiling, in Silico Databases, and Chemometrics. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 704–742, 2 jan. 2019.

XIE, B.; TEUSCH, N.; MRSNY, R. 14 - Comparison of two- and three-dimensional cancer models for assessing potential cancer therapeutics. Em: PARK, K. (Ed.). **Biomaterials for Cancer Therapeutics (Second Edition)**. Woodhead Publishing Series in Biomaterials. [s.l.] Woodhead Publishing, 2020. p. 399–422.

XIE, L.; CHENG, L.; WEI, Y. Mitomycin C enhanced the antitumor efficacy of Rocaglamide in colorectal cancer. **Pathology, Research and Practice**, v. 243, p. 154350, mar. 2023.

YANIV, Z. Introduction: Medicinal Plants in Ancient Traditions. Em: YANIV, Z.; DUDAI, N. (Eds.). **Medicinal and Aromatic Plants of the Middle-East**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. p. 1–7.

YU, J. S. et al. Tandem Mass Spectrometry Molecular Networking as a Powerful and Efficient Tool for Drug Metabolism Studies. **Analytical Chemistry**, v. 94, n. 2, p. 1456–1464, 18 jan. 2022.

ZAID, A. et al. Phytochemical Constituents and Antiproliferative Activities of Essential Oils from Four Varieties of Malaysian *Zingiber officinale* Roscoe against Human Cervical Cancer Cell Line. **Plants**, v. 11, n. 10, p. 1280, 10 maio 2022.

ZHOU, X. S. et al. [Study on the inhibitory and pro-apoptotic effects of different concentrations of total tanshinone alone and in combination with tyrosine kinase inhibitors on human myeloid leukemia cell lines]. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 104, n. 17, p. 1514–1520, 7 maio 2024.