



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PAULO RICARDO DE SOUZA MELO

ESTUDO FITOQUÍMICO, *IN SÍLICO* E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTI-LEISHMANIA DE *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyankin & Clemants

BELÉM-PA

2023

PAULO RICARDO DE SOUZA MELO

**ESTUDO FITOQUÍMICO, *IN SÍLICO* E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTILEISHMANIA DE *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyankin & Clemants**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do Título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Fâni Dolabela

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marliane Batista Campos

BELÉM-PA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

- M528e Melo, Paulo Ricardo de Souza.
ESTUDO FITOQUÍMICO, IN SÍLICO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE *Dysphania ambrosioides*
(L.) Mosyankin & Clemants / Paulo Ricardo de Souza Melo. —
2023.
120 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof^a. Dra. Maria Fani Dolabela
Coorientação: Prof^a. Dra. Marliane Batista Campos
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2023.
1. estudos fitoquímicos. 2. *Dysphania ambrosioides*.
3. atividade antileishmania. 4. Leishmania. 5. terpenos.
I. Título.

CDD 615.4

PAULO RICARDO DE SOUZA MELO

ESTUDO FITOQUÍMICO, *IN SÍLICO* E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTILEISHMANIA DE *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyankin & Clemants

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção do Título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Fâni Dolabela

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Marliane Batista Campos

BANCA EXAMINADORA

Dra. Maria Fâni Dolabela (Orientadora)

Dra. Marliane Batista Campos (Coorientadora)

Dr. Heliton Patrick Cordovil Brígido (Membro externo)

Dr. José Luiz Fernandes Vieira (Membro interno)

BELÉM-PA

2023

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, por ser essencial em minha vida e a minha mãe, Maria de Nazaré (in memoriam), minha maior inspiração e incentivadora.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pelas oportunidades, proteção e amparo durante todas dificuldades e etapas da vida, sem ele nada seria possível.

A minha mãe (in memorian), o meu maior amor, incentivo e exemplo de vida.

À minha família, pois sempre me incentivaram, apoiaram e torceram por mim. Especialmente a minha avó Dulce Melo e aos meus irmãos Paulo e Rento Melo, as minhas tia Ray e Nazaré Lima e ao meu pai Ronaldo Melo, que sempre acreditaram em mim, e se esforçaram para que eu alcançasse meus objetivos.

A minha orientadora Profa. Dra. Maria Fani Dolabela, pela oportunidade, dedicação, ensinamentos e conhecimentos repassados, pela paciência e por ter acreditado no meu trabalho.

A minha coorientadora Dra. Marliane Batista Campos, por ter aceito o convite e ter aberto as portas do Instituto Evandro Chagas e do Laboratório de Leishmanioses para que pudesse realizar parte desta pesquisa. Obrigado por todo apoio, orientação e dedicação em ensinar. Agradeço também aos servidores e alunos do Laboratório de leishmaniose, por todo apoio e acolhimento durante os testes, em especial ao Sr. Nonato, Dr. Fernando, Rodrigo, Vitória e Cecilia.

Ao Laboratório de Farmacologia e Doenças Negligenciadas, e aos amigos e colegas por toda ajuda, disponibilidade e amizade durante estes anos de trabalhos em conjunto, em especial a Kelly Albuquerque, a Ana Carolina, Amanda Ramos, Gleison Ferreira, Cristian Chagas, Dayse Brandão, Juliana Correa, Wálíce Rans, Pedro e Débora Correa. Agradeço por serem pessoas dispostas a colaborar e compartilhar conhecimento e principalmente por tornarem os dias no ambiente de trabalho mais agradável e leve.

Aos amigos Camilla Rolim e Débora Andrade, que estão em jornadas diferentes, mas sempre me apoiaram e incentivaram, obrigado pelos momentos de descontração, pelo incentivo, pela amizade e carinho. Vocês também fizeram parte deste trabalho.

À Universidade Federal do Pará pela Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, a todos os laboratórios da faculdade de farmácia, que de alguma forma ajudaram no desenvolvimento desse trabalho.

E a todos aqueles que torceram por mim e que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

MELO, P. R. S. **Estudo fitoquímico, *in silico* e avaliação da atividade antileishmania de *Dysphania ambrosioides* L. Mosyakin & Clemants.** Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal do Pará, Belém, 2023.

Dysphania ambrosioides (mastruz) é amplamente utilizado na medicina tradicional como cicatrizante, anti-inflamatório e antiparasitário. Desta forma, o presente estudo avaliou os aspectos fitoquímicos e o potencial antileishmania de *D. ambrosioides*. Os extratos das folhas e galhos (EEFo e EEGa) foram obtidos por maceração com etanol. Estes foram submetidos a fracionamento sob refluxo, obtendo-se as frações hexano (FHFo e FHGa), diclorometano (FDFo e FDGa), acetato de etila (FAEFo e FAEGA) e metanol (FMeFo e FMeGa). Os extratos e frações, foram submetidos estudos químicos através de análises cromatográficas e espectrométricas (CCD, HPLC, FT-IR e RMN) e a estudos da atividade antileishmania frente a cepa promastigota de *Leishmania amazonensis*. Para os estudos *in silico*, selecionou-se na literatura os principais isolados da classe dos flavonóides e terpenos, estes foram submetidos a predições das características farmacocinéticas, toxicológicas e a docagem molecular em enzimas alvos de *Leishmania*. Nos estudos químicos foram detectados diferentes metabolitos secundários nos extratos e frações das folhas e galhos de *D. ambrosioides*, dentre estes os majoritários foram as classes de terpenos e flavonóides. Sendo a presença de flavonoides predominante nos extratos e nas frações de maior polaridade FAEFo, FAEGA, FMeFo e FMeGa. Já os terpenos encontram-se presentes em todos os extratos e frações. A espécie demonstrou potencial antileishmania, os extratos foram classificados como moderadamente ativo EEGa (CI₅₀= 189,2 µg/mL) e EEFo (CI₅₀= 145,9 µg/mL), e o fracionamento contribuiu para melhoramento da atividade frente a formas promastigotas, sendo as frações mais promissoras a FDFo (CI₅₀ = 88,3 µg/mL) e (FDGa CI₅₀ = 97,6 µg/mL), que foram classificadas com ativo. Em relação as predições *in silico*, os compostos da classe dos flavonoides foram os que mais violaram a regra de Lipinski, enquanto que terpenos não violaram esta regra, apresentando melhores características farmacocinéticas, como alta absorção intestinal, melhor distribuição e permeabilidade a BHE. Todas as moléculas apresentaram toxicidade, sendo o terpeno (23) o menos tóxico. Com base na regra de Lipinski e toxicidade as moléculas mais promissoras foram os flavonoides (4) afzelina e (6) kaempferol-7-O- α -L-1-C4-ramnopiranosídeo e os terpenos (13) 1,4-Dihidroxip-mento-2-eno, (20) 1,2,3,4-tetradroxi-p-metano, (23) (1S,2S,3R,4S)-1-metil-4-(propan-2-il)ciclohexano-1,2,3,4-tetrol e (24) (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol. A docagem molecular demonstrou que tanto os terpenos como os flavonóides ligam-se as enzimas GP63 e TR em sítios semelhantes à molécula inibidora, demonstrando potencial para inibição dessas vias. Em síntese, a espécie *D. ambrosioides* mostrou-se promissora frente as formas promastigotas de *L. amazonensis* e com potencial para ligar-se a alvos específicos de *Leishmania*.

Palavras chaves: *Dysphania ambrosioides*; *Leishmania*, Flavonóides; Terpenos.

ABSTRACT

MELO, P. R. S. **Phytochemical, *in silicon* study and evaluation of the antileishmania activity of *Dysphania ambrosioides* L. Mosyakin & Clematis.** Dissertation (Master's) - Graduate Program in Pharmaceutical Sciences – Federal University of Pará, Belém, 2023.

Dysphania ambrosioides (mastruz) is widely used in traditional medicine as a wound healing, anti-inflammatory, and antiparasitic. Thus, the present study evaluated the phytochemical aspects and antileishmania potential of *D. ambrosioides*. The extracts of the leaves and twigs (EEFo and EEGa) were obtained by maceration with ethanol. These were subjected to fractionation under reflux, obtaining the fractions hexane (FHFo and FHGa), dichloromethane (FDFo and FDGa), ethyl acetate (FAEFo and FAEGA) and methanol (FMeFo and FMeGa). The extracts and fractions were submitted to chemical studies through chromatographic and spectrometric analysis (CCD, HPLC, FT-IR and NMR) and to studies of the antileishmania activity against the promastigote strain of *Leishmania amazonensis*. For the silicon studies, the main isolates of the class of flavonoids and terpenes were selected in the literature, which were submitted to predictions of pharmacokinetic and toxicological characteristics and molecular docking in *Leishmania target enzymes*. In the chemical studies, different secondary metabolites were detected in the extracts and fractions of the leaves and twigs of *D. ambrosioides*, among which the major ones were the classes of terpenes and flavonoids. The presence of flavonoids is predominant in the extracts and fractions of higher polarity FAEFo, FAEGA, FMeFo and FMeGa. Terpenes, on the other hand, are present in all extracts and fractions. The species showed antileishmania potential, the extracts were classified as moderately active aEEGa (IC₅₀ = 189.2 µg/mL) and eFo (IC₅₀ = 145.9 µg/mL), and the fractionation contributed to the improvement of the activity against promastigote forms, with the most promising fractions being FDFo (IC₅₀ = 88.3 µg/mL) and (FDGa aIC₅₀ = 97.6 µg/mL), which were classified as active. Regarding the *in silicon predictions*, the compounds of the flavonoid class were the ones that most violated the Lipinski rule, while terpenes did not violate this rule, presenting better pharmacokinetic characteristics, such as high intestinal absorption, better distribution and permeability to BBB. All molecules showed toxicity, with terpene (23) being the least toxic. Based on Lipinski's rule and toxicity, the most promising molecules were the flavonoids (4) afzelin and (6) kaempferol-7-O- α -L-1-C4-rhamnopyranoside and the terpenes (13) 1,4-Dihydroxy-p-ment-2-ene, (20) 1,2,3,4-tetradoxy-p-methane, (23) (1S,2S,3R,4S)-1-methyl-4-(propan-2-yl)cyclohexane-1,2,3,4-tetrol and (24) (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol. Molecular docking demonstrated that both terpenes and flavonoids bind to GP63 and TR enzymes at sites similar to the inhibitory molecule, demonstrating potential for inhibition of these pathways. In summary, the species *D. ambrosioides* showed promise against the promastigote forms of *L. amazonensis* and with the potential to bind to specific targets of *Leishmania*

Keywords: *Dysphania ambrosioides*; *Leishmania*, Flavonoids; Terpenes.

LISTA DE ESTRUTURAS

1	Ascaridol.....	38
2	Chenopanona.....	38
3	(1R,2S,3S,4S)-1,2,3,4-tetrahidroxi-p-mentano	38
4	1,4-di-hidroxi- p-ment-2-eno	38
5	(1S, 4S)-p-Mentha-2,8-dien-1-hidroperóxido	38
6	(1R, 4S)-p-Mentha-2,8-dien-1-hidroperóxido	38
7	(1S, 4S)-p-mentha-2,8-dien-1-hidroperóxido	38
8	(1R, 4S)-p-mentha-2,8-dien-1-hidroperóxido	38
9	4-hidroxi-4(α ou β)-isopropil-2-metil-2-ciclohexen-1-ona	38
10	1-metil-4 β -isopropil-1-ciclohexeno-4 α ,5 α ,6 α -triol	38
11	(1S, 2S, 3R, 4S)-1-metil-4-(propan-2-il)ciclohexano-1,2,3,4-tetrol	38
12	<i>Cis</i> -p-Menthadieno-1(7),8ol-2.....	38
13	(1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol	38
14	(1R,4S)-p-met-2-em-1-ol	38
15	Kaempferol.....	39
16	Kaempferol-3-rhamnoside-4'-xyloside.....	39
17	Kaempferol-3-rhamnoside-7'-xyloside	39
18	Kaempferol-7-rhamnosideo.....	39
19	Kaempferol-7-O- α -L-1C4-ramnopiranosídeo	39
20	kaempferol 3- O - α - L - 1 C 4 -ramnopiranosídeo	39
21	Kaempferol 3-O- α -1-1C4-ramnosil-(1 $'''$ $\rightarrow$ 2 $''$)- β -D-4C1-xilopiranosídeo	39
22	Isorhamnetina.....	39
23	Quercetina	39
24	1,2-benzopirona.....	40
25	escopoletina.....	40
26	1-piperoilpiperidina.....	40
27	β -sitosterol	40
28	Estigmasterol.....	40
29	Ácido cafeico	40
30	Ácido octadecanóico	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 incidência mundial de casos de leishmaniose cutânea	20
Figura 2 Incidência mundial de casos de leishmaniose visceral 2020	21
Figura 3 Taxonomia do gênero <i>Leishmania</i>	23
Figura 4 Formas promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania sp.</i>	24
Figura 5 Ciclo de vida da <i>Leishmania sp.</i>	26
Figura 6 Estrutura químicas dos principais fármacos usados no tratamento de leishmaniose	27
Figura 7 <i>Dysphania ambrosioides</i>	31
Figura 8 Terpenos isolados da espécie <i>D. ambrosioides</i>	37
Figura 9 Flavonóides isolados da espécie <i>D. ambrosioides</i>	38
Figura 10 Outros isolados de <i>D. ambrosioides</i>	39
Figura 11 Fluxograma obtenção das frações de <i>D. ambrosioides</i>	48
Figura 12 Desenho esquemático das placas de 96 poços e distribuição das amostras testatadas.....	52
Figura 13 Estrutura química geral de um flavonoide	61
Figura 14 Cromatogramas dos extratos de <i>D. ambrosioides</i>	61
Figura 15 Cromatogramas dos extratos e frações das folhas de <i>D. ambrosioides</i>	65
Figura 16 Cromatogramas dos extratos e frações dos galhos de <i>D. ambrosioides</i>	67
Figura 17 Espectro de infravermelho dos extratos de <i>D. ambrosioides</i>	68
Figura 18 Espectro de infravermelho das frações de <i>D. ambrosioides</i>	70
Figura 19 Espectro de RMN ¹ H dos extratos e frações das folhas de <i>D. ambrosioides</i>	73

Figura 20 Espectro de RMN ^1H dos extratos e frações dos galhos de <i>D. ambrosioides</i>	75
Figura 21 Estruturas dos compostos isolados de <i>D. ambrosioides</i> selecionas para estudo in sílico.....	80
Figura 22 Esquema Boiled-Egg para absorção/permeação de moléculas pelas barreiras fisiológicas.....	83
Figura 23 Enzima cristalografada de tripanotiona redutase (2W0H) e glicoproteína GP53 (1LML)	90
Figura 24 Conformações dos compostos selecionados para docagem.....	90
Figura 25 Representação 2D das interações entre o sítio de ligação da tripanotiona redutase 2W0H e os compostos.....	93
Figura 26 Representação 2D das interações entre o sítio de ligação da GP63 e os compostos.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Parâmetros para classificação da toxicidade oral aguda (DL ₅₀ oral)	56
Tabela 2 Código PDB das enzimas com suas respectivas resoluções.....	57
Tabela 3 Rendimento de dos extratos e frações de <i>D. ambrosioides</i>	58
Tabela 4 Resultados de prospecção fitoquímica de <i>D. ambrosioides</i>	60
Tabela 5 Resultados obtidos por HPLC dos extratos de <i>Dysphania ambrosioides</i> ...	63
Tabela 6 Regiões de absorções de ligação das moléculas de extratos e frações de <i>D. ambrosioides</i>	71
Tabela 7 Valores de deslocamento químicos (δ) RMN ¹ H obtidos dos extratos comparados com dados da literatura de terpenos isolados <i>ambrosioides</i>	76
Tabela 8 Atividade antipromastigota de <i>Dysphania ambrosioides</i> em <i>Leishmania amazonensis</i>	78
Tabela 9 Predição de propriedades físico-químicas e farmacocinéticas de isolados de <i>D. ambrosioides</i>	85
Tabela 10 Predição de toxicidade de isolados de <i>D. ambrosioides</i>	88
Tabela 11 Valores de pontuação Goldscore e interação entre a tripanotona redutase e os compostos selecionados.....	94
Tabela 12 Valores de pontuação Goldscore e interação entre a GP63 e os compostos selecionados.....	98

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Usos tradicionais de <i>D. ambrosioides</i>	32
Quadro 2 Atividade parasitária de <i>D. ambrosioides</i>	35
Quadro 3 Atividade parasitária de compostos isolados de <i>D. ambrosioides</i>	40
Quadro 4 Designação da cepa de <i>Leishmania</i> utilizada no estudo.....	47
Quadro 5 Condições utilizadas nas avaliações em cromatografia em camada delgada	49
Quadro 6 Interpretação dos resultados de <i>Leishmania</i> baseado na concentração Inibitória CI50	53

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CCD – Cromatografia em camada delgada

CI₅₀ – Concentração inibitório 50%

DL₅₀ – Dose letal de 50%

DMSO - Dimetilsulfóxido

EEFo - Extrato de etanol da folha

FHFo - Fração de hexano da folha

FDFo - Fração de diclorometano da folha

FAEFo - Fração de acetato de etila da folha

FMeFo – Fração de metanol da folha

EEGa - Extrato de etanol do galho

FHGa - Fração de hexano do galho

FDGa - Fração de diclorometano do galho

FAEGa - Fração de acetato de etila do galho

FMeGa - Fração de metanol do galho

LC – Leishmaniose cutânea

LV – Leishmaniose visceral

LM – Leishmaniose mucosa

LMC – Leishmaniose mucocutânea

LCAD – Leishmaniose cutânea anérgica difusa

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

FTIR – Fourier Transform Infrared Spectrophotometer

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde

OMS/WHO – Organização Mundial de Saúde/ World Health Organization

RMN – Espectrometria de ressonância magnética nuclear

RPMI-1640 - Roswell Park Memorial Institute 1640

MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium

TR – tripanotona redutase

GP63 – glicoproteína 63

Vis – Visível

UV – ultravioleta

logP - Coeficiente de partição óleo-água

MM - Massa molar

nALH - Número de aceptores de ligação de hidrogênio

nDLH - Número de doadores de ligação de hidrogênio

MDCK - Madin-Darby-Canine-Kidney

Caco2 - Células de adenocarcinoma de cólon humano

HIA - Human intestinal absorption

PP - Proteína plasmática

BHE - Barreira hematoencefálica

CYP - Citocromo P450

mL - Mililitro

% - Porcentagem

g- Grama

µg/mL - Micrograma por mililitro

mg/L - Miligramas por litro

mol/L - Mol por litro

nm/ sec - Newton metro por segundo

g/L - Gramas por litro

µL - Microlitros

v/v - Volume por volume

p/v – Peso por volume

λ - Comprimento de onda

SFB - Soro fetal bovino

(+) - Positivo

(-) – Negativo

> – maior

< – menor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Leishmania.....	19
2.2 Dysphania ambrosioides.....	29
3 OBJETIVOS	41
3.1 Objetivos Gerais.....	41
3.2 Objetivos Específicos.....	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Material	42
4.1.1 EQUIPAMENTOS.....	42
4.1.2 SOLVENTES, REAGENTES E OUTROS.....	43
4.1.3 FÁRMACOS, MEIOS DE CULTURA E OUTROS.....	43
4.1.4 MATERIAL PLÁSTICO E METAL.....	44
4.1.5 VIDRARIAS.....	44
4.1.6 REVELADORES PARA CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	44
4.1.7 PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO.....	46
4.1.7.1 Meio Novy-Nicolle-Mcneal (NNN).....	46
4.1.7.2 MEIO RPMI 1640 PARA LEISHMANIA.....	46
4.1.8 MATERIAL BIOLÓGICO	47
4.1.8.1 ESPÉCIE DE <i>Leishmania</i> E CULTIVO.....	47
4.1.9 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	47
4.2 Métodos	47
4.2.1 PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL.....	47
4.2.2 ESTUDOS QUÍMICOS.....	48
4.2.2.1 Caracterização de extrato e frações.....	49
4.3.1 ATIVIDADE ANTILEISHMANIA.....	51
4.3.3.1 Cultivo e manutenção das formas promastigotas de <i>Leishmania</i>	51
4.3.3.2 Atividade antipromastigota.....	52
4.4.1 ESTUDOS IN SILICO E DOCAGEM MOLECULAR.....	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1 Estudos fitoquímicos.....	58
5.2 Atividade antileishmania.....	76

5.2.1 Avaliação da atividade antipromastigota.....	76
5.3 Estudos in sílico e docagem molecular.....	80
5.3.1 Predição dos aspectos físico-químicos, farmacocinéticos e toxicológicos (ADMET).....	80
5.3.2 Docagem molecular.....	89
6 CONCLUSÃO	100
REFERÊNCIAS	101

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários de várias espécies do gênero *Leishmania*, essas doenças possuem maior ocorrência em países da América Latina, Norte e Leste da África, Sudeste e Oeste da Ásia, ocorrendo em cerca de 97 países (Calixto, 2018; WHO, 2020). As leishmanioses são classificadas como doenças tropicais negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), e estão comumente associadas a condições de desnutrição, sistema imunológico deprimido e falta de recursos financeiros, afetando principalmente regiões pobres ou em desenvolvimento, a doença pode ser classificada em três principais formas clínicas: cutânea, mucosa e visceral (Calixto, 2018; WHO, 2020; OPAS/OMS, 2021).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a leishmaniose tegumentar (LT) está presente em cerca de 89 países, os sintomas da LT manifestam-se por meio de lesões na pele e/ou mucosas, que podem se apresentar de formas variadas, tais como únicas, múltiplas, disseminadas ou difusas. Essas lesões cutâneas frequentemente se apresentam como úlceras, caracterizadas por bordas elevadas e um fundo granuloso, geralmente sem causar desconforto e podem causar desfiguração e mutilação do paciente, quanto às lesões mucosas, estas são mais comumente observadas no nariz, boca e garganta (Silveira *et al.*, 2005; WHO, 2021).

De acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS/OMS, 2021), nos últimos 20 anos, 17 países foram considerados endêmicos nas Américas, sendo notificados 1.067.759 casos de Leishmaniose cutânea (LC) e mucosa (LM), com média anual de 53.387 casos. Do total de 39.705 casos notificados em 2020, 81% destes ocorreram no Brasil (16.432), Colômbia (6.161), Peru (4.178), Nicarágua (3.443) e Bolívia (2.059; OPAS/OMS, 2021).

A leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave das leishmanioses, podendo ser fatal em casos não diagnosticados oportunamente e tratados adequadamente. É endêmica em 13 países das Américas, onde foram registrados 65.934 casos novos de 2001 a 2019, com uma média de 3.470 casos por ano. Do total de 1.988 casos notificados em 2019, destes 97% foram reportados no Brasil (1.933), e os demais casos na Argentina, Bolívia, Colômbia, Guatemala, Honduras, México, Paraguai, Venezuela e Uruguai (OPAS/OMS, 2020).

Atualmente, mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas para leishmaniose e correm risco de infecção. Estima-se que ocorram anualmente 30.000 novos casos de LV e cerca de 1 milhão de novos casos de LC, ocorrendo entre 20 e 30 mil óbitos (WHO, 2020). Nesse sentido, esta doença merece atenção no cenário mundial, devido à sua alta incidência e ao risco de causar deformidades e possíveis óbitos. Além disso, existem inúmeras limitações no tratamento da doença, tais como efeitos tóxicos dos fármacos e baixa eficácia dos tratamentos alternativos (Skraba *et al.*, 2014; Chakravarty e Sundar, 2019).

O tratamento das leishmanioses, no Brasil, é realizado principalmente por quimioterapia com antimoniais pentavalentes, ou como alternativa a anfotericina B. No entanto, os fármacos utilizados em geral possuem alta toxicidade e provocam vários efeitos adversos, além de requerem administração por via parenteral e tempo prolongado de tratamento (Rath *et al.*, 2003; Rocha, 2009; Sundar *et al.*, 2018). Tais fatores contribuem para uma baixa adesão, abandono da terapia e para o surgimento de parasitos resistentes (Frézard, *et al.*, 2005; Lindoso *et al.*, 2022).

Nesse contexto, torna-se necessário estudos que visem a busca de novas substâncias para o tratamento de leishmaniose, substância que sejam mais eficazes e com menos efeitos tóxicos em relação aos fármacos convencionais (Bezerra, 2006; Cragg e Newman, 2013; Volpedo *et al.*, 2021).

Nesse sentido, tem-se adotado algumas estratégias para o desenvolvimento de novos fármacos leishmanicida, uma das alternativas é o estudo das proteases de protozoários, visto que estas estão envolvidas no metabolismo celular ou na interação com o hospedeiro, comportando-se nesse caso como fatores de virulência. Nesse contexto, um inibidor seletivo de proteases vitais para o parasito é uma das estratégias mais promissoras para o desenvolvimento de fármacos no combate de protozoários (Zucca; Savoia, 2011; Almeida, 2013). Assim, estudos *in silico* de docking molecular é uma alternativa a ser explorada, pois consiste na exploração de conformações bioativas, utilizado para predizer interações entre compostos químicos (micromolécula ou ligante) a um alvo molecular ou macromolécula (proteínas, enzimas e receptores) de parasitos (Pandey *et al.*, 2017).

Outra estratégia a ser utilizada, é a pesquisa com plantas medicinais, devido serem fonte de substâncias bioativas promissoras para tratamento de parasitoses (Barros *et al.*, 2013; WHO, 2011). Dentre as plantas utilizadas na medicina tradicional como cicatrizante e tratamento de feridas (Patricio, 2008), destaca-se a espécie

Dysphania ambrosioides (L.) Mosyakin & Clements. Conhecida popularmente como erva de santa maria ou mastruz, é uma espécie nativa da América Central e do Sul, endêmica em todo Brasil e com ampla distribuição geográfica no mundo, principalmente em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (Lorenzi e Matos, 2002; Senna, 2015).

Estudos etnobotânicos demonstram que a espécie é utilizada popularmente nas formas de chás, batidas, xaropes ou infusões para tratamento de verminose, tosse, pneumonia e inflamações (Moraes *et al.*, 2005; Barbosa *et al.*, 2011), infecções parasitárias (Calzada *et al.*, 2010), no alívio de dores musculares (Garcia; Domingues; Rodrigues, 2010), como antifúngico (Fenner *et al.*, 2006) e inflamações em geral (Cartaxo *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2011). Em regiões endêmicas para leishmaniose, a população utiliza as folhas de *D. ambrosioides* no tratamento tópico de úlceras provocadas pela doença (França; Lago; Marsden, 1996).

Estudo avaliou a atividade antileishmania do óleo essencial das partes aéreas de *D. ambrosioides*, onde verificou o efeito inibitório contra as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* (L.) *amazonensis* (CI₅₀ de 3,7 e 4,6 µg/mL, respectivamente). A combinação entre o óleo essencial e pentamidina promoveu atividade sinérgica na inibição de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (Monzote *et al.*, 2006). Outro estudo, demonstrou que extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides* apresentou atividade moderada *in vitro* sobre formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (CI₅₀ = 151,9 µg/mL; Bezerra *et al.*, 2006). Este mesmo extrato foi avaliado *in vivo* (5 mg/kg) induzindo uma diminuição significativa da carga parasitária nas patas, baço e linfonodos de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* (Patrício *et al.*, 2008).

Até o presente, foram avaliadas amostras de *D. ambrosioides* que devem conter compostos de menor polaridade (óleo), sendo muito promissora esta amostra, e de maior polaridade com menor potencial leishmanicida. Entretanto, quando o objetivo terapêutico é a obtenção de uma amostra ativa que possa ser administrada por via oral é importante avaliar o potencial de frações que possam conter compostos de média polaridade, isto é, capazes de solubilizar em água e atravessar as barreiras do trato gastrointestinal. Diante do exposto, ainda existe uma lacuna no conhecimento relacionado a atividade leishmanicida da espécie e do(s) possível(is) compostos e alvos terapêuticos envolvidos nesta atividade, justificando a realização deste estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmania

A leishmaniose é uma doença infecto-parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*. A doença está comumente associada à pobreza, condições precárias de habitação e falta de recursos, sendo predominantes em regiões emergentes como África, Ásia e América Latina (PAHO, 2020; WHO, 2020).

As manifestações clínicas das leishmanioses podem variar desde assintomáticas a letais, e são relacionadas a fatores como: a espécie do parasito, vetor, estado imunológico, carga genética e parasitária (Kevric; Cappel; Keeling, 2015; Calixto, 2018). As principais formas clínicas das leishmanioses são: a leishmaniose visceral e a leishmaniose tegumentar americana (LTA), que pode se apresentar nas seguintes formas clínicas: Leishmaniose cutânea (LC), mucosa (LM), mucocutânea (LMC; Oryan, *et al.*, 2015; BRASIL, 2017; WHO, 2021).

A leishmaniose visceral, conhecida como doença de calazar, é a forma mais grave da doença, é uma infecção crônica que pode ser fatal dentro de 2 anos se não tratada, nesta forma clínica os parasitos promovem infecção em órgãos viscerais como fígado, baço e medula óssea, é caracterizada por crises irregulares de febre, perda de peso, anemia, palidez, fraqueza aumento do baço e do fígado, é causada principalmente pelas espécies *L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani* na Europa e Ásia, e *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis* (Barral *et al.*, 1995; BRASIL, 2014; Feijó *et al.*, 2016; WHO, 2021).

A leishmaniose cutânea, é a forma mais comum da doença, causa lesões na pele bem demarcadas no local da picada do inseto, produzindo lesões nodulares e indolores que aumentam, sofrem ulceração no centro e podem persistir por meses a anos (BRASIL, 2017; Feijó *et al.*, 2016, WHO, 2021). Estas lesões podem cicatrizar de forma espontânea, deixando uma cicatriz semelhante a uma queimadura e a evolução da doença depende da espécie e do estado imune do paciente, sendo a leishmaniose cutânea difusa ou leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD) uma forma rara da doença que está relacionada a anergia mediada por células ao microrganismo, esta é caracterizada pela a intensa proliferação do parasito e pela presença disseminada de nódulos múltiplos não ulcerativos e ao grande número de parasitos na lesão, essas lesões tendem a se espalhar pelo corpo todo (Barral *et al.*, 1995; Mansueto *et al.*, 2014; BRASIL, 2014).

A leishmaniose de mucosa é outra forma progressiva da LC apresentando-se como lesão crônica, que se caracteriza por acometer mucosas com lesões destrutivas, principalmente nas vias aéreas superiores, podendo levar à destruição parcial ou total das mucosas do nariz, boca e garganta (BRASIL, 2014; WHO, 2021). Além disso, a leishmaniose mucocutânea LMC, é resultante da disseminação hematogênica do parasito de lesão cutânea, que pode ocorrer simultaneamente com a LM, está associada geralmente a ausência ou insuficiência do tratamento da infecção primária, é caracterizada por infecção da mucosa nasal e orofaringe, ocorrendo eritema e edema da mucosa, acompanhado de ulceração mucopurulento, esta forma não possui cura espontânea e pode causar complicações permanentes, como destruição ou deformação ulcerativa do nariz, boca, laringe, palato, lábios superiores (BRASIL, 2014; Mansueto *et al.*, 2014).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2020 foram registrados 208.357 novos casos de Leishmaniose cutânea, de todos os casos de LC, o Brasil e mais seis países, representam cerca de 85% dos casos globais (WHO, 2021). Cerca de 95% dos casos de LC ocorrem nas Américas, bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central. Em 2020, mais de 85% dos novos casos de LC ocorreram em 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Iraque, Líbia, Paquistão, Peru, República Árabe da Síria e Tunísia (Figura 1). Estima-se que entre 600.000 a 1 milhão de novos casos ocorram anualmente em todo o mundo (WHO, 2021).

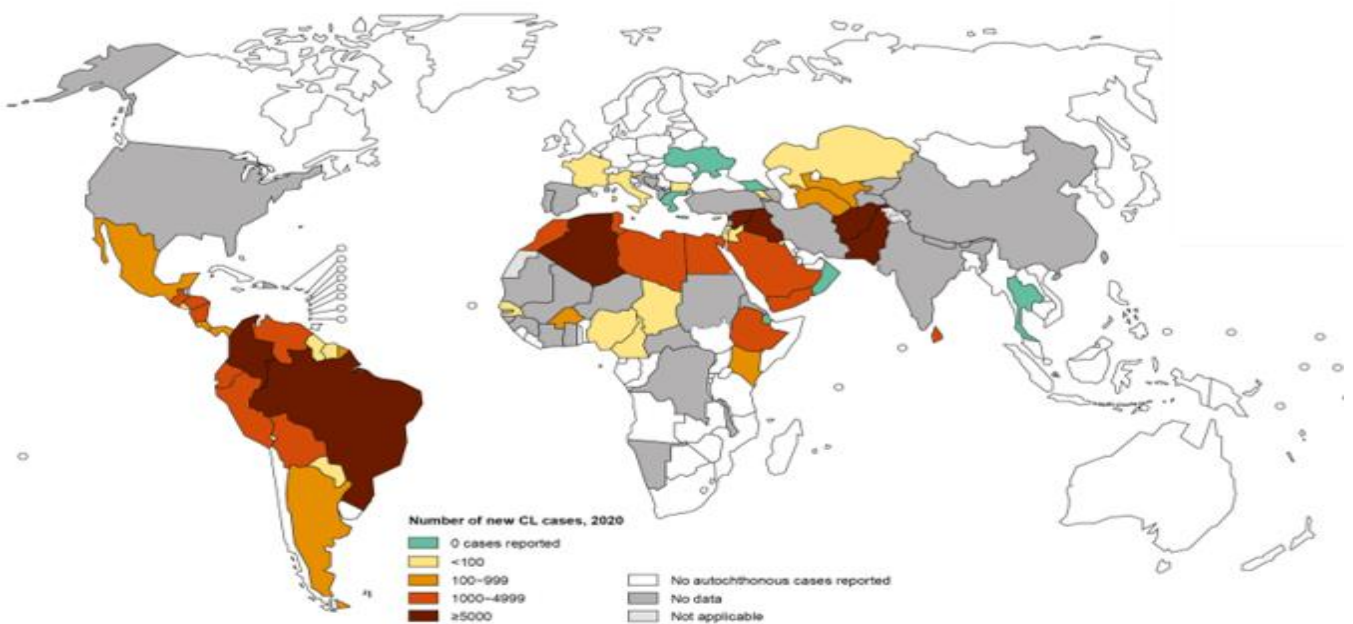


Figura 1- Incidência mundial de casos de leishmaniose cutânea em 2020.
Fonte: WHO, 2021.

Em relação à Leishmaniose visceral, em 2020 foram registrados 12.838 novos casos de LV no mundo. Desses, mais de 90% dos novos casos de LV notificados à OMS ocorreram em 10 países: Brasil, China, Etiópia, Eritreia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul, Sudão e Iêmen. Estima-se que 50.000 a 90.000 novos casos de LV ocorram anualmente em todo o mundo, a maioria dos casos ocorrem no Brasil, na África Oriental e na Índia e continua a ser uma das principais doenças parasitárias com potencial de surto e mortalidade (Figura 2).

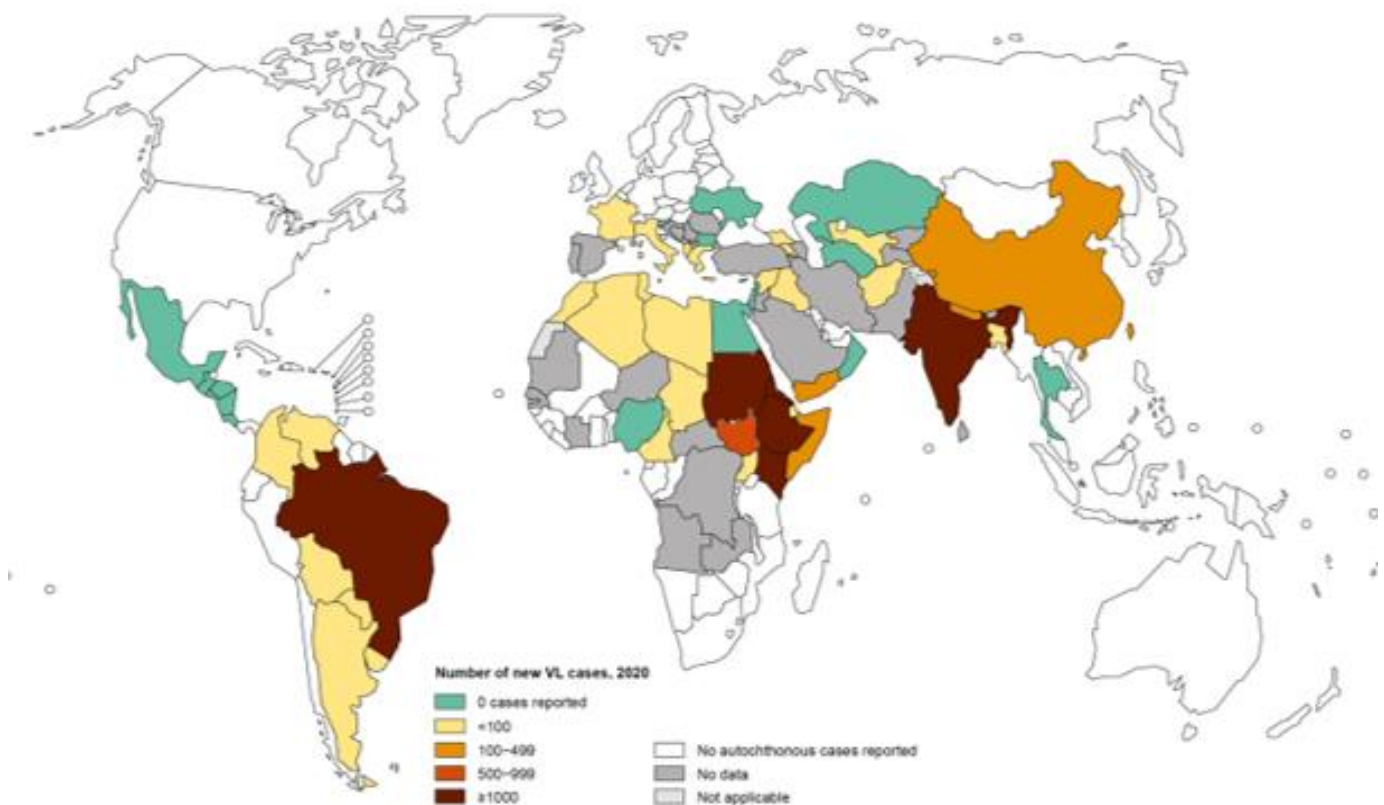


Figura 2- Incidência mundial de casos de leishmaniose visceral em 2020.

Fonte: WHO, 2021.

O Brasil é um dos países que mais notificam casos de leishmaniose por ano, sendo notificados em 2020, 16.560 casos de LC, destes a maioria dos casos foram registrados na região Norte (7.468), seguido da região Nordeste (4.110), Sudeste (2.616), Sul (2.119) e Centro-oeste (247), dos casos notificados na região norte 2.585 casos foram notificados pelo estado do Pará, sendo o estado que mais notifica casos de LC por ano no Brasil (SVSA/MS, 2020). Em relação a LV, em 2020 foram notificados no Brasil 2.202 casos de LV, destes a maioria dos casos foram notificados pela região Nordeste (1.246), região Sudeste (383), Norte (366), Sul (15) e Centro-

oeste (192), dos estados que mais notificaram casos de LV, destaca-se os estados do Maranhão (361), Minas Gerais (257), Ceará (227) e Pará (222; SVSA/MS, 2020).

As principais espécies de parasito responsáveis pela doença são: *L. major* e *L. tropica* no sul da Europa, Ásia e África; *L. mexicana* no México e nas Américas Central e do Sul; *L. (V.) braziliensis* nas Américas Central e do Sul (BRASIL, 2017; Frézard; Demicheli, 2010). No entanto, no Brasil, a leishmaniose cutânea (LC) é a mais incidente, existindo cerca de sete espécies envolvidas na sua ocorrência, as de maior relevância são: *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) guyanensis* e *Leishmania (V.) braziliensis* (BRASIL, 2017), sendo a *Leishmania (L.) amazonensis* a maior causadora de Leishmaniose cutânea difusa, estando associada a outras manifestações clínicas da doença, incluindo a leishmaniose muco-cutânea e visceral (Barral *et al.*, 1991; Aleixo *et al.*, 2006; BRASIL, 2006). Classificação taxonômica do gênero *Leishmania* segundo Lainson *et al.*, (1986):

- Reino: Protista Haeckel;
- Filo: Sarcomastigophora;
- Subfilo: Mastigophora;
- Classe: Zoomastigophorea;
- Ordem: Kinetoplastida;
- Família: Trypanosomatida;
- Gênero: *Leishmania*.

As espécies que causam leishmaniose são agrupadas em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. Essa classificação se dá de acordo com o desenvolvimento e proliferação dos parasitos no trato digestivo do inseto vetor (flebotomíneos). O subgênero *Viannia* reúne espécies que causam leishmaniose cutânea como: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) peruviana* (Lainson e Shaw, 1987). O subgênero *Leishmania* abrange espécies que causam leishmaniose cutânea e/ou visceral, algumas delas são: *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) pifanoi*, *L. (L.) venezuelensis*, *L. (L.) donovani* e *L. (L.) chagasi* (Lainson e Shaw, 1987; Grimaldi Junior *et al.*, 1989). Neste último subgênero, encontra-se a espécie *L. (L.) amazonensis*, uma das principais causadoras de LC e leishmaniose cutânea difusa no Brasil (BRASIL, 2006; BRASIL, 2017; Figura 3).

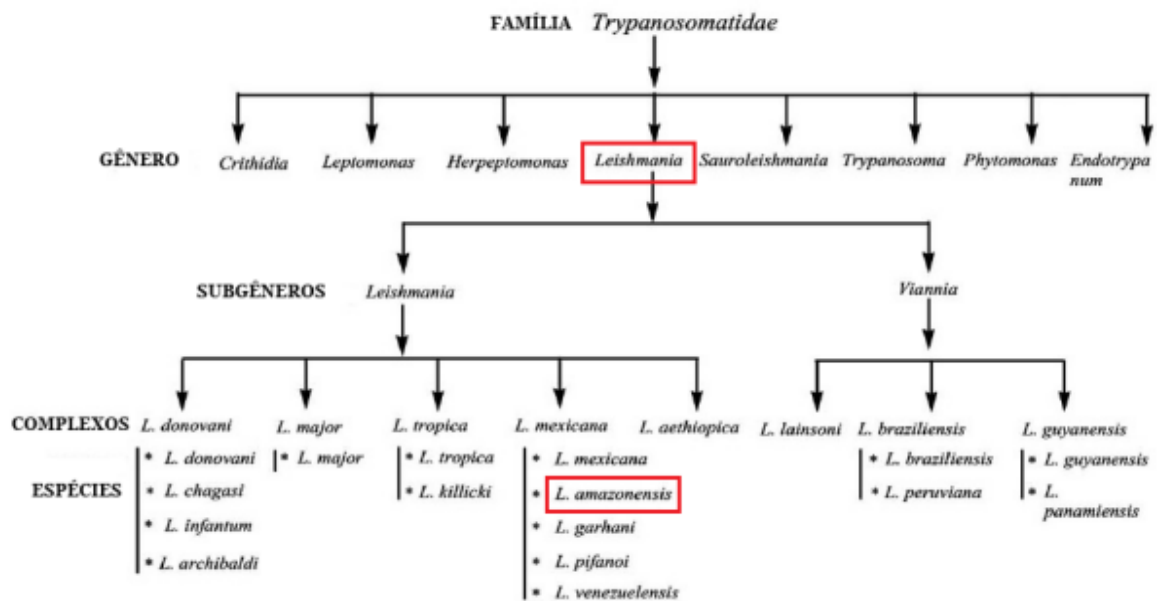


Figura 3: Taxonomia do gênero *Leishmania*.

Fonte: Adaptada de Mishra *et al.*, 2009.

Durante o ciclo de vida, os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam-se em duas formas evolutivas: formas promastigota e amastigota (Figura 4). As formas promastigotas são extracelulares e móveis, possuem morfologia mais alongada e contém um flagelo livre na região anterior, no citoplasma são observados vacúolos e o núcleo é semelhante ao da forma amastigota, o cinetoplasto é situado na região anterior ao núcleo. A forma amastigota são parasitas intracelulares e são geralmente ovóide ou esférico, sem flagelo livre, contém vacúolos no citoplasma, núcleo arredondado e cinetoplasto adjacente ao núcleo (Rogers *et al.*, 2002; Freitas, 2016; Figura 4).

As duas formas evolutivas apresentam estruturas comuns aos demais eucariotos, como retículos endoplasmáticos, complexo de golgi e mitocôndria, além disso, o corpo do protozoário é revestido por membrana plasmáticas constituídas de lipídios, ergosterol, carboidratos e proteínas, algumas proteínas de superfície como lipofosfoglica (LPG) e a glicoproteína (GP63) conferem proteção ao parasita contra a resposta imune do hospedeiro (Rogers *et al.*, 2002; Moraes, 2014).

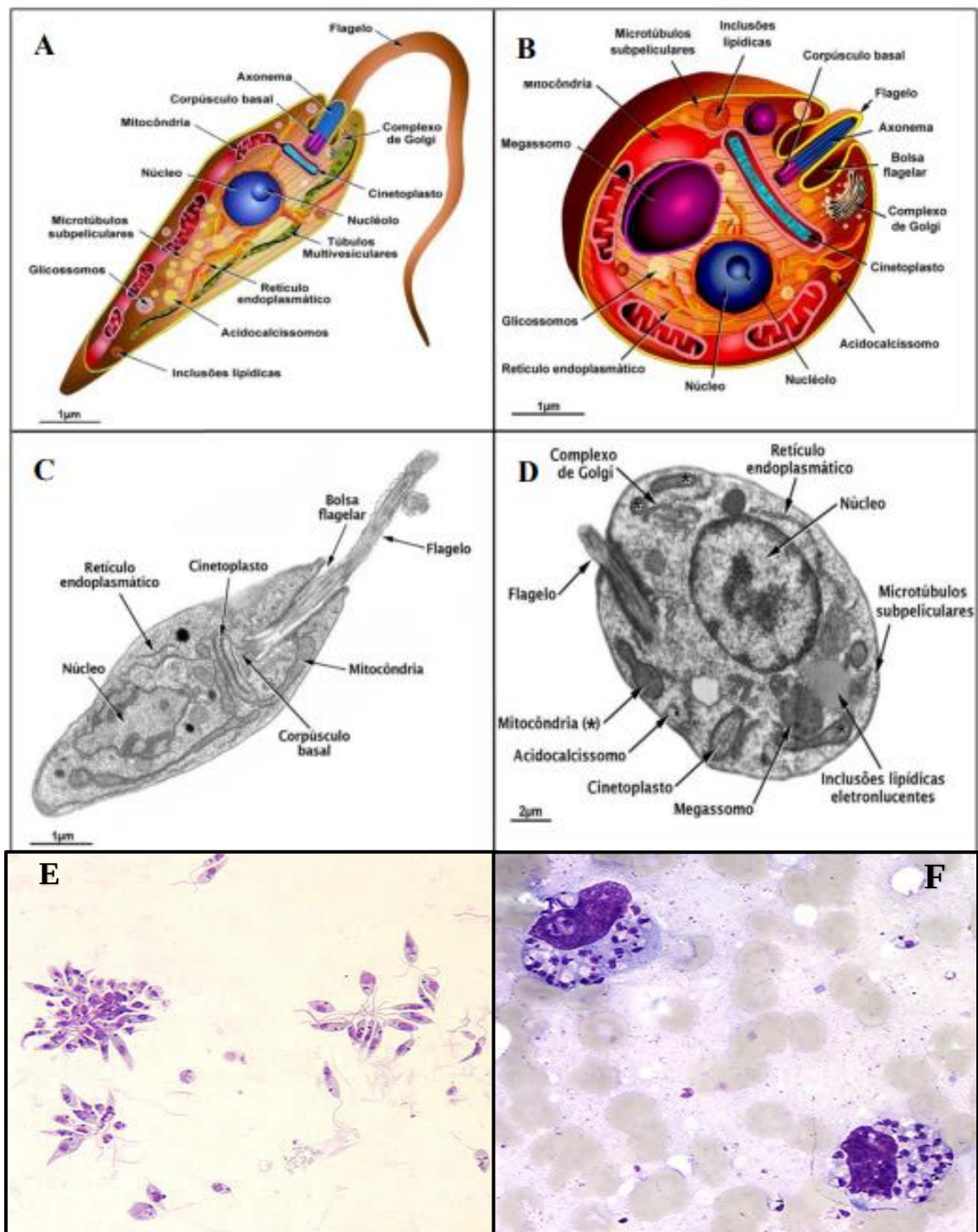


Figura 4 – Formas evolutivas dos protozoários do *Leishmania*.

Legenda: Representação das formas promastigotas (A, C e E) e amastigotas (B, D e F).

Fonte: Adaptada de Teixeira, et al., 2013 e Centers for disease control and prevention

O vetor da *Leishmania*, são as fêmeas dos mosquitos flebotomíneos, conhecido popularmente como mosquito-palha, são dípteros da família *Psychodidae* e gênero *Lutzomyia*. O ciclo biológico da doença inicia-se quando o mosquito (hospedeiro invertebrado) ingere formas amastigotas durante o repasto sanguíneo de um indivíduo

infectado (hospedeiro vertebrado), e posteriormente, ao realizar hematofagia em vertebrados não infectados, como por exemplo cães e humanos, o vetor realizar a ingestão de sangue e regurgita as formas infectantes do parasita contaminando-os (Rogers *et al.*, 2002; Pinto; Vargas, 2017; Maurer *et al.*, 2009).

O ciclo de vida da *Leishmania* é heteroxênico ou digenéticos (Figura 5), desta forma, os parasitas vivem alternadamente em insetos vetores (hospedeiros invertebrados) e hospedeiros vertebrados (Gontijo e Carvalho, 2003). O ciclo evolutivo inicia-se quando os hospedeiros vertebrados são infectados por formas promastigotas metacíclicas, transmitidas por fêmeas de insetos vetores, durante o repasto sanguíneo. O vetor utiliza suas peças bucais curtas e rígidas para dilacerar os tecidos e vasos sanguíneos do hospedeiro, durante o repasto sanguíneo o vetor realiza a ingestão de sangue e regurgita as formas promastigotas metacíclicas no local da picada, ao entrarem na circulação sanguínea, são fagocitadas por macrófagos e neutrófilos do hospedeiro (Ribeiro, 1987; Bates, *et al.*, 2004; Kaye; scott, 2011).

No processo de fagocitose do parasito pela célula hospedeira, duas moléculas de superfície da *Leishmania* são implicadas na ligação e captação de promastigotas: a protease de superfície GP63 e o lipofosfoglicano (LPG), que fazem com que esta forma seja resistente à ação de lise do sistema complemento e, dessa forma, seja fagocitada por células do sistema mononuclear sendo internalizadas em vacúolos parasitóforos (Desjardins e Descoteaux, 1997; Kaye; Scott, 2011). Dentro do macrófago ocorre a diferenciação para a forma amastigota e multiplicação intensa, por divisão binária, até o rompimento da célula hospedeira e liberação destas formas na corrente sanguínea, que serão fagocitadas por novos macrófagos dando continuidade ao processo de proliferação do parasito (Cunningham, 2002; Singh *et al.*, 2014).

Após um novo repasto sanguíneo, flebotomíneos fêmeas ingerem macrófagos infectados com amastigotas. Durante o trajeto pelo trato digestivo, os macrófagos se rompem, liberando as formas amastigotas, que irão se multiplicar por divisão binária no trato digestivo dos flebotomíneos, onde sofrerão a metaciclogênese, processo onde ocorre a diferenciação da forma promastigotas procíclicos não infectivo em promastigotas metacíclicos que são altamente infectivo, essas podem ser transmitidas para o hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo (Figura 5; Rogers *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2014; Freitas, 2016).

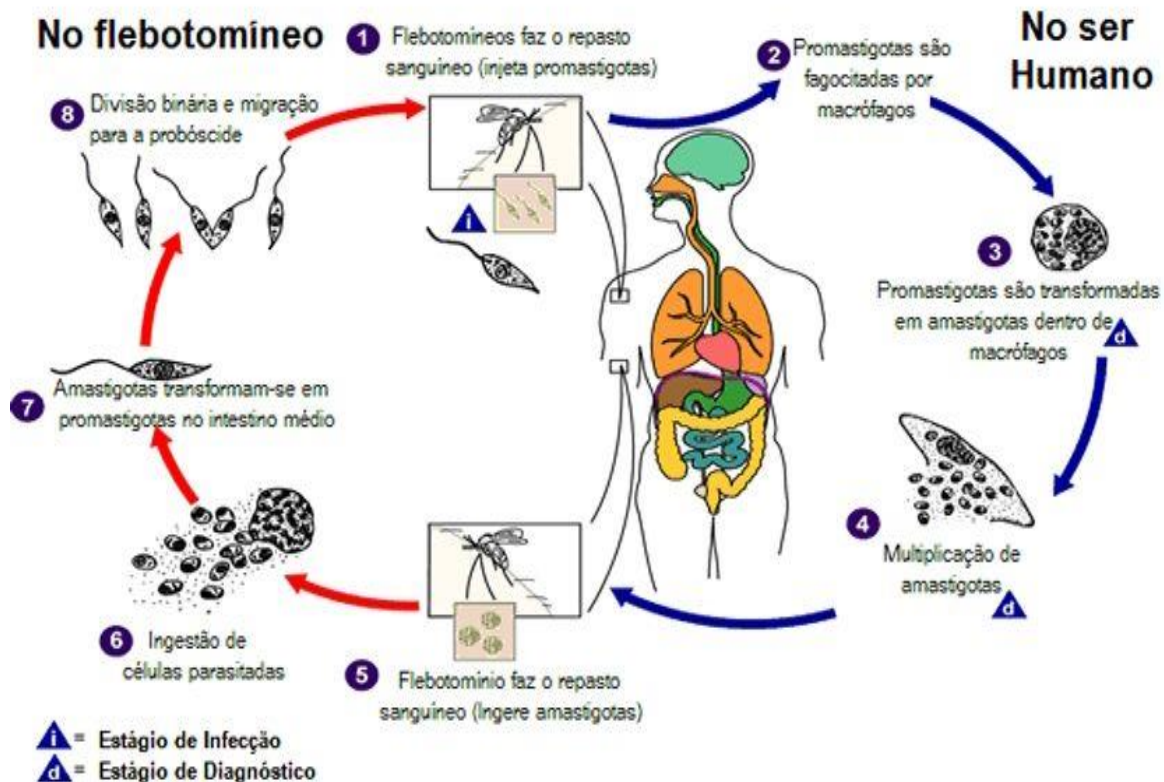


Figura 5 - Ciclo de vida da *Leishmania* spp.

Fonte: adaptado de CDC

O tratamento da leishmaniose é feito com o objetivo de acelerar a cura clínica, reduzir as cicatrizes, evitar recidivas e evolução das formas clínicas da doença, cutâneas para mucosas e muco-cutâneas, prevenindo assim o aparecimento de lesões mutilantes, nesse sentido, a abordagem terapêutica consiste em diminuir a carga parasitária e reduzir lesões por meio da quimioterapia antileishmania (Gontijo; Melo, 2004; PAHO, 2020). Os fármacos de primeira escolha utilizadas na terapia para leishmaniose são os antimoniais pentavalentes (Sb5+), que existem em duas formulações diferentes, o estibogluconato de sódio (Pentostan®) e antimoniato de meglumina (Glucantime®) que são utilizados para todas as formas clínicas de leishmaniose. Além desses fármacos, a anfotericina B e as pentamidinas são consideradas alternativas terapêuticas para leishmaniose (Gontijo e Melo, 2003; BRASIL, 2017; PAHO, 2020; Figura 6).

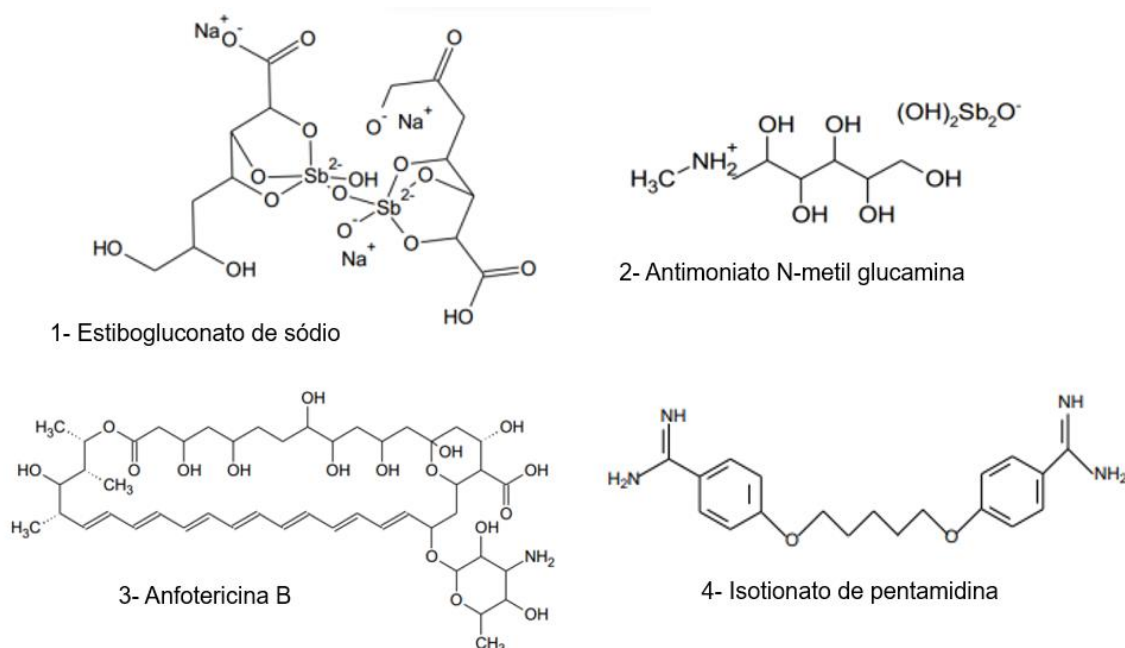


Figura 6: Estrutura química dos principais fármacos usados para tratamento de leishmaniose.
Fonte: Adaptada de Brígido, (2016).

No Brasil, o medicamento de primeira escolha à base de antimônio pentavalente é o antimoníato de meglumina (Glucantime®), visto que o estibogluconato de sódio (Pentostan®) não é comercializado no país. Ambos são eficazes para tratamento de diversas formas de leishmaniose, não existindo diferenças significativas quanto à eficácia terapêutica entre as formulações (Rath *et al.*, 2003; Oryan, *et al.*, 2015; BRASIL, 2017). O mecanismo de ação dos antimoniais ainda não foi totalmente elucidado, embora alguns autores sugiram que a molécula pentavalente ($\text{Sb}+5$) atue como pró-fármaco que, ao ser convertida em antimonial trivalente ($\text{Sb}+3$) no interior dos macrófagos, passa a ser ativa e adquire maior toxicidade contra o parasito, interferindo na atividade bioenergética, sendo capazes de atuar no metabolismo de ácidos graxos e glicose de formas amastigotas de *Leishmania* (Silva, 2017; Mcgwire; Satoskar, 2013).

Embora sejam eficazes, esses fármacos apresentam fatores que limitam sua utilização e consequentemente sua eficácia, como: altas doses, administração por via parenteral (intramuscular ou endovenosa) por período de tratamento prolongado, causa dores e desconforto, necessidade de internação, efeitos tóxicos e colaterais frequentes e problemas relacionados à cardiotoxicidade, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, além disso é contraindicado o uso em mulheres grávidas e em pacientes com HIV (Rath *et al.*, 2003; Demicheli e Frézard, 2005; BRASIL, 2017). Tais

fatores contribuem para a descontinuidade e interrupção do tratamento, isso associado a doses baixas ou inadequadas podem causar surgimento de parasitas resistentes às terapias convencionais (Rath *et al.*, 2003; Haldar *et al.*, 2011).

Além disso, a eficácia dos antimoniais pode ser variar de acordo com a região geográfica devido aos fatores citados anteriormente, visto que estes tem contribuído para o desenvolvimento de resistência parasitária em regiões endêmicas, como na Índia e na África (Haldar; Sen; Roy, 2011). Outro fator que dificulta a terapia da leishmaniose com antimoniais, é a coinfeção *Leishmania*-HIV, esta já foi registrada em cerca de 42 países, e tem tornado a leishmaniose ainda mais onerosa, devido à dificuldade no manejo clínico e terapêutico (Haldar; Sen; Roy, 2011; Mcgwire; Satoskar, 2014; OMS/OPAS, 2021).

As pentamidinas e as anfotericina B (desoxicolato e suas formulações lipossomais) tem sido medicamentos de segunda escolha quando não se obtém resposta ao tratamento com o antimonial pentavalente ou na impossibilidade de seu uso (Demicheli e Frézard, 2005; Goto e Lindoso, 2010; Mcgwire; Satoskar, 2013).

A anfotericina B tem sido eficaz, no tratamento das lesões de mucosas e LV, é a droga de escolha para o tratamento de pacientes grávidas ou portadores do vírus do HIV. Contudo, apresenta efeitos como cardiotoxicidade e nefrotoxicidade, limitando a utilização no ambiente hospitalar, devido a sua administração endovenosa (Gontijo *et al.*, 2003; Mcgwire; Satoskar, 2013; BRASIL, 2014). Além disso, a anfotericina B pode ocasionar várias reações adversas relacionadas as infusões do medicamento, causando constantemente febre, calafrios, vômitos e cefaleia, hipocalcemia e hiperpotassemia (Gonjito *et al.*, 2003; Filippin e Souza, 2006).

O tratamento de leishmaniose com isotionato de pentamidina, tem sido relacionado às seguintes reações adversas: diabetes mellitus, hipoglicemia grave, choque, miocardite e toxicidade renal (Mishra *et al.*, 2009; WHO, 2010), e assim como as anfotericinas, necessitam de acompanhamento hospitalar para administração parenteral, e requerem um tempo tratamento prolongado, e apresentam elevado índice de toxicidade e efeitos adversos, como alterações cardíacas (miocardite) e comprometimento renal (nefrotoxicidade), dificultando assim, o seu uso. (Rath *et al.*, 2003; BRASIL, 2017; Wyrepkowski, 2020).

De modo geral, os fármacos disponíveis para o tratamento da leishmaniose apresentam muitas limitações, possuem efeitos tóxicos, graves reações adversas,

tempo de tratamento prolongado e na maioria dos casos é administrado por via parenteral (endovenoso ou intramuscular), ocasionando dor e incômodo, necessitando em alguns casos de internação. Além de ser um tratamento de custo elevado, as limitações mencionadas dificultam a utilização e contribuem para o abandono e ineficácia do tratamento, possibilitando o surgimento de parasitas resistentes aos fármacos preconizados (Rath *et al.*, 2003; Oryan *et al.*, 2016; BRASIL, 2017).

Mediante o exposto, a busca pelo desenvolvimento de fármacos leishmanicida assume um caráter de urgência, sendo assim, devem ser consideradas alternativas terapêuticas que sejam mais eficazes, de baixo custo e menor toxicidade. Nesse sentido, deve-se priorizar biomoléculas que atue em enzimas específicas do protozoário, afim de evitar possíveis efeitos adversos e toxicidade para células humanas. Para isso, é preciso levar em consideração os alvos proteicos e vias metabólicas e bioquímicas que são essenciais para a sobrevivência do parasita (Chawla; Madhubala, 2010; Figueiredo *et al.*, 2018). Nesse contexto, uma alternativa a ser adotada para o desenvolvimento de novos medicamentos, se baseia na busca de moléculas bioativas em plantas medicinais e produtos naturais, aliado a estudos *in silico* que investiguem interações com alvos específicos de *Leishmania* (WHO; 2011; Cragg e Newman, 2013).

Nesse sentido, para a seleção das espécies vegetais que serão estudadas, pode-se adotar algumas estratégias, sendo comum a utilização de estudos etnobotânicos para nortear esta seleção. No caso da leishmaniose tegumentar, um inquérito realizado numa faixa litorânea da Bahia, perguntou a 100 pacientes se utilizavam alguma espécie vegetal para o tratamento da doença. Para o tratamento da ulceração ocasionada pelo parasito foram utilizadas 49 espécies diferentes, sendo que 31% alegaram utilizar a espécie *Dysphania ambrosioides* (França; Lago; Marsden, 1996).

2.2 *Dysphania ambrosioides*

A família *Amaranthaceae*, à qual pertence a espécie *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clements, é uma das maiores famílias da ordem *Caryophyllales*, é uma angiosperma, conhecida também como sub-família *Chenopodiaceae*, é composta por cerca de 169 gêneros e aproximadamente 2360 espécies.

No Brasil ocorrem cerca de 20 gêneros e 150 espécies da família *Amaranthaceae*, anteriormente a espécie *Dysphania ambrosioides* pertencia ao gênero *Chenopodium* (*Chenopodiaceae*), contudo, estudos morfológicos e filogenéticos recentes, promoveram mudança na classificação botânica e incluíram representantes da família *Chenopodiaceae* na família *Amaranthaceae*. Sendo assim, algumas espécies do gênero *Chenopodium* foram transferidas para o gênero *Dysphania*, como o *Chenopodium ambrosioides*, que atualmente é conhecido como *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (Mosyakin e Clemants, 2008; Fuentes-bazan *et al.*, 2012).

Classificação botânica da *Dysphania ambrosioides* de acordo com Mosyakin & Clemants (2008):

- Reino: Plantae
- Filo: Tracheophyta
- Classe: Magnoliopsida
- Ordem: Caryophyllales
- Família: Amaranthaceae
- Subfamília: Chenopodiaceae
- Gênero: *Dysphania*
- Espécie: *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants

Esta espécie possui distribuição cosmopolita, as quais podem ser encontradas principalmente em zonas tropicais e regiões temperadas (Santos *et al.*, 2010; Sá, 2013). Esta é nativa da América Central e do Sul, com ampla distribuição no Brasil e no mundo, sendo considerada pela Organização mundial da saúde como uma das espécies mais utilizadas na medicina tradicional (LORENZI e MATOS, 2002; SENNA, 2015).

As espécies da família possuem características variadas, no entanto, em sua maioria são arbustos, subarbustos e trepadeiras, anuais ou perenes (Lorenzi e Matos, 2002; Van Den Berg, 2010; Valério, 2014). Entretanto, a caracterização botânica *D. ambrosioides* apresenta-se como uma planta herbácea, anual ou perene, que pode atingir até 1 metro de altura, possui caule ereto e com muitas ramificações na base (Figura 7). Possui numerosas folhas, simples, alongadas, pecioladas, alternas e de variados tamanhos, de cor verde claro a verde escura. Na parte superior são

encontradas as folhas menores, lanceoladas e de margens inteiras. As inferiores geralmente são maiores, lanceoladas e com bordas irregulares, com relação às flores estas são pequenas com coloração verde, dispostas em espigas axilares densas. Produz numerosos frutos esféricos, pretos e ricos em óleo. Toda planta tem cheiro forte e característico (Lorenzi e Matos, 2002; Sá, 2016).



Figura 7 - *Dysphania ambrosioides*.

Fonte: Horto didático de plantas medicinais HU/CCS -UFSC.

A *D. ambrosioides* é conhecida popularmente como erva de santa maria, mastruço ou mastruz (Lorenzi e Matos, 2002; Sá, 2016). Estudos etnobotânicos, demonstram que a espécie é amplamente utilizada na medicina tradicional sob diversas formas, como xaropes, infusões, decoctos, macerados, sucos e emplastros, para tratar diversos problemas de saúde, como: verminoses (Ribeiro *et al.*, 2014), dores musculares e lesões (Garcia *et al.*, 2010), anemia, diarreia, gastrite, resfriado e tosse (Beltreschi *et al.*, 2018), além disso, é usado como antiparasitário, analgésico, para inflamação, dores em geral como cicatrizante e tratamento de feridas (Tene *et al.*, 2007; Patricio, 2009; Heredia-díaz *et al.*, 2018), além de outras alegações descritas no quadro 1 abaixo.

Quadro 1: Usos tradicionais de *Dysphania ambrosioides*

Partes usadas	Usos tradicionais	Modo de preparo e uso	Referências
Folha	Ferimentos	Maceração/via transdérmica	Yazbek <i>et al.</i> , (2019)
Folha e semente	Doenças infecciosas, doenças do sistema gastrointestinal e doenças do sistema respiratório	Infusão, decocção.	Bolson <i>et al.</i> , (2015)
Parte aérea	Vermífugo e calmante	Decocção e suco/oral	Albertasse <i>et al.</i> , (2010)
Folha	Vermífugo, inflamação e feridas	Suco/atadura	Cavalheiro <i>et al.</i> , (2018)
Partes aéreas, planta inteira e raízes	Infecções em geral, resfriado, vermes, depurativo, tranquilizante, insônia, gripe, sinusite, dor de estômago, gastrite, dor no braço, inflamação, cicatrização de feridas, fratura óssea e lesão	Decocção, infusão, maceração, fresco, cataplasma e suco	Ribeiro <i>et al.</i> , (2017)
Planta inteira	Malária	Infusão e maceração/oral	Frausin <i>et al.</i> , (2015)
Planta inteira	Como vermífugo, dor estomacal e expectorante	Suco/oral	Agra <i>et al.</i> , (2008)
Folha, talos, galho e raiz	Expectorante, tosse, lesão musculoesquelética, gripe, tuberculose e doença respiratória	Maceração, decocção, suco e infusão/oral	Magalhães <i>et al.</i> , (2019)
Folha	Febre, tosse, tosse com secreções e pneumonia	Infusão	Lemos <i>et al.</i> , (2016)
Folha	Vermes, baque, pneumonia, pulmão e dor de estômago	Oral	Pedrollo <i>et al.</i> , (2016)
Folha	Inflamação, constipação e gripe	Infusão	Penido <i>et al.</i> , (2016)
Folha	Mal-estar e vermes	Infusão	Caetano <i>et al.</i> , (2015)
Folha	Verme, gripe, tosse e dor de estômago	Suco, xarope e infusão/oral	Vásquez <i>et al.</i> , (2014)
Folha	Cicatrização de feridas, anti-inflamatório e diarreia	Suco e gesso (emplasto)	Monteiro <i>et al.</i> , (2011)
Folha, semente e raiz	Gastrite, fraturas, úlcera, verme, problemas intestinais, estômago, problemas na vesícula biliar, hematoma, úlcera, expectorante, inflamação e cólicas	Decocção, deixar de molho, suco, cataplasma, maceração e infusão/aplicação oral e tópica	Cartaxo <i>et al.</i> , (2010)
Folha ou galho	Vermes, gastrite, gripe, tosse, congestão, tuberculose, dor de estômago, lesões ulcerosas, erisipela e qualquer inchaço	Mistura, xarope, infusão, cataplasma e compressa	Coelho-ferreira, (2009)
Folha	Úlceras de leishmaniose	Decocção e pó/banho	Franca <i>et al.</i> , (1996)
Parte aérea	Dores musculares, lesões nos ossos, bronquite e vermes	Decocção, xarope e infusão/massagem, emplasto e oral	Garcia <i>et al.</i> , (2010)
Folha	Vermes e hematomas	Maceração/aplicação tópica	Da Costa <i>et al.</i> , (2017)

Fonte: Adaptado de Kasali *et al.*, 2021.

Devido a ampla utilização e potencial terapêutico da espécie, em 2009, o Ministério da Saúde incluiu a espécie *D. ambrosioides* na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde (RENISUS), na qual, foi destacada como planta de grande interesse a pesquisa científica (BRASIL, 2009).

Nesse sentido, estudos demonstraram que, algumas alegações de uso, realmente devem ocorrer, tais como: ação tripanocida (Borges *et al.*, 2012), esquistossomicida (Soares *et al.*, 2017), anti-helmíntica (Guimarães *et al.*, 2001; Quinlan *et al.*, 2002), antitumoral (Nascimento *et al.*, 2006; Cruz *et al.*, 2007), antioxidante e antibacteriana (Jaramillo *et al.*, 2012; Jesus *et al.*, 2018), antifúngica (Kumar *et al.*, 2007; Jardim, 2008), analgésica (Ibironke e Ajiboye, 2007), anti-inflamatória e cicatrizante (Trivellato-grassi *et al.*, 2013; Godinho, 2019).

O óleo essencial de *D. ambrosioides* foi ativo contra *Plasmodium falciparum* ($CI_{50} = 0,2 \mu\text{g/mL}$), sendo sua eficácia similar à cloroquina ($CI_{50} = 0,3 \mu\text{g/mL}$; Monzote *et al.*, 2014). Outro estudo avaliou a atividade antimalárica do extrato hidroalcolico *in vitro* em *P. falciparum*, sendo observado um efeito inibitório ($CI_{50} = 25,4 \mu\text{g/mL}$). Estudo *in vivo* deste extrato (5mg/kg do peso do animal) demonstrou que houve um aumento na sobrevivência dos animais infectados com *Plasmodium berghei*, havendo uma redução na parasitemia (Cysne *et al.*, 2016).

A ação tripanocida do óleo essencial de *D. ambrosioides* foi demonstrada contra forma epimastigota ($CI_{50} = 21,3 \mu\text{g/mL}$) e tripomastigota ($CI_{50} = 28,1 \mu\text{g/mL}$) de *Trypanosoma cruzi* (Borges *et al.*, 2012). Outro estudo também avaliou esta atividade em formas tripomastigota de *T. cruzi* ($CI_{50} = 1,9 \mu\text{g/mL}$) e de *T. brucei* ($CI_{50} = 0,2 \mu\text{g/mL}$; Monzote *et al.*, 2014). Os extratos diclorometano e metanólico obtidos das partes aéreas de *D. ambrosioides* foram ativos contra a *T. brucei* ($CI_{50} = 17,1 \mu\text{g/mL}$ e de $38,5 \mu\text{g/mL}$, respectivamente; Nibret e Wink, 2011).

Além disso, foi avaliada a atividade do extrato hidroalcolico de *D. ambrosioides* contra trofozoítos de *Giardia lamblia*, sendo obtida uma $CI_{50} = 198,18 \mu\text{g/mL}$ (Neiva *et al.*, 2014). A atividade do óleo essencial desta espécie, contra trofozoítas de *Entamoeba histolytica*, foi avaliada, sendo obtida uma $CI_{50} = 0,75 \mu\text{g/mL}$. A administração oral deste óleo (8 e 80mg/kg) em hamster infectado com *E. histolytica* demonstrou um efeito amebicida eficaz (Ávila-blanco *et al.*, 2014).

Visando avaliar o potencial leishmanicida desta espécie, foi avaliado o óleo essencial contra forma promastigota de *L. infantum* ($CI_{50} = 6,4 \mu\text{g/mL}$) e *L. donovani* ($CI_{50} = 4,5 \mu\text{g/mL}$) e forma amastigota de *L. donovani* ($CI_{50} = 5,1 \mu\text{g/mL}$), sendo

considerado ativo nas duas formas e espécies (Monzote et al., 2007; Monzote et al., 2014). Camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* foram tratados com o óleo essencial (30mg/kg), sendo observada uma redução na lesão ocasionada pelo parasito, bem como da carga parasitária (Fidalgo, 2007).

Além disso, o extrato hidroalcoólico apresentou, contra forma promastigota de *L. (L.) amazonensis*, uma CI_{50} de 250 $\mu\text{g/mL}$ (Godinho, 2019). Outro estudo, avaliou o extrato aquoso das partes aéreas de *D. ambrosioides*, contra as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, inibindo o crescimento em 87,4% a 100 $\mu\text{g/mL}$ (Queiroz et al., 2014). Além disso, o extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides* foi testado contra formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, sendo observado uma redução na infecção dos macrófagos em 64% (concentração=250 $\mu\text{g/mL}$), também houve efeito profilático para a infecção quando os macrófagos foram tratados com 125 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$ do extrato (Lima Junior et al., 2014).

Em relação às atividades antiparasitárias, a maioria dos estudos avaliaram o potencial do óleo essencial de *D. ambrosioides*, sendo ativos em *P. falciparum*, *T. cruzi*, *T. brucei* (Monzote et al., 2014), *E. histolytica* (Avila-blanco et al., 2014) e *L. amazonensis* (Monzote et al., 2007; Lima Junior et al., 2014; Monzote et al., 2014). Poucos estudos avaliaram a atividade de extratos obtidos da espécie, nos casos da malária e leishmaniose os resultados foram contraditórios e precisam ser melhor investigados (Quadro 2).

Quadro 2: Atividade antiparasitária de *D. ambrosioides*

Parasito	Amostra	Resultado	Referência
Malária			
<i>P. falciparum</i>	Óleo essencial	Ativo	1
<i>P. falciparum</i>	EH	Moderadamente ativo	2
<i>P. berghei</i>	EH	Aumenta a sobrevivência e reduz parasitemia	2
<i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>T. brucei</i>			
<i>T. cruzi</i>	Óleo essencial	epimastigota e tripomastigota moderada	3
<i>T. cruzi</i>	Óleo essencial	tripomastigota ativo	1
<i>T. brucei</i>	Óleo essencial	tripomastigota ativo	1
<i>T. brucei</i>	Extrato	Moderada atividade	4
Parasitas intestinais			
trofozoítas de <i>Entamoeba histolytica</i>	Óleo essencial	Inativo	5
hamster infectado com <i>E. histolytica</i>	Óleo essencial	Ativo	5
trofozoítas de <i>Giardia lamblia</i>	EHDA	Inativo	6
Leishmania			
Promastigota	óleo essencial	<i>L. infantum</i> e <i>L. donovani</i> ativo	1,7
<i>In vivo</i> , <i>L. amazonensis</i>	Óleo essencial	Reduz infecção dos macrófagos e cicatrização	8
<i>In vivo</i> , <i>L. amazonensis</i>	EHDA	Redução da infecção e efeito profilático	9
<i>L. amazonenses</i>	EH	Inativo	10
<i>L. amazonenses</i>	Extrato aquoso	100mg/mL = 87,4% de inibição	11

In vitro: Ativo: $CI_{50} \leq 10 \mu\text{g/mL}$, moderada atividade CI_{50} entre 11 a $50 \mu\text{g/mL}$; inativo $CI_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$
 Referências: 1-Monzote *et al.*, 2014; 2-Cysne *et al.*, 2016; 3- Borges *et al.*, 2014; 4-Nibeet e Wink, 2011; 5- Avala-Blanco *et al.*, 2014; 6- Neiva *et al.*, 2014; 7- Monzote *et al.*, 2007; 8- Fidalgo, 2007; 9- Lima-Junior *et al.*, 2014; 10- Godinho, 2019; 11- Queiroz *et al.*, 2014.

O extrato hidroalcoólico da folha *D. ambrosioides* demonstrou propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas na osteoartrite. Após o décimo dia de tratamento com extrato (doses= 0,5 mg/kg, 5 mg/kg e 50 mg/kg), observou-se a diminuição do edema do joelho, inflamação sinovial e outros sintomas relacionados à dor (Calado *et al.*, 2015). Outro estudo avaliou o efeito anti-inflamatório e cicatrizante do extrato etanólico de folhas e caules (doses = 150, 300 e 500 mg/kg) que inibiu significativamente o edema de pata induzido por carragenina (56%), interferindo nos níveis de prostaglandina-E2 (55%) e bradicinina (62%). Além disso, o tratamento tópico com o extrato etanólico das folhas e caules aumentou a cicatrização de feridas cutâneas causadas por feridas induzidas em camundongos (Trivellato grassi *et al.*, 2013). Ademais foi avaliado a atividade anti-inflamatória e cicatrizante de uma pomada contendo o extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides*, sendo observado efeito anti-

inflamatório e cicatrizante em lesões induzidas por infecção de *L. amazonensis*, em camundongos, reduzindo a lesão e carga parasitária (Godinho, 2019).

Estudos químicos da espécie *D. ambrosioides* têm identificado uma grande variedade de compostos químicos de interesse biológico, sendo eles: terpenos, esteróides, saponinas, flavonoides, cumarinas, polifenóis e alcaloides. Dessas as classes, os flavonoides e terpenos têm sido descritos como sendo os principais constituintes da espécie *D. ambrosioides* (Jain *et al.*, 1990; Kiuchi *et al.*, 2002; Hallala *et al.*, 2010; Jardim *et al.*, 2010; Okhale *et al.*, 2012; Barros *et al.*, 2013).

A partir de extratos das folhas, caules e partes aéreas já foram isolados, os seguintes terpenos: Ascaridol (Paré *et al.*, 1993; Kiuchi *et al.*, 2002; Trivellato Grassi *et al.*, 2013; Hou *et al.*, 2017), Chenopanonona (Ahmed, 2000); (1R,2S,3S,4S)-1,2,3,4-tetrahidroxi-p-mentano (Ahmed, 2000; Trivellato Grassi *et al.*, 2013; Hou *et al.*, 2017), 1,4-di-hidroxi- p-ment-2-eno (Ahmed, 2000; Hou *et al.*, 2017), (1R, 4S) e (1S, 4S)-p-Mentha-2,8-dien-1-hidroperóxido, (1R, 4S) e (1S, 4S)-p-mentha-2,8-dien-1-hidroperóxido (KIUCHI *et al.*, 2002), 4-hidroxi-4(α , β)-isopropil-2-metil-2-ciclohexen-1-ona, 1-metil-4 β -isopropil-1-ciclohexeno-4 α ,5 α ,6 α -triol, (1S,2S, 3R, 4S)-1-metil-4-(propan-2-il)ciclohexano-1,2,3,4-tetrol, (1R,2S)-3-p-menton-1,2-diol, (1R,4S)-p-mento-2-en-1-ol (Hou *et al.*, 2017), *Cis-p*-Menthadieno-1(7),8ol-2 (Paré *et al.*, 1993; Figura 8).

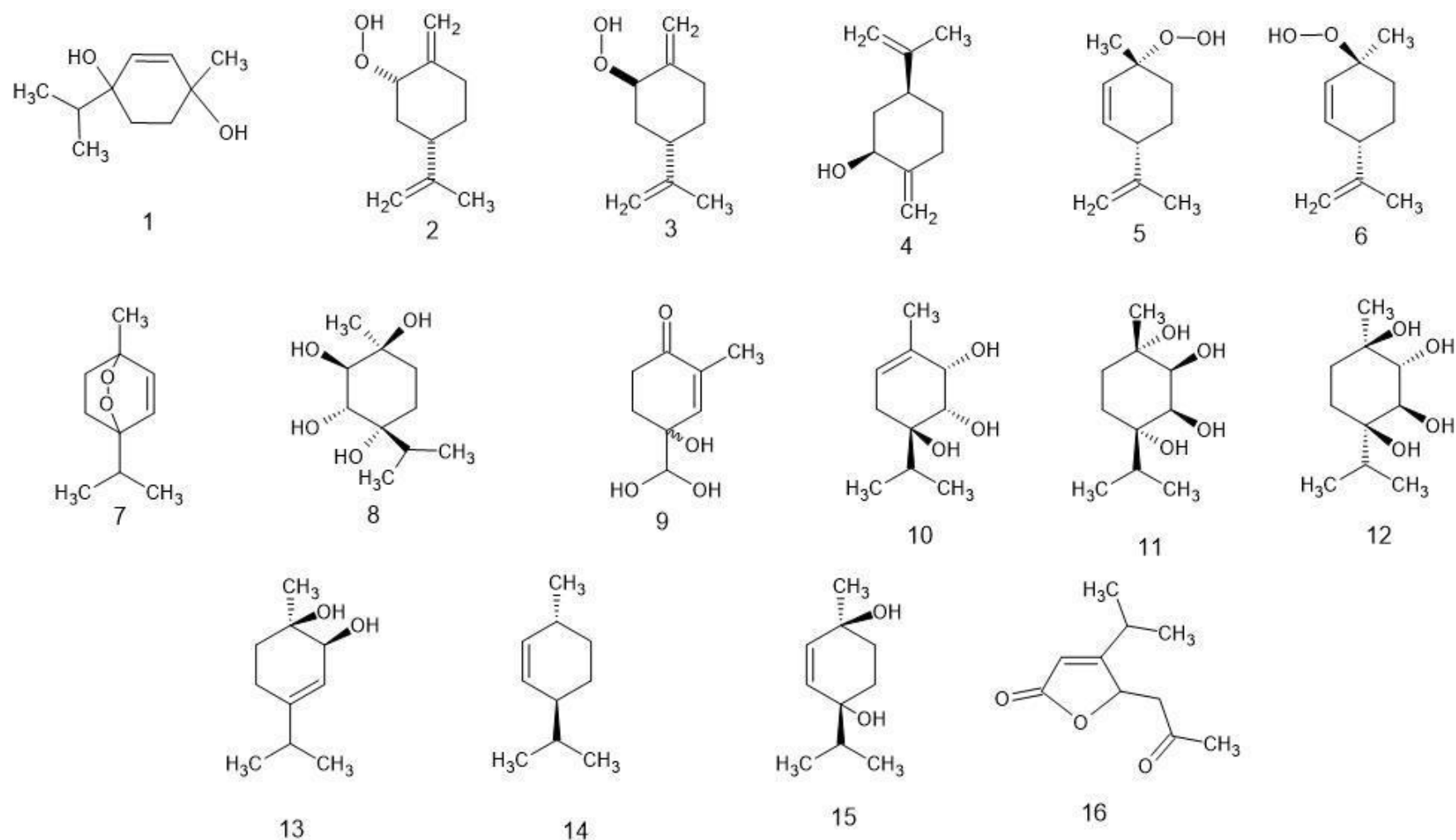


Figura 8: Terpenos isolados da espécie *Dysphania ambrosioides*

Legenda: 1) 1,4-Dihidroxi-p-ment-2-eno; 2) (-)-(2S, 4S)-p-Mentha-1(7),8-dien-2-hidroperóxido; 3) (-)-(2R, 4R)-p-Mentha-1(7),8-dien-2-hidroperóxido; 4) Cis-p-Menta-1(7),8-dien-2-ol; 5) (-1R, 4S)-p-Mentha-1(7),8-dien-2-hidroperóxido; 6) (-1S, 4S)-p-Mentha-1(7),8-dien-2-hidroperóxido; 7) Ascaridol; 8) 1,2,3,4-Tetrahidroxi-p-mentano; 9) 4-Hidroxi-4- α -isopropil-2-metil-2-ciclo-hexen-1-ona; 10) 1-Metil-4- β -isopropil-ciclohexano-4- α ,5- α ,6- α -triol; 11) (1S,2S,3R,4S)-1Metil-4-(propano-2-il)ciclohexano-1,2,3,4-tetrol; 12) (1R, 2S,3S,4S)-1,2,3,4-Tetrahidroxi-p-mentano; 13) (1R, 2S)-3-p-menton-1,2-diol; 14) (1R, 4S)-p-mento-2-em-1-ol; 15) 1,4-di-hidroxi-p-ment-2-eno; 16) Chenopanona.

Da classe dos flavonóides foram isolados as seguintes substância (Figura 9): Kaempferol (Jain *et al.*, 1990; Ghareeb *et al.*, 2016), Quercetina, Kaempferol-3-rhamnoside-4'-xyloside, Kaempferol-3-rhamnoside-7'-xyloside, Isorhamnetina (Jain *et al.*, 1990), Kaempferol 3-O- α -1-1C4-ramnosil-(1 $\rightarrow$ 2 $\rightarrow$)- β -D-4C1-xilopiranosídeo, kaempferol 3-O- α -L-1C4-ramnopiranosídeo, Kaempferol 7-O- α -L-1C4-rhamnopyranoside (Ghareeb *et al.*, 2016) e Kaempferol 7-rhamnoside (Arisawa *et al.*, 1971).

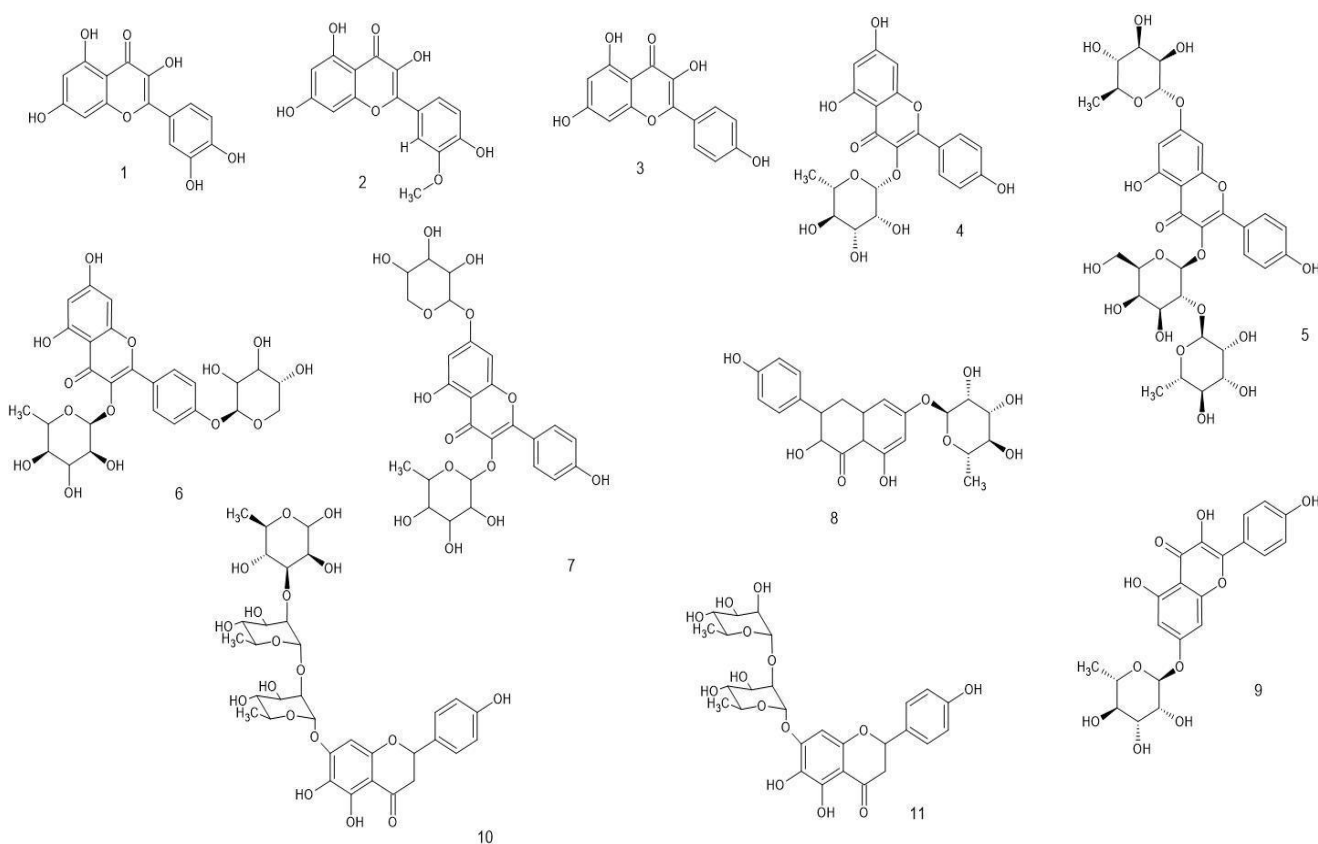


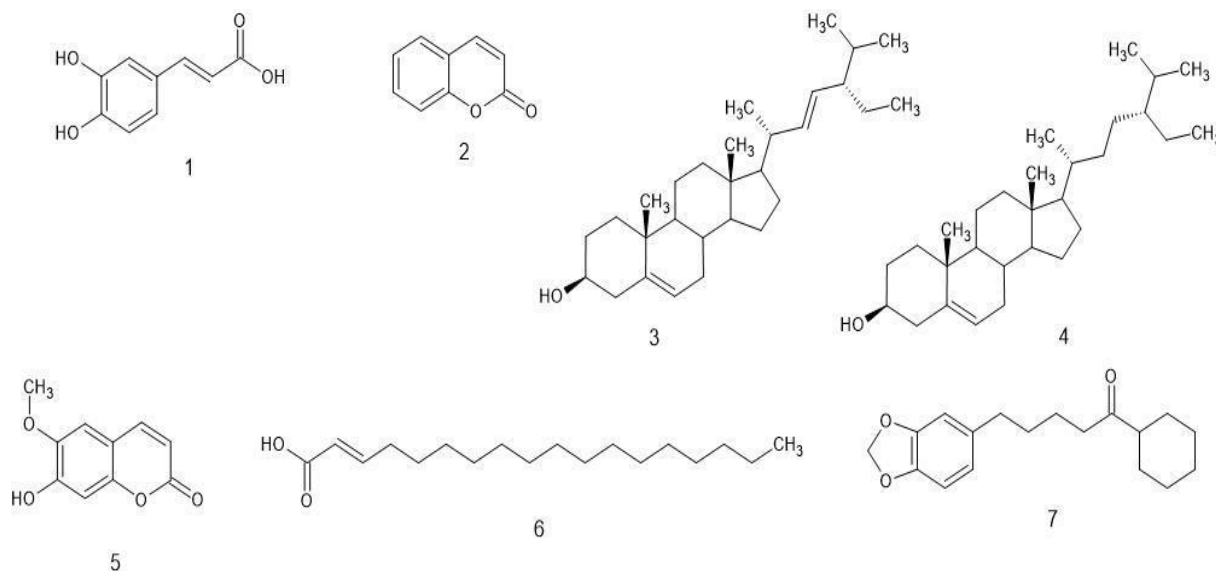
Figura 9: Flavonoides isolados da espécie *Dysphania ambrosioides*.

Legenda: 1) Quercetina; 2) Isorhamnetina; 3) Kaempferol; 4) kaempferol-3-O- α -L-ramnosídeos; 5) Kaempferol-3-O- α -1-1C4-ramnosil-(1 $\rightarrow$ 2 $\rightarrow$)- β -D-4C1-xilopiranosídeo); 6) Kaempferol 3-ramnosídeo-4'-xilósídeos; 7) Kaempferol 3-ramnosídeo 7-xilósídeos; 8) kaempferol-7-O- α -L-ramnopiranosídeos; 9) Raempferol-7-ramnosídeo; 10) Escutelarina-7-O- α -ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- α -ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- α -ramnopiranosídeos; 11) Scutellarein-7-O- α -ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- α -ramnopiranosídeos.

Além de terpenos e flavonóides foram isolados compostos de outras classes, como as cumarinas: 1,2-benzopirona (Ghareeb *et al.*, 2016) e escopoletina (Shan & Khan, 2017), o alcaloide: 1-piperoilpiperidina (Shan & Khan, 2017), os esteróides:

β -sitosterol e Stigmasterol, o ácido graxo: Ácido octadecanóico (Shan & Khan, 2017) e o composto fenólico ácido cafeico (Ghareeb *et al.*, 2016; Figura 10).

Figura 10: Outros metabólitos isolados da espécie *D. ambrosioides*



Legenda: 1) Ácido Cafeico; 2) 1,2-Benzopirona; 3) Stigmasterol; 4) β -Sitosterol; 5) Escopoletina; 6) Ácido Octadecanoico; 7) 1-Piperolpiperidina.

Além da atividade biológica do óleo essencial e/ou extratos de *D. ambrosioides*, alguns estudos avaliaram a atividade de compostos isolados da espécie. O composto com maior número de estudos para a atividade antiparasitária é o ascaridol, que parece muito promissor como leishmanicida (Quadro 3; Monzote *et al.*, 2014). Além disso, o ascaridol apresentou efeito analgésico, sedativo (Okuyama *et al.*, 1993), antitumoral (Efferth *et al.*, 2002) e antifúngico (Paré *et al.*, 1993).

Em relação aos flavonóides isolados da espécie, em geral os estudos avaliaram apenas a atividade antioxidante das substâncias, onde os glicosídeos flavônicos kaempferol e seus derivados, kaempferol-3-O- α -L-1C₄-ramnopiranosídeo (afzelin), kaempferol-7-O- α -L-1C₄-ramnopiranosídeo e Kaempferol-3-O - α -1-1C₄-ramnosil-(1^{'''}→2^{''})- β -D-4C¹-xilopiranosídeo, apresentaram atividade antioxidante *in vitro* (Ghareeb *et al.*, 2016). No entanto, estudos feitos com flavonóides derivados do kaempferol e quercetina isolados de outras espécies, demonstraram ser promissores contra parasitas de *Leishmania* (Schinor *et al.*, 2007; Araújo *et al.*, 2019; Abdeyazdan *et al.*, 2022).

Quadro 3: Atividades antiparasitárias de compostos isolados de *D. ambrosioides*

Parasito	Composto	CI ₅₀ (µg/mL ou µM)	Resultado	Referência
<i>T. cruzi</i>				
Epimastigota	Ascaridol	23µM	Inativo	1
Epimastigota	(2S,4S)-p-mentha-1(7),8-dien-2-hidroperóxido	1,2 µM	Ativo	1
Epimastigota	(2R,4S)-p-mentha-1(7),8-dien-2-hidroperóxido	1,6 µM	Ativo	1
Epimastigota	(1R,4S)-p-mentha-2,8-dien-1-hidroperóxido	3,1 µM	Moderada	1
Epimastigota	(1S,4S)-p-mentha-2,8-dien-1-hidroperóxido	0,8 µM	Ativo	1
Malária				
<i>P. falciparum</i>	Ascaridol	0,1 µM	Ativo	2
Leishmanioses				
Promastigota, <i>L. amazonensis</i>	Ascaridol	0,1 µg/mL	Ativo	3
Amastigota <i>L. amazonensis</i>	Ascaridol	0,3 µg/mL	Ativo	3

In vitro: Ativo: CI₅₀ ≤ 10 µg/mL ou < 2µM, moderada atividade CI₅₀ entre 11 a 50 µg/mL ou 2-5µM; inativo CI₅₀ > 50 µg/mL ou > 5µM

Referências: 1- Kiuchi et al., 2002; 2- Pollack; Segal e Golenser, 1990; 3- Monzote et al., 2014

Diante do exposto, observou-se que a espécie tem um grande potencial biológico, principalmente contra doenças parasitárias, como leishmaniose. No entanto, até o presente, a maioria dos estudos estão relacionados principalmente com composto de alta polaridade, como óleo essencial. Logo, é importante investigar o potencial leishmanicida de amostras de diferentes polaridades e partes da planta, bem como avaliar as interações entre as substâncias isoladas da espécie e as proteínas alvos dos parasitos de *Leishmania* (docking molecular).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivos Geral

- Realizar estudo fitoquímico, *in sílico* e avaliar a atividade antileishmania de *Dysphania ambrosioides*.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar estudos fitoquímicos de *D. ambrosioides*;
- Realizar a predição físico-química, farmacocinética e toxicológica de compostos presentes na *D. ambrosioides*;
- Realizar estudos de docagem molecular para prever a interação dos compostos com alvos moleculares relevantes para *Leishmania*;
- Avaliar a atividade antipromastigota de *D. ambrosioides* frente a espécie *Leishmania (L.) amazonensis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 EQUIPAMENTOS

- Agitador magnético mini com aquecimento - Quimis;
- Autoclave - Phoenix;
- Banho Maria - SOLAB Científica, modelo SL150;
- Balança analítica Bel Engineering M214Ai
- Banho-maria – SOLAB Científica, modelo SL 150;
- Banho de Ultrassom – Tecnal Equipamentos para laboratório, modelo 2210 Branson;
- Bomba de vácuo TECNAL TE-0581;
- Capela de exaustão SP Labor;
- Cabine de fluxo laminar vertical - Pachane, modelo PA 310;
- Câmara de contagem Neubauer espelhada - Improved;
- Centrífuga para tubos - Quimis;
- Chapa aquecedora;
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência - Shimadzu® Prominence LC20AT;
- Dessecador de vidro;
- Destilador de água
- Espectrofotômetro de infravermelho - Shimadzu® IRPrestige-21;
- Espectrofotômetro de varredura de múltiplos poços
- Estufa de esterilização e secagem SolidSteel;
- Estufa ventilada para secagem de material vegetal;
- Estufa BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) - Byosistens Com. Importadora e Exportadora de Equipamentos para Laboratório LTDA, modelo HF212UV
- Evaporador rotatório fisaton, modelo R 803, com banho-maria modelo 558
- Micropipetas - volume ajustável 10µL - 100 µL, 100 µL - 1000 µL;
- Leitora de Microplacas - Biotek, modelo ELX 808
- Microscópio óptico
- Microscópio invertido - Zeiss, modelo Axiovert 25;

- Notebook

4.1.2 SOLVENTES, REAGENTES E OUTROS

- Água destilada;
- Acetato de etila P.A - Isofar®;
- Ácido Clorídrico - Isofar®;
- Ácido sulfúrico - Isofar®;
- Álcool Metílico (Metanol) – CAQ;
- Álcool grau 96°GL (Álcool Etílico hidratado) – Santa Cruz®;
- Diclorometano P.A – Isofar®;
- Dimetil-sulfóxido (DMSO) – Sigma-Aldrich;
- Hexano P.A – CAQ (CASA da Química Ind. E Com. LTDA);
- Sílica gel 60 para cromatografia de camada delgada Flash - Merck®;
- Anisaldeído;
- Cloreto de alumínio;
- Cloreto férrico;
- Ferrocianeto de potássio;
- Iodeto de potássio;
- Hidróxido de potássio;
- Hidróxido de sódio;
- Subnitrito de bismuto.

4.1.3 FÁRMACOS, MEIOS DE CULTURA E OUTROS

- Anfotericina B 50 mg sol. Inj – Cristália produtos farmacêuticos;
- Bicarbonato de sódio – Sigma-Aldrich;
- Fosfato de sódio monobásico anidro P.A - Labsynth produtos para laboratório;
- Fosfato de sódio dibásico anidro P.A - Labsynth produtos para laboratório;
- Infusão de Agar base para Agar sangue - Becton Dickinson Ltda;
- Meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute);
- MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium - Sigma;
- Penicilina G 10.000 units/mL + estreptomicina 10.000 ug/mL – Gibco;

- Soro bovino fetal – Gibco.

4.1.4 MATERIAL PLÁSTICO E METAL

- Cuba cromatográfica;
- Espátulas de metal;
- Estantes plásticas;
- Garrafas para cultura de células - TPP-Switzerland;
- Lamínula 13 mm circular G13C - Glasscyto;
- Papel alumínio comercial;
- Pipetas Pasteur de plástico;
- Placas de cultura de células de 96 poços, fundo chato com tampa;
- Ponteira 200 µl amarela, tipo universal - Labware Manufacturing CO;
- Ponteira 100-1000 µl, azul, tipo universal - Kartell SPA;
- Tubo cônico graduado 15 mL não estéril (Tipo Falcon);
- Tubos de microcentrifuga (Tubos eppendorf) de 1,5 e 2,0 mL – Alfa;

4.1.5 VIDRARIAS

- Balão volumétrico de 100 mL, 250 mL, 500 mL – Laborquimi;
- Bastão de vidro;
- Becker de 600, 1000 mL – Sateli;
- Condensador;
- Cuba cromatográfica;
- Erlenmeyer;
- Pipetas de vidro graduadas de 1 mL, 5 mL, 10 mL – Vidrolabor;
- Proveta de 50 mL, 200 mL, 500 mL, 100 mL – Vidrolex;

4.1.6 Reveladores utilizados na prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada (CCD)

4.1.6.1 Anisaldeído sulfúrico

Para esta solução foi utilizado 0.5 mL de solução-mãe de anisaldeído em 10 mL de ácido acético glacial. Em outro frasco, se adicionou 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado. Estas soluções foram misturadas e acondicionadas em frasco âmbar (100 mL) e conservadas sob refrigeração (WAGNER et al., 1984).

4.1.6.2 Cloreto de alumínio a 2% em metanol

Para esta foi solubilizado 1g de cloreto de alumínio (AlCl_3) em 50 mL de álcool etílico absoluto, esta solução foi armazenada em frasco âmbar (100 mL) sob refrigeração (WAGNER et al., 1984).

4.1.6.3 Dragendorff

Solução A – 0,850g de subnitrato de bismuto ($\text{BiONO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) em 10 mL de ácido acético glacial e 40 mL de água destilada;

Solução B - 8g de iodeto de potássio (KI) em 20 mL de água destilada.

Após a preparação de cada uma das soluções, se adiciona, aos poucos, a solução A em B, resultando em uma solução estoque. Para a pulverização em CCD se diluiu 2,0 mL de solução estoque em 4 mL de ácido acético glacial e 20 mL de água destilada, esta acondicionada em frasco âmbar (100 mL; WAGNER et al., 1984).

4.1.6.4 Hidróxido de potássio a 5% em metanol

Para este reagente, foi solubilizado 2,5g de hidróxido de potássio (KOH) em 50 mL de metanol, esta solução foi armazenada em frasco âmbar (100 mL) sob refrigeração (WAGNER et al., 1984).

4.1.6.5 Solução de ferrocianeto de potássio a 1% e Cloreto férrico a 2%

Para o ferrocianeto de potássio ($\text{C}_6\text{FeK}_4\text{N}_6$) a 1%, foi solubilizada 0,25g deste soluto em 25 mL de água destilada. Para a o cloreto férrico (FeCl_3) a 2%, foi solubilizado 1g do soluto em 25 mL de água destilada. Ambas as soluções foram

armazenadas em frasco âmbar (100 mL) e sob refrigeração e somente no momento do uso são misturadas (WAGNER et al., 1984).

4.1.7 PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO

4.1.7.1 Meio Novy-Nicolle-Mcneal (NNN)

Para o preparo deste meio foram dissolvidos 14 g de Agar base e 6 g de cloreto de sódio em 1000 mL de água destilada. Em seguida, a mistura foi submetida a aquecimento até a sua total dissolução, sendo autoclavada à temperatura de 121° C por 30 minutos e reservada a 55° C em banho Maria para não solidificar, sendo em seguida adicionado o sangue de coelho desfibrinado (10 – 15%) que foi adicionado à mistura estéril. O meio foi homogeneizado e distribuído em tubos (5 mL/tubo), sendo estes inclinados até solidificação, após solidificados os tubos foram mantidos em posição vertical a uma temperatura de até 30° C por 24 horas para exsudação completa do meio dentro do tubo. O preparo deste meio segue o Protocolo Experimental do Instituto Evandro Chagas (IEC/SVS/MS).

4.1.7.2 Meio RPMI 1640 para Leishmania

No preparo do meio, utilizou-se recipiente de Erlenmeyer, onde se acrescentou 200 mL de água autoclavada e 10,4 g de meio RPMI 1640 (pó), realizando uma dissolução. Em seguida foi acrescentado 2 g de bicarbonato de sódio e 5g de tampão HEPES, completando um volume de 1000 mL com água autoclavada. O pH do meio foi verificado e ajustado sempre quando não se encontrava em pH neutro (pH= 7,2). Logo após, usou-se membrana de 0,22 µm para filtrar e esterilizar o meio, que foi mantido em recipientes estéreis a uma temperatura de 4°C. Para confecção do meio suplementado para uso, utilizou-se 1 % de uma solução de penicilina G 10.000 UI/mL e de estreptomicina 10.000 µg/mL e 10% de soro fetal bovino desnaturado (56°C/20 min.), ou seja, para a confecção de 40 mL do meio RPMI suplementado foram adicionados 4 mL de soro fetal bovino desnaturado (56°C/20 min.) e 0,4 mL de uma solução de penicilina G 10.000 UI/mL e de estreptomicina 10.000 µg/mL. (IEC/SVS/MS; VEIGA, 2013).

4.1.8 MATERIAL BIOLÓGICO

4.1.8.1 Espécie de *Leishmania* e cultivo

Neste estudo foram utilizadas cepas de formas promastigotas da espécie *Leishmania (L.) amazonensis* (cedido pelo IEC/SVS/MS), isolado de caso humano procedente do município do Estado do Pará (Quadro 4).

Quadro 4: Designação da cepa de *Leishmania* utilizada no estudo.

Registro	Espécie	Forma clínica de isolamento	Origem geográfica
MHOM/BR/2012/M29719	<i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	Leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD)	Tomé-Açu-Pará.

4.1.9 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

No presente estudo utilizou-se partes aéreas da espécie *D. ambrosioides*, coletadas no município de Santa Izabel do Pará, localizado através da geolocalização à uma latitude 01°17'55" sul e a uma longitude 48°09'38" oeste. O material foi coletado e encaminhado para o Herbário da Embrapa Amazônia Oriental (IAN), onde foi realizado a identificação da espécie e o depósito da exsicata no acervo do herbário sob o registro: IAN 200.838. Além disso, realizou-se o registro do uso da espécie para atividade em pesquisa no sistema nacional de gestão do patrimônio genético e do conhecimento tradicional associado (SisGen), sob o número de cadastro nº A598628.

4.2 Métodos

4.2.1 PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

As folhas e galhos da espécie *D. ambrosioides* foram higienizados em água corrente e em álcool 70%, para retirada de impurezas, posteriormente, foram secas em estufa de ar circulante a 37°C por 7 dias. Em seguida, as folhas e galhos foram pulverizados, separadamente, em moinho de facas até obtenção dos pós, estes foram acondicionados em frascos de vidro ao abrigo de luz e umidade.

4.2.2 ESTUDOS QUÍMICOS

Os pós da folha e do galho foram submetidos, separadamente, à maceração com etanol 96 °G por 7 dias, na proporção de 1:10 de (p/v). Após esse período, as soluções extrativas foram filtradas e concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida até resíduo, obtendo-se assim o extrato etanólico da folha (EEFo) e extrato etanólico do galho (EEGa) de *D. ambrosioides*.

O extrato etanólico da folha e, posteriormente, do galho de *D. ambrosioides* (EEFo; EEGa) foram submetidos separadamente a fracionamento pelo método de extração em sistema de refluxo com solventes de polaridades crescentes (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol). Para tal, 10 g do extrato etanólico foi colocado em balão de fundo redondo, adicionando 100 mL de cada solvente (100 mL) e aquecendo (40°C) por 20 minutos sob refluxo (Vale *et al.*, 2015; Figura 11).

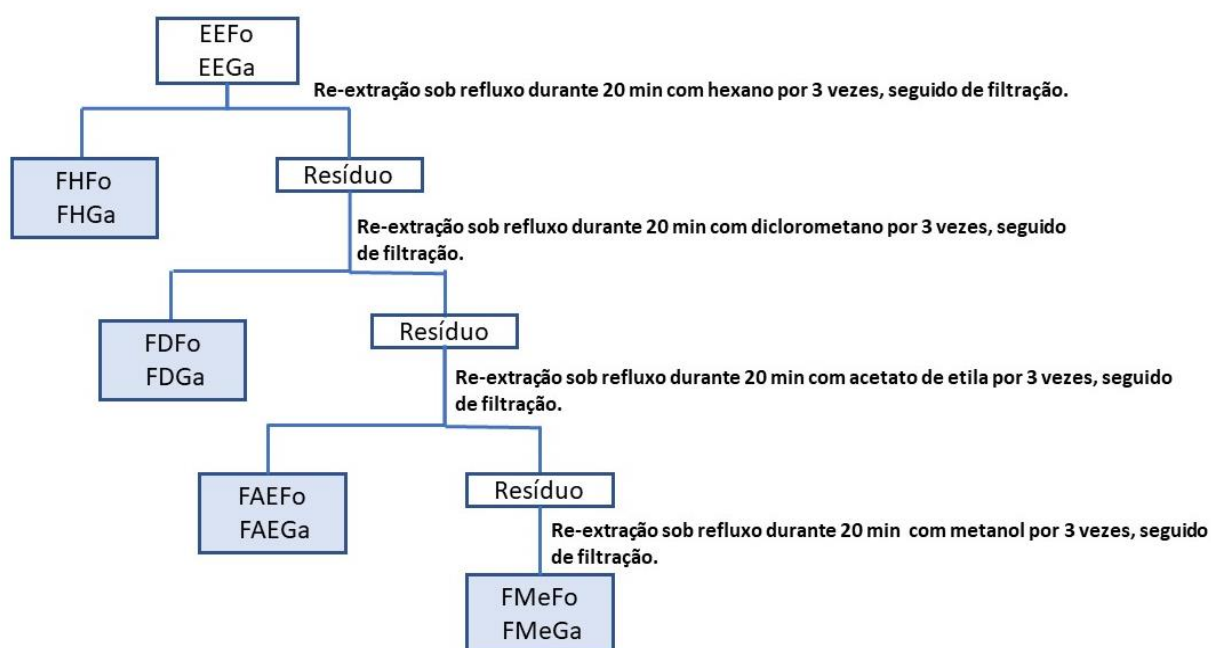


Figura 11: Obtenção das frações de *Dysphania ambrosioides* por extração sob refluxo.

Legenda: Extrato etanólico folha (EEFo); Fração de hexano folha (FHFo); Fração diclorometano folha (FDFo); Fração acetato de Etila folha (FAEFo); Fração metanol folha (FMeFo); Extrato Etanólico galho (EEGa); Fração de hexano galho (FHGa); Fração diclorometano galho (FDGa); Fração acetato de Etila galho (FAEGa); Fração metanol galho (FMeGa). O procedimento foi realizado para o pó de folhas e galhos, separadamente.

Fonte: Próprio autor.

4.2.2.1 Caracterização de extrato e frações

Os extratos etanólicos e frações da folha e do galho de *D. ambrosioides* foram submetidos a prospecção fitoquímica, onde foram analisados em cromatografia de camada delgada (CCD). Pesou-se uma alíquota de cada amostra cerca de 5 mg e solubilizou-se em 500 µL de metanol, armazenadas em tubos do tipo eppendorf (2,0 mL). As classes de metabólitos pesquisadas foram: triterpenos e esteróides, heterosídeos flavônicos, heterosídeos antracênicos, taninos, cumarinas, saponinas, alcalóides, polifenóis, geninas naftoquinônicas e antraquinônicas. Utilizou-se sílica gel como fase estacionária, além de fases móveis e reveladores específicos para cada classe de metabólito a ser pesquisada, conforme descrito no Quadro 5 (Wagner *et al.*, 1984).

Quadro 5 - Condições utilizadas nas avaliações em cromatografia em camada delgada.

Metabólito	Condições	Observações
Alcalóides	Fase móvel: Clorofórmio: Metanol: Hidróxido de Amônio (85:15:0,2). Revelador: Dragendorff.	Manchas de cor marrom ou alaranjada (visível)
Cumarinas	Fase móvel: Tolueno: Éter (1:1) saturado com Ácido acético (5 gotas). Revelador: Hidróxido de potássio a 5% em metanol.	Observar em luz UV 365 antes e após revelação, sendo observada intensificação da fluorescência verde-azulada. Cumarina não substituída: fluorescência amarela-esverdeada apenas após tratamento com hidróxido de potássio
Polifenóis	Fase móvel: Acetato de etila: Ácido Fórmico: Ácido acético: Água (100:11:11:27). Revelador: Soluções de ferricianeto de potássio a 1% e cloreto férrico a 2%.	Manchas de cor negro-azulada ou negro-esverdeada (visível).
Taninos	Fase móvel: Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético:Água (100:11:11:27). Revelador: Soluções de ferrocianeto de potássio a 1% e cloreto férrico a 2%.	Manchas de cor negro-azulada ou negro-esverdeada (visível).
Heterosídeos flavônicos	Fase móvel: Acetato de etila: Ácido fórmico: Ácido acético:Água (100:11:11:27). Revelador: Cloreto de alumínio a 2% em metanol.	Observar em luz UV 365 antes e após revelação com cloreto de alumínio a 2%, sendo observada intensificação da fluorescência amarela. Flavonóides: observar manchas de cor amarela (visível) e

		fluorescência amarelo-esverdeada (UV 365 e UV 254).
Heterosídeos antracênicos	Fase móvel: acetato de etila: metano: água (81:11:8); Revelador: hidróxido de potássio 5% em metanol.	Antraquinonas: manchas de cor laranja ao vermelho (visível) e fluorescência alaranjado ao vermelho (UV365 e UV254); antronas e antranóis: manchas amarelas (visível) e fluorescência alaranjada (UV365 e UV254).
Geninas naftoquinonas e antraquinonas	Fase móvel: tolueno: acetona: clorofórmio (6:4); Revelador: hidróxido de potássio 5% em metanol.	manchas da cor laranja ao vermelho (visível) e fluorescência de cor alaranjado ao vermelho (UV365 e UV254); Antronas e antranóis: manchas amarelas (visível) e fluorescência alaranjada (UV365 e UV254).
Saponinas	Fase móvel: Clorofórmio: Metanol (95:5). Revelador: Anisaldeído.	Manchas de cor azul ou azul-violeta e zonas amarelas (visível).
Triterpenos e Esteróides	Fase móvel: Hexano: Acetato de etila (8:2). Revelador: Reagente de Lieberbanm-Burchard.	Manchas marrons, roxas ou acinzentadas (vis) e fluorescência do alaranjado ao vermelho (UV 365).

Fonte: adaptado de Wagner *et al.*, 1984.

Os extratos etanólicos das folhas e galhos foram analisados em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), o desenvolvimento do método cromatográfico para análise dos extratos etanólicos, foi realizado Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência da Shimadzu® (modelo Prominence LC20AT) acoplado a DAD 254 a 355 nm. Uma alíquota de 13 mg do extrato foi solubilizada em 1 mL de H₂O: metanol (2:8 v/v) e transferiu-se para o cartucho SPE C18. Posteriormente filtrou-se com auxílio de filtro de seringa 0,45 µm (hidrofílico), e transferiu-se para frasco de HPLC (vial) em concentração de 5 mg/mL. A análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência procedeu-se com injeção automática de 20 µL, tendo coluna C18- 25µm (Phenomenex®) como fase estacionária e água/acetonitrila como fase móvel, utilizou-se o modo de eluição gradiente linear de 5-100% por 30 minutos.

Além disso, os extratos e frações das folhas e galhos foram submetidos a uma segunda condição de análise em HPLC, sendo realizado Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência da Alliance® e2695 (Waters) acoplado com detector de arranjo fotodiodo (DAD) 210 a 600 nm. Uma alíquota de 10 mg da amostra foi solubilizada em 1 mL de H₂O: metanol (2:8 v/v) e transferiu-se para o cartucho SPE C18. Posteriormente filtrou-se com auxílio de filtro de seringa 0,45 µm (hidrofílico), e transferiu-se para frasco de HPLC (vial) em concentração de 1mg/mL (1:1). A

análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência procedeu-se com injeção automática de 20 µL, tendo coluna de fase reversa SunFire™ C18- 5µm (4.6x150mm; Waters) como fase estacionária e H₂O/MeOH como fase móvel, a temperatura da coluna foi mantida a 40°C, utilizou-se o modo de eluição gradiente linear de 5-100% por 60 minutos.

Ademais, os extratos e frações foram submetidos a análises de espectrometria de infravermelho (FTIR - Fourier Transform Infrared Spectrophotometer), pela técnica ATR (Total Reflection and internal reflection). As leituras foram realizadas na faixa de 400 cm⁻¹ a 4000 cm⁻¹ em ATR, usando um espectrofotômetro de infravermelho modelo (Shimadzu® IRPrestige-21).

Por fim, as amostras de extratos e frações foram analisadas em espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio ¹H. Os espectros de RMN de ¹H foram obtidos em espectrômetro BRUKER AVANCE DRX 400 MHz. O solvente utilizado na solubilização das amostras foi o clorofórmio deuterado. Os deslocamentos químicos (δ) foram medidos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Para processar os espectros utilizou-se o programa TOPSPIN 3.0 - Bruker.

4.3.1 ATIVIDADE ANTILEISHMANIA

4.3.1.1 Cultivo e manutenção das formas promastigotas de *Leishmania*

As formas promastigotas da espécie *L. (L.) amazonensis* foram primeiramente cultivadas em meio NNN e posteriormente transferidas para o meio de crescimento RPMI, sendo mantidas através de passagens semanais. Foram transferidos 0,5 mL de suspensão de formas promastigotas para garrafas de cultura de células, cada uma contendo 5 mL de meio RPMI completo. Em seguida, observou-se o cultivo em microscópio invertido para verificação da viabilidade das formas em meio RPMI. O cultivo do parasita em meio RPMI completo foi feito a 25°C ± 1°C (IEC/SVS/MS; VEIGA, 2013).

4.3.1.2 Atividade antipromastigota

Para realização do teste, o cultivo de formas promastigotas em fase logarítmica de crescimento, foram reunidas por centrifugação em meio RPMI completo a 3500 rpm por 10 minutos. O precipitado foi resuspenso em meio RPMI completo (1,0 mL), e em seguida as promastigotas foram quantificadas em câmara de Neubauer e ajustadas em uma suspensão na concentração correspondente a 4×10^6 parasitas/100 μ L do cultivo (Veiga *et al.*, 2017). A suspensão de parasitos foi distribuída em placas de 96 poços de fundo chato previamente dosificados com as amostras de extratos e frações, nas seguintes concentrações: 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125 μ g/mL (Figura 12). Como controle negativo utilizou-se uma solução de meio de cultura e suspensão de parasito (suspensão de promastigotas e RPMI 1640), controle do solvente (MeOH volatilizado, suspensão de promastigota e RPMI 1640). Como controle positivo usou-se a anfotericina B, em diferentes concentrações (suspensão de promastigotas e Anfotericina B, nas concentrações de 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,5625; 0,78125 e 0,3906 μ g/mL; Veiga *et al.*, 2017). Em seguida as placas foram incubadas (25 °C/24 h).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figura 12 - Desenho esquemático das placas de 96 poços e da distribuição das substâncias testadas

Legenda:

	Controle negativo		Controle solvente		Branco
	Controle positivo		Extrato etanólico		Frações

Após o período de incubação foram adicionados em cada poço, 10 μ L de MTT (Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium) (5mg/ml) em cada poço, sendo a placa protegida da luz e incubada novamente por 4h (25°C) para metabolização do MTT e, formação dos cristais de formazam. Decorrido este tempo, realizou-se aplicação de 10 μ L de Dimetilsulfóxido (DMSO), seguido de

agitação manual até completa solubilização dos cristais de formazam. Posteriormente, realizou-se a leitura da densidade óptica das amostras em leitor de multiplacas sob o comprimento de onda de 490 nm. A viabilidade das formas promastigotas foram avaliadas com base no metabolismo do MTT, sendo a mesma proporcional ao valor da absorbância gerada. A porcentagem de parasitos foi calculada pela seguinte fórmula, adaptada de Ngure *et al.*, (2009):

$$\% \text{viabilidade} = \frac{\text{abs. dos poços com amostra} - \text{abs. do reagente (branco)}}{\text{abs. dos poços sem amostra} - \text{abs. do reagente (branco)}} \times 100$$

abs = absorbância

A concentração Inibitória 50% (CI₅₀), é a concentração que causa a redução de 50% das células em crescimento (viáveis) e foi determinada pelo programa GraphPad Prism versão 6.0 através da leitura realizada em leitor de placas de ELISA, adotando-se os seguintes critérios Mota *et al.*, (2015): A classificação encontra-se no quadro 6.

Quadro 6. Interpretação dos resultados baseado na concentração inibitória a 50%.

Concentração Inibitória CI ₅₀ µg/mL	Resultados
Menor ou igual a 100	Ativo
Entre 101-200	Moderadamente ativo
Acima de 200	Inativo

Fonte: Mota *et al.*, 2015.

4.4.1 ESTUDO *IN SILICO* E DOCAGEM MOLECULAR

Para a seleção das moléculas submetidas aos estudos *in silico* foram adotados alguns critérios:

- 1- Os estudos químicos devem ter detectados a classe de metabólito secundário;
- 2- Os compostos devem ter sido isolados, anteriormente, desta espécie;
- 3- Possuir sua estrutura química já elucidada e disponibilizada na literatura
- 4- Deve ter sido descrito atividade antileishmania para outras moléculas pertencentes a esta classe e/ou para algum dos compostos isolados.

Com base nos critérios estabelecidos realizou-se um levantamento bibliográfico, selecionando os principais flavonoides e terpenos isolados da espécie *D. ambrosioides*, as informações bibliográficas foram consultadas através de buscas utilizando as bases de dados Periódicos CAPES, PubMed, *Science Direct* e *Pubchem*, sendo empregado, por meio de buscas avançadas, as seguintes palavras-chave: “*Dysphania ambrosioides*”, “metabolitos secundários” e “isolados”. Foram selecionadas 25 moléculas da classe de glicosídeos flavônicos e monoterpenos que foram submetidas ao estudo *in silico* por serem as maiores classes isoladas em prospecção fitoquímica da espécie.

Para que diferentes análises fossem realizadas *in silico*, as 25 estruturas químicas localizadas no banco de dados *Pubchem* foram redesenhadas em modelos estruturais 2D (bidimensional) por meio do programa *MarvinSketch* (versão 2017.5.), sendo gerados arquivos no formato SMILES, MDL Molfile e PNG, para que fossem submetidas nos programas de previsão para avaliar semelhança com medicamentos e a segurança dos flavonoides e terpenos selecionados, com base nas características físico-químicas, perfil farmacocinético e toxicidade.

Para previsões de propriedades físico-química utilizou-se o servidor *pkCSM* (<http://structure.bioc.cam.ac.uk/pkcsml>) para avaliar os parâmetros da regra dos cinco de *Lipinski*, que permite prever aspectos relacionados à absorção e permeabilidade de membranas celulares (coeficiente de partição, lipofilicidade e hidrofiliabilidade).

Para que a molécula tenha um bom perfil físico-químico, ela precisa seguir os seguintes parâmetros: massa molecular (MM) seja igual ou inferior ($\leq$) a 500 kDa; o coeficiente de partição (Log P) seja ≤ 5 ; número de Aceitadores de Ligação de Hidrogênio (ALH) ≤ 10 ; e Doadores de Ligação de Hidrogênio (DLH) ≤ 5 . A solubilidade da substância em meio aquoso quando menor que 10 $\mu\text{g/mL}$ e classificada como baixa; entre 10 e 60 $\mu\text{g/mL}$ se classifica como uma molécula de solubilidade moderada; e quando maior que 60 $\mu\text{g/mL}$: alta solubilidade (Silva, 2015). Para uma boa avaliação, os compostos devem possuir poucas ou nenhuma violação da RO5, para garantir absorção ou permeabilidade adequada (Lipinski *et al.*, 1997).

Para a predição dos parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo e toxicidade utilizou-se os servidores online PreADMET e o ADMETlab. A previsão

de absorção por meio de modelos de células Caco-2 (diferenciadas de adenocarcinoma de cólon humano) e células MDCK (*Madin-Darby canine kidney*), obtidas de células renais, possuem notável correlação de semelhança na absorção de drogas como modelo de barreira celular para avaliar o transporte epitelial intestinal de drogas (Irvine *et al.*, 1999; Avdeef & Tam, 2010). Os programas também avaliam a permeabilidade cutânea em modelos de células intestinais humanas (AIH).

Em relação a interpretação, os programas oferecem valores de referência baseados em estudos *in vitro* para avaliação da farmacocinética, sendo considerados os seguintes critérios: Absorção Intestinal Humana (AIH): 0-20% baixa absorção, 20-70% moderada absorção, > 70% elevada absorção (Yee, 1997); Permeabilidade em células Caco2 e MDCK: baixa permeabilidade < 4 nm/sec, média permeabilidade 4-70 nm/sec e alta permeabilidade > 70 nm/sec (Yaszdanin *et al.*, 1998); Ligação às proteínas plasmáticas: >90% ligada fortemente, entre 30 e 90% ligação moderada e <30% fracamente ligadas; Permeabilidade cutânea se classifica como alta quando menor que 0,1 e baixa permeabilidade quando maior que 0,1 (PreADMET, 2021).

Para avaliação dos aspectos de toxicidade das moléculas isoladas foram utilizados os *softwares*: PreADMET e Protox. Para as predições no *software* PreADMET, foram avaliadas a mutagenicidade por teste ames com as seguintes cepas de Samonella: TA100-10RLI, TA100-NA; TA1535-10RLI e TA1535-NA e carcinogenicidade em ratos e camundongos, sendo indicado se positivo (+) ou negativo (-) para cada um dos efeitos. Para as predições no *software* PROTOX foram avaliadas a dose tóxica em roedores (DL₅₀) e a classificação de toxicidade (Drwal *et al.*, 2014), e efeitos tóxicos como: hepatotoxicidade, carcinogenicidade e mutagenicidade (Hansen *et al.*, 2009; Bento *et al.*, 2014; Schrey *et al.*, 2017; Banerjee; Dehnbostele; Preissner, 2018), sendo indicado se positivo (+) ou negativo (-) para cada um dos efeitos. Quanto a predição de toxicidade via oral em roedores segue a seguinte classificação, tabela 1:

Table 1: Parâmetros adotados para classificação da toxicidade oral aguda (DL₅₀ oral)

Classificação	DL ₅₀ (mg/kg)	Interpretação
I	0 < DL ₅₀ ≤ 5	Fatal se ingerido
II	5 < DL ₅₀ ≤ 50	Fatal se ingerido
III	50 < DL ₅₀ ≤ 300	Tóxico se ingerido
IV	300 < DL ₅₀ ≤ 2000	Nocivo se ingerido
V	2 000 < DL ₅₀ ≤ 5000	Pode ser prejudicial se ingerido
VI	DL ₅₀ >5000	Não tóxico

DL₅₀= Dose letal

Para seleção de moléculas promissoras para estudos de docagem utilizou-se os seguintes critérios:

1. Físico-químico: Não violar mais de uma a regra de Lipinski;
2. Toxicológico: apresentar baixa toxicidade, não ser hepatotóxico e mutagênico para mais de um modelo testado.

Para docagem as moléculas selecionadas foram preparadas a partir de arquivos SMILES, baixados dos bancos de dados ZINC e eMolecules® (Irwin *et al.*, 2012). Na seleção do alvo levou-se em consideração as principais vias metabólicas e enzimas estudadas como alvo para desenvolvimento de novos fármacos antileishmania, sendo estes, alvos proteicos estratégicos importantes para sobrevivência dos parasitas de *Leishmania*, envolvidos no mecanismo do equilíbrio redox e mecanismo de virulência (De Melos, 2012; Figueiredo *et al.*, 2018).

Baseado nessas informações, foram selecionadas as principais proteínas envolvidas no mecanismo de sobrevivência do parasito, em seguida foi feito a pesquisa para ver quais proteínas alvos já foram cristalografadas. Selecionou-se assim, as estruturas cristalinas das enzimas apresentados na tabela 2, que foram obtidas do banco de dados PDB (Protein Data Bank) (Berman, 2000).

O Docking Molecular foi utilizado para explorar as possíveis conformações do ligante com o receptor de ligação, estimando a força de interação proteína-ligante, as moléculas foram desenhadas e preparadas a partir das estruturas obtidas na literatura sendo desenhadas do programa ChemSketch®, e preparadas para a docagem no programa BIOVIA®, os alvos foram obtidos da base de dados Protein Data Bank (PDB).

As simulações de docagem molecular foram realizadas usando o programa GOLD 2020.1 (Cambridge Crystallographic Data Centre - CCDC, Cambridge, UK), que utiliza um algoritmo genético para gerar e selecionar conformações de

compostos flexíveis que se ligam ao local do receptor de uma proteína (Jones *et al.*, 1995). E foram acoplados aplicando a função de pontuação GoldScore, com pesquisa 100% eficiente, sendo que aquelas com maior pontuação na função GoldScore, foram realizadas as análises das interações com os aminoácidos utilizando o programa BIOVIA ®. Como método de validação do Docking, foi realizado o redocking, que consiste em reacoplar o ligante cristalografado no sítio ativo, prevendo sua conformação, sendo considerado como válido, aqueles que possuíam RMSD (Root Mean Square Deviation) menor que 2 Angströms.

Tabela 2- Código PDB das enzimas com suas respectivas resoluções.

Enzima	Código PDB	Via metabólica / Função	Resolução (Å)	Coordenadas de grid (Å)
GP63	1LML ⁽¹⁾	Mecanismo de virulência	1,86	09,92 x 22,18 x 07,99
Tripanotiona redutase	2W0H ⁽²⁾	Metabolismo redox	3,00	29,13 x 20,93 x 45,14

Referências: 1-Schlagenhauf *et al.*, 1998, 2- Baiocco *et al.*, 2009.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDOS FITOQUÍMICOS

Os extratos etanólicos obtidos das folha *D. ambrosioides* (EEFo, rendimento= 8,3) e dos galhos (EEGa, rendimento= 5,35%) foram submetidos ao fracionamento sob refluxo que resultou em 4 frações para cada extrato: fração de hexano (FHFo- rendimento de 28%; FHGa- 12,6%), fração diclorometano (FDFo- 8,32%; FDGa- 2,73%); fração acetato de etila (FAEFo= 8,08%; FAEGa=1,78%) e fração de metanol (FMeFo- 32%; FMeGa- 37,4%; Tabela 3).

Em relação ao procedimento extrativo utilizado para a obtenção dos extratos foram satisfatórios, visto que, em outro estudo os percentuais de rendimentos foram menores (2,18% das folhas e 1,97% para os galhos) do que os obtidos no presente estudo (Grassi, 2011). Observou-se que para os dois extratos que a fração majoritária foi de metanol, seguido da fração hexano (Tabela 3). De *D. ambrosioides* já foram isolados flavonóides que são compostos glicosilados, com maior polaridade (Ghareeb *et al.*, 2016) e isto pode estar relacionado ao maior rendimento das frações de metanol.

Tabela 3. Rendimento dos extratos e frações de *D. ambrosioides*.

EXTRATO OU FRAÇÃO	RENDIMENTO (%)	
	FOLHA	GALHO
Etanol	8,3%	5,35%
Hexano	28%	12,6%
Diclorometano	8,32%	2,73%
Acetato de etila	8,08%	1,78%
Metanol	32%	37,4%

Fonte: Próprio autor.

Os extratos etanólicos e frações, da folha e do galho, de *D. ambrosioides* foram submetidos à prospecção fitoquímica, utilizando-se o método de cromatografia em camada delgada (Wagner *et al.*, 1984). Os resultados da prospecção para os extratos e frações detectaram a presença de metabólitos pertencentes à classe dos terpenos e esteroides, heterosídeos flavônicos,

cumarinas e saponinas (tabela 4). Todos os extratos e frações analisados foram positivos para a presença de terpenos e esteroides, com exceção das frações de metanol, esta classe é facilmente retido em solvente de baixa e média polaridade (Soares *et al.*, 2016), desta forma é provável uma maior concentração desta classe na fração de hexano e diclorometano.

Para os heterosídeos flavônicos, os extratos (EEFo e EEGa) e as frações (FAEFo, FMeFo, FAEGa e FMeGa) foram positivos para a presença deste metabólito. Esta classe tem afinidade por solventes de maior polaridade como acetato de etila e metanol (Soares *et al.*, 2016), desta forma, é possível que os compostos flavônicos sejam encontrados em maior quantidade nas frações correspondentes a estes solventes, isso pode estar relacionado ao maior rendimento nas frações de metanol.

Além disso, observou-se a presença de saponinas para os extratos (EEFo e EEGa) e as frações (FDFo, FAEFo, FMeFo, FAEGa e FMeGa) e a presença de cumarinas somente nas amostras do galho, no extrato (EEGa) e nas frações (FDGa, FAEGa e FMeGa; Tabela 4). Achados semelhantes foram observados em prospecção fitoquímica, pelo método de CCD, que utilizou o extrato etanólico das partes aéreas de *D. ambrosioides* e detectou a presença de triterpenoides, compostos flavônicos e saponinas, além de taninos, alcaloides e óleo voláteis que foram ausentes nas análises reportadas neste estudo (Okhale *et al.*, 2012). O extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides* foi submetido a prospecção fitoquímica pelo método de reagentes de precipitação, detectou-se a presença de triterpenos e esteroides, cumarinas, fenóis e taninos (Valério, 2014). Da mesma forma, foi reportado em outro estudo, a presença de flavonóides e terpenos, e a ausência de alcalóides, polifenóis e taninos para o extrato etanólico das partes aéreas da espécie (Nascimento *et al.*, 2020).

As divergências em relação a composição química desse para os demais estudos podem estar relacionadas às metodologias empregadas e às diferentes partes da planta utilizadas nos estudos. Ademais diferenças nos locais de origens das espécies como sazonalidade, disponibilidade hídrica, exposição a luz e temperatura, são fatores que expõe as plantas a mudanças metabólicas e fisiológicas periódicas, devido aos ajustes às condições locais (Magalhães *et al.*, 2005).

Tabela 4 - Resultados da prospecção fitoquímica de *D. ambrosioides*.

Metabólitos secundários	Extratos									
	FOLHA					GALHO				
	EE	FH	FD	FA	FM	EE	FH	FD	FA	FM
Alcaloides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumarinas	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
Heterosídeos Flavônicos	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+
Polifenóis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Taninos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saponinas	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
Triterpenos e Esteróides	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-

Legenda: (+) presença; (-) ausência; EE – Extrato Etanólico; FH – Fração Hexano; FD – Fração Diclorometano; FA – Fração Acetato de Etila; FM – Fração Metanol.

Fonte: Próprio autor.

Os extratos etanólicos (EEFo e EEGa) foram submetidos a análises exploratórias por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e por métodos de espectrometria. Na primeira condição cromatográfica, as análises por HPLC foram realizadas em comprimento de onda de 254 nm e 355 nm para verificação dos metabólitos secundários presentes nos extratos, as análises dos espectros de UV foi realizada através da comparação com os dados disponíveis na literatura.

O espectro de UV-VIS característico de flavonóides inclui duas bandas de absorção (Figura 13), sendo, a banda I, característica do grupo cinamoil do anel B que se encontra na região de comprimento de onda (λ) que varia de 310 a 350 nm para as flavonas, enquanto nos flavonóis é encontrada entre 350 a 385 nm (Harborne *et al.*, 1977; Tsimogiannis *et al.*, 2007). A banda II, característica do grupo benzoil do anel A, que é encontrada na faixa de 240 a 280 nm, sendo semelhante entre os diversos subgrupos de flavonoides (Harborne *et al.*, 1977; Tsimogiannis *et al.*, 2007).

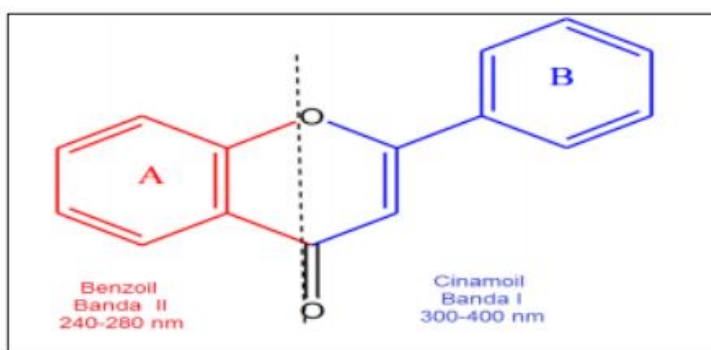


Figura 13: Estrutura química geral de um flavonóide com bandas de absorção em UV
Fonte: Brígido, (2016).

Os cromatogramas obtidos dos extratos EEFo e EEGa (Figura 14; Tabela 5), apresentaram picos com tempo de retenção semelhantes, que variaram entre 1,69 min a 13,20 min, sugerindo a presença de compostos de média e alta polaridade, como derivados de flavonóides.

No cromatograma do EEFo observou-se picos majoritários com tempo médio de retenção em (Tr 9,46 min) e espectro de UV com absorbância de $\lambda = 255$ nm e 349 nm, em (Tr 10,06 min) com $\lambda = 263$ nm a 341 nm, e em (Tr 11,8 min) com absorbância $\lambda = 264$ nm e 344 nm. Os espectros de UV com picos observados entre 255 nm a 264 nm são sugestivos da banda II (anel A, porção benzoil), enquanto que os picos detectados entre 341 nm a 349 nm pode estar relacionados com a banda I (anel B, porção cinamoil), sendo sugestivos para flavonóides.

Para o EEGa, observou-se sinais de maior intensidade com tempo médio de retenção em Tr 1,69 min com absorção em UV $\lambda = 255$ nm e 352 nm, em Tr 10,13 min com $\lambda = 265$ nm e 343 nm, e com menor intensidade em Tr 9,96 min com λ de 264 nm e 344 nm. Esses picos no ultravioleta são característicos de bandas de flavonóides. De acordo com Fossen e Andersen (2006), os picos dos cromatogramas obtidos por HPLC-DAD com bandas em UV entre 240-285 nm são referentes a banda A, porção benzoil, e 300-550 nm a banda B, porção cinamoil, estão relacionados à presença de derivados de flavonoides.

Nesse sentido, através das análises de HPLC, verificou-se que os extratos etanólicos da folha e do galho apresentam perfil fitoquímico similar, sendo observado a presença de compostos flavônicos em sua composição, sendo esse possivelmente um dos componentes majoritários da planta. Ademais, os resultados

encontrados nessas análises corroboram com a literatura da espécie que descrevem a presença desta classe.

O extrato hidroalcoólico das folhas de *D. ambrosioides* e suas frações (clorofórmio, acetato de etila e butanol), foi analisado por HPLC-DAD e observou-se que o extrato e as frações, apresentaram os compostos flavônicos rutina, quercetina e crisina com absorção λ_{max} entre 313 nm a 365 nm (Jesus *et al.*, 2017). Outro estudo analisou o extrato metanólico das sementes de *D. ambrosioides* por HPLC, onde foram identificados os compostos rutina, quercetina e kaempferol (Bano *et al.*, 2022).

Barros e colaboradores (2013), avaliaram o extrato metanólico das partes aéreas da espécie por HPLC-DAD-MS e observaram espectros no UV correspondente a flavonas e derivados de flavonóis, sendo a maioria deles derivados da quercetina com absorção λ_{max} de 354 nm e kaempferol com λ_{max} de 346 nm. Ademais, a partir de extratos da espécie *D. ambrosioides* já foram isolados alguns flavonóides, como a quercetina, o Kaempferol e derivados de kaempferol (Jain *et al.*, 1990; Ghareeb *et al.*, 2016).

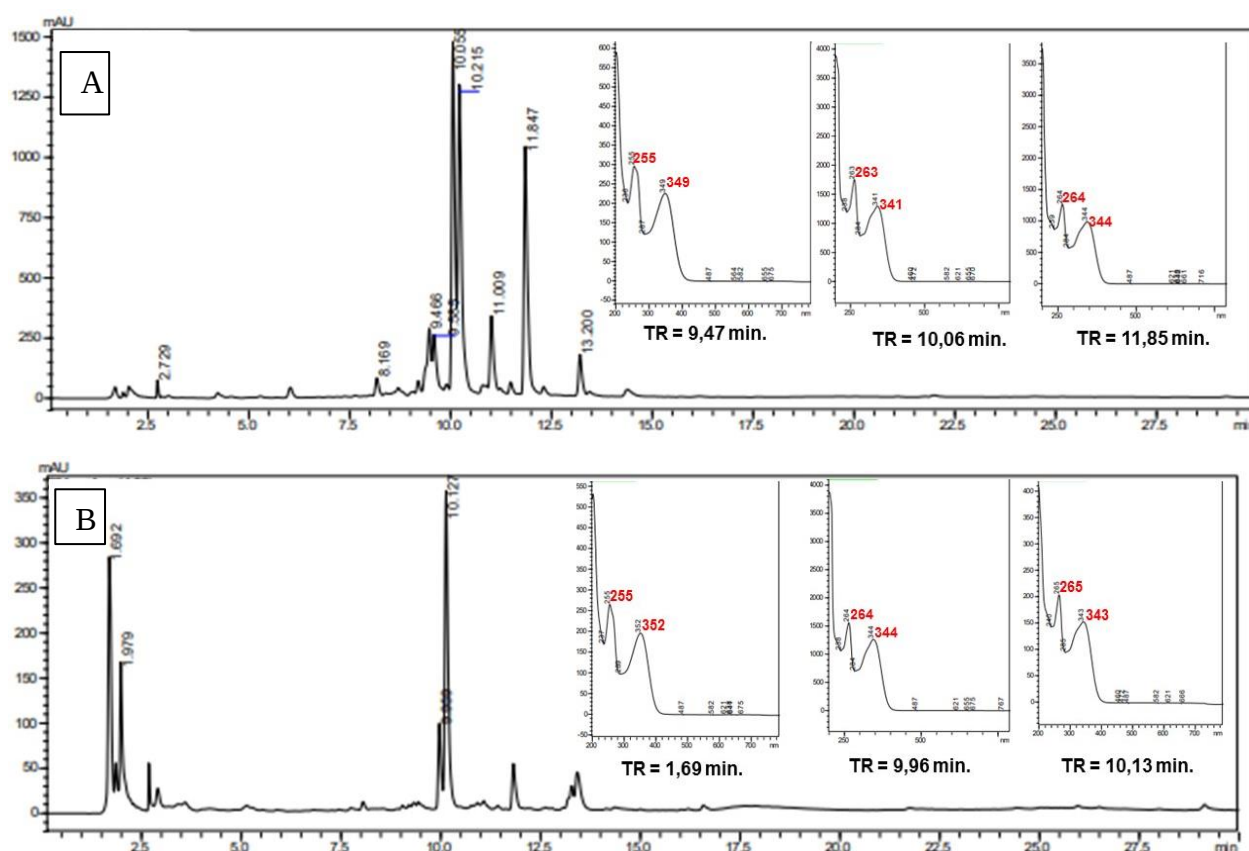


Figura 14: Cromatogramas e espectros de UV dos extratos de *D. ambrosioides*.

Condições cromatográficas: coluna phenomenex C18, 3 μ m (150x4.60 mm); condições de eluição: tempo de varredura de 30 min. em gradiente linear de 5 a 100 %, empregando-se água deionizada

(eluente A) e acetonitrila (eluente B), fluxo de 0,5 mL/min., temperatura 40°C, injetando-se 20 µL e detecção em UV com comprimento de ondas: 254 nm e 355nm.

Legenda: A- Extrato etanólico folha (EEFo); B- extrato etanólico galho (EEGa).

Tabela 5: comparação dos resultados obtidos nas análises em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a arranjos de diodos (HPLC-DAD)

Extrato	Tempo de Retenção (min)	Absorbância UV (nm)	Classe detectada	Literatura
EEFo	9,47	255 – 349	Flavonóides	Composto flavônicos derivados de kaempferol (1) (2) e quercetina (3)
	10,06	263 – 341	Flavonóides	
	11,85	264 – 344	Flavonóides	
EEGa	1,69	255 – 352	Flavonóides	
	9,96	264 – 344	Flavonóides	
	10,13	265 - 343	Flavonóides	

Legenda: A- Extrato etanólico folha (EEFo); B- extrato etanólico galho (EEGa).

Referência: 1- ZOHRA et al., 2018; 2- ZAGO et al., 2019; 3- KANDSI et al., 2021.

Na condição cromatográfica 2, os extratos e as frações das folhas e galhos foram submetidos a análise exploratória por HPLC-DAD, visando identificar demais compostos, sendo feitas análises em UV em comprimento de onda entre 210 a 600nm. Dentre os picos com maior intensidade selecionados em cada uma das amostras, foi possível notar que o extrato EEFo, fração FAEFo e fração FMFo apresentam compostos de média e alta polaridade, com tempos de retenção semelhantes, o EEFo apresentou bandas em 26.38 min. ($\lambda_{\text{max}} = 265.4 \text{ nm}$ e 346.0 nm) e em 29.94 min. ($\lambda_{\text{max}} = 265.4 \text{ nm}$ e 348.4 nm ; Figura 15), a FAEFo evidenciou bandas em tempo de retenção em 26.42 min. ($\lambda = 265.4 \text{ nm}$ e 347 nm) e em 30.0 min. ($\lambda = 266.6 \text{ nm}$ e 367 nm) e a FMeFo exibiu bandas com tempo de retenção em 28.75 min. (265.4 nm e 346.0 nm) e em 32.51 min. com máximos de absorbância em 265.4 nm e 348.0 nm . Os sinais encontrados no extrato EEFo e nas frações FAEFo e FMeFo são sugestivos para presença de metabólitos pertencentes a classe dos flavonóides, visto que os derivados desta classe têm padrões espectrais de absorção no UV/VIS com máximos de absorção entre 254,8 e 256 nm que são características do anel A – porção benzoil, e as absorções em 300 e 400 nm característicos do anel B – porção cinamoil da estrutura base dos flavonóides (Arapitsas, 2008; Simões *et al.*, 2013)

No entanto, a fração FHFo e FDFo, evidenciaram tempo de retenção em 52.61 minutos e em 52.01 minutos, respectivamente (Figura 15), onde não foi possível detectar nenhuma classe de metabólitos secundários, visto que os espectros não apresentaram padrão de absorbância em UV. Entretanto, tais

solventes possuem afinidades por compostos de baixa polaridade, como os terpenos e triterpenos que foram detectados anteriormente em CDD e que já foram isolados da espécie, nesse sentido, é possível que a classe esteja presente nas frações FHfO e FDFo. O não aparecimento da classe em HPLC pode ser justificado, pois a classe dos terpenos não possui grupo cromóforo com absorbância em UV, devido à baixa absorção em UV não é indicado o emprego do detector de ultravioleta para terpenos (Silva, 2017).

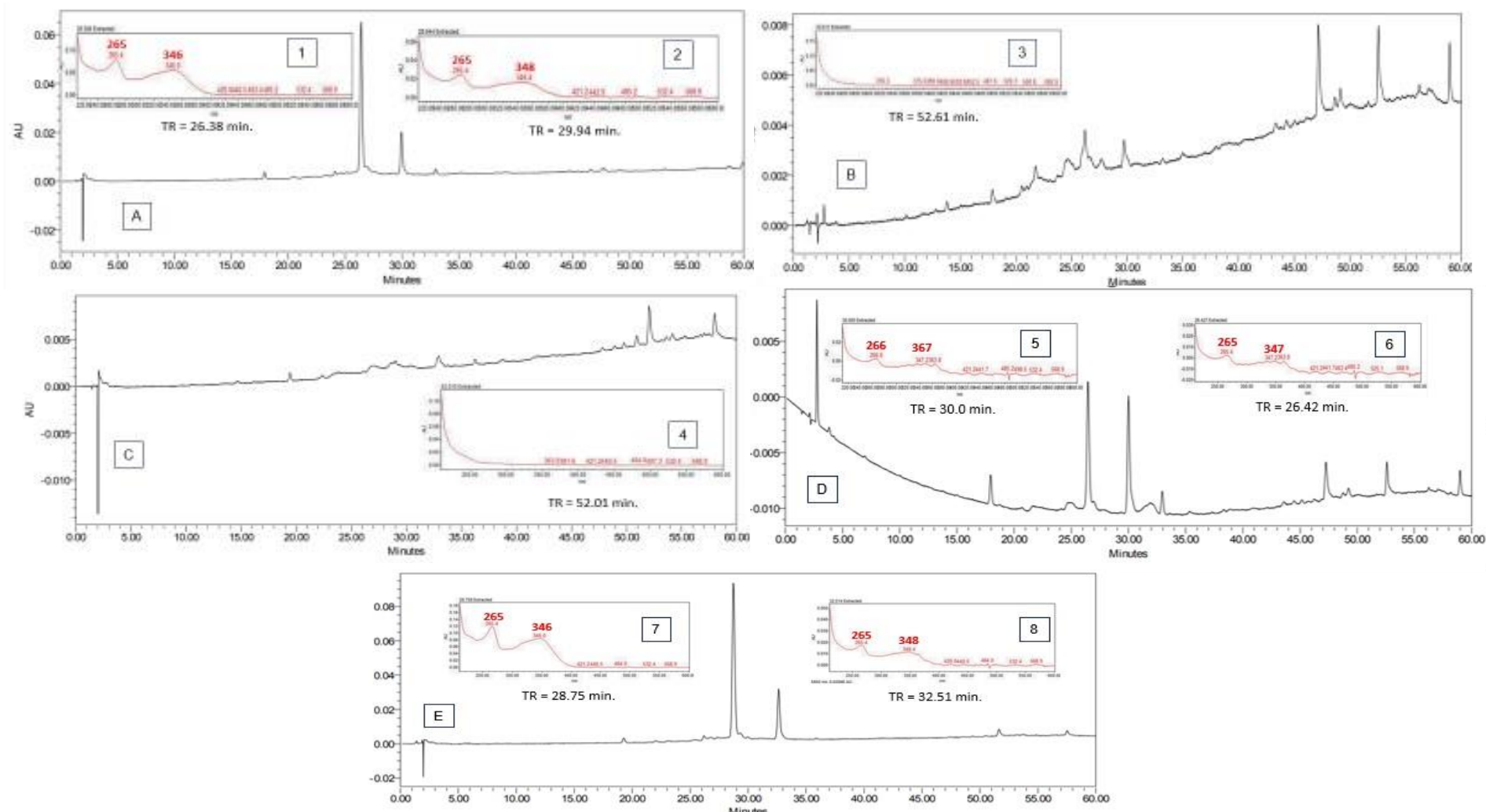


Figura 15: Cromatogramas e espectros de UV dos extratos e frações das folhas de *D. ambrosioides*.

Condições cromatográficas: coluna de fase reversa SunFire C18-5µm (4.8x150mm; Waters): eluição em gradiente: H₂O/Met (proporção 5-100%); detecção: 210-600 nm; temperatura: 40°C, vazão: 5 L/min.

Legenda: A- Extrato de etanol folha (EEFo); B- Fração hexano folha (FHFo); C- Fração diclorometano folha (FDFo); D- Fração acetato de etila folha (FAEFo) e E- fração metanol folha (FMeFo).

Nas análises cromatográficas do extrato e frações do galho, observou-se os picos de maior intensidade que foram selecionados em cada uma das amostras, sendo possível notar banda no extrato EEGa com tempo de retenção em 26.63 min. ($\lambda_{\text{max}} = 363.0 \text{ nm}$), já a fração FAEGa registrou banda com tempo de retenção em 29.13 min. ($\lambda_{\text{max}} = 266.6 \text{ nm}$ e 321 nm ; Figura 16) e 33.15 min. ($\lambda = 265.4$ e 347 nm), a fração FMeGa exibiu banda com tempo de retenção em 26.51 min. ($\lambda_{\text{max}} = 255 \text{ nm}$ e 348 nm) e 29.94 min. ($\lambda_{\text{max}} = 265 \text{ nm}$ e 336 nm). As similaridades entre os tempos de retenção e características de absorção em UV indicam que tratar-se de compostos de média e alta polaridade presente no extrato EEGa e nas frações FAEGa e FMeGa, sendo sugestivo para flavonóides, visto que esta classe tem características espectrais no UV/VIS com máximos de absorção entre 340 e 370 nm que pode estar relacionado com a banda I (anel B, porção cinamoil), enquanto que os picos na faixa em 255 e 270 é sugestivo da banda II (anel A, porção benzoil) (Simões *et al.*, 2013; Manach *et al.*, 2004; Arapitsas, 2008).

Os cromatogramas das frações FHGa e FDGa, não apresentaram padrões de absorbância em UV, não sendo possível a detecção de classes de metabólitos secundários, no entanto, é provável a presença de terpenos nessas amostras devido a afinidade dessa classe por solventes de baixa polaridade.

Os padrões cromatográficos foram semelhantes entre as amostras das folhas e galhos, assim como aos resultados encontrados na primeira análise cromatográfica dos extratos, sugerindo a presença de compostos flavônicos, sendo estes provavelmente uma das classes majoritárias da espécie. Ademais, nota-se que os resultados deste estudo corroboram com os presentes na literatura, visto que em análises em HPLC-DAD dos extratos hidroalcolico, acetato de etila e metanol das partes aéreas de *D. ambrosioides* detectaram a presença de flavonoides, e dos derivados de kaempferol e quercetina (Jesus, *et al.*, 2017; Assaide *et al.*, 2019).

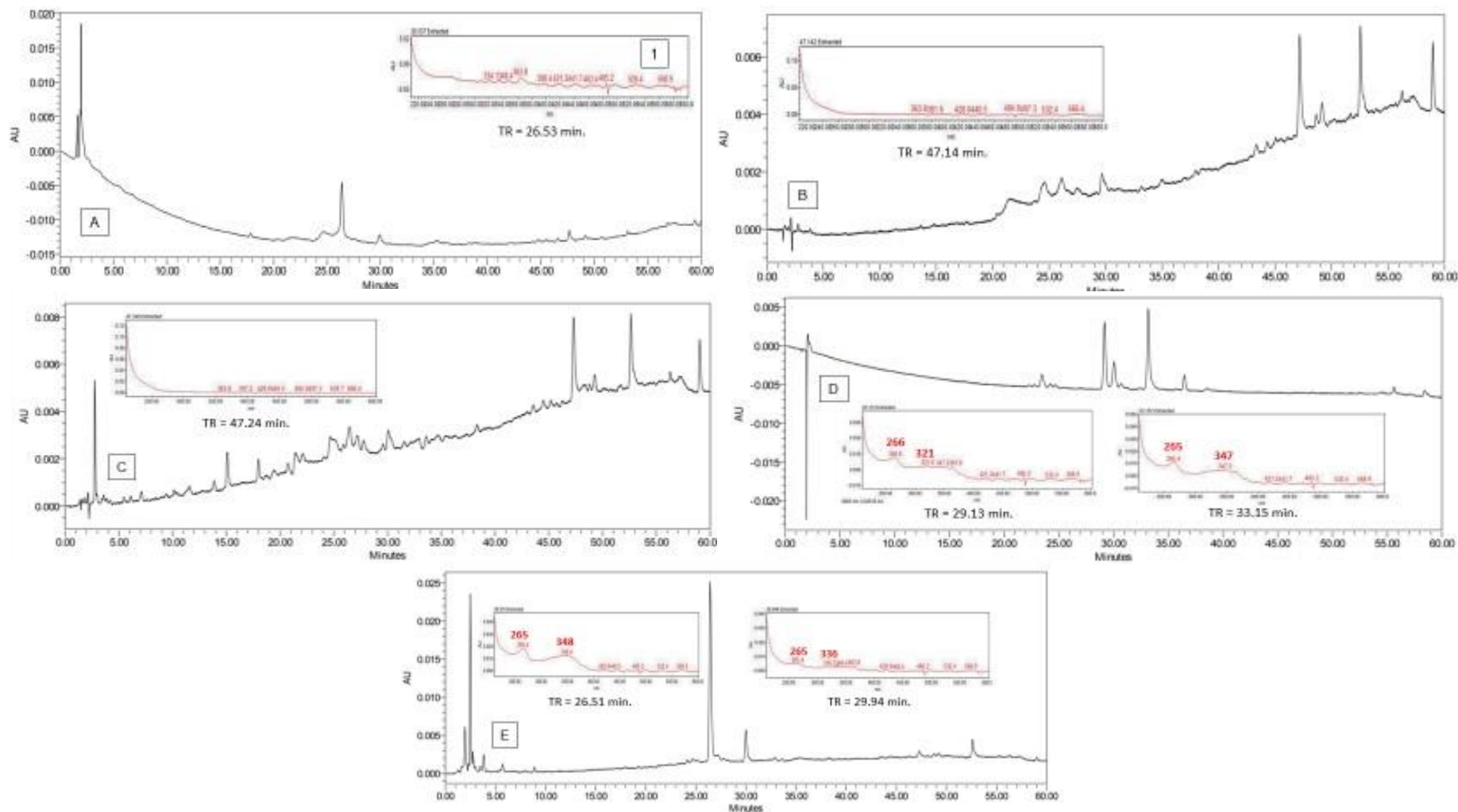


Figura 16: Cromatogramas e espectros de UV dos extratos e frações dos galhos de *D. ambrosioides*.

Condições cromatográficas: coluna de fase reversa SunFire C18-5 μ m (4.8x150mm; Waters); eluição em gradiente: H₂O/Met (proporção 5-100%); detecção: 210-600 000; temperatura: 40°C, vazão: 5 L/min.

Legenda: A- Extrato de etanol galho (EEGa); B- Fração de Hexano galho (FHGa); C- Fração diclorometano galho (FDGa); D- Fração acetato de etila galho (FAEGa) e E- Fração de metanol galho (FMeGa)

Os espectros na região do infravermelho dos extratos EEFo e EEGa apresentaram bandas semelhantes (figura 17), onde observou-se sinais na faixa de 3195 cm^{-1} a 3352 cm^{-1} , que indicam a presença do grupo --OH , --NH-- e C--H , visto que bandas na região de $3600\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ de estiramento axial, indicam a presença desses grupos. Além disso, observou-se banda forte e intensa em 2922 cm^{-1} referente a vibração do estiramento (C--H), em 1614 cm^{-1} e 1627 cm^{-1} as vibrações sugerem a presença de ligação dupla entre Carbono e Oxigênio (C=O), que absorve em torno da região 1600 cm^{-1} . Também é sugestivo a presença de anéis aromáticos, já que esses são absorvidos na faixa de $1600\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ (Silverstein e Webster, 2000; Pavia, 2010).

As bandas identificadas na faixa de 1456 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} sugerem a presença de dupla ligação de carbonos no anel aromático ($\text{C} = \text{C}$), visto que, absorções de intensidade média a forte na região de 1600 cm^{-1} a 1450 cm^{-1} , implicam normalmente em anel aromático (Silverstein e Webster, 2000; Pavia, 2010). Observou-se que bandas na faixa de 1396 cm^{-1} e 1376 cm^{-1} podem ser referentes à dobramento do grupo --C--H em alcanos, visto que estes absorvem na faixa de 1450 a 1375 cm^{-1} (Pavia, 2010). Verificou-se também formação de bandas na faixa de 1041 cm^{-1} e 1013 cm^{-1} , que correspondem a ligação --C--O e houve registro de bandas nas faixas de 828 , 895 , 714 e 696 cm^{-1} essas vibrações sugerem ligações de C--H do anel benzênico (Figura 17; Tabela 5; Silverstein e Webster, 2000; Pavia, 2010).

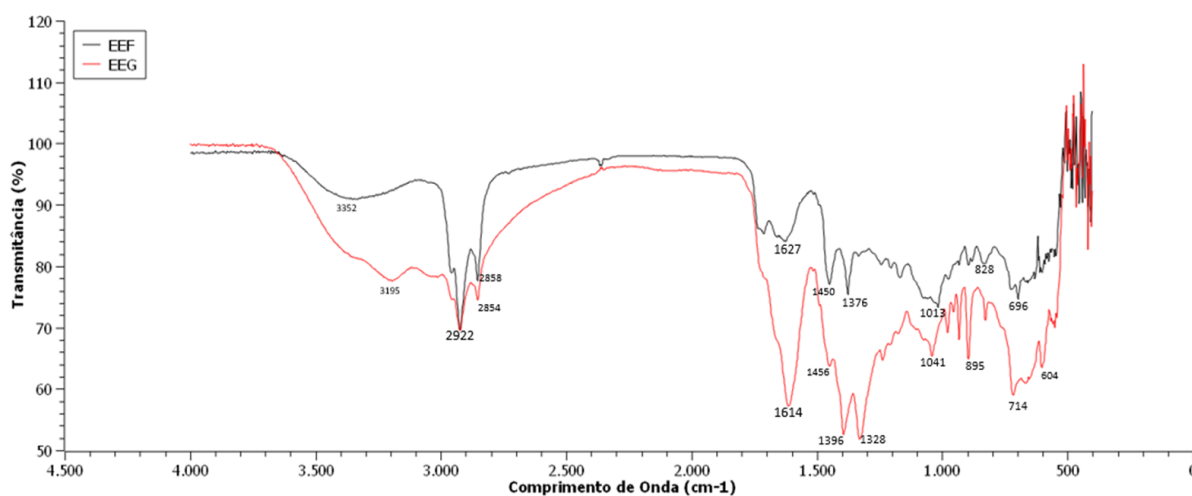


Figura 17: Espectro de absorção no infravermelho do extrato etanólico da folha (EEFo) e do galho (EEGa).

Os espectros de infravermelho das frações obtidas do extrato etanólico das folhas (Figura 18; Tabela 6), registraram bandas em comum na faixa de 3216 cm^{-1} a 3359 cm^{-1} , que indica a presença de grupos --OH e --NH-- , apresentaram bandas fortes na faixa de 2915 cm^{-1} a 2851 cm^{-1} , sendo essas vibrações característica do estiramento C-H em alcanos ou aldeídos (Silverstein e Webster, 2000; Pavia, 2010). As frações evidenciaram bandas leves na faixa de 2340 cm^{-1} , indicam a presença da ligação $\text{--C}\equiv\text{C}$ e $\text{C}\equiv\text{N}$ de alcinos e nitrilas, visto que essas vibram em $2300\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$ (Silverstein e Webster, 2000; Pavia, 2010). Observou-se sinais na faixa de $1710\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$, que sugerem a presença de ligações duplas entre carbono e oxigênio (--C=O), características do grupo funcional carboxila, visto que esses apresentam bandas na faixa de $1720\text{--}1670\text{ cm}^{-1}$ (Pavia, 2010). Ademais, evidenciou-se bandas na faixa de 1400 a 1332 cm^{-1} , que são referentes à dobramento do grupo --CH e sugerem dupla ligação, as mesmas, registraram bandas fortes na faixa de 1059 a 1013 cm^{-1} , e sugerem a presença da ligação (--C--O--) de álcool, éteres e fenóis, visto que esses produzem uma banda forte no intervalo de $1261\text{--}1016\text{ cm}^{-1}$ (Silverstein e Webster, 2000; Pavia, 2010).

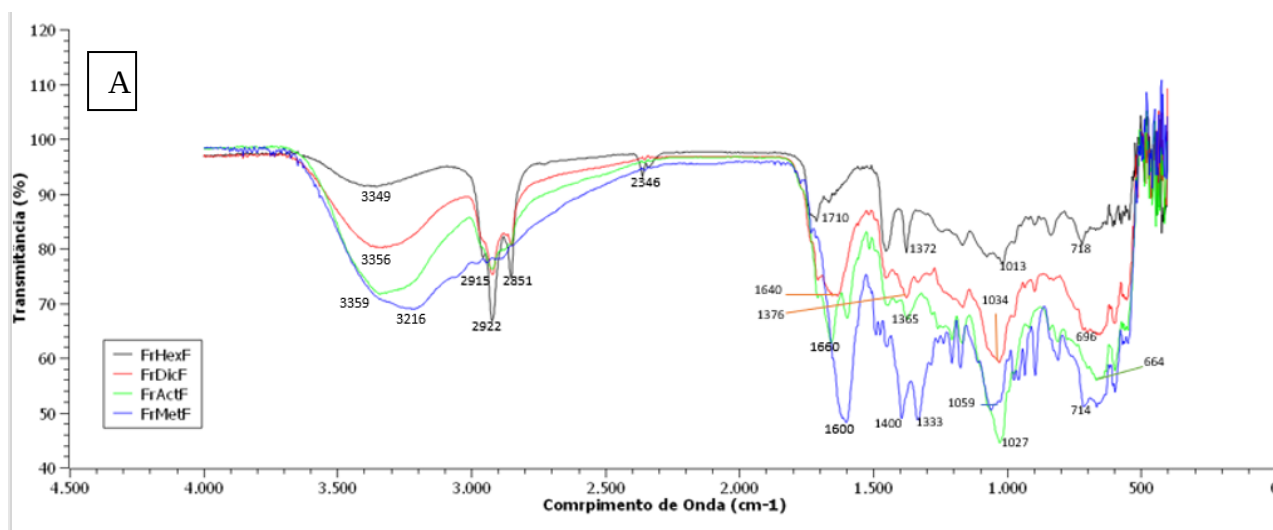
As análises de infravermelho das frações do galho (Figura 18; Tabela 5), apresentaram bandas em comum entre si, observou-se sinais na faixa de 3341 a 3352 cm^{-1} , que indica a presença de grupos --OH e --NH-- , e bandas na faixa de 3032 a 2992 cm^{-1} , indicando a presença de ligações de --C--H em alcanos ou aldeídos. Observou-se bandas leves na região de 2353 cm^{-1} , que indica a presença de ligações $\text{--C}\equiv\text{C}$ ou $\text{C}\equiv\text{N}$. Além destas, evidenciou-se sinais na faixa de 1710 a 1610 cm^{-1} , indicando a presença de ligações --C=O , características do grupo carboxila. As frações evidenciaram bandas na faixa de 1300 a 1127 cm^{-1} , indicando a presença de ligações --C--O-- presentes álcoois, éteres, ésteres, ácidos carboxílicos e anidridos. Além disso, observou-se bandas na faixa de 1376 a 1390 cm^{-1} e de 899 a 649 cm^{-1} , que indicam a presença de ligações do tipo --CH (Silverstein e Webster, 2000; Pavia, 2010).

Os espectros de infravermelho das amostras das folhas e dos galhos foram semelhantes e sugerem a presença dos mesmos grupos funcionais e compostos químicos (Tabela 6). Sendo observados a presença de compostos hidroxilados, carbonilados e anéis aromáticos, entre os seus grupos funcionais. A presença de anéis aromáticos e compostos hidroxilados, são comuns em compostos fenólicos

como flavonóides e cumarinas bem como terpenos e esteroides, o que em conjuntos com as análises de prospecção por CCD sugere a presença desses compostos nas amostras das folhas e galhos.

Desta espécie já foram isolados os monoterpenos, 4-hidroxi-4(α ou β)-isopropil-2-metil-2-ciclohexen-1-ona e 1-metil-4 β -isopropil-1-ciclohexeno-4 α ,5 α ,6 α -triol dos galhos de *D. ambrosioides*, e observou no espectro infravermelho dessas substância a presença de hidroxilas (3340, 3442 e 3379 cm^{-1}) e carbonilas (1648, 1676 e 1441 cm^{-1} ; HOU et al., 2017), que foram semelhantes ao encontrado neste trabalho.

Outro estudo isolou alguns glicosídeos flavônicos, como o kaempferol e seus derivados Kaempferol 3-a-ramnopiranosídeo-4'-p-xilopiranosídeo e Kaempferol 3-a-ramnopiranosídeo-7-p-xilopiranosídeo, onde os espectros de infravermelho dos compostos apresentaram hidroxilas (3425 – 3350 cm^{-1}), carbonilas (1695 - 1456 cm^{-1}), além de bandas que sugerem dupla ligação aromática (1658 – 1308 cm^{-1} ; GHAREEB et al., 2016). Tais registros corroboram com os achados deste estudo, sugerindo assim que os extratos e frações das folhas e dos galhos possuem compostos da classe dos terpenos e flavonóides, sendo estes provavelmente as classes predominantes da espécie.



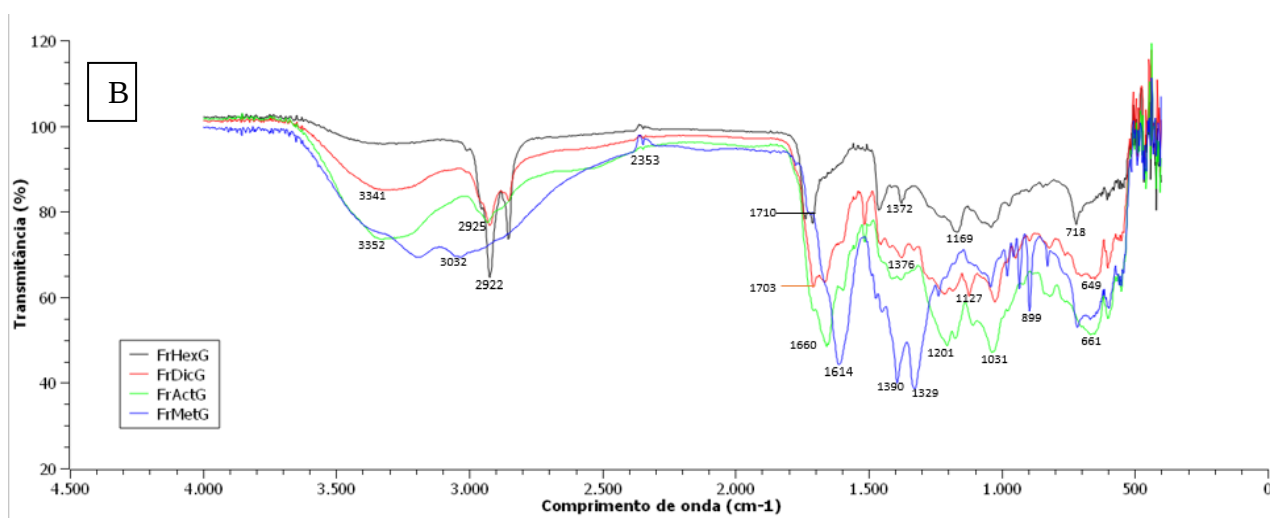


Figura 18: Espectro de absorção no infravermelho das frações obtidas do extrato etanólico.

Legenda: (A) frações da folha e (B) frações do galho

Tabela 6: Regiões de absorção de ligação das moléculas dos extratos e suas frações

Bandas de absorção (cm-1)					Tipos de ligação
EE	FH	FD	FAE	FMe	
Folhas					
3352	3349	3356	3359	3216	–OH; –NH–
2922	2922	2915	2915	2851	–H–C–
-	2340	2340	2340	2354	–C≡C; C≡N
1627	1710	1640	1660	1600	–C=O–
1450	1372	1376	1365	1400	–C–H–; –C=C–
1013	1013	1034	1027	1059	–C–O–
828	719	696	664	714	–C–H–
Galhos					
3195	3341	3341	3352	3352	–OH; –NH–
2922	2922	2925	2925	3032	–H–C–
-	2353	2353	2353	2353	–C≡C; C≡N
1614	1710	1703	1660	1614	–C=O–
1456	1372	1376	1376	1390	–C–H–; –C=C–
1041	1169	1127	1201	1031	–C–O–
895	718	649	661	899	–C–H–

Legenda: Extrato etanólico (EE), fração de hexano (FH), fração de diclorometano (FD), fração de acetato de etila (FAE), fração de metanol (FMe).

Os extratos e frações da folha e do galho foram submetidas a análises de espectrometria de ressonância magnética nuclear. Nos espectros de RMN de ^1H das amostras da folha, os deslocamentos que aparecem na ampla faixa entre 0.5 e 4.0 ppm sendo característicos para a presença de hidrogênios do grupo amina (R-N-H), sendo possível notar sinais de deslocamento químico entre δ 0,58 – 2,80 ppm no extrato EEFo, δ 0,81 – 2,76 ppm na fração FHFo, δ 0,56 – 1,67 ppm na fração FDFo, δ 0,09 – 1,74 ppm na fração FAEFo e δ 0,87 – 1,62 ppm na fração FMeFo (Figura 19), ambos sugerem a presença de hidrogênios metínicos e metilênicos, presentes em estruturas químicas de terpenos (Pavia, 2010; Nascimento et al., 2020).

Além disso, nos espectros de RMN do extrato e frações, observou-se sinais de deslocamento químico entre δ 3,50 – 5,59 ppm no extrato EEFo, δ 3,50 – 5,58 ppm na fração FHFo, δ 3,23 – 5,78 ppm na fração FDFo e δ 2,80 – 3,5 ppm na fração FAEFo, ambos apresentaram sinais na faixa entre 3,23 e 4,30 ppm sugestivos de hidrogênios de grupos metílicos e oximetínicos ligados a carbonos oxigenados e hidroxilas de unidades glicosídicas, sugerindo a presença de compostos glicosilados na espécie, como heterosídeos de flavônicos e glicosídeos flavônicos (Figura 19), os espectros de RMN ^1H de compostos glicosilados são caracterizados por sinais entre δ 3,00 - 4,50 ppm referentes aos hidrogênios carbinólicos dos compostos, o intervalo para os hidrogênios da hidroxila dos álcoois (-C-O-H) presentes em compostos glicosilados é variável e pode prolongar-se de δ 2,5 a 5,0.

Ademais, os sinais entre δ 5,0 a 5,59 ppm podem estar relacionados aos hidrogênios olefínicos e os ésteres (R-O-CH-) que são geralmente encontrados no mesmo sinais de deslocamentos que a maioria dos álcoois de 3,5 a 4,5 ppm, ambos foram detectados nas amostras analisadas, esses grupos funcionais são comumente encontrados em estruturas de compostos flavônicos e terpenos (Mcmurry, 1996; Kehlbeck et al. 2014; Silverstein et al., 2000).

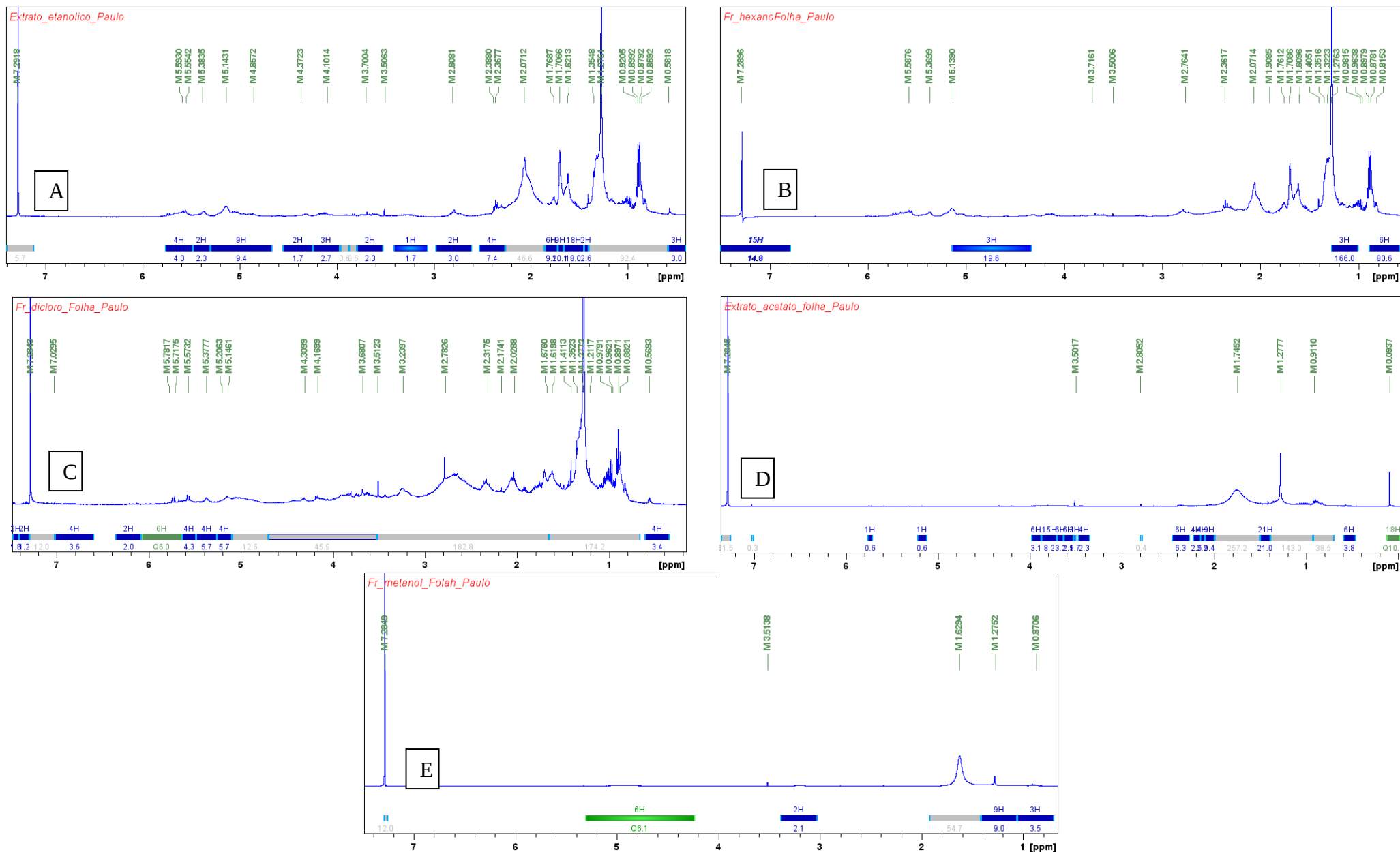


Figura 19: Espectro de ressonância de magnética nuclear de hidrogênio de extratos e frações da folha

Legenda: A- Extrato de etanol folha (EEFo); B- Fração hexano folha (FHFo); C- Fração diclorometano folha (FDFo); D- Fração acetato de etila folha (FAEFo) e E- fração metanol folha (FMeFo).

As análises de RMN de ^1H das amostras do galho foram semelhantes ao encontrados nas folhas, com pequenas variações nos deslocamentos químicos, sugerindo a presença de terpenos e flavonóides. Sendo possível notar sinais de deslocamento químico entre δ 0,02 – 2,80 ppm no extrato EEGa, δ 0,83 – 2,38 ppm na fração FHGa, δ 0,80 – 2,79 ppm na fração FDGa, δ 0,83 – 2,95 ppm na fração FAEGa e δ 0,89 – 1,63 ppm na fração FMeGa (figura 20), ambos sugerem a presença que de hidrogênios metínicos e metilênicos, presentes na estrutura química dos terpenos (Pavia, 2010; Nascimento *et al.*, 2020).

Além disso, nos espectros de RMN do extrato e frações, observou-se sinais de deslocamento químico entre δ 3,00 – 4,78 ppm no extrato EEGa, δ 3,22 – 5,41 ppm na fração FHGa, δ 3,01 – 4,18 ppm na fração FDGa, δ 3,01 – 3,88 ppm na fração FAEGa e δ 3,15 e 4,90 ppm na fração FMeGa (figura 20), ambos apresentaram sinais sugestivos de hidrogênios de grupos metílicos e hidroxilas de unidades glicosídicas, sugerindo a presença compostos glicosilados na espécie, que podem ser atribuído aos heterosídeos e glicosídeos flavônicos. Ademais, é possível detectar sinais de hidrogênios de hidroxila dos álcoois ($-\text{C}-\text{O}-\text{H}$) presentes em compostos glicosilados que varia de δ 2,5 a 5,0 e de ésteres ($\text{R}-\text{O}-\text{CH}-$) que são geralmente encontrados em sinais de deslocamentos de 3,5 a 4,5 ppm (Silverstein e Webster, 2000; Pavia, 2010).

Observa-se que a composição química para as amostras derivadas das folhas e galhos são semelhantes, no entanto, pode ocorrer variação nos teores de metabólitos presentes em cada uma das amostras. Desta forma, quando comparado os espectros obtidos das amostras das folhas e galhos, nota-se que os sinais químicos são mais evidentes nas amostras da folha, sendo possível que os compostos químicos estejam maiores teores nesta parte da planta.

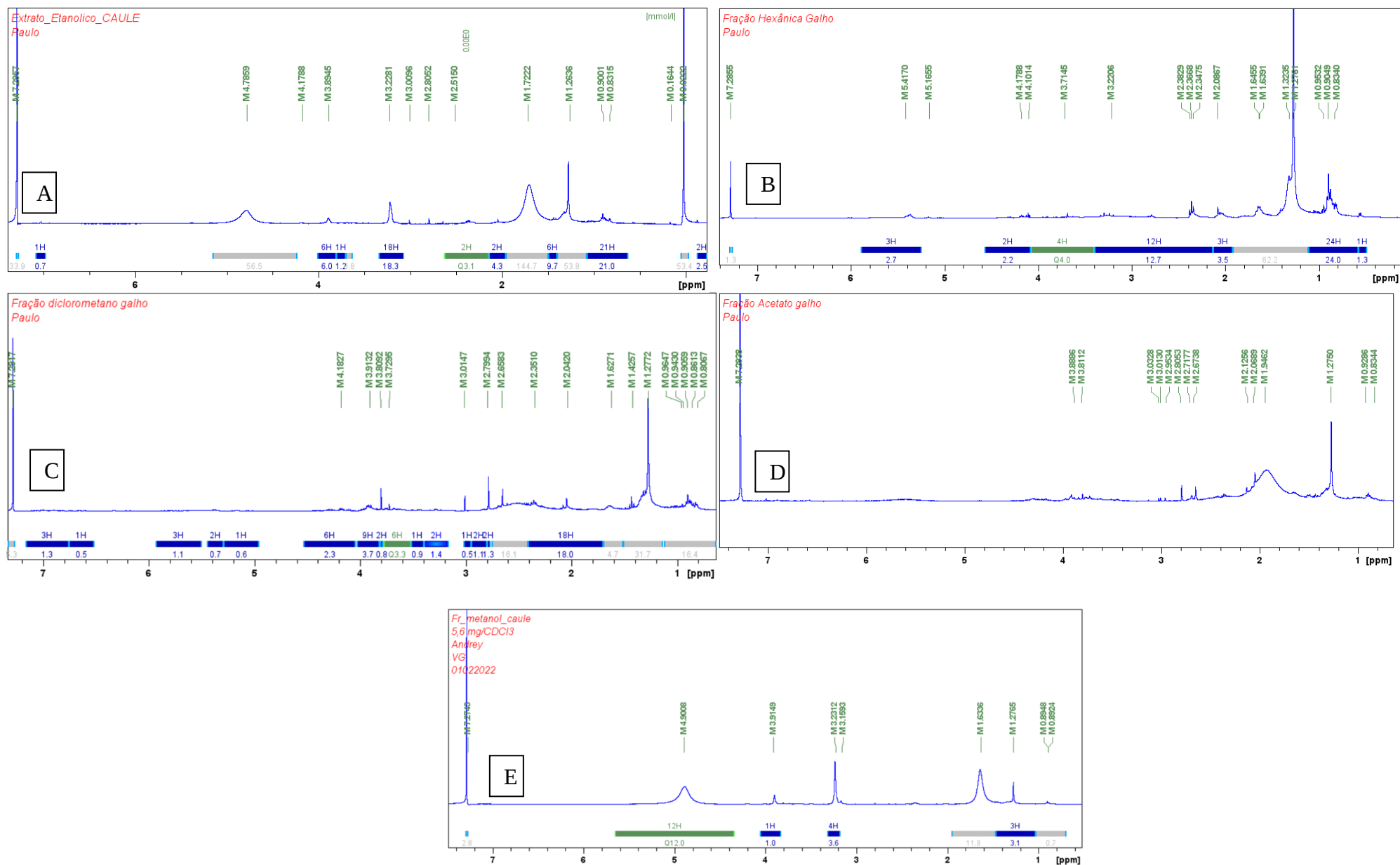


Figura 20: Espectros de ressonância de magnética nuclear de hidrogênio de extratos e frações do galho

Legenda: A- Extrato de etanol galho (EEGa); B- Fração hexano galho (FHGa); C- Fração diclorometano galho (FDGa); D- Fração acetato de etila galho (FAEGa) e E- fração metanol folha (FMeGa).

A Tabela 7, mostra os valores de deslocamentos químicos (δ) obtidos dos extratos, comparados com terpenos isolados da espécie, desta forma observou-se que os extratos demonstram sinais e valores de deslocamento semelhantes as substâncias isoladas, desta forma sugere que composto desta classe estejam presentes nas amostras estudadas, ademais na *D. ambrosioides*, a classe dos terpenos é considerada como majoritária na espécie (Gille *et al.*, 2010; Hallal *et al.*, 2010).

Tabela 7: Deslocamento químicos obtidos de extratos *D. ambrosioides* e dados da literatura de terpenos isolados da espécie.

Picos	δ H (ppm)- RMN ^1H					
	EEFo	EEGa	1*	EEFo	EEGa	2*
2	3,68	3,64	3,77	5,74	5,64	6,50
3	3,52	3,21	3,56	5,77	5,04	6,40
5	1,27	1,27	1,20	1,41	1,44	1,49
6	2,06	2,04	2,00	2,06	2,04	1,99
7	1,41	1,44	1,37	1,35	1,27	1,36
8	1,78	2,03	1,98	2,00	1,70	1,91
9	0,98	0,90	0,99	0,98	0,91	0,99
10	0,96	0,93	0,96	0,98	0,90	0,99

Referência: 1- 1,2,3,4-Tetrahidroxi-p-mentano; 2- Ascaridol *trivellato Grassi, 2011.

Legenda: EEFo – extrato etanólico folha e EEGa – extrato etanólico galho

5.2. ATIVIDADE ANTILEISHMANIA

5.2.1 Atividade antipromastigota

Os extratos e frações obtidos da folha e do galho foram submetidos à avaliação da atividade antileishmania contra cepas de formas promastigotas de *L. amazonensis*. Os extratos etanólicos (EEFo e EEGa) nas concentrações testadas mostraram-se moderadamente ativos contra promastigota de *L. amazonensis* com concentrações inibitórias 50% (CI_{50}) de $\text{CI}_{50} = 145,9 \mu\text{g/mL}$ e $\text{CI}_{50} = 189,2$, respectivamente.

No entanto, quando se compara as CI_{50} , observa-se que o EEGa ($\text{CI}_{50} = 189,2 \pm 0,27 \mu\text{g/mL}$) apresentou uma atividade antipromastigota inferior ao EEFo

(CI_{50} = 145,9 $\mu\text{g/mL}$ $\pm$ 0,09 $\mu\text{g/mL}$; tabela 8), ambos possuem perfil químico semelhante, logo a distinção nas atividades pode estar relacionada as diferenças nos teores dos constituintes químicos dos extratos. Outro estudo, avaliou o extrato hidroalcoólico de *D. ambrosioides*, e apresentou atividade moderada *in vitro* sobre formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (CI_{50} = 151,9 $\mu\text{g/mL}$; Bezerra *et al.*, 2006), semelhante ao encontrado neste estudo.

Com a hipótese que o fracionamento talvez contribuisse para a atividade antipromastigota, os extratos brutos obtidos das folhas e galhos de *D. ambrosioides* foram submetidos ao fracionamento com solventes de diferentes polaridades (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol). A polaridade do solvente utilizado no processo de fracionamento permite obter frações com composições químicas diferentes, e isso pode interferir na resposta biológica e pode se obter frações ativas ou inativas.

Observou-se que o fracionamento do extrato bruto obtido das folhas contribuiu para a atividade antipromastigota, obtendo resultados melhores que do extrato (FHFO CI_{50} = 133,8 $\mu\text{g/mL}$; FDFo CI_{50} = 88,3 $\mu\text{g/mL}$ e FAEFo CI_{50} = 118,7 $\mu\text{g/mL}$; tabela 8). Da mesma forma, no extrato bruto obtido da galhos, observou-se que o fracionamento contribuiu para atividade, sendo observadas respostas similares as frações das folhas (FHGa CI_{50} = 172,9 $\mu\text{g/mL}$; FDFo CI_{50} = 97,6 $\mu\text{g/mL}$ e FAEFo CI_{50} = 163,2 $\mu\text{g/mL}$; tabela 8)

No presente estudo, foram obtidas frações inativas contra promastigota de *L. amazonensis* como as frações de metanol (FMeFo e FMeGa, ambas com CI_{50} = >200 $\mu\text{g/mL}$), moderadamente ativas (FHFO, FHGa, FAEFo e FAEGA) e ativas (FDFo e FDGa; tabela 8). Quando se relaciona estes resultados aos estudos químicos, a fração diclorometano foi a mais promissora e parece conter terpenos e estes serem os responsáveis pela atividade, ou pode resultar do sinergismo entre os terpenos e demais constituintes de média polaridade.

Outro estudo, avaliou a atividade antileishmania em formas promastigota de *L. amazonensis* do extrato hidroalcoólico obtido das folhas de *D. ambrosioides* (EHDA), bem como de suas frações (hexano-FHDA, acetato de etila-FAEDA e clorofórmio-FCDA), sendo obtidas CI_{50} superiores a 100 $\mu\text{g/mL}$ (EHDA = 151,9 $\mu\text{g/mL}$; FHDA = 177 $\mu\text{g/mL}$; FCDA = 220 $\mu\text{g/mL}$; FAEDA = >500 $\mu\text{g/mL}$; Reis *et al.*, 2012). No entanto, observou-se que o fracionamento não contribuiu para atividade

antileishmania, resultado diferente ao obtidos neste trabalho, cujo os resultados foram mais promissores, tais diferença pode estar relacionados ao método de extração e fracionamento que pode interferir diretamente nos compostos químicos presentes nas amostras de extratos e frações.

Em síntese quando se relaciona os dados da atividade biológica observa-se que o fracionamento contribuiu para a obtenção de frações mais ativas sobre promastigota de *L. amazonensis*, sendo as amostras derivadas das folhas mais promissoras que as derivados do galho. Além disso, as amostras possuem atividade antileishmania semelhantes, provável que a composição química responsável pelo efeito inibitório se encontra em concentrações próximas em todas as frações, está atividade pode estar relacionado a presença de terpenos, pois de acordo com os estudos químicos, é a classe que está presente em todas as amostras, com exceção das frações de metanol. As frações mais promissoras foram as de diclorometano apresentando menor concentração inibitória (FDFo $CI_{50} = 88,3 \mu\text{g/mL}$ e FDGa $CI_{50} = 97,6 \mu\text{g/mL}$; Tabela 8), podendo estar relacionado ao sinergismo dos terpenos e demais compostos presentes nas frações.

Da classe dos terpenos, o ascaridol já foi isolado da espécie *D. ambrosioides*, e obteve atividade frente as formas promastigota e amastigota de *L. amazonensis* ($CI_{50} = 0,1 \mu\text{g/mL}$ e $CI_{50} = 0,3 \mu\text{g/mL}$, respectivamente; Monzote *et al.*, 2014). Outro estudo avaliou o efeito dos principais componentes terpênicos isolados de *D. ambrosioides* contra *L. amazonensis* e verificou-se o efeito inibitório contra formas promastigotas (ascaridol $CI_{50} = 0,1 \mu\text{g/mL}$, carvacrol $CI_{50} = 0,15 \mu\text{g/mL}$ e cariofileno $CI_{50} = 4,9 \mu\text{g/mL}$), além disso observou um efeito sinérgico da combinação de ascaridol e carvacrol contra promastigotas de *L. amazonensis* (Pastor *et al.*, 2015). Desta forma é provável que a atividade antileishmania da espécie, assim como das frações diclorometano contra a forma promastigota deve estar relacionada aos terpenos, principalmente.

O mecanismo de ação dos monoterpenos pode estar relacionado a vários alvos, estudos recentes sugerem que estes compostos devem atuar promovendo perturbações na integridade e permeabilidade de membranas dos parasitos, bem como na alteração na morfologia das formas promastigotas, interferindo nas funções básicas dos parasitos, além disso o mecanismo de ação pode envolver o acúmulo nos níveis de espécie reativas de oxigênio (ROS), uma das vias que

envolve o aumento nos níveis de radicais superóxidos pode ser decorrente da inibição da via da tripanotona redutase (TR), desencadeando uma diminuição no potencial de membrana mitocondrial e subsequente diminuição nos níveis de ATP intracelular, levando a morte do parasito (Ribeira, 2011; Monzote *et al.*, 2018; Chacón-vargas *et al.*, 2022)

Tabela 8 – Atividade antipromastigota de *Dysphania ambrosioides* em *Leishmania amazonensis*

AMOSTRAS	CI ₅₀ ± SD (µg/mL)	INTERPRETAÇÃO
EEFo	145,9 ± 0,09	Moderadamente ativo
FHFo	133,8 ± 0,12	Moderadamente ativo
FDFo	88,3 ± 0,06	Ativo
FAEFo	118,7 ± 0,16	Moderadamente ativo
FMeFo	>200	Inativo
EEGa	189,2 ± 0,27	Moderadamente ativo
FHGa	172,9 ± 1,09	Moderadamente ativo
FDGa	97,6 ± 0,33	Ativo
FAEGa	163,2 ± 0,91	Moderadamente ativo
FMeGa	>200	Inativo
Anfotericina B	0,069 ± 0,004	Ativo

Legenda: CI₅₀ – Concentração inibitória 50%; Extrato etanólico folha (EEFo); Fração de hexano folha (FHFo); Fração diclorometano folha (FDFo); Fração acetato de Etila folha (FAEFo); Fração metanol folha (FMeFo); Extrato Etanólico galho (EEGa); Fração de hexano galho (FHGa); Fração diclorometano galho (FDGa); Fração acetato de Etila galho (FAEGa); Fração metanol galho (FMeGa). O procedimento foi realizado para o pó de folhas e galhos, separadamente.

Fonte: Próprio autor

5.3 ESTUDO IN SILICO E DOCAGEM MOLECULAR

5.3.1 Predição dos aspectos físico-químicos, farmacocinéticos e toxicológicos (ADMET)

De acordo com a literatura científica (Vital *et al.*, 2023; Zohra *et al.*, 2019; Sá *et al.*, 2013), evidencia-se a presença de flavonoides e terpenos na espécie *D. ambrosioides* que podem ser promissores para atividade biológica, nesse sentido, visando avaliar os parâmetros físico-químicos, farmacocinéticos e toxicológicos desses compostos, foram selecionados os flavonoides: (1) Quercetina; (2) Isorhamnetina; (3) Kaempferol; (4) kaempferol 3-O- α -L-1-C-4-ramnopiranosídeo (afzelina); (5) Kaempferol 3-O- α -1-C-4-ramnosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-4C1-xilopiranosídeo; (6) kaempferol-7-O- α -L-1-C-4-ramnopiranosídeo; (7) Kaempferol-3-ramnoside-4'-xilósídeo; (8) Kaempferol 3-ramnosídeo-7-xilósídeo; (9) Kaempferol-7-ramnoside; (10) Scutellarein-7-O-ramnosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-ramnosyl (1 $\rightarrow$ 2)-ramnosídeo; (11) Scutellarein-7-O-ramnosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-ramnosídeo e (12) Quercetina-7-O- α -L-ramnopiranosídeo (Figura 21). Também selecionou-se os terpenos: (13) 1,4-Dihidroxip-mento-2-eno; (14) (-)-(2S,4S)-p-Mentha-1(7),8-dien-2-hidroperóxido; (15) (2R,4S)-p-Mentha-1(7),8-dien-2-hidroperóxido; (16) Cis-p-Ment quarenta l(7), 8ol-2; (17) (1R,4S)-p-met-2-en-1-ol; (18) (-1S,4S)-p-Mentha-1(7),8-dien-2-hidroperóxido; (19) Ascaridol; (20) 1,2,3,4-tetradroxi-p-metano; (21) 4-hidroxi-4(α ou β)-isopropil-2-metil-2-ciclohexeno-1-ona; (22) 1-metil-4 β -isopropil-1-ciclohexeno-4 α ,5 α ,6 α -triol; (23) (1S, 2S, 3R, 4S)-1-metil-4-(propan-2-il)ciclohexano-1,2,3,4-tetrol; (24) (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol; (25) chenopanona; (Figura 21).

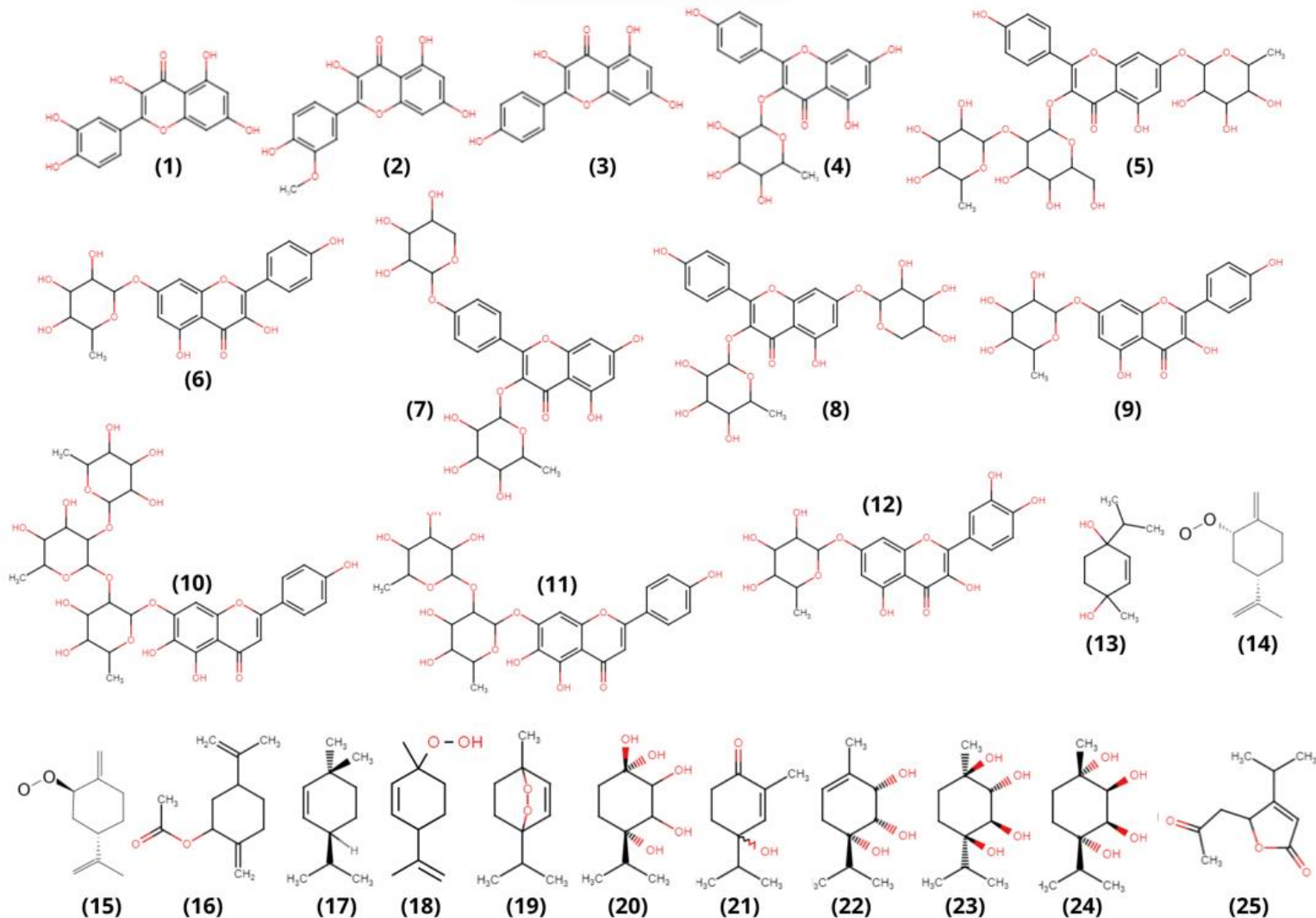


Figura 21: Estruturas dos compostos isolados selecionados de *D. ambrosioides*

Legenda: **1** – Quercetina; **2** – Isorhamnetina; **3** – Kaempferol; **4** – Kaempferol 3-O-α-L1 C4–ramnopiranosídeo (afzelina); **5** kaempferol 3-O-α-L-1 C4 - ramnosil-(1"→2")-β-D-4 C1 -xilopiranosídeo; **6** - : kaempferol 7-O-α-L-1 C4 –ramnopiranosídeo; **7** - Kaempferol 3-ramnosídeo-4'-xilósídeo; **8** - Kaempferol 3-ramnosídeo-7-xilósídeo; **9** - Kaempferol 7-ramnosídeo; **10** - Scutellarein-7-O-ramnosyl-(1→2) ramnosyl (1→2) ramnosídeo; **11** - Scutellarein-7-O-ramnosyl-(1→2) ramnosídeo; **12** - Quercetina-7-O-alfa-L-ramnopiranosídeo **13)** 1,4-Dihidroxi-p-mento-2-eno; **14)** (-)-(2S,4S)-p-Mentha-1(7),8-dien-2-hidroperóxido; **15)** (-)-(2R,4S)-p-Mentha-1(7),8-dien-2-hidroperóxido; **16)** Cis-p-Menthadiene-1(7),8ol-2; **17)** (1R,4S)-p-met-2-en-1-ol; **18)** (-1S,4S)-p-Mentha-1(7),8-dien-2-hidroperóxido; **19)** Ascaridole; **20)** 1,2,3,4-tetraidróxi-p-metano; **21)** 4-Hidroxi-4(α ou β)-isopropil-2-metil-2-ciclohexeno-1-ona; **22)** 1-metil-4β- isopropil-1-ciclohexeno-4α,5α,6α-triol; **23)** (1S,2S,3R,4S)-1-metil-4-(propan-2-il)ciclohexano-1,2,3,4-tetrol; **24)** (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol; **25)** chenopanona.

Inicialmente, foi realizada uma avaliação das características físico-químicas das moléculas para verificar se atendiam a regra de Lipinski (RO5). Ao seguir esta regra, existe elevada possibilidade do composto químico ter uma adequada biodisponibilidade por via oral, pois isso atribui maior solubilidade e permeabilidade, especialmente, daquelas moléculas absorvidas por difusão passiva ou facilitada (Chen *et al.*, 2020; Mignani, 2018).

Em relação ao perfil físico-químico, observou-se que os compostos que violaram a regra de Lipinski foram, majoritariamente, da classe dos flavonoides e, destes todos possuem uma ou mais molécula de glicose em sua estrutura (Tabela 9 e figura 21). As violações ocorreram para os flavonoides glicosilados (5), (7), (8), (10), (11) e (12) devido as características de maior polaridade e elevada massa molecular desses metabolitos, o que resulta diretamente em um processo de absorção prejudicado (Abegão, 2016). A maioria dos monoterpenos analisados apresentam baixo peso molecular, estando na faixa estabelecida por Lipinski, indicando que estes compostos terão maior facilidade em atravessar as membranas por serem moléculas pequenas e lipossolúveis. Um ponto bastante positivo dos flavonoides é a elevada solubilidade em meio aquoso, bem como para os terpenos, com exceção do composto 17. Além disso, os terpenos apresentam um bom perfil de lipossolubilidade (Tabela 9, página 85).

As moléculas (5), (7), (8), (10), (11) e (12) violaram mais de um parâmetro da regra de Lipinski, sendo estes: massa molecular (MM), coeficiente de solubilidade (Log P); número de aceptores de hidrogênio (nADH) e número de doadores de hidrogênio (nDLH) (tabela 8). A elevada MM das moléculas é um dos principais limitantes da permeação pelas barreiras fisiológicas, o que inclui baixa distribuição pela BHE. Violações do nALH e nDLH, implicam em baixa biodisponibilidade oral (Veber *et al.*, 2002). Um número excessivo de DLH prejudica a permeabilidade ao passar do meio hidrofílico para o hidrofóbico, devido ao excesso de quebra nas ligações (Mendes, 2019). Um maior número de ALH também parece estar relacionado a formação de pontes de hidrogênio no sitio alostérico das CYP influenciando na biodisponibilidade (Ferreira *et al.*, 2017).

O LogP (coeficiente de partição octanol-água ou lipofilicidade), permite determinar o grau de hidrofobicidade das moléculas, este influencia diretamente na absorção do fármaco e na biodisponibilidade, substâncias que apresentam logP

maior que 1 são mais solúveis em meio orgânico e com valores menores que 1 apresentam maior solubilidade em meio aquoso (Testa *et al.*, 2000). Desta forma, Lipinski *et al.*, (1997) descrevem que o valor ideal de logP deve estar na faixa de 0,4 a +5,6. Neste estudo, quase todas as moléculas apresentam logP dentro do parâmetro estabelecido, a considerar (5), (6), (7), (8), (12) e (21), que apresentaram valores abaixo do esperado para o coeficiente de partição, indicando que estas são mais solúveis em meio aquoso e possivelmente apresentam dificuldade de serem absorvidos pelas membranas plasmáticas. Em sua maioria, os glicosídeos flavônicos apresentam logP mais baixo do que os monoterpenos, indicando que a classe monoterpênica é mais lipossolúvel.

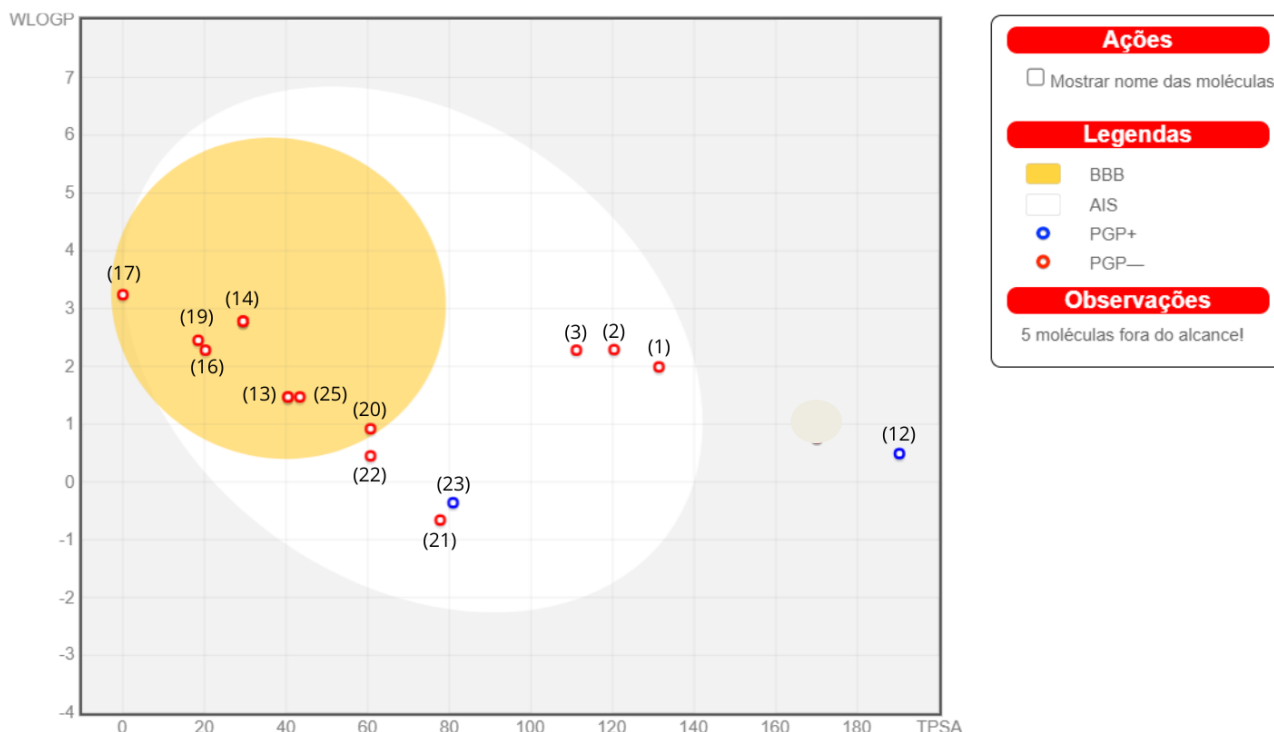
A figura 22, mostra o esquema *boiled-egg* que prevê a absorção intestinal e a permeação cerebral de moléculas de baixo peso molecular a partir dos cálculos de lipofilicidade e polaridade (Daina; Zonete, 2016). Os programas previram que para as moléculas (5), (7), (8), (10) e (11) tiveram mais de 2 violações na RO5 e não foram detectados no gráfico *boiled-egg*, pois teoricamente não ocorreria solubilização e consequente absorção intestinal (tabela 8 e figura 21), que refletem diretamente na absorção e biodisponibilidade de fármacos (Karalis *et al.*, 2008). O programa mostrou que o flavonoide (12) e o terpeno (23) atravessam as barreiras fisiológicas e que, teoricamente, serão eluidos pela glicoproteína P (GpP), enquanto os demais terão sua permeação por difusão passiva ou facilitada. A GpP pode atuar no transporte dos fármacos do intestino para o sangue, mas também pode facilitar o efluxo dessas substâncias no TGI, impedindo sua absorção (Araujo, 2015).

Em relação ao perfil farmacocinético, todas os compostos da classe dos terpenos, bem como os flavonoides (1), (2) e (3), atenderam a esse critério, parecendo possuir boa absorção cutânea e intestinal (tabela 9). Compostos glicosilados possuem menor capacidade de atravessar as barreiras fisiológicas e as agliconas dos flavonóides são cinco vezes mais absorvidas que os seus compostos glicosilados através das células Caco-2 (Liu; Hu, 2002). Nesse caso, as agliconas poderão demonstrar uma absorção maior, na medida em que são metabolizadas em moléculas com menor peso molecular e menos polares que a sua forma glicosilada (Abegão, 2016). O peso molecular destes compostos influencia na absorção pelas membranas biológicas, desta forma, quanto maior o peso molecular maior será o grau de dificuldade para o composto permear

membranas, indicando que possivelmente tem menos possibilidade de ser disponível por via oral (Lipinski *et al.*, 1997).

As moléculas que chegam a corrente sanguínea poderão ser distribuídas para diferentes órgãos e tecidos, podendo chegar a barreira hematoencefálica (BHE), atravessá-la e exercer efeitos sobre o SNC, dependendo do seu grau de lipofilicidade e peso molecular (Bentes, 2016). Quando se deseja fármacos que atuem no SNC esses precisam atravessar a BHE de forma ampla, como previsto para os terpenos (13), (14), (15), (16), (17), (18), (19) e (24), que são mais lipossolúveis. No entanto, moléculas que conseguem se difundir pela BHE podem desencadear, além de ação farmacológica, efeitos adversos como toxicidade (Martins *et al.*, 2021). Os terpenos (20) e (25) atravessam de forma moderada, e as moléculas da classe de flavonoides e os terpenos (21), (22) e (23) parecem não atravessar a BHE, provavelmente devido a característica mais hidrossolúvel dessas moléculas e ao peso molecular (Silverthorn, 2017).

Figura 22 - Esquema Boiled-Egg para absorção/permeação de moléculas pelas barreiras fisiológicas



Legenda: 1) Quercetina; 2) Isorhamnetina; 3) Kaempferol; 4) Kaempferol 3-O- α -L-1 C4-ramnopiranosídeo (afzelina); 9) Kaempferol 7-ramnosídeo; 12) Quercetina-7-O- α -L-ramnopiranosídeo 13) 1,4-Dihidroxip-mento-2-eno; 14) (-)-(2S,4S)-p-Mentha-1(7),8-dien-2-hidroperóxido; 15) (-)-(2R,4S)-p-Mentha-1(7),8-dien-2-hidroperóxido; 16) Cis-p-Menthadiene-1(7),8ol-2; 17) (1R,4S)-p-met-2-en-1-ol; 18) (-1S,4S)-p-Mentha-1(7),8-dien-2-hidroperóxido; 19) Ascaridole; 20) 1,2,3,4-tetraidróxi-p-metano; 21) 4-Hidroxi-4(α ou β)-isopropil-2-metil-2-

ciclohexeno-1-ona; **22**) 1-metil-4 β - isopropil-1-ciclohexeno-4 α ,5 α ,6 α -triol; **23**) (1S,2S,3R,4S)-1-metil-4-(propan-2-il)ciclohexano-1,2,3,4-tetrol; **24**) (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol; **25**) Chenopanona. **Parâmetros avaliados:** Barreira Hematoencefálica (BBB); Absorção pelo Trato Gastrointestinal (AIS); Eluição pela Glicoproteína P (PGP+); Eluição não ocorre pela Glicoproteína P (PGP-). os pontos localizados na gema do ovo cozido são moléculas que permeiam a barreira hematoencefálica (BBB), os pontos localizados na clara do ovo cozido referem-se as moléculas que são absorvidas passivamente pelo trato gastrointestinal (AIS), os pontos azuis são moléculas que podem ser efluídas do SNC pela Glicoproteína P (PGP+) e os vermelhos são as moléculas que não são efluídas do SNC pela Glicoproteína P (PGP-). Moléculas fora do alcance indica absorção ruim.

Após a solubilização e passagem através das barreiras do TGI para o sangue, as moléculas tendem a se ligar às proteínas plasmáticas (PP) e/ou aos componentes do sangue, como a albumina e a glicoproteína P (Franco *et al.*, 2007). Somente a fração não-ligada se liga ao sitio de ação, procedendo do efeito terapêutico (Yang *et al.*, 2006). Em relação a ligação a proteína plasmática (LPP) a maioria dos flavonoides e os terpenos (17) e (25) parecem ligar-se fortemente a PP (>75%). No geral os terpenos, se ligam de forma moderada (>30% e <75%) e a molécula (21) (4-Hidroxi-4(α ou β)-isopropil-2-metil-2-ciclohexeno-1-ona) se liga fracamente as proteínas plasmáticas (<30%), tendo melhor distribuição e seguindo o grau de ligação a proteínas plasmáticas de alguns medicamentos (tabela 9) (Parfitt, 1999).

Em relação ao efeito de primeira passagem, com exceção das moléculas (5), (7) e (8), todas as demais estruturas sofrem reações oxidativas catalisadas pelas enzimas microsossomais hepáticas citocromo P450. Quanto maior o número de isoformas inibidas, maior será a interação desses compostos com outros fármacos, o que pode gerar a presença de reações adversas (Habenschus, 2017).

Em relação ao tempo de meia-vida de eliminação ($T^{1/2}$) em horas, previu-se que tanto os flavonoides quanto os terpenos possuem um $T^{1/2}$ alto (>3h) em sua maioria, mas os compostos (7), (8), (11), (15) e (17) possuem uma meia vida curta (<3h), podendo ser eliminados mais rapidamente, o que levaria a necessidade de maior frequência de doses durante o dia. Em relação a taxa de excreção (TE), em teoria, a maioria dos terpenos e os flavonoides (1), (2), (6), (12), apresentam baixa TE o que sugere que outras vias estão envolvidas no processo de eliminação desses compostos que está relacionado com o maior $T^{1/2}$ atribuído a esses compostos.

Tabela 9: Predição de propriedades físico-químicas e farmacocinéticas de isolados de *D. ambrosioides*

	FÍSICO-QUÍMICA						ABSORÇÃO			DISTRIBUIÇÃO		BIOTRANSFORMAÇÃO		EXCREÇÃO	
	MM	LogP	nALH	nLDLH	LogS	Cutânea	MDCK	Caco2	AIH	LPP	BHE	Inibição	Substrato	T ½	TE
1	302,24	1,98	7	5	Alta	Alta	Media	Media	Media	Alta	Baixa	1A2 e 3A4	Não	Ruim	Media
2	316,26	2,29	7	4	Alta	Alta	Media	Media	Alta	Alta	Baixa	1A2 e 3A4	2C9	Ruim	Media
3	286,05	2,65	6	4	Alta	Alta	Media	Media	Alta	Alta	Baixa	1A2	2C9	Ruim	Baixa
4	432,11	0,78	10	6	Alta	Alta	Baixa	Media	Media	Alta	Baixa	3A4	2C9	Médio	Baixa
5	740,66	-2,89	19	11	Alta	Alta	Baixa	Media	Baixa	Media	Baixa	Não	Não	Ruim	Baixa
6	434,44	0,22	9	6	Alta	Alta	Baixa	Media	Media	Alta	Baixa	Não	GpP	Médio	Media
7	564,59	-0,74	14	8	Alta	Alta	Baixa	Media	Baixa	Alta	Baixa	2C9 e 2C19	3A4	Excelente	Baixa
8	564,49	-1,10	14	8	Alta	Alta	Baixa	Media	Baixa	Alta	Baixa	Não	Não	Excelente	Baixa
9	432,38	0,72	10	6	Alta	Alta	Baixa	Media	Media	Alta	Baixa	Não	Não	Médio	Baixa
10	726,68	-1,58	18	10	Alta	Alta	Baixa	Baixa	Media	Media	Baixa	Não	GpP	Ruim	Baixa
11	578,52	-0,36	14	8	Alta	Alta	Baixa	Media	Media	Alta	Baixa	Não	GpP	Excelente	Baixa
12	448,38	0,48	11	7	Alta	Alta	Baixa	Media	Media	Alta	Baixa	2C9 e 2C19	Não	Ruim	Media
13	170,25	1,47	2	2	Alta	Alta	Media	Media	Alta	Media	Alta	2C9	2C19	Médio	Media
14	168,23	2,77	2	1	Alta	Alta	Alta	Media	Alta	Media	Alta	2C19 e 2C9	3A4	Médio	Media
15	168,23	2,77	2	1	Alta	Alta	Alta	Media	Alta	Media	Alta	2C19 e 2C9	3A4	Excelente	Media
16	152,23	2,28	1	1	Alta	Alta	Alta	Baixa	Alta	Media	Alta	Não	3A4	Médio	Media
17	138,25	3,24	0	0	Baixa	Alta	Alta	Media	Alta	Alta	Alta	2C9 e 2C19	2C19, 1A2, 3A4	Excelente	Media
18	168,23	2,22	2	1	Alta	Alta	Media	Media	Alta	Media	Alta	2C19 e 2C9	1A2;	Médio	Baixa
19	168,23	2,45	2	0	Alta	Alta	Media	Media	Alta	Media	Alta	2C9	2C19 e 2D6	Médio	Media
20	202,29	0,91	3	3	Alta	Alta	Alta	Baixa	Media	Media	Media	2C9	CYP2C19	Médio	Media
21	172,18	-0,66	4	3	Alta	Alta	Baixa	Media	Media	Baixa	Baixa	Não	GpP	Médio	Baixa
22	186,25	0,44	3	3	Alta	Alta	Media	Media	Media	Media	Baixa	2C9	CYP2C19	Médio	Media
23	204,26	-0,36	4	4	Alta	Alta	Baixa	Media	Media	Media	Baixa	2C19	Não	Médio	Baixa
24	170,25	1,47	2	2	Alta	Alta	Alta	Media	Alta	Media	Alta	2C9	2C19	Médio	Media
25	182,21	1,47	3	0	Alta	Alta	Media	Media	Alta	Alta	Media	2C9	2C19, 1A2, 3A4	Ruim	Media

Legenda: **1)** Quercetina; **2)** Isorhamnetina; **3)** Kaempferol; **4)** Kaempferol 3-O- α -L-1 C4-ramnopiranosídeo (afzelina); **5)** kaempferol 3-O- α -L-1 C4-ramnosil-(1" $\rightarrow$ 2")- β -D-4 C1-xilopiranosídeo(1); **6)** kaempferol 7-O- α -L-1 C4-ramnopiranosídeo(3); **7)** Kaempferol 3-ramnosídeo-4'-xilósídeo; **8)** Kaempferol 3-ramnosídeo-7-xilósídeo; **9)** Kaempferol 7-ramnosídeo; **10)** Scutellarein-7-O-ramnosyl-(1 $\rightarrow$ 2) ramnosil (1 $\rightarrow$ 2) ramnosídeo; **11)** Scutellarein-7-O-ramnosyl-(1 $\rightarrow$ 2) ramnosídeo; **12)** Quercetina-7-O- α -L-ramnopiranosídeo **13)** 1,4-Dihidroxip-mento-2-eno; **14*)**(-)-(2S,4S)-p-Mentha-1(7),8-dien-2-hidroperóxido; **15)** (-)-(2R,4S)-p-Mentha-1(7),8-dien-2-hidroperóxido; **16)** Cis-p-Menthadiene-(7),8ol-2; **17)** (1R,4S)-p-met-2-en-1-ol; **18)** (-1S,4S)-p-Mentha-1(7),8-dien-2-hidroperóxido; **19)** Ascaridole; **20)** 1,2,3,4-tetraidróxi-p-metano; **21)** 4-Hidroxi-4(α ou β)-isopropil-2-metil-2-ciclohexeno-1-ona; **22)** 1-metil-4 β - isopropil-1-ciclohexeno-4 α ,5 α ,6 α -triol; **23)** (1S,2S,3R,4S)-1-metil-4-(propan-2-il)ciclohexano-1,2,3,4-tetrol; **24)** (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol; **25)** Chenopanona. **Parâmetros avaliados:** massa molecular (MM) $\leq$ 500 (g/mol); Log P $\leq$ 5; número de Aceitadores de Ligação de Hidrogênio (nALH) $\leq$ 10; número de Doadores de Ligação de Hidrogênio (nDLH) $\leq$ 5; Solubilidade em Meio Aquoso (LogS): <10 μ g/mL: Baixa solubilidade; $10-60$ μ g/mL: Solubilidade moderada; >60 μ g/mL: alta solubilidade. Permeabilidade cutânea – alta permeabilidade: $<0,1$, Baixa permeabilidade: $>0,1$. Permeabilidade em células Caco2 e MDCK – Alta permeabilidade: >70 nm/sec, Média permeabilidade: $4-70$ nm/sec, Baixa permeabilidade <4 nm/sec. Absorção Intestinal Humana – Alta absorção: $70-100\%$, Absorção moderada: $20-70\%$, Mal absorvida: $0-20\%$. Ligação às proteínas plasmáticas – Fortemente $>75\%$, moderadamente >30 e <75 , Fracamente $<30\%$. Distribuição na Barreira hematoencefálica – Alta distribuição $>2,0$, Média distribuição $2,0-1,0$, Baixa distribuição $>1,0$. *Biotransformação via Citocromo P450 - Substrato Glicoproteína P (gpP). Tempo de meia vida (T ½): $0-0,3$: excelente; $0,3-0,7$: médio; $0,7-1,0$: ruim. Taxa de Excreção (TE): >15 ml/min/kg: depuração alta; $5-15$ ml/min/kg: depuração moderada; <5 ml/min/kg: depuração baixa.

Em relação aos parâmetros de toxicidade, todos flavonoides e os terpenos, avaliados no teste *in silico* apresentaram resultado positivo para um ou mais dos parâmetros avaliados, seja de toxicidade aguda, cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, mutagenicidade e/ou carcinogenicidade (Tabela 10).

Os resultados de dose letal oral capaz de matar 50% da população testada (DL50) sugere que grande parte dos flavonoides foram classificados como nocivos (classificação IV), as moléculas (7) e (8) aparentemente são as mais tóxicas (classificação III). O flavonoide 12 e a maioria dos terpenos foram apontados pelo programa como atóxicos (classe VI) e a molécula 14 como prejudicial (classe V).

Em relação ao teste *AMES* de mutagenicidade, somente os flavonoides (4), (5), (6), (8), (9), (10) e (11) apontaram resultado positivo frente as cepas mutantes de *S. typhimurium*, em relação aos terpenos, as estruturas (13), (16) e (23) não reverteram a mutação em nenhuma das cepas bacterianas, não apontando potencial mutagênico. Dos compostos avaliados quanto ao potencial carcinogênico em roedores, somente os flavonoides (1), (2), (3), (5) e (13) foram carcinogênicos frente a ratos e camundongos, já os terpenos apresentaram maior potencial para essa avaliação. Tanto os compostos da classe dos flavonoides quanto dos terpenos, as moléculas que apresentaram potencial carcinogênico também foram mutagênicas, portanto, provavelmente, tais substâncias possuem o potencial de desencadear alterações genéticas.

Na tabela 9 observa-se que o flavonoide (11) possui maior potencial de desencadear cardiotoxicidade, pois parece inibir Herg I e II, sendo teoricamente mais nocivo. Em relação a hepatotoxicidade, os flavonoides foram amplamente positivos para esse teste, sendo mais hepatotóxicos que os terpenos, com exceção dos terpenos (15), (16) e (25) que demonstram ser hepatotóxicos nos modelos *in silico*.

De forma geral, os flavonoides (1), (2), (3) e (9), bem como os terpenos quase todos os terpenos possuem melhores características físico-químicas, o que reflete também em melhores características farmacocinéticas. Os flavonoides possuem menor capacidade de atravessar a BHE, o que não ocorre com os terpenos em sua maioria, que possuem facilidade em atravessar a BHE. O terpeno 23 (1S,2S,3R,4S)-1-metil-4-(propan-2-il)ciclohexano-1,2,3,4-tetrol)

não apresentou nenhum resultado positivo referente aos parâmetros avaliados de toxicidade, além disso os flavonoides (4), (6), (10) e (12) assim como os terpenos (20), (23) e (24) parecem possuir baixa toxicidade se comparado aos demais compostos.

Portanto, as moléculas mais promissoras para estudos de atividade biológica foram os terpenos 20, 23 e 24 que demonstraram, *in silico*, possuir melhor capacidade de solubilização, permeação pelas barreiras fisiológicas, boa taxa de LPP para serem transportadas, assim, estarem disponíveis nos alvos farmacológicos. Além disso, teoricamente, os flavonoides 4 e 6 e os terpenos 20, 23 e 24, apresentam baixa toxicidade frente aos diversos sistemas analisados, no entanto estes resultados devem ser confirmados por meio de testes *in vitro* e/ou *in vivo* de toxicidade. Os flavonoides que fugiram a regra RO5 podem ainda ser melhorados em relação aos aspectos farmacocinéticos via modelagem molecular.

Tabela 10- Predição de toxicidade de isolados de *D. ambrosioides*

DL50		TESTE AMES DE MUTAGENICIDADE					CARCINOGENICIDADE		CARDIOTOXICIDADE		HEPATOTOXICIDADE	
Classe	TA100	10RLI	TA100 NA	TA1535	10RLI	TA1535 NA	Camundongos	Ratos	Herg I	Herg II.	DILI	Humana
1	IV	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
2	IV	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
3	IV	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
4	IV	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
5	IV	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
6	IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	III	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
8	III	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
9	IV	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
10	IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
11	IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	VI	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
13	IV	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
14	V	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
15	VI	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
16	VI	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
17	VI	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
18	VI	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
19	VI	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
20	VI	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
21	VI	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
22	VI	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
23	VI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	VI	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
25	VI	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+

Legenda: 1º) Quercetina; 2) Isorhamnetina; 3) Kaempferol; 4) Kaempferol 3-O- α -L-1 C4-ramnopiranosídeo (afzelina); 5) kaempferol 3-O- α -L-1 C4-ramnosil-(1 $\rightarrow$ 2 $\rightarrow$ 2 $\rightarrow$)- β -D-4 C1-xilopiranosídeo(1); 6) kaempferol 7-O- α -L-1 C4-ramnopiranosídeo(3); 7) Kaempferol 3-ramnosídeo-4'-xilósídeo; 8) Kaempferol 3-ramnosídeo-7-xilósídeo; 9) Kaempferol 7-ramnosídeo; 10) Scutellarein-7-O-ramnosyl-(1 $\rightarrow$ 2) ramnosil (1 $\rightarrow$ 2) ramnosídeo; 11) Scutellarein-7-O-ramnosyl-(1 $\rightarrow$ 2) ramnosídeo; 12) Quercetina-7-O-alfa-L-ramnopiranosídeo 13) 1,4-Dihidroxip-mento-2-eno; 14º)(-)-(2S,4S)-p-Mentha-1(7),8-dien-2-hidroperóxido; 15) (-)-(2R,4S)-p-Mentha-1(7),8-dien-2-hidroperóxido; 16) Cis-p-Menthadiene-1(7),8ol-2; 17) (1R,4S)-p-met-2-en-1-ol; 18) (-1S,4S)-p-Mentha-1(7),8-dien-2-hidroperóxido; 19) Ascaridole; 20) 1,2,3,4-tetraidróxi-p-metano; 21) 4-Hidroxi-4(α ou β)-isopropil-2-metil-2-ciclohexeno-1-ona; 22) 1-metil-4 β - isopropil-1-ciclohexeno4 α ,5 α ,6 α -triol; 23) (1S,2S,3R,4S)-1-metil-4-(propan-2-il)ciclohexano-1,2,3,4-tetrol; 24) (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol; 25) Chenopanona **Parâmetros avaliados:** A dose letal mediana (DL50): Classe I: fatal se ingerido (DL50 $\leq$ 5); classe III: tóxico se ingerido (50 < DL50 $\leq$ 300); classe IV: nocivo se ingerido (300 < DL50 $\leq$ 2000); classe V: pode ser nocivo se ingerido (20000 < DL50 $\leq$ 5000); classe VI: não tóxico (DL50>5000). (+) carcinogênico, (-) não carcinogênico, (+) mutagênico, (-) não mutagênico, (+) hepatóxico, (-) não hepatóxico

5.3.2 Docagem molecular

As análises por docking molecular foi realizado com alvos proteicos essenciais envolvidos em mecanismo de sobrevivência dos parasitos. Neste contexto, dois alvos atrativos de protozoários de *Leishmania*, são a tripanotiona redutase (TR) e a glicoproteína 63 (GP63), que estão envolvidas na defesa contra oxidantes e no transporte e sobrevivência do parasita, respectivamente (Figueiredo et al., 2018).

A Leishmanolisina ou glicoproteína 63 (GP63) é uma metaloprotease dependente de zinco, e o principal componente proteico da superfície de formas promastigota de protozoários *Leishmania*, tem um papel fundamental durante a infecção, essa enzima torna as formas promastigotas resistentes a ação mediada pelo sistema complemento, pois clivam a formação de ataque e são responsáveis por maximiza a ligação das promastigotas para internalizar os macrófagos, facilitando assim sua entrada nessas células e aumentando a fagocitose e a sobrevivência do parasita, contribuindo assim para a infectividade da *Leishmania*. (Lieke et al., 2008; Hallé et al., 2009; Schirmann et al., 2023)

Ademais, o dano oxidativo em protozoários de *Leishmania* pode ser evitado devido à presença de tripanotiona redutase (TR), a via tripanotiona é responsável pelo controle oxidativo das células do parasito, e possui múltiplas funções para o parasita, como a defesa contra agentes oxidantes e a homeostase proteica, esta enzima promove a ativação de uma cascata de eventos que neutralizam as espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas através da redução catalítica do dissulfeto de tripanotiona a tripanotiona ditiol, neutralizando assim os efeitos prejudiciais produzido pelos macrófagos durante a infecção. (Baiocco, 2009; Saccoliti et al., 2017).

Todos esses fatores consolidam as enzimas TR e o Gp63 como alvos atrativos no desenvolvimento de medicamentos antileishmania, sendo assim, foram os escolhidos para este estudo. A figura 23, mostra as enzimas cristalografadas de tripanotiona redutase (2W0H) e glicoproteína GP53 (1LML).

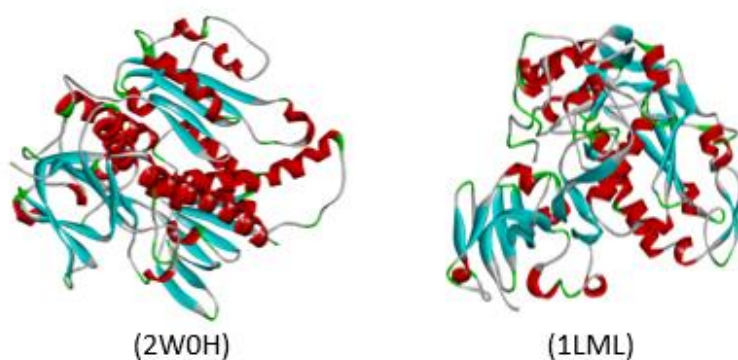


Figura 23: Enzima cristalografada de tripanotona redutase (2W0H) e glicoproteína GP53 (1LML).

Baseado nos critérios de seleção das moléculas para a docagem molecular, considerou-se principalmente os parâmetros da regra de Lipinski e toxicidade, foram selecionados os seis compostos mais promissores, ou seja, aqueles que não violaram a regra de Lipinski e que foram menos tóxicos (tabela 8 e 9). Sendo estes, as moléculas (04), (06), (13), (20), (23) e (24) (Figura 24).

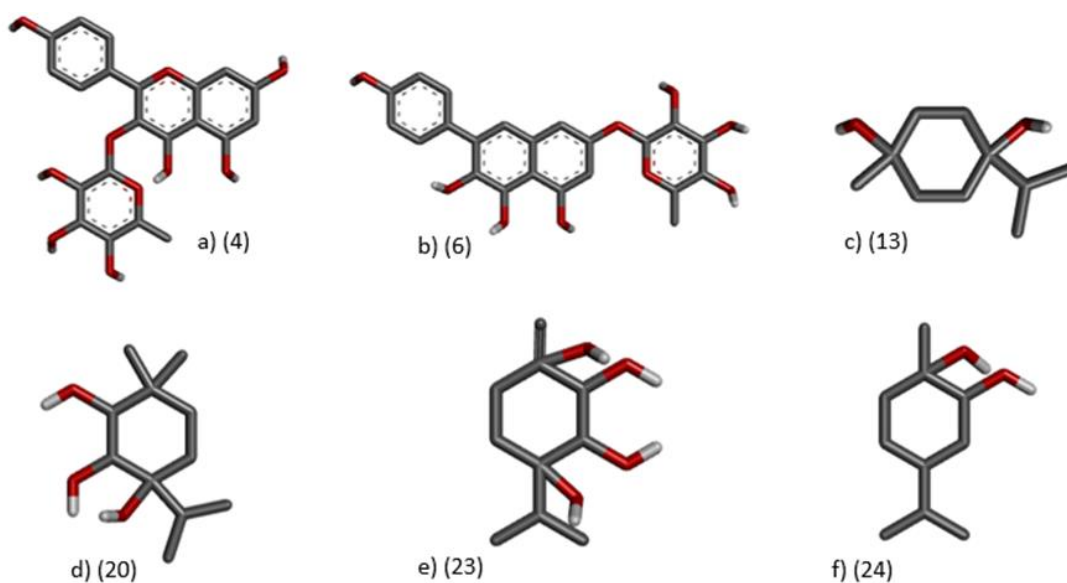


Figura 24: Conformações dos compostos selecionados para docagem

Legenda: a) (4) kaempferol 3-O- α -L1 C4-ramnopiranosídeo (afzelina); b) (6) kaempferol 7-O- α -L-1-C4-ramnopiranosídeo; c) (13) 1,4-Dihidroxip-mento-2-eno; d) (20) 1,2,3,4-tetraidróxi-p-metano; e) (23) 1S,2S,3R,4S-1metil-4-(propano-2-il)-ciclohexano-1,2,3,4-tetrol; f) (24) (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol.

O processo de *re-docking* é descrito como a retirada do ligante cristalografado no complexo enzima-substrato que é submetido novamente ao *docking* (Schneider *et al.*, 2012). Este procedimento é realizado para validar o

sistema de estudo, neste trabalho foram obtidos os valores de desvio quadrático médio (RMSD) abaixo de 2 Å para o sítio da glicoproteína GP53 (1LML) e de tripanotona redutase (2W0H), estando de acordo com a literatura que prevê valores de referência para RMSD de até 2 Å para estruturas rígidas e de até 2,5 Å para estruturas flexíveis (Xiao et al., 2018; Santos et al., 2020; Altê, Glorister et al., 2022). Portanto, estes resultados mostram que os modelos foram adequados para prever o perfil de acoplamento entre as moléculas ligante e os sítios dos alvos selecionados, sendo assim, observou-se que os complexos conservam as ligações interatômicas com os principais resíduos de aminoácidos dos receptores.

Foram analisadas as ligações dos compostos selecionados (04), (06), (13), (19), (23) e (24) ao sítio da tripanotona redutase (2W0H), as ligações ocorridas no sítio ativo da enzima TR foram analisadas levando em consideração as interações realizadas com os resíduos Cys52, Cys57, His461 e Glu466, que estão envolvidos no metabolismo redox de *Leishmania* (Baiocco, 2009).

Foram selecionadas as ligações com posições mais favoráveis, isto é, com a maior função de pontuação Goldscore e menor energia de ligação (ΔG) (tabela 11). Ao selecionar estas posições, acredita-se que a ligação ao sítio receptor seja mais favorável e estável (Tavares et al., 2015). Pelos valores dos scores obtidos no programa GOLD, observa-se que o composto (6) apresentou o maior valor de pontuação (31.95), seguido do (4), (23), (20), (13) e (24), que apresentaram Goldscore de 28.78, 21.96, 21.53, 20.83 e 15.96, respectivamente (tabela 11).

Em relação a energia de ligação dos compostos ao alvo, observamos que o composto (4) obteve menor energia de ligação (-36.41 kcal/mol), seguido do composto (6) com energia de -28.95 kcal/mol, estes devem possuir maior ligação e estabilidade com o alvo, se comparados aos compostos 20, 23, 13 e 24 que apresentaram maior energia de ligação (-23.81, -23.52, -21.92 e -19.37 kcal/mol, respectivamente). A atividade de uma molécula está relacionada à energia que ela emite para se ligar a um alvo, nessa relação, um complexo mais estável requer menos energia para que a interação ocorra (Silva, 2022). Assim, os valores negativos encontrados neste estudo demonstram que a compostos selecionados, teoricamente, se liga efetivamente ao complexo da TR (2W0H).

Em termos de interação entre os compostos e o sítio de TR (2W0H), observa-se principalmente, que todos os compostos tiveram interações de van der

Waals (Figura 25), sendo estas interações favoráveis pois contribuem para a estabilização do sistema. Além disso, observou-se que os compostos 4, 6 e 24 estabelecem ligações hidrofóbicas do tipo alquil e pi-alquil (Figura 25), essas ligações tendem a realizar interação nucleofílica que favorece a interação entre a molécula e o receptor, possibilitando melhor acoplamento e estabilidade.

Na figura 25 e na tabela 11, encontram-se todos os tipos de interações químicas estabelecidas entre os compostos e o sítio TR (2W0H). Baseado nos tipos de ligações, pode-se sugerir que o composto 4 apesar de possuir menor energia de ligação com o alvo parece não ser favorável, visto que possui ligações de doações não favoráveis com os resíduos Thr35 e Cys A52 (Figura 25; Tabela 11). Os resíduos que são determinantes no sítio catalítico da tripanotona são: Cys52, Cys57, His461 e Glu466, observa-se que todos os compostos realizam interações de van der Waals com pelo menos um desses resíduos. O composto 6 (b) realiza mais interações favoráveis com resíduos do sítio da TR, principalmente com os resíduos Cys52 e Cys57, e possui melhor acoplamento devido realizar interações hidrofóbicas com demais resíduos que promovem estabilidade, tendo assim melhor acoplamento e menor energia de ligação ao sítio redox da TR (Tabela 11).

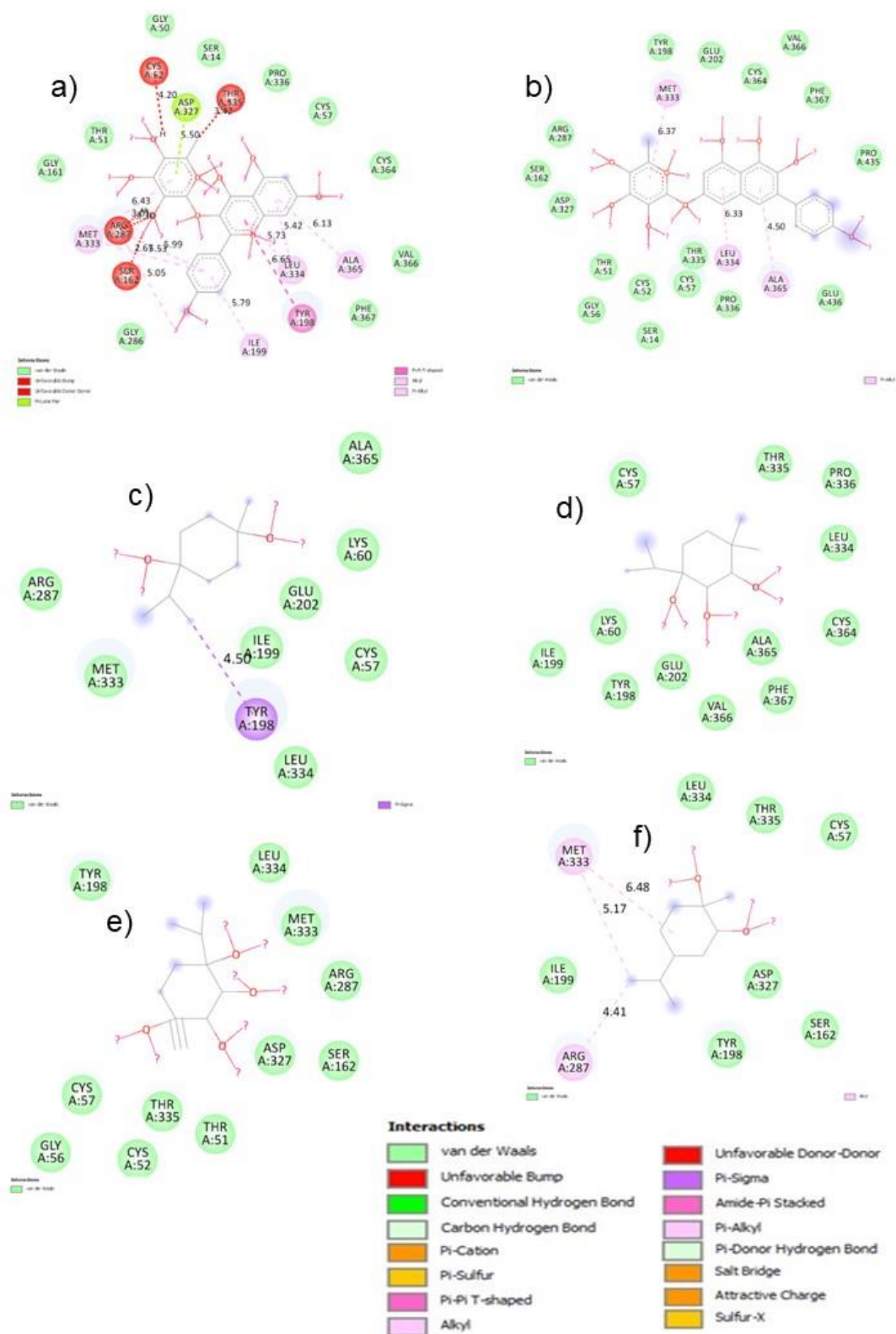


Figura 25: Representação 2D das interações entre o sítio de ligação da tripanotona redutase 2W0H e os compostos.

Legenda: a) (4) kaempferol 3-O- α -L-1 C4-ramnopiranosídeo (afzelina); b) (6) kaempferol 7-O- α -L-1 C4-ramnopiranosídeo; c) (13) 1,4-Dihidroxip-mento-2-eno; d) (20) 1,2,3,4-tetraidróxi-p-metano; e) (23) 1S,2S,3R,4S-1metil-4-(propano-2-il)-ciclohexano-1,2,3,4-tetrol; f) (24) (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol.

Tabela 11 – Valores de pontuação Goldscore e interação entre a tripanotona redutase e os compostos selecionados.

Composto	ΔG (kcal/mol)	GoldScore	Aminoácidos	Interações	Distância (Å)	Interações de van der Waals
a) 4	-36.41	28.78	Ala A: 227	π -alquil	4,31	Ile A: 190
			Ala A: 225	π -alquil	5,34	Thr A: 228
			Ala A: 225	π -alquil	6,48	Thr A: 229
			Val A: 223	π -alquil	4,90	His A: 268
			Val A: 223	π -alquil	7,18	His A: 334
			Ala A: 136	π -alquil	7,54	Gly A: 329
			Thr A: 335	LD - D-D	5,10	His A: 264
			Cys A52	LD - D-D	4,67	Glu A: 265
			AspA: 134	LH	4,71	Gly A: 222
						Leu A: 224
b) 6	-28.95	31,71				Ser A: 219
						Glu A: 220
			Ala A: 365	π -alquil	4,50	Asp A: 327
			LeuA: 334	π -alquil	6,33	Arg A: 287
			MetA: 333	π -alquil	6,37	Cys A: 52
						Cys A: 57
						Cys A: 364
						Gly A: 56
						Glu A: 202
						Glu A: 436
c) 12	-21.84	20,83				Ser A: 14
						Ser A: 162
						Pro A: 336
						Pro A: 435
						Phe A: 367
						Thr A: 51
						Thr A: 335
						Tyr A: 198
						Val A: 366
			Tyr A: 198	π -sigma	4,50	Ala A: 365
d) 19	-23.37	21.53				Arg A: 287
						Met A: 333
						Ile A: 199
						Glu A: 202
						Lys A: 60
						Cys A: 57
						Leu A: 334
						Cys A: 57
						Thr A: 335
						Pro A: 336
e) 23	-23.67	21.96				Leu A: 334
						Cys A: 364
						Ala A: 365
						Phe A: 367
						Val A: 366
						Glu A: 202
						Thy A: 198
						Lys A: 60
						Ile A: 99
						Pys A: 198
						Leu A: 334
						Met A: 333
						Arg A: 287

							Ser A: 162 Asp A: 327 Thr A: 51 Thr A: 335 Cys A: 52 Cys A: 57 Gly A: 56
f)	24	-19.37	15.97	MetA: 333 ArgA: 287	Alquil Alquil	5,17 e 6,48 4,41	Leu A: 334 Thr A: 335 Cys A: 57 Asp A: 327 Ser A: 162 Tyr A: 198 Ile A: 199

Legenda: tripanotiona redutase 2OWH; LH- ligação de hidrogênio; LD – ligação desfavorável; D-D Des. – Doador-doador desfavorável; ligações hidrofóbicas (Alquil e π -alquil); a) (4) kaempferol 3-O- α -L1 C4-ramnopiranosídeo (afzelina); b) (6) kaempferol 7-O- α -L-1-C4-ramnopiranosídeo; c) (13) 1,4-Dihidroxip-mento-2-eno; d) (20) 1,2,3,4-tetraidróxi-p-metano; e) (23) 1S,2S,3R,4S-1metil-4-(propano-2-il)-ciclohexano-1,2,3,4-tetrol; f) (24) (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol.

Em outra análise, avaliou-se as ligações dos compostos selecionados (4, 6, 13, 20, 23 e 24) ao sítio 1LML (glicoproteína GP63), sendo selecionadas as posições mais favoráveis, isto é, com melhor função de pontuação no Goldscore e energia de ligação. Observa-se que o composto (4) apresentou o maior valor de pontuação GoldScore (40.65), seguido dos compostos (20), (23), (6), (24) e (12), que apresentaram valores de escore de 30.13, 23.30, 17.14, 17.10 e 14.18 respectivamente (tabela 12). As moléculas (4) e (19) apresentaram as funções de pontuações mais próxima do ligante cristalografado (49.58), sendo provavelmente as que possuem afinidade semelhante ao do ligante base com o sítio GP53.

A avaliação da energia de ligação dos compostos ao alvo, mostrou que o composto (6) obteve menor energia de ligação (-26.04 kcal/mol; tabela 12), seguido do composto (4) com energia de -24.04 kcal/mol, os compostos 23, 13, 19 e 24 apresentaram maior energia de ligação de -23.81, -23.52, -21.92, -19.24 e -19.37 kcal/mol (tabela 12), respectivamente. Logo, as moléculas com menor energia, devem se ligar com mais estabilidade com o sítio ativo, além disso, os valores de energia de ligação negativos encontrados para os compostos deste estudo, foram semelhantes a energia de ligação do ligante cristalografado (-29.89 kcal/mol), demonstrando que os compostos avaliados se ligam efetivamente ao complexo da GP63.

Em termos de interação entre os compostos e o sítio da GP63, observa-se principalmente, que todos os compostos apresentaram interações de van der Waals

(Figura 26), sendo essas interações favoráveis e responsáveis pelo acoplamento e estabilização no sítio. No entanto, nota-se que os compostos 4 e 6 estabelece ligações hidrofóbicas do tipo alquil e pi-alquil (Figura 26), essas são ligações fortes e tendem a favorecer o acoplamento entre a molécula e o receptor, desta forma esses compostos necessitam de menor energia de ligação com o sítio devido sua afinidade.

Na figura 26 e na tabela 12 encontram-se todos os tipos de interações químicas estabelecidas entre os compostos e o sítio GP63. Nota-se que o composto 20 (d) apresentou ligações desfavoráveis de doação de hidrogênio (Figura 26), enquanto as demais moléculas apresentaram um melhor perfil nas interações com o sítio GP63, logo o composto 20 necessita de maior energia de ligação para se ligar ao sítio, devido possuir interação desfavorável com o resíduo Ala227, se tornando mais instável.

Os resíduos determinantes no sítio de interação da GP53 são: His264, His268, His332 e Glu265 (Schlagenhauf *et al.*, 1998), nota-se que todos o composto realiza interações de van der Waals com pelo menos um desses resíduos, sendo os resíduos Glu265 e His264 os principais envolvidos nas interações. As moléculas 04 e 06 são as que formam mais interações com estes resíduos, devido possuir interações de van der Waals em conjunto com as ligações hidrofóbicas do tipo alquil, que contribuem para o melhor acoplamento ao sítio, logo necessitam de uma menor energia de ligação para se estabilizarem ao sítio (Tabela 12).

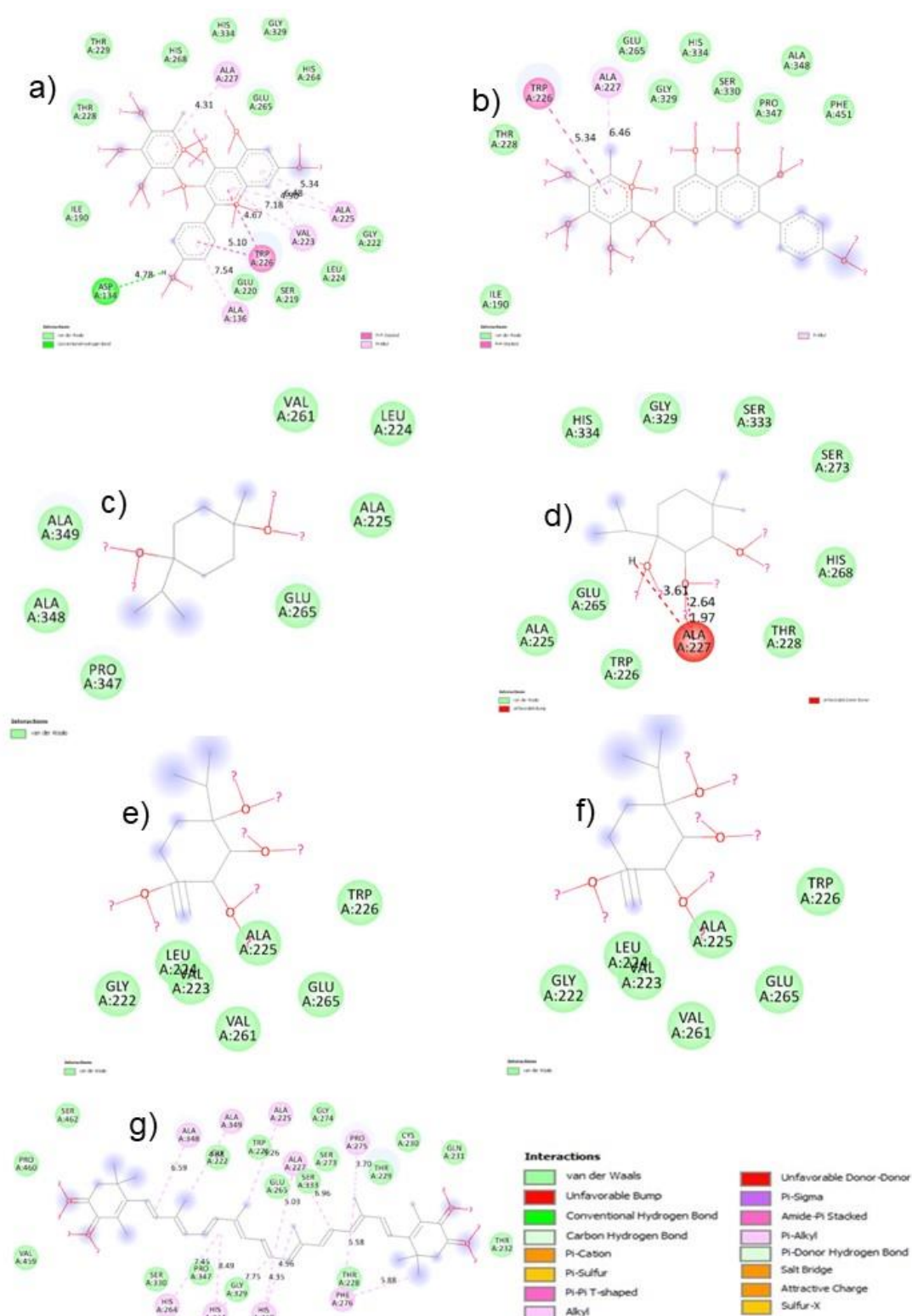


Figura 26: Representação 2D das interações entre o sítio de ligação da glicoproteína GP63 e os compostos.

Legenda: a) (4) kaempferol 3-O- α -L1 C4-ramnopiranosídeo (afzelina); b) (6) kaempferol 7-O- α -L-1-C4-ramnopiranosídeo; c) (13) 1,4-Dihidroxip-mento-2-eno; d) (20) 1,2,3,4-tetraidróxi-p-metano; e) (23) 1S,2S,3R,4S-1metil-4-(propano-2-il)-ciclohexano-1,2,3,4-tetrol; f) (24) (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol

Tabela 12 – Valores de pontuação Goldscore, energia e interação entre a GP53 e os compostos selecionados.

Composto	Energia kcal/mol	Goldscore	Aminoácidos	Interações	Distância (Å)	Interações de van der Waals
a) 4	-24.86	40,65	Ala A: 227 Trp A: 226 Val A: 223 Ala A: 225 Asp A: 134	π -alquil π -alquil Alquil π -alquil LH	4,31 4,67 5,42 6,48 4,78	Thr A: 229 Thr A: 228 Ile A: 190 His A: 334 Glu A: 265 His A: 268 His A: 264 Glu A: 220 Ser A: 219 Gly A: 222 Leu A: 224
b) 6	-26.04	17.14	Ala A: 227 Trp A: 226	π -alquil Alquil	6,46 5,34	Thr A: 228 Glu A: 265 Gly A: 329 Hys A: 334 Ser A: 330 Pro A: 347 Ala A: 348 Phe A: 541
c) 12	-18.38	14.18				Ala A: 349 Ala A: 348 Pro A: 347 Glu A: 265 Ala A: 225 Leu A: 224 Val A: 261
d) 20	-19.24	30.13	Ala A: 227 Ala A: 227 Ala A: 227	LD LD LD	3,61 1,97 2,64	His A: 334 Gly A: 329 Ser A: 333 Ser A: 273 His A: 268 Thr A: 228 Trp A: 226 Glu A: 265 Ala A: 225
e) 23	-21.84	23.30				Gly A: 222 Leu A: 224 Val A: 223 Ala A: 225 Trp A: 226 Glu A: 265 Val A: 261
f) 24	-17.33	17.10				Gly A: 222 Leu A: 224 Val A: 223 Ala A: 225 Trp A: 226 Glu A: 265 Val A: 261

g) RD	-29.89	49.58	Ala A: 348	π -alquil	6,59	Thr A: 232
			Ala A: 349	π -alquil	4,83	Thr A: 228
			Ala A: 225	π -alquil	5,26	Thr A: 229
			Ala A: 227	π -alquil	5,03	Gln A: 231
			Ala A: 227	π -alquil	6,96	Cys A: 230
			Pro A: 275	alquil	3,70	Ser A: 273
			Phe A: 276	alquil	5,58	Ser A: 333
			Phe A: 276	alquil	5,88	Ser A: 330
			His A: 268	alquil	4,35	Ser A: 462
			His A: 268	alquil	4,96	Gly A: 274
			His A: 334	alquil	7,75	Gly A: 222
			His A: 334	alquil	8,49	Gly A: 329
			His A: 264	alquil	7,45	Glu A: 265
						Trp A: 226
						Pro A: 347
						Pro A: 460
						Val A: 459

Legenda: Glicoproteína GP63 (1LML); LH- ligação de hidrogênio; LD – ligação desfavorável; D-D Des. – Doador-doador desfavorável; ligações hidrofóbicas (Alquil e π -alquil); a) (4) kaempferol 3-O- α -L1 C4-ramnopiranosídeo (afzelina); b) (6) kaempferol 7-O- α -L-1-C4-ramnopiranosídeo; c) (13) 1,4-Dihidroxip-mento-2-eno; d) (20) 1,2,3,4-tetraidrôxi-p-metano; e) (23) 1S,2S,3R,4S-1metil-4-(propano-2-il)-ciclohexano-1,2,3,4-tetrol; f) (24) (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol.; g) RD- redocking (ligante cristalografado).

De modo geral, os compostos da espécie *D. ambrosioides* avaliados possuem capacidade de se acoplar aos alvos estudados necessitando de baixa energia de ligação, além disso parecem preservar as interações com os resíduos de aminoácidos do sitio catalítico através de interações van der Waals, ademais os compostos que realizam ligações hidrofóbicas possuem melhor acoplamento e estabilidade, sendo este principalmente o composto (6) para tripanotiona redutase e o composto (4) para glicoproteína GP63. Sugere-se que esses compostos possam inibir essas enzimas e consequentemente influenciar no mecanismo de sobrevivência e virulência da *Leishmania*.

6 CONCLUSÃO

Observou-se neste estudo que os principais metabólitos detectados nos extratos e frações de *D. ambrosioides*, foram as classes dos flavonoides e terpenos. Além disso a espécie demonstrou potencial antileishmania para formas promastigotas de *L. amazonensis*. Ressalta-se que o fracionamento dos extratos contribuiu para atividade antipromastigota, sendo as frações de diclorometano as mais promissoras. Nas predições *in silico*, a classe de terpenos demonstra melhor perfil farmacocinético. Além disso, tanto os terpenos como os flavonóides ligam-se as enzimas GP63 e TR em sítios semelhantes à molécula inibidora, demonstrando potencial para inibição dessas vias, desta forma sugere-se que os compostos podem influenciar nos mecanismos de sobrevivência da *Leishmania*.

REFERÊNCIAS

ABDEYAZDAN, S., et al. Sb(v) Kaempferol and Quercetin Derivative Complexes: Synthesis, Characterization and Antileishmanial Activities. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, vol. 21, n. 1, 2022.

AGRA, M. F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 18, p. 472-508, 2008.

AHMED, A.A. Highly oxygenated monoterpenes from *Chenopodium ambrosioides*. **J. Nat. Prod.** v.63, p. 989-991, 2000.

ALBERTASSE, P. D.; THOMAZ, L. D.; ANDRADE, M. A. Plantas medicinais e seus usos na comunidade da Barra do Jucu, Vila Velha, ES. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, p. 250-260, 2010.

ALEIXO, J. A. et al. Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. **Trans Royal Soc of Trop Med and Hyg**, v. 100, p. 79-82, 2006.

ALMEIDA, L. **Efeito leishmanicida de derivados benzofenônicos e estudo comparativo do potencial de inibição enzimática in silico e in vitro**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Alfenas, Minas Gerais, 2013.

ALTÊ, GLORISTER ALVES. **Planejamento computacional de inibidores da glutathione peroxidase 4 - GPX4**. Dissertação (mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.

AMIDON, Gordon L. et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical research**, v. 12, p. 413-420, 1995.

ARAPITSAS, P. Identification and quantification of polyphenolic compounds from okra seeds and skins. **Food Chemistry**, v. 110, n. 4, p. 1041–1045, 1 out. 2008.

ARAÚJO, M.V., et al. Flavonoids Induce Cell Death in *Leishmania Amazonensis*: in Vitro Characterization by Flow Cytometry and Raman Spectroscopy. **The Analyst**, vol. 144, no. 17, pp. 5232–5244, 2019.

ARAÚJO, Ana Patrícia Loureiro Machado Gomes de. **O papel da glicoproteína-P nas interações fármaco-fármaco**. 2015. Tese de Doutorado. [sn].

ARISAWA, M. et al. Studies on unutilized resources. V. The components of the flavonoids in *Chenopodium* genus plants. 1. Flavonoids of *Chenopodium ambrosioides* L. **Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 91, n. 5, p. 522-524, 1971.

ASSAIDI, A.; LEGSSYER, A.; BERRICHI, A.; AZIZ, M.; MEKHFI, H.; BNOUHAM, M.; ZIYYAT, A. Hypotensive property of *Chenopodium ambrosioides* in

anesthetized normotensive rats. **J Complement Integr Med.** v.11, n. 1, p. 1-7, 2014.

AVDEEF, A.; KIN YIP TAM. How Well Can the Caco-2/Madin-Darby Canine Kidney Models Predict Effective Human Jejunal Permeability? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 9, p. 3566–3584, 7 abr. 2010.

ÁVILA-BLANCO, M.E., et al. Amoebicidal Activity of Essential Oil of *Dysphania Ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants in an Amoebic Liver Abscess Hamster Model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2014, pp. 1–7, 2014.

BATES, P. A.; ROGERS, M. E. New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of *Leishmania*. **Current Molecular Medicine**, v. 4, n. 6, p. 601–609, 1 set. 2004.

BANERJEE, P.; DERNBOSTEL, F.O.; PREISSNER, R. Prediction is a balancing act: importance of sampling methods to balance sensitivity and specificity Chemical data sets. **Front. Chem.** v. 6, p. 1-11, 2018.

BAIOCCO, P. et al. Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. **Journal of medicinal chemistry**, v. 52, n. 8, p. 2603-2612, 2009.

BARBOSA, W. L. R.; PINTO, L. N.; SILVA, W. B.; FERNANDES, J. G. S.; SOLER, O.; Etnofarmácia do município de Igarapé-Miri – PA. In: **Etnofarmácia – Fitoterapia popular e ciência farmacêutica**. Belém: NUMA/UFPA, p. 49-16, 2011.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; MECMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO, J. A.; ALMEIDA R.; BADARO, R.; Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Trans Royal Soc Med and Hyg**, v. 44, p. 536-546, 1991.

BANO, Saira et al. Antioxidant, Antimicrobial, and Protein Kinase Inhibition Profiling of *C. ambrosioides* Seed Extracts along with RP-HPLC. **Journal of Chemistry**, v. 2022, 2022.

BARROS, L., PEREIRA, E., CALHELHA R. C., DUEÑAS, M., CARVALHO, A. M., SANTOS-BUELGA, C. FERREIRA, I.C.F.R. Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Functional Foods**. 5, p. 1732-1740, 2013.

BELTRESCHI, Letícia; DE LIMA, Rita Baltazar; DA CRUZ, Denise Dias. Traditional botanical knowledge of medicinal plants in a “quilombola” community in the Atlantic Forest of northeastern Brazil. **Environment, Development and Sustainability**, v. 21, p. 1185-1203, 2019.

BENTES, Henrique Miguel Marques. Desenho de fármacos assistido por computador: aplicação à permeação através da barreira hematoencefálica. 2016.

BENTO, A.P.; GAUTON, A.; HERSEY, A.; BELLIS, L.J.; CÂMARAS, J.; DAVIES, M.; KRUGER, F.A.; LUZ, Y.; MAK, L.; MCGLINCHEY, S.; NOWOTKA, M.; PAPADATOS, J.; SANTOS, R.; OVERINGTON, J.P. The ChEMBL bioactivity database: na update. **Nucleic Acids Res.** v. 42, p. 1083-1090, 2014

BEZERRA, J. L. **Avaliação da atividade leishmanicida de espécies vegetais.** 2006. 64 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente). Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas da Saúde, São Luís, 2006.

BEZERRA, J. L.; COSTA, G. C.; LOPES, T. C.; CARVALHO, I. C. D. S.; PATRÍCIO, F. J.; SOUSA, S. M.; AMARAL, F. M. M.; REBELO, J. M. M.; GUERRA, R. N. M.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F. Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 631-637, 2006.

BOLSON, Mônica et al. Ethno-medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 161, p. 1-10, 2015.

BORGES, A. R. et al. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 132, p. 123-128, 2012.

BORTOLETI, B. T. S. *et al.* Solidagenone acts on promastigotes of *L. amazonensis* by inducing apoptosis-like processes on intracellular amastigotes by IL-12p70/ROS/NO pathway activation. **Phytomedicine**, v. 85, p. 153536, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Atlas de Leishmaniose tegumentar Americana: diagnósticos clínico e diferencial.** Brasília: Ministério da Saúde, p. 136, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e de controle da Leishmaniose tegumentar americana.** 1 ed. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em saúde. Departamento de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Ministério da Saúde. 812p. Brasília, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose visceral.** 1 ed. 2014.

BRÍGIDO, H. P. C. **Estudos Farmacognósticos, Fitoquímicos e Biológicos de *Annona glabra* L. (Annonaceae).** Dissertação de mestrado (Ciências farmacêuticas). Universidade Federal do Pará. [s.l.], 2016.

CAETANO, N. L. B. et al. Plantas medicinais utilizadas pela população do município de Lagarto-SE, Brasil—ênfase em pacientes oncológicos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, p. 748-756, 2015.

CALADO, G. P. et al. "Chenopodium Ambrosioides L. Reduces Synovial Inflammation and Pain in Experimental Osteoarthritis." **PLOS ONE**, vol. 10, no. 11, p. 2. 2015.

CALIXTO, S. L. **Atividade in vitro de derivados de 4-amino-7-cloroquinolina em Leishmania sp e possíveis mecanismos de morte do parasito**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Juiz de Fora. Minas Gerais, 2018.

CALZADA, F.; ARISTA, R.; PÉREZ, H; Effect of plants used in Mexico to treat gastrointestinal disorders on charcoal–gum acacia-induced hyperperistalsis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 49-51, 2010.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 326-342, 2010.

CAVALHEIRO, L.; GUARIM-NETO, G. Ethnobotany and regional knowledge: combining popular knowledge with the biotechnological potential of plants in the Aldeia Velha community, Chapada dos Guimarães, Mato Grosso, Brazil. **Boletín latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 17, n. 2, 2018.

CHEN, X. et al. Análise das propriedades físico-químicas de acaricidas com base na regra dos cinco de Lipinski. **Revista de biologia computacional**. v. 27, n. 9, pág. 1397-1406, 2020.

COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 1, p. 159–175, 1 out. 2009.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

CRUZ, Gustavo VB et al. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 1, p. 148-154, 2007.

DAINA, Antoine; ZOETE, Vincent. A boiled-egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. **ChemMedChem**, v. 11, n. 11, p. 1117-1121, 2016.

DEMBITSKY, V.; SHKROB, I.; HANUS, L.O. Ascaridole and related peroxides from the genus *Chenopodium*. **Biomed. Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.** V. 152, n. 2, p. 209-215, 2008.

CHACÓN-VARGAS, Karla Fabiola et al. Mexican Oregano (*Lippia berlandieri* Schauer and *Poliomintha longiflora* Gray) essential oils induce cell death by apoptosis in *Leishmania* (*Leishmania*) mexicana promastigotes. **Molecules**, v. 27, n. 16, p. 5183, 2022.

CHAWLA, B.; RENTALA MADHUBALA. Drug targets in Leishmania. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 34, n. 1, p. 1–13, 1 abr. 2010.

CHAKRAVARTY, Jaya; SUNDAR, Shyam. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 20, n. 10, p. 1251-1265, 2019.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic Adaptive Mechanisms in infection by Leishmania. *Experimental and Molecular Pathology*, v. 72, p. 132-141, 2002.

CYSNE, D. N. et al. “Antimalarial Potential of Leaves of *Chenopodium Ambrosioides* L.” **Parasitology Research**, vol. 115, no. 11, p. 4327–4334, 2016.

DA SILVA, Célio Batista. Ferramenta Computacional para Obtenção de Coeficientes de Partição de Fármacos. **Revista de Estudos Universitários-REU**, v. 34, 2008

D'ANTONIO, EDWARD L., et al. Crystal Structure of Arginase from *Leishmania Mexicana* and Implications for the Inhibition of Polyamine Biosynthesis in Parasitic Infections. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 535, no. 2, pp. 163–176, 2013.

DE OLIVEIRA, L. F. G., et al. Natural Products and Phytotherapy: An Innovative Perspective in Leishmaniasis Treatment. **Phytochemistry Reviews**, vol. 16, no. 2, pp. 219–233, 2016.

DE QUEIROZ, A. C., et al. Antileishmanial Activity of Medicinal Plants Used in Endemic Areas in Northeastern Brazil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2014, pp. 1–9, 2014.

DESJARDINS, M.; DESCOTEAUX, A. Inhibition of Phagolysosomal Biogenesis by the *Leishmania* Lipophosphoglycan. **Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 12, p. 2061–2068, 16 jun. 1997.

EFFERTH T., et al. Activity of ascaridol from the anthelmintic herb *Chenopodium anthelminticum* L. against sensitive and multidrug-resistant tumor cells. **Anticancer research**, v. 22, n. 6C, 2012.

FEIJÓ, D. et al. Dendritic cells and *Leishmania* infection: adding layers of complexity to a complex disease. **Journal of immunology research**, v. 2016, 2016.

FENNER, R. et al.; Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 369-394, 2006.

FERREIRA, É. P. R. et al. **Planejamento e avaliação in sílica de análogos de lapachol em enzima alvo de *Leishmania (Leishmania) amazonensis***. (Dissertação de mestrado) – Universidade Federal do Pará. 2017.

FIDALGO, Lianet Monzote. Essential Oil from *Chenopodium ambrosioides* as a Promising Antileishmanial Agent. **Natural Product Communications**, v. 2, n. 12, p. 1934578X0700201214, 2007.

FIGUEIREDO, K. et al. "Prospecting Biochemical Targets for in Silico Study for Antileishmania Chemotherapy." **Revista Virtual de Química**, vol. 10, no. 5, 2018, pp. 1485–1501, <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20180101>. Accessed 27 Nov. 2022.

FILIPPIN, Fabíola Branco; SOUZA, Liliete Canes. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 167-194, 2006.

FOSSEN, T., & ANDERSEN. Técnicas Espectroscópicas Aplicadas a Flavonóide. **Flavonóides**, v. 1 p. 37-142, 2005.

FRANCO, Gilson Cesar Nobre et al. Interações medicamentosas: fatores relacionados ao paciente (Parte I). **Rev Cir traumatol buco-maxilo-fac**, v. 7, p. 17-28, 2007.

FRANÇA, F.; LAGO, E. L.; MARSDEN, P. D.; Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (viannia) braziliensis* in the endemic area of Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, p. 229-232, 1996.

FRAUSIN, G. et al. An ethnobotanical study of anti-malarial plants among indigenous people on the upper Negro River in the Brazilian Amazon. **Journal of ethnopharmacology**, v. 174, p. 238-252, 2015.

FREITAS, K. C. A. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antileishmania de virola surinamensis (rol.) Warbi**. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Belém, 2016.

FRÉZARD, Frédéric et al., Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, v. 28, pág. 511-518, 2005.

FRÉZARD, F; DEMICHELI, C. New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 12, p. 1343–1358, 2010.

FUENTES-BAZÁN, S.; PERTTI UOTILA; BORSCH, T. A novel phylogeny-based generic classification for *Chenopodium* sensu lato, and a tribal rearrangement of *Chenopodioideae* (*Chenopodiaceae*). **Willdenowia**, v. 42, n. 1, p. 5–24, 21 jun. 2012.

GARCIA, D.; DOMINGUES, M. V.; RODRIGUES, E. Ethnopharmacological survey among migrants living in the Southeast Atlantic Forest of Diadema, São Paulo, Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 6, n. 29, 2010.

GHAREEB, M.A.; SAAD, A.M.; ABDOL, A.M.; REFAHY, L.A.; AHMED, W.S. A new kaempferol glycoside with antioxidant activity from *Chenopodium ambrosioides* growing in Egypt. **Oriental Journal of Chemistry**. v.32, n.6, p. 3053-3061, 2016.

GILLE, L. et al. Toxicity of ascaridole from *Chenopodium ambrosioides* in mammalian mitochondria. **BMC Pharmacology**, v. 10, n. S1, 1 nov. 2010.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GONTIJO, C. M. F. et al. Leishmaniose Visceral no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GOTO, H; LINDOSO, JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Rev Anti Infect Ther**. v. 8, p.419-433, 2010.

GUIMARAES, D. L. et al. Ascariasis: comparison of the therapeutic efficacy between paico and albendazole in children from Huaraz. **Revista de gastroenterologia del Peru: organo oficial de la Sociedad de Gastroenterologia del Peru**, v. 21, n. 3, p. 212-219, 2001.

GRIMALDI JUNIOR, G. Leishmanioses tegumentares: aspectos clínicos e imunopatológicos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 77, n. 2, p. 195-215, 1982.

GRIMALDI JUNIOR, G.; TESH, R.B.; McMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 41, n. 6, p. 687-725, 1989.

HABENSCHUS, M. D. *et al.*, Inibição in vitro de CYP450s humanos 1A2, 2C9, 3A4/5, 2D6 e 2E1 por grandisin. v. 83, n. 08, pág. 727-736 **Planta Medica**. 2017.

HARBORNE, J. B. Flavonoids and the evolution of the angiosperms. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 5, n. 1, p. 7-22, 1 maio 1977.

HALDAR, A.K.; SEN, P.; ROY, S.. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. **Molecular Biology International**, v. 2011, p. 1-23, 2011.

HALLÉ, M. et al. The *Leishmania* surface protease GP63 cleaves multiple intracellular proteins and actively participates in p38 mitogen-activated protein kinase inactivation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 11, p. 6893-6908, 2009.

HALLAL, A.; BENALI, S.; MOHAMMED, M.; BEKKOUCHE, K. Evaluation of the analgesic and antipyretic activities of *Chenopodium ambrosioides* L. **Asian J. Exp. Biol. Sci**. v. 1, n. 1, p. 189-192, 2010.

HANSEN, K.; MIKA, S.; SCHROETER, T.; SUTTER, A.; TER LAACK, A.; STEGER, HARTMANN, T.; HEINRICH, N.; MÜLLER, K.R. Benchmark data set for in silico prediction of Ames mutagenicity. **J. Chem. Inf. Model**. v. 49, n. 9, p. 2077-2081, 2009.

HEREDIA-DÍAZ, Y. et al. An ethnobotanical survey of medicinal plants used by inhabitants of Holguín, Eastern Region, Cuba. **Bol. latinoam. Caribe plantas med. aromát**, p. 160–196, 2018.

HOU, S.Q.; LI, Y.H.; HUANG, X.Z.; LI, R. HUAI, L.; TIAN, K.; RUAN, R.S.; LI, Y.K. Polyol monoterpenes isolated from *Chenopodium ambrosioides*. **Natural Product Research**. v. 31, n. 21, p. 2467-2472, 2017.

IBIRONKE GF, AJIBOYE KI. Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Chenopodium ambrosioides* leaf extract in rats. **International Journal of Pharmacology**, v. 3, p. 111-115. 2007.

IRVINE, J.D.; TAKAHASHI, L.; LOCKHART, K.; CHEONG, J.; TOLAN, J.W.; SELICK, H.E.; GROVE, R.J. MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) cells: a tool for membrane permeability screening. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 88, n. 1, p. 28-33, 1999.

IRWIN, J.J.; STERLING, T.; MYSINGER, M.M.; BOLSTAD, E.S.; COLEMAN, R.G. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. **Journal of Chemical information and modeling**. v. 52, n. 7, p. 1757-1768, 2012.

JAIN, N.; ALAM, M.S.; KAMIL, M.; ILYAS, M.; NIWA, M.; SAKAE, A. Two flavonol glycosides from *Chenopodium ambrosioides*. **Phytochemistry**. v.29, n. 12, p. 3988-3991, 1990.

JARAMILLO, B. E.; DUARTE, E.; DELGADO, W, Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* colombiano. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 17, n. 1, p. 54-64, 2012.

JARDIM, C.M. **Composição e atividade antifúngica de extratos de *Chenopodium ambrosioides* L.** Dissertação de mestrado (Mestrado em agroquímica). Viçosa: Universidade Federal do Viçosa, p. 67, 2006.

JARDIM, C.M.; JHAM, G.N.; DHINGRA, O.D.; FREIRE, M.M. Composition and antifungal activity of the essential oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. **J Chem Ecol**. v. 34, n. 9, p. 1213-8, 2008.

JESUS, R.S., et al. In Vitro Antimicrobial and Antimycobacterial Activity and HPLC–DAD Screening of Phenolics from *Chenopodium Ambrosioides* L. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 49, no. 2, pp. 296–302, 2018.

KASALI, Félicien Mushagalusa et al. Ethnomedical uses, chemical constituents, and evidence-based pharmacological properties of *Chenopodium ambrosioides* L.: extensive overview. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, p. 1-36, 2021.

LIMA JUNIOR, JOSÉ A.C., COSTA, G. C., REIS, A. S., BEZERRA, J. L., PATRICIO, F. J., SILVA, L. A., AMARAL, F. M. M., NASCIMENTO, F. R. F. Inibição da infecção in vitro de macrófagos por *Leishmania amazonensis* por extrato e frações de *Chenopodium ambrosioides* L. **Revista de Ciências da Saúde**, v. 16, n. 1, 2014.

LINDOSO, J. A. L. et al. Review of the current treatments for leishmaniasis. **Research and reports in tropical medicine**, p. 69-77, 2012.

LIPINSKI, C.A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five **Revolution. Drug Discovery today: Technologies**. v.1, n.4, p.337-341, 2004.

LIPINSKI, C.A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B.W.; FEENEY, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug Discovery and development sittings. **Advanced drug delivery reviews**. v. 23, p. 3-25, 1997

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.

KARALIS, V.; MACHERAS, P.; PEER, A.; SHAH, V. Bioavailability and bioequivalence: focus on physiological factors and variability. **Pharmaceutical Research**, v.25, n.8, p.1956–1962, 2008

KANDSI, FAHD, et al. Phytochemical Analysis, Antispasmodic, Myorelaxant, and Antioxidant Effect of *Dysphania Ambrosioides* (L.) Mosyakin and Clemants Flower Hydroethanolic Extracts and Its Chloroform and Ethyl Acetate Fractions. **Molecules**, vol. 26, no. 23, p. 7300, 2021.

KEHLBECK, J. D.; SLACK, C. C.; TURNBULL M. T.; KOHLER, S. J. Exploring the 94 Hydrolysis of Sucrose by Invertase Using Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: A Flexible Package of Kinetic Experiments. **Journal of Chemical Education**, v. 91, n. 5, p. 734–738, 2014

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 1 jul. 2015.

KIUCHI, F., et al. Monoterpene Hydroperoxides with Trypanocidal Activity from *Chenopodium ambrosioides*. **Journal Natural Products**, vol. 65, n. 4, p. 509–512, 2002.

KUMAR, R. et al. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 159-164, 2007.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T.; BRAGA, R.R.; RYAN, L.; PÓVOA, M.M.; ISHIKAWA, E.A.Y. A leishmania e as Leishmanioses. Instituto Evandro Chagas, v. 1, p. 83-124, 1986.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. The leishmaniasis in biology and medicine, v.1, p. 1-120, 1987.

LEMOS, I. C. S. et al. Ethnobiological survey of plants and animals used for the treatment of acute respiratory infections in children of a traditional community in the municipality of Barbalha, Ceará, Brazil. **African journal of traditional, complementary and alternative medicines**, v. 13, n. 4, p. 166-175, 2016.

LIEKE, T. et al. Leishmania surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 153, n. 2, p. 221-230, 2008.

LIU, Yan; HU, Ming. Absorption and metabolism of flavonoids in the caco-2 cell culture model and a perused rat intestinal model. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 30, n. 4, p. 370-377, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Plantarum, p. 512, 2002.

MAGALHÃES, N. K. et al. Medicinal plants of the Caatinga, northeastern Brazil: Ethnopharmacopeia (1980–1990) of the late professor Francisco José de Abreu Matos. **Journal of ethnopharmacology**, v. 237, p. 314-353, 2019.

MAGALHÃES, M.A.F.; CORTINES, E.; MELO, A.L.; e VALCARCEL, R. Influência da sazonalidade nos processos de regeneração espontânea na serra Madureira-Mendanha, RJ. In: **VI Simpósio Nacional sobre Áreas Degradadas, e II Congresso Latino Americano de Recuperação de Áreas**. Resumo expandido. 2005.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727–747, 1 maio 2004.

MANSUETO, P., et al. Leishmaniasis in travelers: a literature review. **Travel medicine and infectious disease**, v. 12, n. 6, p. 563-581, 2014.

MARTINS, A. C. et al. Revisão da literatura: Avanços e perspectivas no tratamento de alzheimer em idosos com ênfase na barreira hematoencefálica. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 7, n. 9, p. 624-642, 2021.

MELOS, Jorge LR; ECHEVARRIA, Aurea. Sistemas enzimáticos de Tripanossomatídeos como potenciais alvos quimioterápicos. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 4, p. 374-392, 2012.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 107, n. 1, p. 7–14, 5 jun. 2013.

MCMURRY, Journal of Organic Chemistry. 4ed. **Ed. Pacific Grove**, 1996.

MIGNANI, Serge et al. Present drug-likeness filters in medicinal chemistry during the hit and lead optimization process: how far can they be simplified?. **Drug discovery today**, v. 23, n. 3, p. 605-615, 2018.

MISHRA, Bhuwan B. et al. Alkaloids: future prospective to combat leishmaniasis. **Fitoterapia**, v. 80, n. 2, p. 81-90, 2009.

MORAES, L. Ação do alcaloide filantidina sobre o protozoário Leishmania (Leishmania) amazonensis e a célula hospedeira. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Pará, 2014.

MOTA, E. F.; ROSARIO, D. M.; VEIGA, A. S. S.; BRASIL, D. S. B.; SILVEIRA, F. T.; DOLABELA, M. F. Biological activities of *Croton palanostigma* Klotzsch. **Pharmacognosy**, v. 11, n. 43, p. 601-606, 2015.

MONTEIRO, Maria Vivina Barros et al. Ethnoveterinary knowledge of the inhabitants of Marajó Island, eastern Amazonia, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 41, p. 233-242, 2011.

MONZOTE, L., et al. Activity of the Essential Oil from *Chenopodium Ambrosioides* Grown in Cuba against *Leishmania Amazonensis*. **Chemotherapy**, vol. 52, n. 3, p. 130–136, 2006.

MONZOTE, L. et al. Combined effect of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and antileishmanial drugs on promastigotes of *Leishmania amazonensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 4, p. 257-260, 2007.

MONZOTE, L. et al. Activity, toxicity and analysis of resistance of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* after intraperitoneal, oral and intralesional administration in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*: A preliminary study. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 61, n. 2-3, p. 148-153, 2007.

MONZOTE, L., et al. Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and main components: Activity against *Leishmania*, their mitochondria and other microorganisms. *Experimental Parasitology*, v. 136, p. 20–26, 2014.

MONZOTE, Lianet et al. Interaction of ascaridole, carvacrol, and caryophyllene oxide from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. with mitochondria in *Leishmania* and other eukaryotes. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 9, p. 1729-1740, 2018.

MORAIS, S. M. et al.; Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 169-177, 2005.

MOSYAKIN, S.L. E CLEMANTS, S.E. Further transfers of glandular-pubescent species from *Chenopodium* subg. *Ambrosia* to *Dysphania* (Chenopodiaceae). *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*. v.2, n. 1, p. 425-431, 2008.

NASCIMENTO F.R.F. et al.; **Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment.** *Life Sci* 78: 2650-2653. 2006.

NASCIMENTO JUNIOR, C.S.; CAVALCANTI, E.B.V.S.; DE SOUSA, A..P.; SILVA, D.F.; FERREIRA, M.D.L. Qualitative analysis of the Chemical profile of medicinal plants olegge Garden Nova Esperança. **Research, Society and development**. v.9, n. 9, p. 1-22, 2020.

NEIVA, Vanessa do A. et al. Plant species used in giardiasis treatment: ethnopharmacology and in vitro evaluation of anti-Giardia activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 215-224, 2014.

NGURE, P. K.; TONUI, W. K.; INGONGA, J. MUTAI, C.; KIGONDU, E.. RUKUNGA, G.; KIMUTAI, A. In vitro antileishmanial activity of extracts of Warburgia ugandensis (Canellaceae), a Kenyan medicinal plant. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 2, p. 61-66, 2009.

NIBRET, ENDALKACHEW, e MICHAEL WINK. Trypanocidal and Cytotoxic Effects of 30 Ethiopian Medicinal Plants. **Zeitschrift Für Naturforschung C**, vol. 66, no. 11-12, pp. 541–546, 2011.

OKHALE, S. et al. Phytochemical and proximate analyses and thin layer chromatography fingerprinting of the aerial part of *Chenopodium ambrosioides* Linn.(Chenopodiaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 12, p. 2289-2294, 2012.

OKUYAMA, E.; UMEYAMA, K.; SAITO, Y.; YAMAZAKI, M.; SATAKE, M. Ascaridole as pharmacologically active principle of “Paico” a medicinal peruvian plant. **Chem Pharm Bull**. v. 41, n. 7, p. 1309-1311, 1993.

ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 10, p. 925–932, 1 out. 2016.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas**, v. 10, [s.l], 2021. Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/55386>>.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas**, v. 9, [s.l], 2020. Disponível em: < <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53090>>.

ORYAN, Ahmad; BEMANI, Effat; BAHRAMI, Somayeh. Anti-leishmanial, immunomodulatory and anti-oxidative activity of quercetin against cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 13, n. 1, p. 26-34, 2023.

PANDEY, A.; NEGI, S.; SOCCOL, C. R. (Ed.). **Current developments in biotechnology and bioengineering: production, isolation and purification of industrial products**. Elsevier, 2016.

PASTOR, Jacinta et al. Combinations of ascaridole, carvacrol, and caryophyllene oxide against *Leishmania*. **Acta tropica**, v. 145, p. 31-38, 2015.

PAVIA, D. L., LAMPMAN, G. M., KRIZ, G. S., Introduction to Spectroscopy, 4rd edition. **Brooks Cole**, 2010.

PARÉ, P.W., et al. Antifungal terpenoids from *Chenopodium ambrosioides*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 21, n. 6-7, p. 649–653, 1993.

PATRÍCIO, F.J., et al. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 115, p. 313–319, 2008.

PEDROLLO, C. T. et al. Medicinal plants at Rio Jauaperi, Brazilian Amazon: Ethnobotanical survey and environmental conservation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 186, p. 111-124, 2016.

PENIDO, A. B. et al. Ethnobotanical study of medicinal plants in Imperatriz, State of Maranhão, Northeastern Brazil. **Acta Amazonica**, v. 46, p. 345-354, 2016.

PINTO, L.; VARGAS, E. “Leishmania” reflexões sobre o manejo do mundo em contextos de risco sanitário. **Revista de antropologia**, v. 1, n. 49, 2017.

POLLACK, Y., ET AL. The Effect of Ascaridole on the in Vitro Development Of Plasmodium Falciparum. **Parasitology Research**, vol. 76, no. 7, p. 570–572 1990.

QUINLAN, M. B.; QUINLAN, R. J.; NOLAN, J. M. Ethnophysiology and herbal treatments of intestinal worms in Dominica, West Indies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, n. 1, p. 75-83, 2002.

RAMOS, U. F.; SOLEDADE, S. C.; BAPTISTA, E. R. **Utilização de plantas medicinais pela comunidade atendida no Programa Saúde da Família da Pirajá, Belém, PA**. Infarma, v. 24, n. 5/6, p. 10-18, 2011.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; DE JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C.; ANDRADE Jr.; H. F.; TEMPONE, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado de arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550- 555, 2003.

REIMÃO, J. Q. **Estudo da atividade anti-leishmania de compostos de invertebrados marinhos brasileiros**. 2009. 132 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado de São Paulo, São Paulo, 2009.

REIS, A. S. et al. Atividade leishmanicida in vitro de frações do extrato hidroalcoólico das folhas de *Chenopodium ambrosioides* L. **Revista de Ciências da Saúde**. v.14, n.2, 2012.

RIBEIRO, R. V. et al. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 205, p. 69-102, 2017.

RIBEIRO, Daiany Alves et al. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, p. 912-930, 2014.

RIBEIRO, C. Vector salivation and parasite transmission. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. suppl 3, p. 1–3, 1 jan. 1987.

RIBEIRO, Mariana Vagos. **Novas estratégias terapêuticas para a leishmaniose: Efeitos do p-cimeno e 2-nitro-p-cimeno em Leishmania Infantum**. 2011. Dissertação de Mestrado.

ROCHA, I. C. M. **Avaliação da atividade anti-leishmania in vitro de complexos Sbv-ribonucleosídeos em Leishmania (Leishmania) chagasi**. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

RODRIGUES, J. A. P. **Estudo da Fauna de Flebotomíneos (Diptera: psychodidae) No Parque Do Sabiá, Uberlândia - MG**. 2019. Monografia (Bacharel em Geografia) - Universidade Federal de Uberlândia, [S. l.], 2019.

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**, v. 124, n. 5, p. 495-507, 2002.

SACCOLITI, F. et al. Inhibition of *Leishmania infantum* trypanothione reductase by diaryl sulfide derivatives. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 32, n. 1, p. 304-310, 2017.

SANTIAGO, A.S.; PITA, S.S.R; GUIMARÃES, E.T.. Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual e a necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, 2021.

SANTOS, K. B. et al. Highly Flexible Ligand Docking: Benchmarking of the DockThor Program on the LEADS-PEP Protein–Peptide Data Set. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 60, n. 2, p. 667–683, 10 jan. 2020.

SANTOS JÚNIOR H. M., OLIVEIRA D., DE CARVALHO D. A., PINTO J. M., CAMPOS V. A., MOURÃO A. R., PESSOA C., DE MORAES M. O., COSTA-LOTUFO L. V. Evaluation of native and exotic Brazilian plants for anticancer activity. **Journal of Natural Medicines**, 64(2):231-238, 2010.

SÁ, R.D., et al. Anatomical and Histochemical Analysis of *Dysphania Ambrosioides* Supported by Light and Electron Microscopy. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 26, n. 5, p. 533–543, 2016.

SÁ, R.D. **Estudo farmacognóstico de *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae)**. Dissertação de mestrado - (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Recife: Universidade Federal do Pernambuco, p. 106, 2013.

SCHINOR, Elisandra Cristina et al. Effect of extracts and isolated compounds from *Chresta scapigera* on viability of *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 295-300, 2007.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE (SVSA/MS). **Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil**. 2020. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/ltabr.def>. Acesso em: 20 abri. 2023.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE E AMBIENTE (SVSA/MS). **Casos de Leishmaniose Visceral no Brasil**. 2020. Disponível em:

<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/ltabr.def>. Acesso em: 20 abri. 2023.

SENNA L. **Chenopodium in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.** 2015 Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB139759>. Acesso em: 30 de março de 2021.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 6 ed. 1 reimp. Porto Alegre. Editora da UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2010. cap. 12 e 16. p. 263-403.

SHAH, H.; KHAN, A.A. Phytochemical characterisation of na important medicinal plant, *Chenopodium ambrosioides* Linn. **Natural Product Research.** p. 1-4, 2017.

SHI, WUXIAN, et al. Nucleoside Hydrolase from *Leishmania Major*. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 274, n. 30, p. 21114–21120, 1999.

SILVA, F. R. O. **Planejamento de inibidores da enzima tripanotiona redutase utilizando ferramentas in silico.** 2022. 122 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2022.

SILVA, M.J. **Estudo químico e desenvolvimento de métodos analíticos validados em cromatografia para análise de oleorresinas e extratos de folhas de espécies de Copaifera.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

SILVA, F. S. **Avaliação in vitro da azitromicina nas espécies *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Leishmania) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) chagasi*.** 2005. 43 p. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de doenças infecciosas e parasitárias) – Centro de pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2005.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. v. 5, 2005.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, 6^a. ed. **LTC Livros Técnicos e Científicos**, Rio de Janeiro, 2000.

SCHIRMANN, Jéseka G. et al. In-vitro biological evaluation of 3, 3', 5, 5'-tetramethoxy-biphenyl-4, 4'-diol and molecular docking studies on trypanothione reductase and Gp63 from *Leishmania amazonensis* demonstrated anti-leishmania potential. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 6928, 2023.

SCHLAGENHAUF, E; ETGES, R; METCALF, P. The crystal structure of the *Leishmania major* surface proteinase leishmanolysin (gp63). **Structure**, v. 6, n. 8, p. 1035-1046, 1998.

SCHREY, A.K.; NICKEL-SEEBER, J.; DRWAL, M.N.; ZWICKER, P.; SCHULTZE, N.; HAERTEL, B.; PREISSNER, R. Computacional prediction of imune cell cytotoxicity. **Food and Chemical toxicology**. v. 107, p.150-166, 2017.

SCHNEIDER, N. et al. Substantial improvements in large-scale redocking and screening using the novel HYDE scoring function. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 26, n. 6, p. 701–723, 27 dez. 2011.

SINGH, O. P.; HASKER, E.; SACKS, D.; *et al.* Asymptomatic Leishmania Infection: A New Challenge for Leishmania Control. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 10, p. 1424–1429, 2014.

SOARES, M. H. et al. Chemical Composition, Antibacterial, Schistosomicidal, and Cytotoxic Activities of the Essential Oil of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin&Clemants(Chenopodiaceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 14, n. 8, 29 jul. 2017.

SOARES, N.P.; SANTOS, P.L.; VIEIRA, V.S.; PIMENTA, V.S.C.; ARAÚJO, E.G. Técnicas de prospecção fitoquímica e sua importância para o estudo de biomoléculas derivadas de plantas. **Enciclopédia biosfera**. v. 13, n. 24, p. 991-1010, 2016.

SONG, K.; WANG, H.Q.; LIU, C.; KANG, J.; LI, B.M.; CHEN, R.Y. Chemical constituents from *Chenopodium ambrosioides*. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**. V. 39, n.2, p. 254-257, 2014.

SUNDAR, Shyam; CHAKRAVARTY, Jaya; MEENA, Lalit P. Leishmaniasis: treatment, drug resistance and emerging therapies. **Expert Opinion on Orphan Drugs**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2019.

SKRABA, C. M.; PEDROSO, R. B.; FIORINI, A.; ROSADO, F. R.; ARISTIDES, S. M. A.; LONARDONI, M. V. C.; TEIXEIRA, J. J. V.; SILVEIRA, T. G. V. Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay using membrane antigens of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 4, p. 411-417, 2014.

TEMPONE, A. G.; BORBOREMA, S. E. T.; GUALDA, N. C.; YOGI, A.; CARVALHO, C. S.; BACHIEGA, D.; LUPO, F. N.; BONOTTO, S. V.; FISCHER, D. C. H. Antiprotozoal activity of brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloidproducing families. **Phytomedicine**, v. 12, p. 382-390, 2005.

TENE, V. et al. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchiipe, Ecuador. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 1, p. 63–81, 1 abr. 2007.

TIWARI, N., *et al.* Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 1, 2017.

TRIVELLATO-GRASSI, L.T. *Chenopodium ambrosioides* L. – erva de santa maria (amaranthaceae): estudo do potencial anti-inflamatório, antinociceptivo e cicatrizante. Mestrado (Mestrado em ciências farmacêuticas). Itajaí, p. 146, 2011.

TRIVELLATOGRASSI L., et al., From popular use to pharmacological validation: a study of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. **Journal of ethnopharmacology**, v. 145, p. 127-138. 2013.

TSIMOGIANNIS, D. et al. Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 593–606, 21 mar. 2007.

VALE, V. V. et al.; Anti-malarial activity and toxicity assessment of *Himatanthus articulatus*, a plant used to treat malaria in the Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, v. 14, n. 132, p. 1-10, 2015.

VAN DEN BERG, M.E. Plantas medicinais na Amazônia: Contribuição ao seu conhecimento sistemático. **3 ed. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi**, p. 268. 2010.

VÁSQUEZ, Silvia Patricia Flores; MENDONÇA, Maria Silvia de; NODA, Sandra do Nascimento. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta amazônica**, v. 44, p. 457-472, 2014.

VITAL, L. S. et al. **Extração e quantificação de flavonoides por análise espectrofotométrica UV/VIS no mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.)**. 2023. Dissertação de Mestrado. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, 2023.

VEIGA, A. et al. *Leishmania amazonensis* and *Leishmania chagasi*: in vitro leishmanicide activity of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. **Experimental Parasitology**, v. 175, p. 68-73, 2017.

VEIGA, A. S. S. **Atividade antileishmania de plantas da Amazônia**. 2013.168 f. Dissertação de Mestrado. PPGCF-UFPA. Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 2013

VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.

VOLPEDO, Greta et al. From infection to vaccination: Reviewing the global burden, history of vaccine development, and recurring challenges in global leishmaniasis protection. **Expert Review of Vaccines**, v. 20, n. 11, p. 1431-1446, 2021.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant drug analysis**. Springer- Verlag, Berlin, 1984.

WYREPKOWSKI, C.D.C., et al. Aspectos farmacológicos da terapia medicamentosa utilizada para a leishmaniose cutânea: uma revisão de literatura. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 12, n. 8, p. e3352, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1>. Acesso em: agosto de 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global leishmaniasis surveillance: 2019–2020, a baseline for the 2030 roadmap – Surveillance mondiale de la leishmaniose: 2019-2020, une période de référence pour la feuille de route à l'horizon 2030. **Weekly Epidemiological Record=Relevé épidémiologique hebdomadaire**, v. 96, n. 35, p. 401–419, 2021. Acesso em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/344795>>. Acesso em: 2 ago. 2022

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis: background information**. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/resources/who_paho_era7/en/>; Acesso em 30 março de 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Organisation Mondiale de La Santé. **Weekly Epidemiological Record. Relevé épidémiologique hebdomadaire**, v. 95, n. 25, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) - The world medicines situation 2011. **Traditional medicines: global situation, issues and challenges**. Geneva. 12p. 2011.

WYREPKOWSKI, Claudia Dantas Comandolli et al. Aspectos farmacológicos da terapia medicamentosa utilizada para a leishmaniose cutânea: uma revisão de literatura. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 12, n. 8, p. e3352-e3352, 2020.

XIAO, W. et al. Multi-Body Interactions in Molecular Docking Program Deviced with Key Water Molecules in Protein Binding Sites. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2321–2321, 11 set. 2018.

YANG, X.X. et al. Monitoring drug-protein interaction. **Clin Chim Acta**, v. 365, n. 1-2, p. 9-29, 2006.

YAZBEK, P. B. et al. Plants utilized as medicines by residents of Quilombo da Fazenda, Núcleo Picinguaba, Ubatuba, São Paulo, Brazil: A participatory survey. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 244, p. 112123, 2019.

YEE, S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man—fact or myth. **Pharmaceutical Research**. v.14, n.6, p.763-766, 1997.

ZAGO, P.M.W, et al. Anti-Biofilm Action of Chenopodium Ambrosioides Extract, Cytotoxic Potential and Effects on Acrylic Denture Surface. **Frontiers in Microbiology**, vol. 10, 2019.

ZOHRA, Tanzeel et al. Extraction optimization, total phenolic, flavonoid contents, HPLC-DAD analysis and diverse pharmacological evaluations of Dysphania

ambrosioides (L.) Mosyakin & Clemants. **Natural product research**, v. 33, n. 1, p. 136-142, 2019.

ZUCCA, M.; SAVOIA, D. Current developments in the therapy of protozoan infections. **The open medicinal chemistry journal**, v. 5, p. 4, 2011.