



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ESTUDO *in silico* DE
COMPOSTOS DE *Dysphania ambrosioides* L. MOSYAKIN &
CLEMANTS**

Ana Carolina Sousa Quaresma

BELÉM – PA

2023



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

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ESTUDO *in silico* DE
COMPOSTOS DE *Dysphania ambrosioides* L. MOSYAKIN &
CLEMANTS**

Autora: Ana Carolina Sousa Quaresma

Orientadora: Prof. Dra. Maria Fâni Dolabela

Plano de defesa de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas, do Instituto de Ciências da
Saúde da Universidade Federal do Pará
como requisito para obtenção do título de
mestre em ciências farmacêuticas.

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)

S725a Sousa Quaresma, Ana Carolina.
 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ESTUDO in silico DE
 COMPOSTOS DE *Dysphania ambrosioides* L. MOSYAKIN &
 CLEMANTS / Ana Carolina Sousa Quaresma. — 2023.
 106 f. : il.

 Orientador(a): Prof^a. Dra. Maria Fâni Dolabela
 Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
 Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação
 em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2023.

 1. *Chenopodium ambrosioides*. 2. compostos
 isolados. 3. terpenos e flavonóides. 4. plantas
 medicinais. I. Título.

CDD 615.32

ANA CAROLINA SOUSA QUARESMA

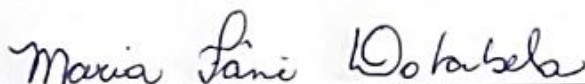
**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ESTUDO *in silico* DE COMPOSTOS
DE *Dysphania ambrosioides* L. MOSYAKIN & CLEMANTS**

Texto dissertativo apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de mestre em ciências farmacêuticas. Área de concentração: Desenvolvimento e avaliação de medicamentos e produtos naturais.

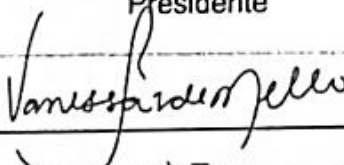
Orientadora: Prof. Dra. Maria Fani Dolabela.

Aprovada em 08 de novembro de 2023.

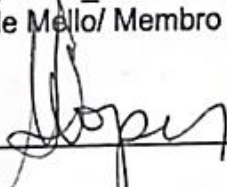
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Maria Fâni Dolabela/ Orientadora, PPGCF, UFPA
Presidente



Profa. Dra. Vanessa Jola de Mello/ Membro Interno, PPGCF, UFPA



Profa. Dra. Miriam Tereza Paz Lopes/ Membro externo, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG

RESUMO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ESTUDO *IN SILICO* DE COMPOSTOS DE *DYSPHANIA AMBROSIOIDES* L. MOSYAKIN & CLEMANTS.

O uso de plantas medicinais é uma prática comum a população, sendo a principal forma de tratamento de doenças em algumas regiões. A *Dysphania ambrosioides* L. (mastruz; Amaranthaceae) é uma espécie bastante utilizada por conta de suas propriedades medicinais no tratamento de doenças respiratórias e infecções. Apesar da atividade biológica ser atribuída a diversos metabólitos, não é esclarecido quais podem ocasionar efeitos tóxicos, necessitando estudos adicionais. Portanto, este trabalho visou avaliar a toxicidade de extratos e frações de *Dysphania ambrosioides* L.. Foram obtidos extratos etanólicos das folhas (EEF) e dos caules (EEC) por maceração e, por extração sob refluxo com solventes de polaridade crescente foram obtidas quatro frações de cada uma das partes (folha- FHF, FDF, FAEF e FMF; caule – FHC, FDC, FAEC e FMC) para a realização de estudos químicos. A atividade tóxica foi avaliada pelo ensaio de toxicidade com *Artemia salina* e *Allium cepa*. Para o estudo *in silico*, os compostos isolados foram selecionados da literatura e submetidos a testes de toxicidade, reações adversas, atividade biológica, propriedades físico-químicas, farmacocinética e *docking* molecular. Foram detectados triterpenos e esteróides em todos os extratos e frações, heterosídeos flavônicos principalmente nas amostras referentes a folha e cumarinas nas amostras de caule. Quanto a toxicidade, em ensaio com *Artemia salina* as amostras mais tóxicas foram as hexânicas (CL50 66,1 µg/mL), em ensaio com *Allium cepa* EEF, EEC e FDC foram citotóxicas e genotóxicas por diminuírem o índice mitótico (IM) e aumentarem o índice de aberrações cromossômicas (IA), FAEF, FAEC e FMF aumentaram o IM e o IA reduzidos. Em estudo *in silico*, os compostos 4, 19 e 20 foram selecionados como os menos tóxicos, enquanto 14, 15 e 17 mais tóxicos. Na predição de atividade biológica, os flavonóides apresentaram mais atividades como: potencial antioxidante, sequestradores de ERO's, propriedades antineoplásicas e ação contra microorganismos e parasitas, em contrapartida, os terpenos demonstraram mais efeitos adversos, principalmente gastrointestinais e ulcerogênicos, esses efeitos são devido a suas características químicas que influenciam na farmacocinética que tem melhor perfil de absorção e forte ligação a proteínas de transporte. No *docking* molecular, o composto 14 interage de forma favorável com os resíduos do sítio de ativação da caspase 8 e da topoisomerase II, explicando parcialmente o seu potencial tóxico, além disso, fica claro que o composto 4 tem atividade antitumoral por ativação da caspase 8 e que o composto 20, apesar de apresentar a mesma atividade, não estás relacionadas a qualquer uma das enzimas estudadas. A *Dysphania ambrosioides* tem potencial citotóxico e genotóxico principalmente determinado pelos compostos terpênicos e esteróides presentes, apesar disso, os flavonóides que a compõe são muito promissores com potencial biológico.

Palavras-chave: *Chenopodium ambrosioides*; compostos isolados; terpenos e flavonóides; topoisomerase II; caspase 8; plantas medicinais.

ABSTRACT

EVALUATION OF TOXICITY AND STUDY IN SILICO OF DYSPHANIA AMBROSIODES L. MOSYAKIN & CLEMANTS COMPOUNDS

The use of medicinal plants is a common practice among the population, being the main way of treating diseases in some regions. *Dysphania ambrosioides* L. (mastruz, Amaranthaceae) is a species widely used due to its medicinal properties in the treatment of respiratory diseases and infections. Although the biological activity is attributed to several metabolites, it is not clear which ones can cause toxic effects, requiring additional studies. Therefore, this work aimed to evaluate the toxicity of extracts and fractions of *Dysphania ambrosioides* L. Ethanol extracts from the leaves (EEF) and stems (EEC) were obtained by maceration and by extraction under reflux with solvents of increasing polarity, four fractions were obtained. of each part (leaf – FHF, FDF, FAEF and FMF; stem – FHC, FDC, FAEC and FMC) to carry out chemical studies. The toxic activity was evaluated by the toxicity test with *Artemia salina* and *Allium cepa*. For the *in silico* study, the isolated compounds were selected from the literature and subjected to toxicity tests, adverse reactions, biological activity, physicochemical properties, pharmacokinetics and molecular docking. Triterpenes and steroids were detected in all extracts and fractions, flavonic heterosides mainly in leaf samples and coumarins in stem samples. Regarding toxicity, in a test with *Brine shrimp* the most toxic samples were hexane (LC50 66.1µg/mL), in a test with *Allium cepa* EEF, EEC e FDC were cytotoxic and genotoxic by decreasing the mitotic index (IM) and increasing chromosomal aberration index (IA), FAEF, FAEC e FMF increased IM and reduced AI. In an *in silico* study, compounds 4, 19 and 20 were selected as the least toxic, while 14, 15 and 17 were most toxic. In predicting biological activity, flavonoids showed more activities, such as: antioxidant potential, ROS scavenger, antineoplastic properties and action against microorganisms and parasites, on the other hand, terpenes showed more adverse effects, mainly gastrointestinal and ulcerogenic, these effects are due to their chemical characteristics that influence pharmacokinetics that have a better absorption profile and strong binding to transport proteins. In molecular docking, compound 14 interacts favorably with the residues of the caspase 8 and topoisomerase II activation sites, partially, explaining its toxic potential. Furthermore, it is clear that compound 4 has antitumor activity through caspase activation, and the compound 20, despite showing the same activity, is not related to any of the enzymes studies. *Dysphania ambrosioides* has cytotoxic and genotoxic potential mainly determined by the terpene and steroid compounds present, despite this, the flavonoids that compose it are very promising with biological potential.

Key-words: *Chenopodium ambrosioides*; isolated compounds; terpenes and flavonoids; topoisomerase II; caspase 8; medicinal plants.

LISTA DE ESTRUTURAS

1 Kaempferol	23
2 Benzil- beta-D-glucopiranosideo	23
3 Afzelina	23
4 Kempferol-3-rhamnosideo-4'-xilosideo	23
5 Kempferol-3-rhamnosideo-7-xilosideo	23
6 Kempferol-7-rhamnosideo	23
7 Quercetina-7-O-alfa-L-rhamnopiranosideo	23
8 Isorhamnetina	23
9 Patuletina	23
10 Quercetina	23
11 Dendranthemosideo B	23
12 4-hidroxi-4-metilciclohex-2-em-1-ona	23
13 (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol	23
14 (1R,4S)-p-met-2-em-1-ol	23
15 Ascaridol	23
16 Chenopanona	23
17 Isoascaridol	23
18 Carvacrol	23
19 p-cimeno	23
20 A-terpineno	23
21 1S,2S,3R,4S)-1-metil-4-(propan-2-il)ciclohexano-1,2,3,4-tetrol	23
22 1,2,3,4-tetrahidroxi-p-metano	23
23 (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol	23
24 (1R,4S)-p-met-2-en-1-ol	23
25 1,4-dihidroxip-met-2-eno	23
26 1-metil-4β-isopropil-1-ciclohexeno-4α,5α,6α-triol	23

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Terpenos isolados de <i>D. ambrosioides</i>	13
Figura 2 - <i>Dysphania ambrosioides</i>	20
Figura 3 - Compostos isolados de <i>D. ambrosioides</i>	23
Figura 4 - Fracionamento do extrato etanólicos das folhas de <i>Dysphania ambrosioides</i> com solventes de polaridade crescente por extração sob refluxo.....	34
Figura 5 - Fracionamento do extrato etanólicos dos caules de <i>Dysphania ambrosioides</i> com solventes de polaridade crescente por extração sob refluxo.....	34
Figura 6 - Estudos cromatográficos do extrato etanólico das folhas de <i>D. ambrosioides</i> e suas frações.....	45
Figura 7 - Estudos cromatográficos do extrato etanólico dos caules de <i>D. ambrosioides</i> e suas frações.....	47
Figura 8 - Espectro de RMN de ¹ H do extrato e frações das folhas de <i>D. ambrosioides</i>	49
Figura 9 - Espectro de RMN de ¹ H do extrato e frações dos caules de <i>D. ambrosioides</i>	51
Figura 10 - Alterações celulares observadas por análise de células meristemáticas de raízes de <i>Allium cepa</i>	59
Figura 11 - Enzima cristalografadas de caspase 8 (1QTN) e topoisomerase II (1ZXM)	77
Figura 12 - Sobreposição das poses geradas no processo de <i>redocking</i> como ligante cristalografado.....	78
Figura 13 - Conformações dos compostos selecionados e sua configuração durante a ligação ao sitio 1QTN (caspase 8)	79
Figura 14 - Representação 2D das interações entre o sitio de ligação 1QTN da caspase 8 e os compostos.....	80
Figura 15 - Conformações dos compostos selecionados e sua configuração durante a ligação ao sitio 1ZXM (topoisomerase II)	83
Figura 16 - Representação 2D das interações entre o sitio de ligação 1ZMX da topoisomerase II e os compostos.....	85

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 - Condições utilizadas nas avaliações em cromatografia em camada delgada.....	35
Quadro 2 - Gradiente de eluição por CLAE-DAD.....	36
Tabela 1 - Rendimento de dos extratos e frações de <i>D. ambrosioides</i>	41
Tabela 2 - Prospecção fitoquímica por CCD de extratos e frações de folha e caule de <i>D. ambrosioides</i>	43
Tabela 3 - Toxicidade em <i>Artemia salina</i> de extratos e frações de <i>D. ambrosioides</i>	53
Tabela 4 - Índice mitótico e índice de aberrações cromossômicas em <i>Allium cepa</i> induzido por extratos e frações das folhas de <i>D. ambrosioides</i>	56
Tabela 5 - Índice mitótico e índice de aberrações cromossômicas em <i>Allium cepa</i> induzido por extratos e frações dos caules de <i>D. ambrosioides</i>	58
Tabela 6 - Análise in sílico de toxicidade de terpenos e flavonóides.....	62
Tabela 7 - Predição da toxicidade de terpenos e flavonóides.....	64
Tabela 8 - Predição de atividades biológicas de terpenos e flavonóides.....	68
Tabela 9 - Avaliação in sílico dos efeitos adversos dos terpenos e flavonoides.....	71
Tabela 10 - Propriedades físico-química dos terpenos e flavonoides	72
Tabela 11 - Análise in sílico da farmacocinética dos terpenos e flavonóides.....	76
Tabela 12 - Energia e interação entre a enzima 1QTN (caspase 8) e os compostos selecionados.....	81
Tabela 13 - Energia e interações entre enzima 1ZXM (topoisomerase II) e os compostos selecionados.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

mL	Mililitro
%	Porcentagem
G	Grama
µg/mL	Micrograma por mililitro
°C	Graus Celsius
CO₂	Dióxido de carbono
°GL	Graus Gay-Lussac
>	Maior que
<	Menor que
Nm/ sec	Newton metro por segundo
mg/L	Miligramas por litro
DL₅₀	Dose letal de 50%
CC₅₀	Concentração citotóxica 50%
g/L	Gramas por litro
mol/L	Mol por litro
pH	Potencial hidrogeniônico
h	Horas
µL	Microlitros
DMSO	Dimetilsulfóxido
cm	Centímetros
v/v	Volume por volume
HCl	Ácido clorídrico
N	Normalidade
(x)	Multiplicação
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
λ	Comprimento de onda

(≤)	Menor ou igual
M	Molaridade
mM	Milimol
NaCl	Cloreto de sódio
V	Volts
mA	Miliampere
KCl	Cloreto de potássio
EEF	Extrato de etanol da folha
FHF	Fração de hexano da folha
FDF	Fração de diclorometano da folha
FAEF	Fração acetato de etila da folha
EEC	Extrato de etanol do caule
FHC	Fração de hexano do caule
FDC	Fração de diclorometano do caule
FAEC	Fração de acetato de etila do caule
CCD	Cromatografia em camada delgada
logP	Coeficiente de partição óleo-água
TPSA	Área de superfície polarizada topológica
MM	Massa molar
nALH	Número de aceptores de ligação de hidrogênio
nDLH	Número de doadores de ligação de hidrogênio
nROTB	Número de rotações
n°	Número da molécula
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
(+)	Positivo
(-)	Negativo

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1. Riscos da utilização das plantas medicinais.....	16
2.2. <i>Dysphania ambrosioides (L.) Mosyakin & Clemants</i>	21
3. OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Material	30
4.1.1 Equipamentos.....	30
4.1.2 Solventes, fases estacionárias e demais reagentes	30
4.1.3 Material plástico, vidrarias e outros.....	31
4.1.4 Corante e outros	32
4.1.5. Programas e softwares	32
4.1.6 Reveladores utilizados na prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada (CCD)	32
4.1.7 Material biológico	33
4.2 Métodos	33
4.2.1 Coleta e identificação do material vegetal	33
4.2.2 Processamento da droga vegetal e estudos fitoquímicos	34
4.2.3. Estudos de toxicidade	37
4.2.3. Ensaio <i>In silico</i>	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1. Estudos fitoquímicos.....	42
5.2. Determinação da CL ₅₀ pelo bioensaio com <i>Artemia salina</i>	53
5.3. Determinação da citotoxicidade e genotoxicidade por bioensaio em <i>Allium cepa</i> ...	54
5.4. Ensaio <i>in silico</i>	60
6. CONCLUSÃO	89
REFERÊNCIAS	91

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (2002) considera a *Dysphania ambrosioides* L. Mosyakin & Clemants (mastruz; Amaranthaceae) uma das espécies mais utilizadas na medicina tradicional do mundo (Soares *et al.*, 2015). No Brasil, é muito utilizada na forma de chás e de batida com leite para tratar sintomas gripais, pneumonia, verminoses e infecções uterinas (Morais *et al.*, 2005), bem como para promover o alívio da dor e da inflamação (Cartaxo *et al.*, 2010) e algumas comunidades a utilizam de forma triturada para tratar feridas e fraturas ósseas (Silva, 2012).

Desta espécie já foram isoladas uma variedade de compostos químicos, em especial os terpenos, tais como: (-)(1R, 4S)-1,4 dihidroxi-p-met-2-ene, (-)(1R, 2S, 3S, 4S)-1,2,3,4-tetrahidroxi-p-metano, chenopanona (Ahmed, 1999), ascaridol (Dembitsky, 2008), 4-hidroxi-4(4 ou 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-(propano-2-il) ciclohexano-1,2,3,4-tetrol; (1R,2S,3S,4S)-1,2,3,4-tetrahidroxi-p-metano; (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol; (1R,4S)-p-met-2-en-1-ol; 1,4-di-hidroxi-p-met-2-eno (Hou *et al.*, 2017; Figura 1).

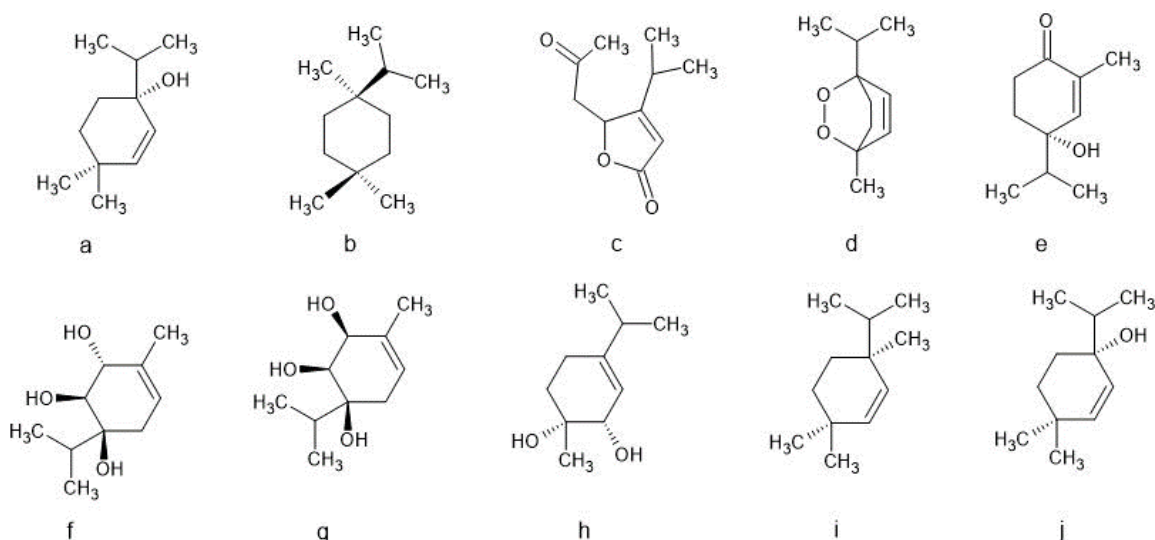


Figura 1 - Terpenos isolados de *Dysphania ambrosioides*

Legenda: (a) (-)(1R, 4S)-1,4 dihidroxi-p-met-2-eno; (b) (-)(1R, 2S, 3S, 4S)-1,2,3,4-tetrahidroxi-p-metano; (c) chenopanona; (d) ascaridol; (e) 4-hidroxi-4(4 ou β)-isopropil-2-metil-2-ciclohexen-1-ona; (f) 1-metil-4 β -isopropil-1-ciclohexeno-4 α , 5 α , 6 α -triol; (g) (1S,2S,3R,4S)-1-metil-4-(propano-2-il) ciclohexano-1,2,3,4-tetrol; (h) (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol; (i) (1R,4S)-p-met-2-en-1-ol; (j) 1,4-di-hidroxi-p-met-2-eno.

Estudos apontam que extratos, frações e/ou isolados obtidos de *D. ambrosioides* apresentaram várias atividades biológicas, dentre essas destacam-se: hipotensora (Assaidi *et al.*, 2014), antitumoral (Nascimento, 2006; Shameen *et al.*,

2019), anti-inflamatória e antinociceptiva (Calado *et al.*, 2015) e antioxidante (Pandiangan, 2020).

O óleo essencial de *D. ambrosioides* foi considerado tóxico em ratos e humanos (Pascual *et al.*, 1980; Gadano *et al.*, 2006), sendo associada à presença do ascaridol (Pollack *et al.*, 1990). O extrato aquoso obtido das folhas de *D. ambrosioides* livre de ascaridol não foi tóxico *in vivo*, porém foi capaz de ocasionar alterações cromossômicas *in vitro* (Gadano *et al.*, 2002; MacDonald *et al.*, 2004). Outro estudo com extrato aquoso das folhas demonstrou efeito tóxico em doses aguda e subcrônica desta espécie (Silva *et al.*, 2014). Logo, não se encontrou concordância entre os resultados sobre a toxicidade dos extratos obtidos da espécie.

Neste contexto, para elucidar os efeitos tóxicos, principalmente, citotóxicos e genotóxicos, de extratos e frações obtidos de *D. ambrosioides* se faz necessário estudos adicionais. Partindo dessa premissa, e observando que o ascaridol é o marcador de toxicidade, quais outros metabólitos podem se envolver em uma resposta toxicológica quando este está ausente? Assim, identificar qual(is) molécula(s) possui(em) potencial tóxico e podem estar envolvidas na toxicidade do extrato e/ou frações é essencial. Além disso, é importante conhecer os aspectos físico-químicos dessas moléculas e seus potenciais biológicos. Dessa forma, este trabalho visa contribuir no aspecto da toxicidade da planta fornecendo estudos sobre toxicidade celular em modelo *Allium cepa* e avaliação dos compostos isolados da espécie em modelos *in silico*.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Riscos da utilização das plantas medicinais

Desde os primórdios, a humanidade vem utilizando as plantas com fins medicinais e, apesar do desenvolvimento da indústria farmacêutica no século XX as plantas continuam sendo empregadas com diferentes objetivos terapêuticos (Marston e Hostettmann, 2009). Anteriormente, a manutenção da utilização das plantas se justificava, em parte, pela falta de acesso aos medicamentos de populações mais vulneráveis (Santa Rosa *et al.*, 2014).

Contudo, nas últimas duas décadas até o ano presente, a busca por plantas medicinais por parte dos pacientes aumentou em todo o mundo. O mercado global de plantas medicinais e derivados de plantas aumentou em 2015, com uma estimativa de 26,6 bilhões de dólares e de 35,4 bilhões de dólares em 2020. Nesse contexto, as plantas medicinais têm importância econômica podendo ser uma fonte de renda para as comunidades tradicionais e agricultores familiares, contribuindo para a geração de renda e inclusão social (Alonso-Castro *et al.*, 2017).

As plantas que constituem a biodiversidade Amazônica são complexas, apresentando na sua composição diferentes classes de metabólitos secundários, que são compostos químicos oriundos dos produtos do metabolismo primário (Filho, 2010). Estes metabólitos secundários variam de acordo com a espécie vegetal, sendo alguns restritos a determinadas família, gênero ou espécie, o que o possibilita ser um marcador quimiotaxonômico (Ferreira, 2010). A sua principal função é garantir a sobrevivência das plantas por meio da proteção contra raios UV, atração de polinizadores e dispersores de sementes, ação contra herbívoros, comunicação entre as plantas e outras (Ootani *et al.*, 2013; Wink, 2013).

Partindo da utilização de plantas com fins medicinais, ainda há a crença de que o natural não causa efeito nocivo, é seguro e possui inúmeros benefícios (Caetano *et al.*, 2015). No entanto, as plantas possuem compostos bioativos que podem causar efeitos tóxicos, dentre as classes de metabólitos secundários pode-se citar: alcaloides, glicosídeos cardiotônicos e cianogênicos, taninos, saponinas e oxalatos de cálcio e toxalbuminas (Maciel *et al.*, 2018).

Vários fatores podem estar relacionados a toxicidade das plantas e estes efeitos tóxicos podem ser relativos ao indivíduo, a própria planta, a forma de exposição

e as questões ambientais (de Melo *et al.*, 2021). Os efeitos tóxicos das plantas medicinais podem ocorrer de forma imediata, ocasionando colapso circulatório, taquicardia, hipotensão, sudorese, cianose, astenia, entre outros (Brasil, 2012; Campos *et al.*, 2016). Como de forma crônica, a partir do contato continuado ou pelo costume de ingestão de certas espécies comuns a alimentação e à medicina tradicional (Aguilar *et al.*, 2001).

Quando se trata de notificação de intoxicação por plantas medicinais, os Estados Unidos da América lideram os registros, seguido pela Itália e França. Nesse ranking, o Brasil ocupa a oitava posição (Baltar *et al.*, 2017), e isso pode ocorrer, pois, no Brasil, não há obrigatoriedade de notificação de eventos adversos ou toxicidade induzida por uso de plantas medicinais, ou ainda, da não correlação da ingesta com efeitos adjacentes. As plantas medicinais ocuparam o 13º lugar, em número de casos de intoxicação com 2.028 casos registrados no SINITOX nos anos de 2016 a 2017 (Brasil, 2020). Apesar de serem raros os casos de óbitos, os casos de notificação devem ser analisados de forma cautelosa, pois, muitas vezes, não se conhece a espécie vegetal que ocasionou, ou não se tem informações suficientes em relação sua composição química, ou não existem outros relatos na literatura (Oliveira *et al.*, 2003; Monseny *et al.*, 2015).

Há diversos fatores que dificultam a notificação de intoxicação por plantas medicinais: o não relato de consumo ou contato pelo paciente, a falta de informação a respeito da espécie tóxica e a falta de profissionais qualificados para a identificação de forma correta a espécie em pontos de atendimento (Peacock *et al.*, 2009; Monseny *et al.*, 2015). Problemas como estes dificultam a implantação a elaboração de estratégias de controle, prevenção e tratamento das intoxicações, sendo um grande desafio para as instituições públicas de saúde (de Melo *et al.*, 2021).

Para deixar a situação mais complexa, o Brasil tem a maior biodiversidade do mundo, com mais de 20% do número total de espécies da Terra (Brasil, 2016) no qual diferentes espécies são utilizadas com a finalidade medicinal (Badke *et al.*, 2016), existindo uma carência de estudos relacionados a toxicidade destas espécies, em especial das plantas amazônicas.

Nos quadros de intoxicação por plantas medicinais, devem ser observados os seguintes aspectos: parte da planta, idade e estado de amadurecimento dos frutos, clima, solo, estação do ano e patologias vegetais, uma vez que estes influenciam

diretamente na alteração dos níveis e concentrações nos metabólitos tóxicos presentes na planta (Oliveira, Godoy e Costa, 2003). Assim, todas as substâncias naturais têm um potencial de causar danos em órgãos, sistemas bioquímicos ou alterar sistemas enzimáticos, a depender da condição de exposição e da dose administrada (Ottoboni, 1991).

Para produzir um efeito tóxico, a substância deve entrar em contato com o organismo, a partir de três principais vias: digestiva, cutânea e respiratória; após atingir uma destas porta de entrada, podem ser absorvidas e chegar à corrente sanguínea e após a distribuição para os principais órgão podem ser metabolizadas e produzir efeitos tóxicos até chegar à eliminação do organismo (Barbosa, 2005).

Os efeitos tóxicos observados podem incluir: danos teciduais e outras modificações patológicas, lesões bioquímicas, efeitos teratogênicos, efeitos na reprodução, mutagenicidade, efeitos irritantes e reações alérgicas (Vieira e Fernandes, 2021). Em muitas emergências relacionadas a plantas medicinais é difícil identificar o principal metabólito envolvido no processo de intoxicação o que o torna de grande complexidade (Silveira, Bandeira e Arrais, 2008).

A exposição as plantas medicinais podem ocorrer através de sua ingestão oral ou contato cutâneo. No caso da ingestão, o metabólito tóxico pode ser absorvido em qualquer parte do trato gastrointestinal, sendo que a maior absorção acontece no intestino delgado. Pela via cutânea, a espessura da pele é fator determinante no quanto esta substância será absorvida, bem como das propriedades físico-químicas de cada um dos grupos metabólicos encontrados nessa planta (Campos *et al.*, 2016).

Após a absorção, o metabólito passa por todo o organismo e causa efeitos nocivos, principalmente, em órgão(s)-alvo, e para produzir este efeito tóxico é necessário que esta substância atinja uma determinada concentração no órgão, a depender da dose administrada, tempo de exposição e do grau de bioacumulação de cada um dos metabólitos (Pereira, 2007).

O processo de biotransformação é determinante para o efeito dos metabólitos no organismo, uma vez que é capaz de transformar a substância tóxica em outra de menor toxicidade e/ou ainda em um metabolito de maior toxicidade. Neste processo, o metabolito pode ser solúvel em água e rapidamente excretado pelo organismo ou pode haver a potencialização do efeito tóxico gerando reações de intoxicação até que este seja completamente eliminado (Pereira, 2007).

Algumas Resoluções da Diretoria Colegiada (RDC) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelecem normas de segurança para o registro de drogas vegetais, dentre estas destaca-se a RDC 14/2010, que permite registro de drogas vegetais como ativo de medicamentos fitoterápicos, sendo necessário a comprovação de segurança e eficácia que ocorre através da realização de estudos pré-clínicos e clínicos que determinem doses que evitem as reações tóxicas advindas dos compostos dessas plantas (Cechinel-Zanchett, 2017).

Inicialmente, a toxicidade pode ser avaliada em modelos *in vitro* (cultura células, crustáceos, algas, entre outros), posteriormente, em modelos *in vivo* para que se consiga determinar a maior quantidade de informações das propriedades e dos efeitos adversos (Ferreira *et al.*, 2009). Através do modelo animal pode-se avaliar as toxicidades aguda, subcrônica e crônica para estabelecer doses seguras e sem estes efeitos indesejados. Também, utilizando esses modelos animais pode-se avaliar a mutagenicidade, carcinogenicidade e o potencial teratogênico. De posse desses resultados, pode-se estimar o possível potencial tóxico da planta (Bednarczuk *et al.*, 2010).

As pesquisas com animais são usadas com objetivo de proteger e melhorar a saúde humana, entretanto existem diferenças anatômicas e fisiológicas entre os humanos e as outras espécies, que podem influenciar nos aspectos farmacocinéticos e toxicológicos, limitando a extrapolação de dados para humanos (Andrade, Pinto e Oliveira, 2002). Em adição a isto, a prática da experimentação em animais vivos tem provocado consideráveis preocupações políticas e públicas, havendo um crescente posicionamento crítico de setores da sociedade civil organizada e por parte da comunidade científica sobre o volumoso e generalizado quantitativo de animais utilizados em experimentação anualmente (Tréz, 2018).

Essa discussão juntamente aos recentes estudos sobre a natureza subjetiva dos animais, a partir de pesquisas comportamentais sobre o reconhecimento da presença de consciência (Silva e Ataíde Jr., 2020), traz reflexões críticas sobre a filosofia tradicional moral da utilização dos animais em estudos experimentais (Sganzerla e Xavier, 2020). Nesse contexto, “os princípios da técnica experimental humanitária” idealizada por William Russel e Rex Burch em 1959, deve ser entendida pelo princípio dos 3R’s referindo-se à redução, substituição e refinamento (*Reduction*,

Replacement e Refinement) do uso de animais em experimentação (Santos *et al.*, 2021).

Considerando que uma substituição completa do modelo animal só é possível de forma gradativa e a longo prazo, é importante que antes de seu uso seja utilizados ensaios que visem triar as substâncias em termos de atividade farmacológica e toxicidade. Partindo dessa condição, ensaios *in silico* e *in vitro* podem dar valiosas contribuições.

O estudo *in silico* é um método de simulação computacional que modela um fenômeno natural (Šmelcerovic *et al.*, 2017), para a avaliação de metabólitos bioativos, a sua principal estratégia é selecionar as melhores moléculas isoladas a partir de parâmetros físico-químicos, farmacocinéticos, toxicológicos e avaliação de atividade biológica (De Macedo *et al.*, 2013). Este modelo em comparação com os ensaios tradicionais possuem uma aplicabilidade mais eficiente no quesito de atender a grande demanda gerada na triagem em larga escala de novas moléculas candidatas a fármacos (Cruz *et al.*, 2019).

Os ensaios *in silico* apresentam como limitação a predição de extratos, devendo ser utilizado como ensaio de triagem de moléculas previamente isoladas (Maia *et al.*, 2020). Neste caso, seria a melhor alternativa à utilização de ensaios *in vitro* com cultura de células ou parasitas, onde se pode avaliar as atividades e citotoxicidade, bem como a seletividade. Também, podem ser usados testes enzimáticos e testes em diferentes espécies de estirpes de bactérias, além de algas e microcrustáceos (*Artemia salina* e *Daphnia magna*; de Sousa *et al.*, 2022).

Microcrustáceos são sensíveis a uma variedade de substâncias, espécies como *Artemia salina* são utilizadas como bioindicador por seu grau de tolerância mínimo em resposta a variações na qualidade do ambiente (Abel, 1989), sendo empregada como modelo *in vitro* para análise de toxicidade de curta exposição (24h – 48h), dessa forma, a letalidade desse organismo é utilizada para identificar respostas biológicas em que variáveis como morte e vida são as únicas envolvidas (Meyer *et al.*, 1982). Baseado no princípio da redução do número de animais, foi construído o protocolo experimental do presente trabalho.

2.2. *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants

A *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants, em território nacional é popularmente conhecida como erva-de-Santa-Maria, mastruz, mastruço, erva-das-cobras, ambrósia-do-méxico, chá do méxico, apazote, lombrigueira, quenopódio, arsênia vermífuga, epazote e erva-do-formigueiro (Camargo e Scavone, 1979; Lorenzi e Matos, 2002). Em outros países é conhecido como “yerba de Santa Maria” ou “paico” (argentina); “epazolt” (México); “american worn seed” e “jerusalen oak” (EUA; Camargo e Scavone, 1979).

A primeira descrição da espécie foi feita por Carl Von Linné em 1753 sendo *Chenopodium ambrosioides* Linnaeus, família Chenopodiaceae (Winsor, 2001). Contudo, estudos filogenéticos recentes determinaram que algumas espécies componentes a essa família tinham mais características do gênero *Dysphania*, família Amaranthaceae, sendo assim, a espécie foi realocada e passou a ser reconhecida como *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants (Mosyakin e Clemants, 2008), seguindo a classificação taxonômica de Mosyakin & Clemants:

Reino: *Plantae*

Filo: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Caryophyllales

Família: *Amaranthaceae*

Gênero: *Dysphania*

Do ponto de vista botânico, é uma erva anual ereta ou ascendente geralmente com 0,5 m, puberulenta, com râmulos floríferos vilosos com pelos glandulosos. Folhas membranáceas, lanceoladas a oblongas com 3,4-14 cm de comprimento e 1,8-3,5 cm de largura, ápice agudo, base atenuada, subssésil, margem dentada-sinuada. Inflorescência espiciforme, axilares e terminais, muito numerosas; flores com 5 sépalas pilosas, androceu oligostêmone. Fruto com semente globosa, nigrescente e brilhosa (Figura 2; Van Den Berg, 2010).



Figura 2 - *Dysphania ambrosioides*.

Fonte: Flora.on (Sociedade Portuguesa de Botânica)

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) essa espécie é uma das mais utilizadas no mundo com potencial medicinal, apresenta-se nativa na América Central e do Sul. Tem crescimento favorável em regiões de clima tropical, subtropical (América e África) e temperado (regiões do Mediterrâneo até Europa Central). No Brasil, a sua distribuição é ocorrente em quase todo o território, presente principalmente nos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (REFLORA, 2018), sendo considerada uma erva daninha, seu uso medicinal está restrito a hortas caseiras (Cruz e Grassi, 1981).

Por meio de dados históricos, o mastruz é utilizado desde os maias pré-colombianos (Klikis, 1985) e na medicina tradicional, a sua mais antiga utilização é para tratar afecções relacionadas a parasitas intestinais na forma de decocto e infusão (Gupta, 1995). Outras formas de utilização são em infuso ou sumo, sendo utilizados para o tratamento de bronquites, tuberculose, pneumonias e outras afecções do trato respiratório (Lorenzi e Matos, 2008). A forma de emplasto, compressa ou atadura são utilizados para tratar contusões, luxações, fraturas ósseas e feridas (Lorenzi e Matos, 2008; Silva, 2012; Bieski *et al.*, 2015); e para promover o alívio da dor e inflamação (Cartaxo *et al.*, 2010). Em áreas endêmicas de leishmaniose, a população usa as folhas para tratamento tópico nas úlceras causadas pela doença (França *et al.*, 1996).

Devido a sua diversidade de aplicações na medicina popular e seu potencial terapêutico, essa é uma das espécies que compõe a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). A lista foi desenvolvida pelo Ministério da Saúde com o objetivo de orientar estudos e pesquisas que possam contribuir na

elaboração de fitoterápicos, servindo de estímulo para o desenvolvimento de estudos que comprovem a segurança e eficácia das plantas que a compõe (Degenhardt *et al.*, 2016).

Muitos estudos químicos foram realizados com o óleo essencial obtido das folhas, que somente quantificam as estruturas químicas sem isolar alguma delas. Os primeiros estudos afirmavam que o óleo era composto por ascaridol, e uma mistura de hidrocarbonetos (Smillie e Pessoa, 1924), a partir do aprimoramento das técnicas cromatográficas foi possível identificar a presença de outros compostos e que essa composição varia em função do local de coleta do material. A principal classe componente do óleo essencial de *D. ambrosioides* é o monoterpenos em que são encontrados, principalmente, os compostos ascaridol e seus isômeros (Z)-ascaridol e (E)-ascaridol, alfa-terpineno e p-cimeno (Jardim *et al.*, 2008; Sá *et al.*, 2015; de Souza *et al.*, 2015).

Dessa espécie já foram isolados compostos pertencentes a classe de terpenos: (-)(1R, 4S)-1,4 dihidroxi-p-met-2-eno (Figura 3-23, p.24), (-)(1R, 2S, 3S, 4S)-1,2,3,4-terahidroxi-p-metano (Figura 3-20), chenopanona (Ahmed, 1999; Figura 3-14), ascaridol (Dembitsky, 2008; Figura 3-13), 4-hidroxi-4(4 ou β)-isopropil-2-metil-2-ciclohexen-1-ona (Figura 3-10), 1-metil-4 β -isopropil-1-ciclohexeno-4 α , 5 α , 6 α -triol (Figura 3-24), (1S, 2S, 3R, 4S)-1-metil-4-(propano-2-il)ciclohexano-1,2,3,4-tetrol (Figura 3-19), (1R,2S,3S,4S)-1,2,3,4-tetra hidroxi-p-metano (Figura 3-20), (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol (Figura 3-11), (1R,4S)-p-met-2-em-1-ol (Figura 3-12), 1,4-di-hidroxi - p-met-2-eno (Hou *et al.*, 2017, Figura 3-23). Dos frutos da espécie já foram isolados os glicosídeos flavônicos: kaempferol (Figura 3-1), isohamnetina (Figura 3-7), quercetina (Figura 3-9), kaempferol-3-rhamnosídeo-4'xilosídeo (Figura 3-3) e kaempferol-3-rhamnosídeo-7-xilosídeo (Jain *et al.*, 1990; Figura 3-4). A molécula afazelina foi isolada a partir do extrato n-butanol das folhas de *D. ambrosioides* (Ghareeb *et al.*, 2016, Figura 3-2).

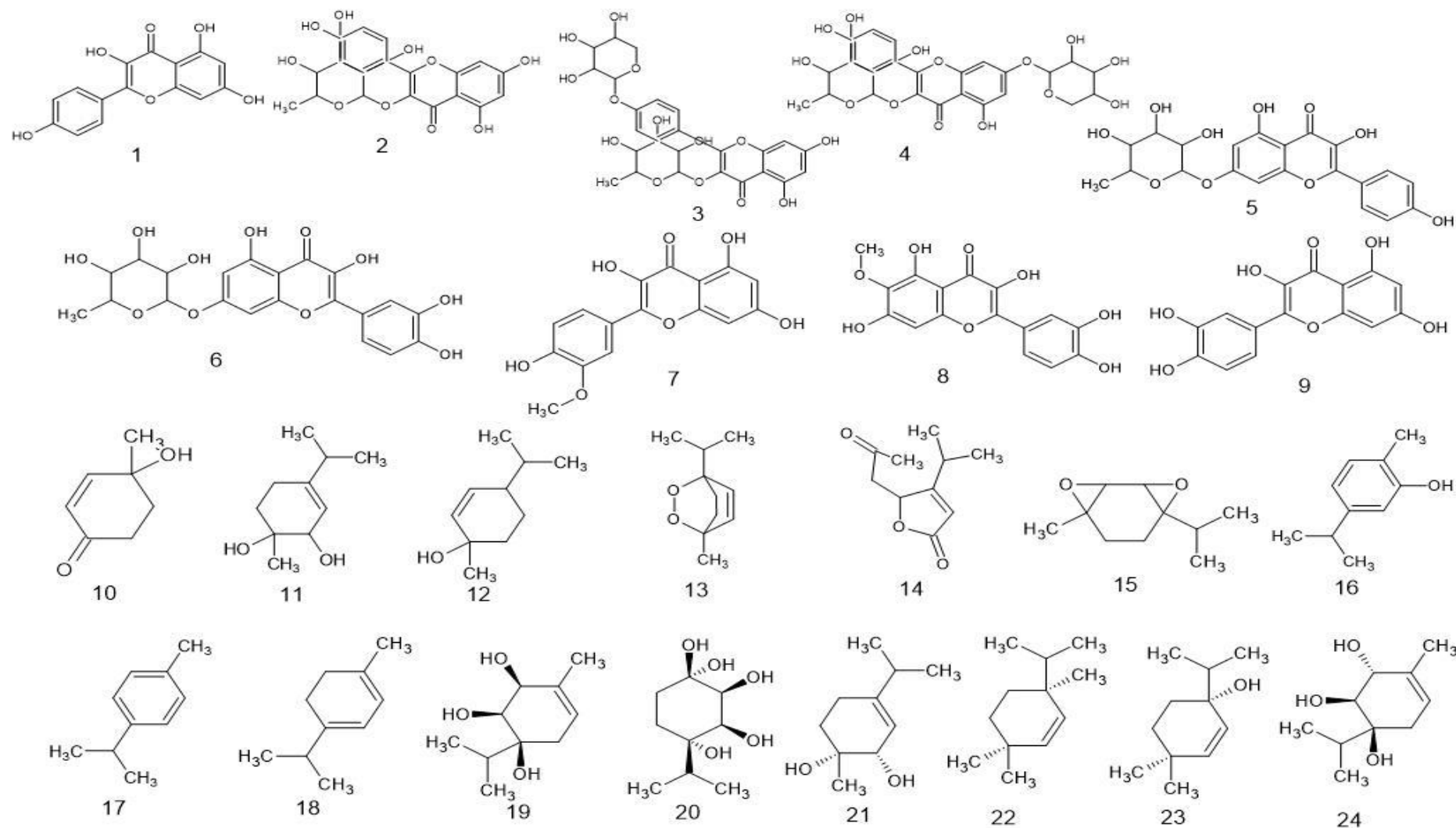


Figura 3 - Compostos isolados de *D. ambrosioides*

Legenda: (1) Kaempferol; (2) Afzelina; (3) Kempferol-3-rhamnosideo-4'-xilosideo; (4) Kempferol-3-rhamnosideo-7-xilosideo; (5) Kempferol-7-rhamnosideo; (6) Quercetina-7-O-alfa-L-rhamnopiranosideo; (7) Isorhamnetina; (8) Patuletina; (9) Quercetina; (10) 4-hidroxi-4-metilciclohex-2-em-1-ona; (11) (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol; (12) (1R,4S)-p-met-2-em-1-ol; (13) Ascaridol; (14) Chenopanona; (15) Isoascaridol; (16) Carvacrol; (17) p-cimeno; (18) α-terpineno; (19) (1S,2S,3R,4S)-1-metil-4-(propan-2-il)ciclohexano-1,2,3,4-tetrol; (20) 1,2,3,4-tetrahidroxi-p-metano; (21) (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol; (22) (1R,4S)-p-met-2-en-1-ol; (23) 1,4-dihidroxip-met-2-eno; (24) 1-metil-4β-isopropil-1-ciclohexeno-4α,5α,6α-triol.

Vários estudos já avaliaram e confirmaram as diferentes atividades biológicas da espécie, tais como: propriedades de atividade antitumoral (Cruz *et al.*, 2007), anti-inflamatória e analgésica (Ibironke e Ajiboye, 2007), cicatrizante (Trivellato-Grassi *et al.*, 2013), antiparasitária (Pollack *et al.*, 1990; Kuichi *et al.*, 2002), antibacteriana e antifúngica (Harraz *et al.*, 2014), ansiolítica e antipirética (Ngo Bum *et al.*, 2011), antiartrítica (Pereira *et al.*, 2018), hipotensora (Assaidi *et al.*, 2014), preventiva de perda óssea e regeneradora de ossos (Soares *et al.*, 2015; Penha *et al.*, 2017).

A avaliação da atividade antitumoral foi realizada utilizando linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) que foi exposta a diferentes concentrações do extrato metanólico de *D. ambrosioides*, porém não houve inibição significativa do crescimento celular na faixa de concentração de 15,5 a 1000 µg/mL (Ruffa *et al.*, 2002). Em células de leucemia P388, o extrato aquoso apresentou CI₅₀ igual a 0,105 µg/mL, sendo considerado ativo (Pandiangnan, 2020). Ainda, testes realizados com indução de tumor de Ehrlich mostrou resultados promissores quanto a sua inibição pelo extrato hidroalcoólico da planta, porém, não foi possível identificar qual metabólito estava associado a essa ação farmacológica (Nascimento, 2006).

Além de extratos, foi avaliado o potencial antitumoral do óleo essencial de *D. ambrosioides*. Esse apresentou atividade antumorigênica em teste de citotoxicidade com linhagem celular de câncer humano A549, onde inibiu o crescimento celular em 40% na concentração de 125 µg/mL, enquanto a célula de câncer humano MCF-7 foi inibida em 45% com uma concentração de 31,2 µg/mL (Shameen *et al.*, 2019).

Os potenciais anti-inflamatório, antinociceptivo e cicatrizantes foram avaliados em camundongos através dos testes de formalina, edema de pata e ferida por excisão. O extrato etanólico foi capaz de inibir a dor induzida por formalina em fase neurogênica e em fase inflamatória, respectivamente, na dose de 500 mg/kg. Além disso, inibiu a atividade de mediadores inflamatórios (BK, NO, SP, PGE2 e TNF-α), enzimáticos (MPO e ADA) e reduziu, significativamente, a área de lesão induzida quando comparados ao controle não tratado (Trivellato-Grassi *et al.*, 2013).

Em outro estudo, o extrato hidroalcoólico na concentração de 5mg/kg foi capaz de reduzir a dor e a inflamação em ratos com indução a osteoartrite. A atividade foi relacionada ao ascaridol, sendo esse capaz de se ligar ao receptor de glutamato N-metil-D-aspartato, apresentando um efeito antagonista (Calado *et al.*, 2015).

O óleo essencial apresentou atividade inibitória contra as formas tripomastigota e epimastigota de *Trypanosoma cruzi*, sendo os constituintes químicos prevalentes no óleo essencial os monoterpenos e sesquiterpenos, deduzindo que possivelmente a classe de terpenos está relacionada a atividade (Borges *et al.*, 2012). A atividade antileishmania é bem descrita para o óleo essencial de *D. ambrosioides*, tendo sido demonstrada tanto em estudos *in vitro* quanto *in vivo* (Monzote *et al.*, 2014). Também o uso tópico de folhas desta espécie em ulcerações causadas pelo parasito demonstrou redução da carga parasitária (Patricio *et al.*, 2008).

Ainda relacionado a microorganismos, o óleo essencial inibe de forma eficiente o crescimento de espécies de leveduras, dermatófitos e outros fungos filamentosos (Jardim *et al.*, 2008; Prasad *et al.*, 2009; Chekem *et al.*, 2010). O óleo, rico em monoterpenos, também se mostrou ativo contra *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (Harraz *et al.*, 2014). Os extratos hexânico e diclorometânico da planta apresentaram ação contra cepas de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (Sousa *et al.*, 2012).

Em estudo ansiolítico, o extrato aquoso de *D. ambrosioides* (120mg/kg), utilizando o teste de labirinto em cruz, induziu um aumento significativo do percentual (51%) de entradas e no tempo em braços abertos (31,8%), sendo este efeito semelhante ao do grupo tratado com Diazepam. Sugerindo atividade ansiolítica (Ngo Bum *et al.*, 2011), entretanto, não foi mencionado qual metabólito poderia estar relacionado a atividade ansiolítica.

O extrato aquoso obtido das folhas de *D. ambrosioides* apresentou potencial antioxidante no teste de DPPH com $CI_{50}=50,736 \mu\text{g/mL}$, sendo classificado com atividade antioxidante moderada (Pandiangan, 2020). A afazelina e kaempferol (Figura 3, pag. 23) apresentaram atividade antioxidante moderada e alta, respectivamente (Ghareeb *et al.*, 2016).

As substâncias 4-hidroxi-4(4 ou 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-(propano-2-il)ciclohexano-1,2,3,4-tetrol; (1R,2S,3S,4S)-1,2,3,4-tetra hidroxi-p-metano; (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol; (1R,4S)-p-met-2-em-1-ol; 1,4-di-hidroxi -p-met-2-eno (Figura 3, p. 23) foram avaliadas para atividade anti-inflamatória por meio da inibição de óxido nítrico induzido por lipopolissacarídeos em linhagem celular de macrófagos de murinos RAW264.7. Somente a molécula 4-hidroxi-4(4 ou β)-isopropil-2-metil-2-

ciclohexen-1-ona foi capaz de inibir moderadamente a produção de óxido nítrico (Hou *et al.*, 2017).

O ascaridol (Figura 1, p. 13) apresentou potencial sedativo, analgésico e anti-helmíntico, este também é responsável por efeitos tóxicos como a produção de convulsões e toxicidade letal em ratos, indicando que há uma faixa estreita entre a dose efetiva e a dose tóxica deste isolado (Okuyama *et al.*, 1993).

Um outro estudo demonstrou que o potencial tóxico do óleo essencial de *D. ambrosioides* pode ocasionar irritação gastrointestinal, danos hepáticos e renais (Matos, 2011). Os sintomas primários de intoxicação aguda do óleo essencial são: distúrbios gastrointestinais, seguidos de gastroenterite com hiperemia difusa no início, seguido de alterações do sistema nervoso central, tais como cefaleia, rubor facial, deficiência visual, vertigem, incoordenação e parestesia (Gadano *et al.*, 2006). O uso de doses elevadas do óleo essencial causou a morte em ratos e humanos (De Pascual, Torres e Perez, 1980), sendo essa toxicidade associada ao composto ascaridol (Pollack *et al.*, 1990).

Estudos *in vitro* e *in vivo* avaliaram a toxicidade do extrato aquoso, evidenciando baixo potencial tóxico (Kliks, 1985). Outro estudo, avaliou *in vitro* a citotoxicidade do extrato aquoso livre de ascaridol e infusões aquosas de partes aéreas e não foram observados efeitos tóxicos (MacDonald *et al.*, 2004).

O uso de infusões ou decocções das partes aéreas de *D. ambrosioides* ocasionaram danos genéticos em cultura celular de linfócitos humanos, verificando-se o aumento de aberrações cromossômicas e da frequência de trocas entre cromátides irmãs (indicadores de danos celulares) bem como a diminuição do índice mitótico (indicador de morte celular). Este mesmo estudo indicou, após fracionamento destes extratos, que a fração metanólica apresenta maior potencial tóxico, sugerindo que os compostos tóxicos sejam mais polares (Gadano *et al.*, 2002).

Além disso, a toxicidade de extratos obtidos *D. ambrosioides* (dose única de 2,5g/kg) foi avaliada em camundongos e ratos. A toxicidade oral aguda do extrato hidroetanólico foi avaliada em camundongos e realizada uma avaliação clínica utilizando o *screening* hipocrático diária por 14 dias. No último dia de avaliação, os animais foram submetidos à eutanásia e removidos os órgãos para a análise histológica. Durante a avaliação clínica dos animais não foi observada alterações,

também não houve alteração ponderal e histológica, logo foi classificado como não tóxico ($DL_{50} > 2,5\text{g/kg}$) (Pereira *et al.*, 2010).

Em ratos foi avaliada a toxicidade aguda de dose única do extrato aquoso obtido das folhas de *D. ambrosioides* (0,3; 1,3 e 3g/kg) e doses repetidas (15 dias de tratamento). De modo dose-dependente, na toxicidade oral aguda, observou elevação de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e redução nos níveis séricos de ureia. No tratamento com doses repetidas, na dose 1g/kg, houve elevação ALT e AST, discreta vacuolização dos hepatócitos, sugerindo potencial hepatóxico. Os ratos foram ainda submetidos ao tratamento por 42 dias, sendo observado perda de peso corporal, alterações metaplásicas na superfície mucosa do estômago e necrose dos túbulos renais (Silva *et al.*, 2014).

O efeito tóxico da *D. ambrosioides* parece variar a partir da obtenção de extratos e dos constituintes presentes. No entanto, ainda é necessário estudos complementares de avaliação de toxicidade dos seus extratos, sendo fundamental a investigação do potencial tóxico desta espécie para estabelecer o uso seguro.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial citotóxico e genotóxicos de extratos e frações de *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants, bem como desenvolver estudo *in silico* de compostos da planta.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar estudo fitoquímico dos extratos etanólicos e frações *D. ambrosioides*;
- Determinar a Concentração Letal (CL50) de extratos etanólicos e frações de *D. ambrosioides* por bioensaio com *Artemia salina*;
- Avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade dos extratos etanólicos e frações de *D. ambrosioides* por ensaio com *Allium cepa*.
- Realizar estudo de predição *in silico* de atividade biológica e toxicidade dos compostos de *D. ambrosioides*;
- Definir o modo de ligação dos compostos ligantes de *D. ambrosioides* em sítio ativo das enzimas caspase 8 e topoisomerase II por método de docagem molecular.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Equipamentos

- Banho-maria
- Balança analítica Bel Engineering M214Ai
- Bomba de vácuo TECNAL TE-0581
- Bomba de aeração
- Capela para exaustão de gases SP Labor
- Centrífuga
- Contador manual de células
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência da Alliance® e2695 (Waters) equipado com detector de arranjo fotodiodo (DAD) de injeção automática de 20 µL, tendo
- Destilador de água
- Espectrômetro BRUKER AVANCE DRX 400 MHz
- Estufa de esterilização e secagem SolidSteel
- Estufa ventilada para secagem de material vegetal
- Evaporador rotatório fisaton, modelo R 803, com banho-maria modelo 558
- Lâmpada incandescente 40 w
- Manta aquecedora Quimis®
- Micropipetas - volume ajustável 10µL - 100 µL, 100 µL - 1000 µL
- Microscópio óptico
- Notebook

4.1.2 Solventes, fases estacionárias e demais reagentes

- Acetato de etila Neon®
- Ácido acético glacial Neon®
- Ácido clorídrico Greentec®
- Ácido sulfúrico Quemis®
- Anisaldeído Êxodo®
- Cloreto de alumínio
- Cloreto férrico

- Diclorometano PA Neon®
- Dimetilsulfóxido (DMSO) Neon®
- Etanol 96
- Ferrocianeto de potássio Êxodo®
- Iodeto de potássio
- Metanol PA Neon®
- Hexano PA Neon®
- Hidróxido de potássio
- Hidróxido de sódio
- Sílica gel Sigma 230x400 mesh, 40-60 um
- Subnitrato de bismuto

4.1.3 Material plástico, vidrarias e outros

- Aquário de vidro 2L
- Balões de fundo redondo 250, 500 e 1000 ml
- Bastão de vidro
- Béqueres 10, 50, 100, 500 e 2000 ml
- Bisturi
- Condensador de vidro
- Cubas cromatográficas
- Dessecador de vidro
- Papel filtro
- Placa de petri 55mm de diâmetro
- Erlenmeyers 250 e 2000 ml
- Espátulas de metal
- Lâmina FirstLab 26x76 mm
- Lamínula Olen 24X60 mm
- Lupa
- Papel alumínio comercial
- Pinça
- Pipetas de vidro graduadas 1,0; 2, 5 e 10 ml
- Pipeta Pasteur de vidro
- Placas cromatográficas de vidro 10x5 cm

- Tubos de ensaio de vidro

4.1.4 Corante e outros

- Corante Orceína acética 2% Êxodo®
- Esmalte transparente
- Sal marinho

4.1.5. Programas e softwares

- Discovery Studio Visualizer™
- Gaussian 09™
- Marvin Sketch™
- Molegro Virtual Docker™
- Molinspiration™
- *Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS)*™
- PreADMET™
- ProTOX™

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 (H₂SO₄) 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 (AlCl₃) 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 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 Material biológico

As espécies de *Artemia salina* Leach foram compradas em loja de piscicultura em forma de cistos e armazenadas em temperatura ambiente e protegida de umidade. As sementes de cebola baía periforme (*Allium cepa*) foram obtidas na loja de materiais agropecuários ISLA Sementes LTDA.

4.2 Métodos

4.2.1 Coleta e identificação do material vegetal

Os caules e folhas de *D. ambrosioides* foram coletados no município de Santa Isabel, Pará, Brasil, localizado à uma latitude 01°17'55" sul e a uma longitude 48°09'38" oeste. A identificação foi feita pelo Herbário IAN da Embrapa Amazônia Oriental e foi depositada uma exsicata no acervo do herbário sob nº de registro

200572, posteriormente foi cadastrada no Sistema Nacional do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob número de cadastro A598628.

4.2.2 Processamento da droga vegetal e estudos fitoquímicos

A planta foi lavada em água corrente para a retiradas das impurezas, foram separados em folhas e caules e postas para secagem em estufa de ar circulado até completa desidratação, em seguida, foram moídas em moinho de facas para a obtenção do pó de cada uma das partes, estes foram acondicionados em potes de vidro ao abrigo de luz e umidade. O pó de cada uma das partes foi submetido a maceração exaustiva com etanol 96°GL (1:1), com agitação diária, após 7 dias a solução foi filtrada e concentrada em rotaevaporador até resíduo, obtendo-se dois extratos etanólicos, posteriormente foram calculados os rendimentos.

Para o fracionamento, o extrato etanólico de cada uma das partes foi submetido à extração exaustiva utilizando-se de um sistema de refluxo e solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol). Para isso, foi colocado 10g de cada extrato por vez (EEF e EEC) em um balão de fundo redondo e acrescentado o solvente (100 mL) e aquecido (40°C) sob refluxo por 30 minutos (Figura 4 e Figura 5). O procedimento foi repetido por três vezes para cada um dos solventes utilizados (Vale *et al.*, 2015).

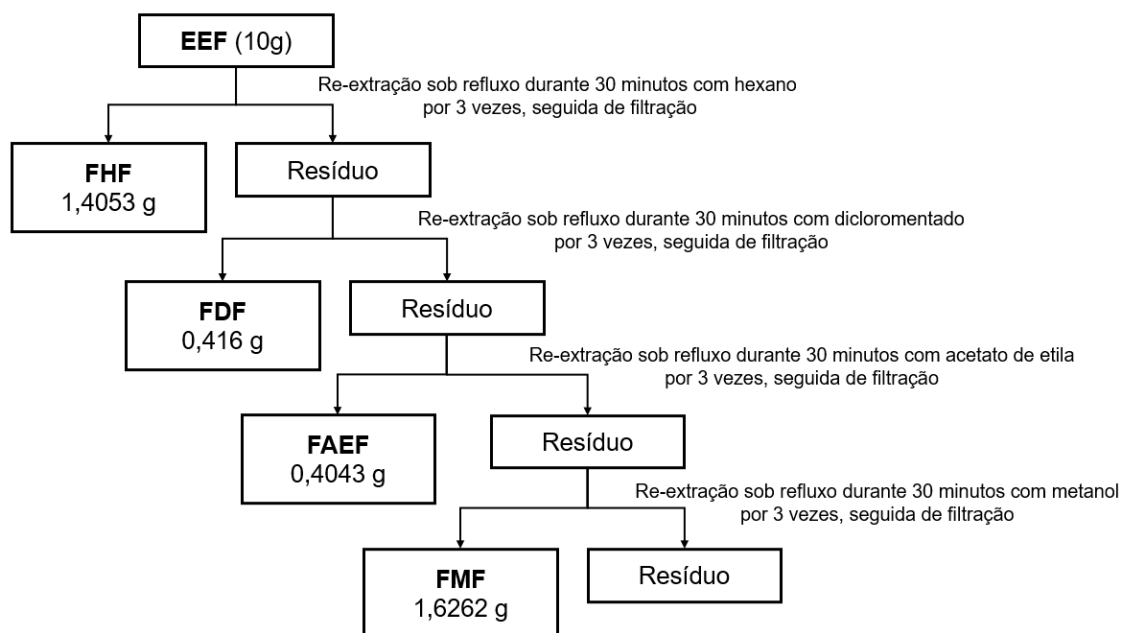


Figura 4 - Fracionamento do extrato etanólicos das folhas de *Dysphania ambrosioides* com solventes de polaridade crescente por extração sob refluxo.

Legenda: EEF – Extrato Etanólico da Folha; FHF – Fração de Hexano da Folha; FDF – Fração de Diclorometano da Folha; FAEF – Fração de Acetato de Etila da folha; FMF – Fração de Metanol da Folha.

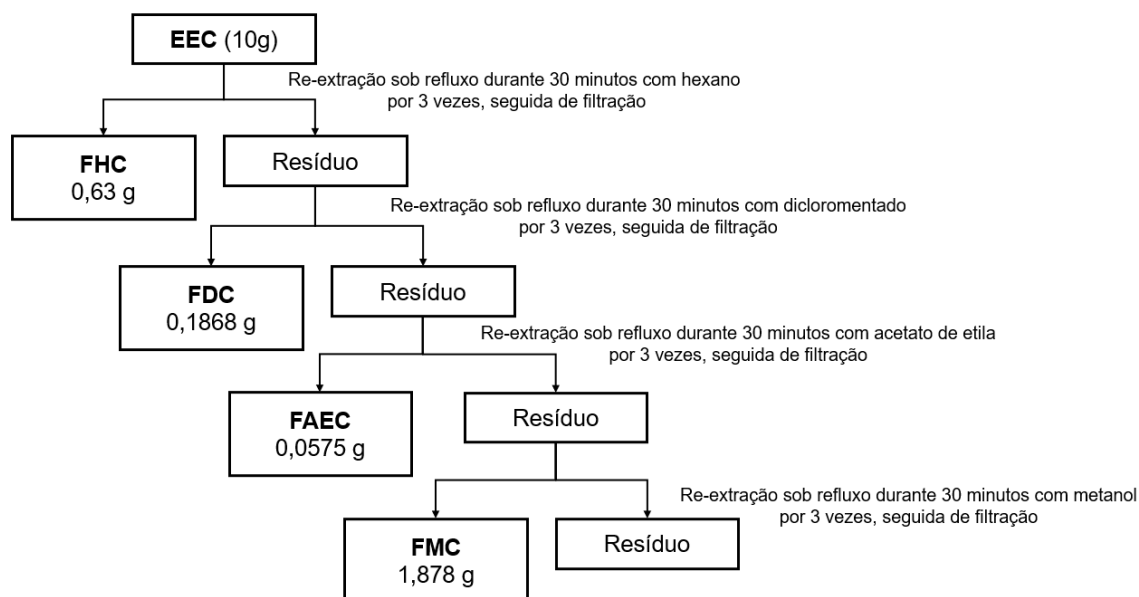


Figura 5 - Fracionamento do extrato etanólico dos caules de *Dysphania ambrosioides* com solventes de polaridade crescente por extração sob refluxo.

Legenda: EEC – Extrato Etanólico do Caule; FHC – Fração de Hexano do Caule; FDC – Fração de Diclorometano do Caule; FAEC – Fração de Acetato de Etila do Caule; FMC – Fração de Metanol do Caule.

Para a prospecção fitoquímica, em método de Cromatografia em Camada Delgada (CCD), para fase estacionária utilizou-se sílica e para fase móvel proporções de solventes de polaridades específicas, os reveladores variaram conforme a classe de metabólito a ser analisada conforme descrito no Quadro 1. As amostras foram solubilizadas em metanol e armazenadas em tubos cônicos tipo eppendorf (2,0 mL). As classes de metabólitos investigadas foram: esteróides e triterpenos, polifenóis e taninos, saponinas, heterosídeos flavônicos, cumarinas, geninas naftoquinônicas e antraquinônicas, heterosídeos antracênicos e alcalóides.

Quadro 1 - Condições utilizadas nas avaliações em cromatografia em camada delgada (continua)

Metabólito	Condições	Resultados
Triterpenos e esteróides	Fase móvel: hexano: diclorometano (6:4) Revelador: anisaldeído sulfúrico	No visível: após aquecimento, manchas róseas.
Polifenóis	Fase móvel: hexano: diclorometano (6:4); Revelador: ferrocianeto de potássio a 1% e cloreto férrico a 2%	No visível: manchas de cor negro-azulada ou negro-esverdeada.
Taninos	Fase móvel: hexano: diclorometano (6:4); Revelador: ferrocianeto de potássio a 1% e cloreto férrico a 2%;	No visível: manchas de cor negro-azulada ou negro-esverdeada.
Saponinas	Fase móvel: hexano: diclorometano (6:4); Revelador: anisaldeído sulfúrico;	No visível: manchas de cor azul ou azul-violeta com zonas amareladas

Quadro 1 - Condições utilizadas nas avaliações em cromatografia em camada delgada (conclusão)

Metabólito	Condições	Resultados
Heterosídeos flavônicos	Fase móvel: hexano: diclorometano (6:4); Revelador: cloreto de alumínio a 2% em metanol.	UV ₃₆₅ e UV ₂₅₄ antes e após revelação: intensificação da fluorescência amarela. Flavonoides: manchas de cor amarela (visível) e fluorescência amarelo-esverdeada
Cumarinas	Fase móvel: hexano: diclorometano (6:4); Revelador: hidróxido de potássio 5% em metanol;	UV ₃₆₅ e UV ₂₅₄ antes e após: intensificação da fluorescência verde-azulada. Cumarinas não substituídas: fluorescência amarela-esverdeada somente após utilização do revelador
Geninas naftoquinônicas e antraquinônicas	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 (UV ₃₆₅ e UV ₂₅₄); Antrons e antranóis: manchas amarelas (visível) e fluorescência alaranjada (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 (UV ₃₆₅ e UV ₂₅₄); antrons e antranóis: manchas amarelas (visível) e fluorescência alaranjada (UV ₃₆₅ e UV ₂₅₄).
Alcalóides	Fase móvel: acetato de etila: metanol: água: ácido fórmico (80:12:8); Revelador: Dragendorff;	No visível: manchas de cor marrom ou alaranjada.

Fonte: WAGNER *et al.* 1984 adaptado

Os extratos etanólicos e frações das folhas e caules foram analisados CLAE, sendo solubilizado 10 mg da amostra em 1 mL de H₂O:metanol (2:8 v/v) e transferiu-se para o cartucho SPE C18. Posteriormente filtrou-se a extração com auxílio de filtro de seringa 0,45 µm (hidrofílico), e transferiu-se para frasco de CLAE (vial) em concentração de 1mg/mL (1:1). Foram injetados 20 µL das amostras, sendo utilizado um gradiente contendo água deionizada e metanol (Quadro 2). A temperatura da coluna foi mantida a 40°C, em fluxo de eluição de 5ml/minuto.

Quadro 2 - Gradiente de eluição por CLAE-DAD

Tempo (min)	%A	%B
0	95	5
1	95	5
55	0	100
60	0	100

Legenda: A: água; B: metanol; fluxo 5mL/min., temperatura: 40°C.

Posteriormente, as amostras dos extratos e frações das folhas e dos caules foram analisadas em RMN de ¹H. O solvente utilizado para solubilização das amostras foi diclorometano. Os deslocamentos químicos (δ) foram medidos em ppm

e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). Para processamento dos dados de espectro utilizou-se o programa TOPSPIN 3.0 – Bruker.

4.2.3. Estudos de toxicidade

4.2.3.1. Determinação de CL₅₀ por bioensaio com *Artemia salina*

O bioensaio com *Artemia salina* Leach foi realizado a partir de adaptações das metodologias de Meyer *et al.* (1982) e Veiga (1989). Para a eclosão dos cistos de *A. salina* foi utilizada uma solução de sal marinho e água destilada na concentração de 35 g/L, além de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,1 mol/L para ajuste de pH (9,0-10) e assim, possibilitar um meio compatível ao desenvolvimento dos metanúplios. Após homogeneizar, a solução foi filtrada e transferida para um aquário de vidro com bomba de aeração. Foram adicionados 20 mg de cistos do microcrustáceo. Os cistos ficaram em solução por 24h, ambientados em uma temperatura variável de 27°C a 30°C, tempo suficiente para a completa eclosão (Veiga, 1989).

Os extratos e frações foram preparados na proporção de 1:2 (v/v) e foi feita diluição seriada, nas seguintes concentrações: 5000; 2500, 1250, 625 e 312,5 µg/mL, foi adicionado 50 µL de DMSO para solubilizar somente as amostras da fração hexânica em solução salina, em cada tubo de experimentação deve haver o volume final de 2,5 ml das soluções. Para o grupo controle negativo foi mantida somente solução salina e 50 µL de DMSO e, para controle positivo solução com dicromato de potássio. O ensaio foi realizado em quintuplicata e em cada um dos tubos de vidro foram adicionados 10 metanúplios e mantidos por mais 24h e 48h. Após os períodos, com o auxílio de uma lupa, foi feita a contagem das artemias vivas e mortas e a partir do resultado, o cálculo de CL₅₀ (Meyer *et al.*, 1982). Para o cálculo da concentração letal 50% (CL₅₀) utilizou-se o AAT Bioquest e considerou-se atóxico quando CL₅₀ superior a 1000 µg/mL, baixa toxicidade quando a CL₅₀ superior a 500 µg/mL, moderada entre 100 a 500 µg/mL e muito tóxico quando a CL₅₀ for inferior a 100 µg/mL (Amarante *et al.*, 2011).

4.2.5.3 Ensaio de determinação de citotoxicidade e genotoxicidade em *Allium cepa*

Para avaliar os efeitos genotóxicos e mutagênicos dos extratos e frações, foi utilizado o teste de *Allium cepa*. As sementes foram germinadas em placas de Petri forradas com papel filtro, em cada uma delas, foi adicionada concentrações diferentes de amostras-teste; solução de colchicina (controle positivo) e água deionizada (controle negativo). Após atingirem o comprimento de 1 a 1,5 cm, contou-se o tempo de exposição em 24h, 48h, 72h. Após este tempo, as raízes foram fixadas em Carnoy (3 partes de etanol absoluto para 1 parte de ácido acético glacial – v/v) por 24h em temperatura ambiente e, posteriormente armazenadas em geladeira, em solução de álcool etílico a 96° até a sua utilização (Bianchi *et al.*, 2016 adaptado).

No momento de preparo das lâminas, as radículas anteriormente fixadas foram lavadas em três banhos, por 5 minutos, em água destilada; hidrolisadas por 15 minutos em solução de HCl 1N, novamente lavadas em três banhos e submetidas por 10 minutos ao corante de orceína acética a 2% (Leme e Marin-Morales, 2009). Após a coração dos meristemas, as lâminas foram preparadas, pelo método de esmagamento, para que fossem avaliadas as aberrações cromossômicas (teste de genotoxicidade), os micronúcleos formados (teste de mutagenicidade) e morte celular e índice mitótico (teste de citotoxicidade; Pires *et al.*, 2001; Leme e Marin-Morales, 2009). Foram analisadas 2500 células por tratamento. As observações foram feitas em microscópio de luz em um aumento de 400x (Bianchi *et al.*, 2016; Bagatine *et al.*, 2007; Caritá e Marin-Morales, 2008).

4.2.3. Ensaio *In sílico*

A partir do resultado de prospecção fitoquímica e das análises de espectrometria de ressonância magnética (Tabela 2, p. 44; Figura 6, p. 46; Figura 7, p. 48) foram feitas buscas em plataformas de pesquisas com os descritores: *Chenopodium/Dysphania ambrosioides and terpens*, *Chenopodium/Dysphania ambrosioides and flavonic glycosides* e *Chenopodium/Dysphania ambrosioides and isolated compounds*. Foram selecionadas 26 moléculas das classes glicosídeos flavônicos e monoterpênicos (Figura 2, p.24) para serem submetidas ao estudo *in sílico* por serem as maiores classes isoladas em prospecção fitoquímica com a espécie.

As estruturas químicas selecionadas foram preparadas a partir de esquivos SMILES baixados do banco de dados Pubchem e submetidas ao estudo de

propriedades físico-química utilizando-se o servidor *online* Molinspiration para serem analisados os parâmetros de regra dos cinco de Lipinski (2004) que determina os parâmetros de biodisponibilidade de fármacos.

Utilizou-se como critérios de avaliação os seguintes parâmetros: partição octanol/água: $\log P \leq 5$; área de superfície topológica $\leq 140\text{\AA}$, massa molar (MM) $\leq 500\text{Da}$; aceptores de ligação de hidrogênio (nALH) ≤ 10 ; número de grupos de doadores de hidrogênio (nDLH) ≤ 5 ; número de ligações rotacionáveis (nROTB) ≤ 10 (Lipinski, 2004).

Para a predição dos parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo e toxicidade utilizou-se o servidor *online* PreADMET analisando os seguintes critérios: 1-farmacocinética: 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 $< 4\text{ nm/sec}$, média permeabilidade 4-70 nm/sec e alta permeabilidade $> 70\text{ nm/sec}$; Ligação às proteínas plasmáticas: $>90\%$ ligada fortemente e $< 90\%$ fracamente ligadas (Yaszdanin *et al.*, 1998).

2- toxicidades: algas: $< 1\text{ mg/L}$; Não tóxicos: $> 1\text{ mg/L}$ (Costa *et al.*, 2008); *Daphnia sp.*: tóxico $< 0,22\text{ }\mu\text{g/mL}$, não tóxico $> 0,22\text{ }\mu\text{g/mL}$ (Guilhermino *et al.*, 2000); peixes Medeka e Minnow Muito tóxico: $< 1\text{ mg/L}$; Tóxico: 1-10 mg/L; Prejudiciais: 10-100 mg/L; Não tóxico: $> 100\text{ mg/L}$ (Zunckner, 1985), mutagenicidade em teste de ames: não mutagênico (NM), mutagênico a depender da quantidade de cepas de Salmonella que foram positivas (M/0; M/1; M/2; M/3) e carcinogenicidade em ratos e camundongos: (+) carcinogênico e (-) não carcinogênico (Hodgson, 2001).

Para as predições no software ProTox foram avaliadas a dose tóxica em roedores (DL50) e a classificação de toxicidade: Classe 1: fatal se ingerido ($\text{DL50} \leq 5$); classe 3: tóxico se ingerido ($50 < \text{DL50} \leq 300$); classe 4: nocivo se ingerido ($300 < \text{DL50} \leq 2000$); classe 5: pode ser nocivo se ingerido ($20000 < \text{DL50} \leq 50000$); classe 6: não tóxico ($\text{DL50} > 50000$; Drwal *et al.*, 2014). Além disso foram avaliados os potenciais: hepatotoxicidade, imunotoxicidade, citotoxicidade, carcinogenicidade e mutagenicidade (Gold *et al.*, 1991; 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.

Também foi avaliado o potencial de atividade biológica no servidor *online* Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS) por meio de similaridade entre

substâncias biologicamente ativas, tendo como critério avaliativo a Pa (Probabilidade de atividade) de 0,7 (70%; Filimonov *et al.*, 1995).

As simulações de docagem molecular foram utilizadas para explorar as possíveis conformações dos inibidores com o receptor-alvo, estimando as principais interações, assim como a afinidade pelo sítio de ligação do receptor. As moléculas selecionadas foram preparadas no software MarvinSketch versão 17.27 (CHEMAXON, [s.d.]), a partir de arquivos SMILES e otimizadas no programa Gaussian09 (Frisch *et al.*, 2009) pelo método semi-empírico *Parametric Method 6* (PM6; Stewart, 2007). As estruturas cristalográficas das enzimas caspase 8 e topoisomerase II foram obtidas do banco de dados Protein Data Bank (PDB) sob os códigos 1QTN (Watt *et al.*, 1999) 1ZXN (Wei *et al.*, 2005) com resoluções de 1.20 Å e de 1,87 Å, respectivamente.

Para a realização das simulações de docagem molecular foi usando o software Molegro Virtual Docker (MVD; Thomsen e Christensen, 2006), a função de pontuação implementada no programa MVD é conhecido como *MolDock Score*. O *MolDock Score* é baseado em uma aproximação da energia de interação entre o ligante e seu receptor. Utilizando as coordenadas atômicas do ligante, da proteína e, em alguns casos, também as coordenadas de co-fatores e moléculas de água importantes para o sistema, é possível calcular a pontuação para os sistemas. Na docagem molecular, o valor da função de pontuação *MolDock* é obtido para cada possível conformação da molécula ligante no sítio do seu receptor. Esse valor da função de pontuação é, então, utilizado como um dos critérios para selecionar as melhores conformações (Thomsen e Christensen, 2006). Dessa forma, inicialmente para validar a metodologia proposta, foram realizadas simulações de re-docagem, utilizando os ligantes que já estavam presentes na cristalografia, ou seja, acetil-ile-glu-thr-asp-aldeído em 1QTN e éster de adenilato de ácido fosfoaminofosfônico em 1ZXN.

Posteriormente, as conformações obtidas foram analisadas tomando como referência seu valor de Desvio Médio Quadrático (*Root Mean Square Deviation* - RMSD). O RMSD consegue estimativas dos desvios da estrutura obtida nos cálculos em relação a sua estrutura de referência. Para uma re-docagem considerada satisfatória, as conformações geradas como resultado devem apresentar um valor nos desvios (RMSD) baixo, sendo que, quanto mais próximo de zero o valor do RMSD, melhor o resultado (Friesner *et al.*, 2004; Barone *et al.*, 2014).

Em seguida os inibidores de maior e menor toxicidade selecionados da Tabela 6 (p. 63) foram submetidos aos cálculos de docagem molecular sob as mesmas condições utilizadas para a re-docagem. A análise de interações intermoleculares e cálculos de RMSD foram realizados usando o Discovery Studio Visualizer (Dassault Systems BIOVIA, Discovery Studio Modeling Ambiente, versão 2021, San Diego: Dassault Syst emes, 2021).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudos fitoquímicos

Em termos de rendimentos, o extrato etanólico obtido de folhas (EEF) e suas frações hexano (FHF), diclorometano (FDF) e acetato de etila (FAF) tiveram maiores rendimentos que as obtidas dos caules (Tabela 1). Os rendimentos obtidos dos extratos etanólicos foram considerados satisfatórios, quando comparado a estudo que utilizou processo semelhante de extração e obteve um percentual de 2,18% para folha e 1,97% para o caule (Grassi, 2011).

Tabela 1 - Rendimento dos extratos e frações de *D. ambrosioides*

Amostra	Rendimento (%)	
	Folha	Caule
Extrato etanólico (EE)	8,73%	5,35%
Fração de hexano (FH)	28%	12,6%
Fração de diclorometano (FD)	8,32%	3,73%
Fração de acetato de etila (FA)	8,08%	1,15%
Fração de metanol (FM)	32%	37,5%

As frações de hexano tiveram um rendimento de 28% para a folha (FHF) e 12,6% para o caule (FHC). As frações de diclorometano tiveram rendimento de 8,32% para a folha (FDF) e 3,73% para o caule (FDC). Já as frações de acetato de etila tiveram rendimento de 8,08% para a folha (FAEF) e 1,15% para o caule (FAEC) e por fim, as frações de metanol obtiveram rendimento de 32% para folha (FMF) e 37,5% para o caule (FMC; Tabela 1). As frações com maior rendimento foram as de hexano e metanol (FHF, FHC, FMF e FMC), para ambas as partes da planta, mostrando que o fracionamento foi eficiente em separar os componentes das amostras a partir da afinidade deles por cada um dos solventes, facilitando posterior detecção de metabólitos.

Na prospecção fitoquímica, as classes detectadas foram triterpenos e esteróides, saponinas, heterosídeos flavônicos e cumarinas (Tabela 2). A Prospecção fitoquímica realizada com extrato hidroalcólico de folhas de *D. ambrosioides* detectou a presença: monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos e esteroides (Sá, 2013). Comparando os resultados, de ambos os estudos, foram detectados em comum triterpenos e esteroides.

A classe de triterpenos e esteróides foi sugestiva em todos os extratos e frações de caule e folha, com exceção de FMF; Tabela 2, p. 44). Nessa espécie, os terpenos

são considerados a classe majoritária (Gille *et al.*, 2010; Hallal *et al.*, 2010), sendo um marcador da planta, além de ser relatado o isolamento de alguns compostos monoterpênicos em outros estudos (Kiuchi *et al.*, 2002; Hou *et al.*, 2017).

A classe de saponinas foi sugestiva no EEF, FDF, FAEF e FMF, já na amostra do caule, houve a presença no EEC, FAEC e FMC (Tabela 2). Estudos já comprovaram a presença de saponinas em extrato aquoso de *D. ambrosioides* a partir de técnicas qualitativas (Jorge; Ferro; Koschtschak, 1986; Trindade *et al.*, 2021), inferindo que esta é mais bem extraída em solventes de maior polaridade como acetato de etila, metanol e água. Além de estudos relatarem o isolamento de saponinas (Jain *et al.*, 1990; Song *et al.*, 2014; Ghareeb *et al.*, 2016)

Para heterosídeos flavônicos, foi detectada a presença em FHF, FDF, FAEF e FMF. Para a amostra do caule, foi detectada essa classe somente nas frações de acetato de etila (FAEC) e fração de metanol (FMC; Tabela 2). Essa classe tem afinidade por solventes como acetato de etila e metanol, a depender das características químicas dos compostos encontrados na amostra (Soares *et al.*, 2016), isso possibilita deduzir que os compostos flavônicos são encontrados em maior quantidade nas frações correspondentes a solventes com essa polaridade. Outros estudos detectaram a presença da classe metabólica em extrato etanólico e extrato de metanol (Jorge; Ferro; Koschtschak, 1986; Pereira *et al.*, 2015; Jesus *et al.*, 2018).

A classe de cumarinas foi detectada somente no caule (EEC; FDC; FAEC e FMC; Tabela 2, p. 44), sugerindo que esta classe se encontra distribuída, principalmente, no caule. Anterior a este trabalho foram isoladas duas cumarinas (escopoletina e 1-piperoilpiperidina) a partir da sub-fração de diclorometano e de n-butanol do extrato metanólico das partes aéreas da planta (Shah e Khan, 2017).

Vários fatores podem influenciar na composição química da *D. ambrosioides*, tais como a localização geográfica do cultivo, condições ambientais, período de evolução, variabilidade genética e forma de obtenção dos extratos (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Isto pode explicar as diferenças entre os diferentes estudos químicos realizados com a espécie.

Tabela 2 - Prospecção fitoquímica por CCD de extratos e frações de folha e caule de *D. ambrosioides*

Classes metabólicas	Folha					Caule				
	EEF	FHF	FDF	FAEF	FMF	EEC	FHC	FDC	FAEC	FMC
Triterpenos e esteróides	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Saponinas	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
Alcalóides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Polifenóis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Taninos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Geninas flavônicas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heterosídeos flavônicos	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Cumarinas	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
Geninas antraquinônicas e naftoquinônicas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heterosídeos antracênicos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: EEF – Extrato Etanólico da Folha; FHF – Fração de Hexano da Folha; FDF – Fração de Diclorometano da Folha; FAEF – Fração de Acetato de Etila da folha; FMF – Fração de Metanol da Folha; EEC – Extrato Etanólico do Caule; FHC – Fração de Hexano do Caule; FDC – Fração de Diclorometano do Caule; FAEC – Fração de Acetato de Etila do Caule; FMC – Fração de Metanol do Caule; + presença do metabólito; - ausência do metabólito.

Os extratos e frações foram submetidos a análise exploratória por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada a espectrometria no UV. As análises por CLAE foram realizadas em comprimento de onda entre 210 nm a 600 nm. O EEF apresentou compostos de média polaridade, sendo que os compostos com tempos de retenções (TR) em 26.38 minutos (min.; $\lambda=265.4$ nm e 346.0 nm) e 29.94 min. (265.4 nm e 348.4 nm; figura 6-A: 1 e 2) apresentam espectros em ultravioleta sugestivo de flavonoides. Essa classe tem características espectrais no UV/VIS com máximos de absorção entre 340 e 370 nm (Arapitsas, 2008) e existem estudos anteriores que demonstraram o isolamento de flavonoides nesta espécie (Jain *et al.*, 1990; Ghareeb *et al.*, 2016).

A fração hexânica das folhas (FHF) exibiu tempo de retenção em 52.61 min. (figura 6-B: 3), sem qualquer padrão de absorbância de bandas específicas de alguma classe metabólica no CLAE-UV, porém, a análise em CCD sugere a presença de triterpenos e esteróides, permitindo inferir que esta é uma classe que não possui bons cromóforos para a sua identificação pelo método utilizado, o que justifica o não aparecimento de bandas nos cromatogramas apesar da existência da classe na planta. O mesmo padrão foi observado na fração diclorometânica das folhas (FDF) que apresentou tempo de retenção em 52.01 min. (figura 6-C:4) em que o espectro de UV não forneceu informações que indicassem alguma classe de metabólitos.

A fração de acetato de etila (FAEF) apresentou tempo de retenção em 30.0 min. ($\lambda= 266.6$ nm; figura 6, D: 5) e 26.42 min. ($\lambda= 265.4$ mn; figura x, D: 6). A fração

metanólica (FMF) exibiu tempo de retenção em 28.75 min. e 32.51 min. com máximos de absorbância em 265.4 nm e 346.0 nm (FMF; figura 6-E: 7 e 8), respectivamente, ambas sugerem a presença de flavonóides.

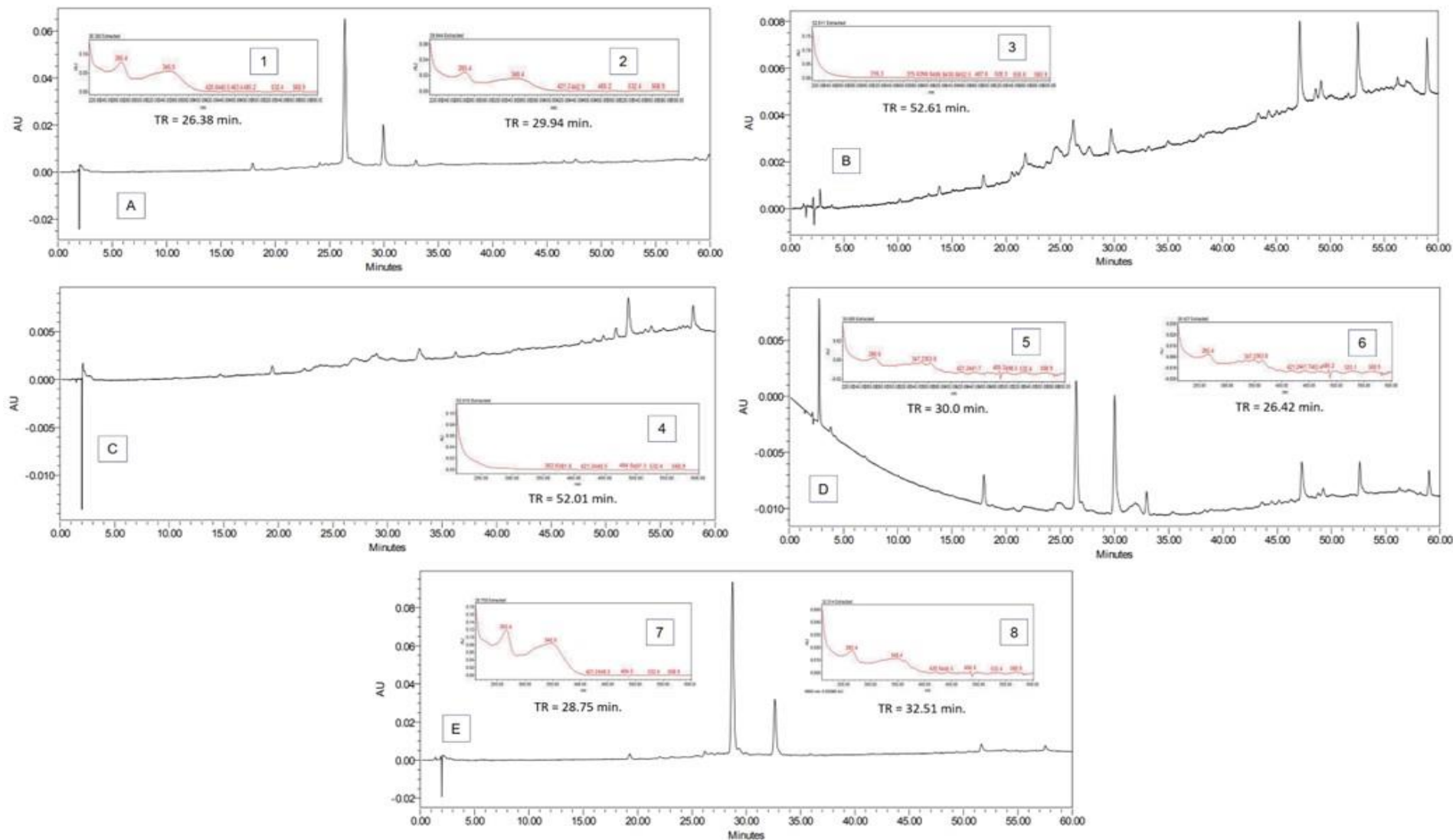


Figura 6 - Estudos cromatográficos do extrato etanólico das folhas de *D. ambrosioides* e suas frações.

Legenda: A- extrato etanólico; B- fração hexânica; C- fração diclorometânica; D- fração acetato de etila; E- fração metanólica. 1-TR=26.38 min.; 2-TR=29.94 min.; 3- TR= 52.61 min.; 4- TR= 52.01 min.; 5- TR= 30.0 min.; 6- TR=26.42 min.; 7- TR= 28.75 min.; 8- TR= 32.51 min.

Condições cromatográficas: coluna de fase reversa SunFire™ C18- 5µm (4.6x150mm; Waters); eluição em gradiente: H₂O/MeOH (proporção 5-100%); detecção: 210-600 nm; temperatura: 40°C, vazão: 5 mL/min.

O EEC apresentou tempo de retenção em 26.63 minutos (min.; λ 363.8 nm.; figura 7-A: 1), sugerindo que neste extrato há a presença de derivados de flavonóides, em especial de flavonóis (λ entre 350-385 nm; Harbone *et al.*, 1975; Tsimogiannis *et al.*, 2007). Comparando os resultados obtidos em CLAE-DAD e CCD, observa-se uma boa correlação, visto que ambos sugerem a presença de heterosídeos flavônicos.

A FHC apresentou tempo de retenção em 47.14 min. (Figura 7-B:2), e assim como a FHF, não apresentou padrão de absorbância de bandas de alguma classe metabólica no CLAE-UV. Fato semelhante ocorre com a fração diclorometânica do caule (FDC) que teve tempo de retenção em 47.24 min. (Figura 7-C: 3) e nenhuma absorbância no UV, não permitindo a sugestão de classes de metabólitos secundários.

A fração de acetato de etila (FAEC) apresentou tempo de retenção em 29.13 min. (λ =266.6 nm; figura 7-D: 5) e 33.15 min. (λ = 265.4 nm; figura 7-D: 6). A fração metanólica exibiu tempo de retenção em 26.51 min. (λ =255.4 nm e 348.4 nm) e 29.94 min. (λ =265.4 nm; figura 7-E: 6 e 7), sendo também bandas sugestivas da classe de flavonóides em ambas as frações.

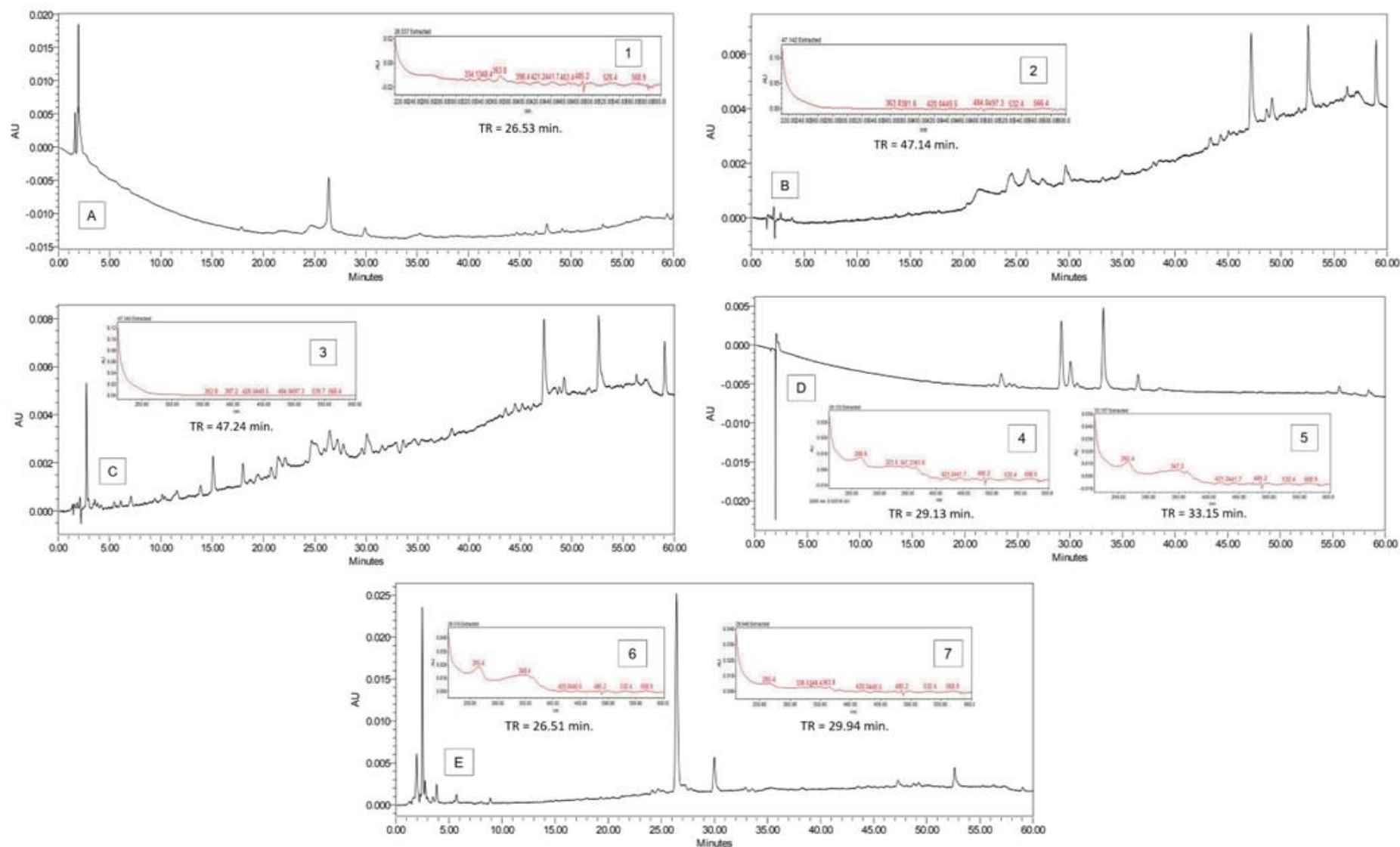


Figura 7 - Estudos cromatográficos do extrato etanólico dos caules de *D. ambrosioides* e suas frações

Legenda: A- extrato etanólico; B- fração hexânica; C- fração diclorometânica; D- fração acetato de etila; E- fração metanólica. 1-TR= 26.53 min.; 2-TR= 47.14 min.; 3- TR= 47.24 min.; 4- TR= 29.13 min.; 5- TR= 33.15 min.; 6- TR=26.51 min.; 7- TR= 29.94 min.

Condições cromatográficas: coluna de fase reversa SunFire™ C18- 5µm (4.6x150mm; Waters); eluição em gradiente: H₂O/MeOH (proporção 5-100%); detecção: 210-600 nm; temperatura: 40°C, vazão: 5 mL/min.

Desta forma, observa-se que em comparação, o perfil fitoquímico das partes da planta são muito similares, sendo que a diferença marcante é a detecção de cumarinas no EEC e frações. Caso o objetivo seja o isolamento de cumarinas, o ideal é utilizar apenas os caules para obtenção da classe. Agora, se o objetivo é o isolamento de terpenos e flavonoides não há necessidade de separar as partes. Alguns flavonoides já foram isolados da espécie, tais como: kaempferol, isohamnetina, quercetina, kaempferol-3-rhamnosídeo-4'-xilósídeo e kaempferol-3-rhamnosídeo-7-xilósídeo (Jain *et al.*, 1990) e afazelina (Ghareeb *et al.*, 2016).

Esses dados contribuem com os achados da literatura da espécie que descrevem a presença dessa classe metabólica. Em análise de extrato hidroalcolico das folhas de *D. ambrosioides* e suas frações (clorofórmio, acetato de etila e butanol) analisadas em CLAE-DAD, foi detectada a presença de flavonoides com absorção em λ 254 nm a 365 nm (Jesus *et al.*, 2018). Análise CLAE-DAD-MS do extrato metanólico das folhas indicou a presença de flavonas e derivados de flavonol, sendo derivados da quercetina (λ_{max} de 354 nm) e kaempferol (λ_{max} de 346 nm e λ 280 nm a 370; Barros *et al.*, 2013). Esses compostos foram detectadas em outros extratos das folhas de *D.ambrosioides*, por método CLAE-DAD, que se mostraram rico em flavonoides derivados de quercetina e kaempferol (Assaidi *et al.*, 2019).

O EEF e suas frações FHF e FDF foram submetidas as análises RMN de ^1H e apresentaram sinais entre δ 0,85 – 2,78 ppm (Figura 8), sugerindo a presença de terpenos, dado que terpenos tem sinais na região de 1,0 a 2,5 ppm para hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos característicos desta classe (Nascimento *et al.*, 2020). O EEF e frações FHF e FDF apresentaram sinais entre δ 3,21-4,78 ppm, sendo estes sinais que caracterizam hidrogênios oximétricos ligados a carbonos oxigenados e hidroxilas de unidades glicosídicas, o que sugere a presença de compostos glicosilados como heterosídeos flavônicos e glicosídeos flavônicos (Nascimento *et al.*, 2020).

Nas frações FAF e FMF, apesar de pouco intensos, existem sinais entre δ 3,21-4,78 ppm, sendo estes sinais que caracterizam hidrogênios oximétricos ligados a carbonos oxigenados e hidroxilas de unidades glicosídicas (Figura 8). Estudos em CCD destas frações sugerem a presença de heterosídeos flavônicos, reforçando a hipótese que estas frações contenham flavonoides glicosilados.

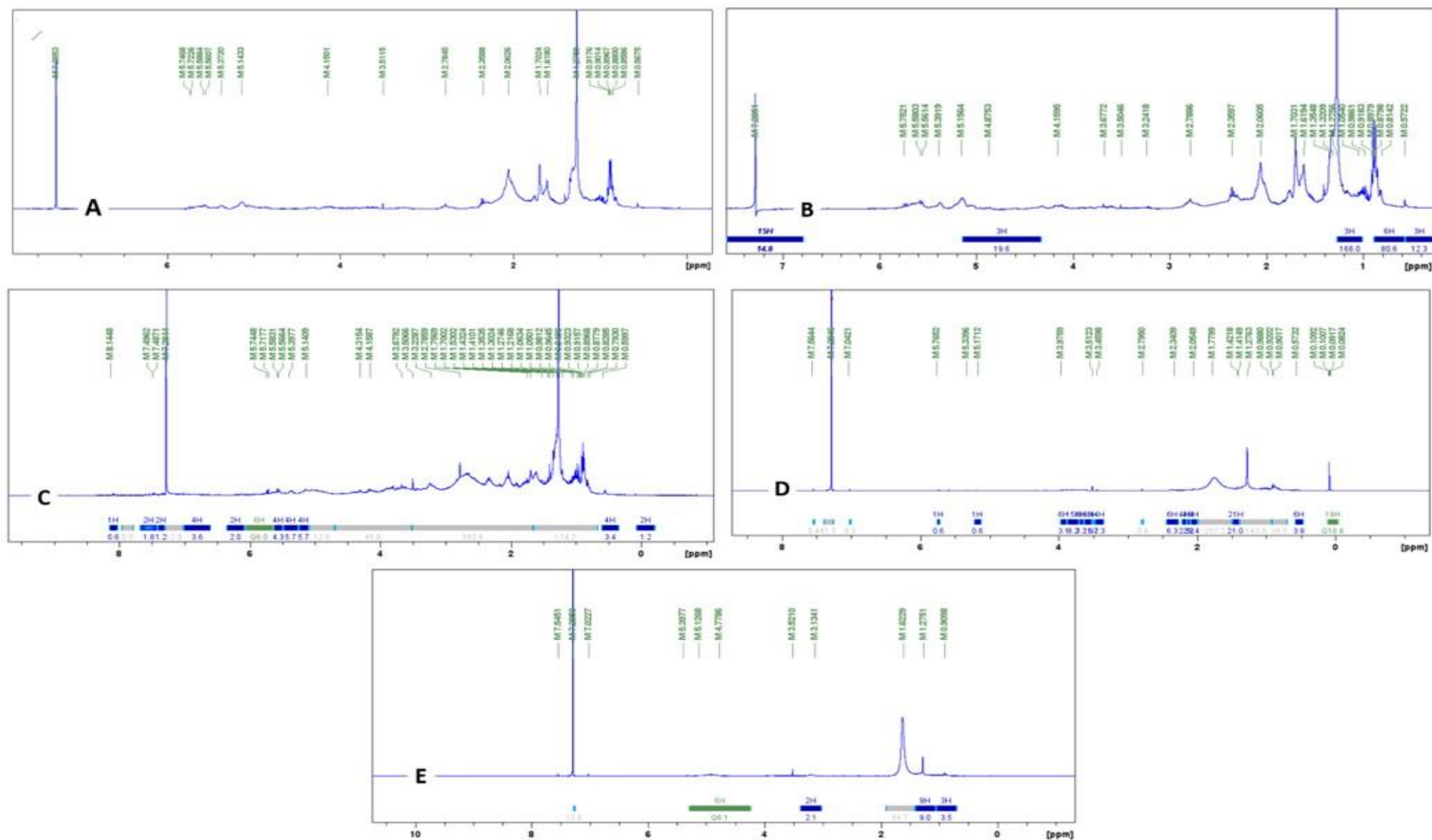


Figura 8 - Espectro de RMN de ^1H do extrato e frações das folhas de *D. ambrosioides*.

Legenda: (a) extrato etanólico, (b) fração de hexano, (c) fração de diclorometano, (d) fração de acetato de etila e (e) fração de metanol.

As análises em RMN de ^1H do extrato e frações obtidos dos caules mostraram pequenas diferenças nos sinais, porém, aparentemente contêm terpenos e flavonoides (Figura 9). O EEC e suas frações FHC e FDC apresentaram sinais entre δ 0,85 – 2,78 ppm (Figura 9), sugerindo a presença de terpenos, dado que terpenos tem sinais na região de 1,0 a 2,5 ppm para hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos característicos desta classe (Nascimento *et al.*, 2020). O EEC e frações FHC e FDC apresentaram sinais entre δ 3,21-4,78 ppm, sendo estes sinais que caracterizam hidrogênios oximétricos ligados a carbonos oxigenados e hidroxilas de unidades glicosídicas, o que sugere a presença de compostos glicosilados como heterosídeos flavônicos e glicosídeos flavônicos (Nascimento *et al.*, 2020).

Nas frações FAC e FMC, apesar de pouco intensos, existem sinais entre δ 3,21-4,78 ppm, sendo estes os sinais que caracterizam hidrogênios oximétricos ligados a carbonos oxigenados e hidroxilas de unidades glicosídicas (Figura 9). Estudos em CCD destas frações sugerem a presença de heterosídeos flavônicos, reforçando a hipótese que estas frações contenham flavonoides glicosilados.

Quando se relaciona os resultados obtidos em CCD, CLAE-DAD e RMN ^1H pode-se sugerir que os EE e frações obtidos de Folhas e Caules apresentam perfis semelhantes em termos químicos, a única diferença observada nas análises em CCD, sendo detectado cumarina em amostras do Caule. Os estudos em CLAE-DAD e RMN permitiram sugerir a presença de flavonoides. Também, já existem estudos que isolaram flavonoides (Arisawa *et al.*, 1971; Jain *et al.*, 1990; Ghareeb *et al.*, 2016) e terpenos (Ahmed, 1999; Dembitsky, 2008; Hou *et al.*, 2017) desta espécie.

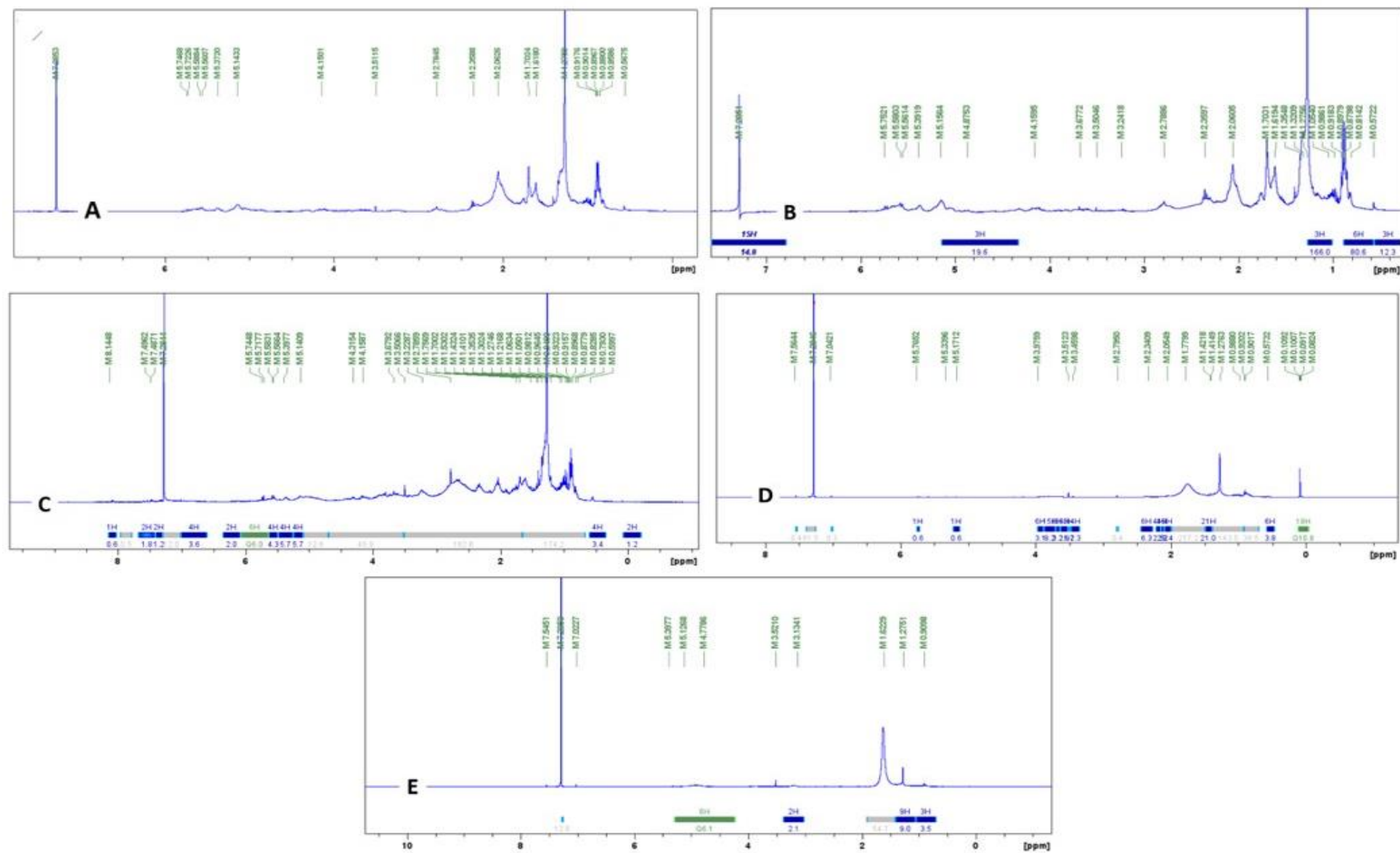


Figura 9 - Espectro de RMN de ^1H do extrato e frações do caule de *D. ambrosioides*.

Legenda: (a) extrato etanólico, (b) fração de hexano, (c) fração de diclorometano, (d) fração de acetato de etila e (e) fração de metanol.

5.2. Determinação da CL₅₀ pelo bioensaio com *Artemia salina*

Inicialmente, realizou-se a avaliação da toxicidade em *Artemia salina* dos extratos (EEF e EEC) e frações (FHF, FMF, FHC e FMC). Neste estudo, pretendia-se verificar se diferentes extratos e frações de partes da planta *D. ambrosioides* podem apresentar diferentes níveis de toxicidade.

Ao se comparar as CL₅₀, exceto a FMF, as amostras obtidas dos caules parecem ter menor potencial tóxico que as amostras obtidas das folhas. A única fração considerada a atóxica foi a FMF (Tabela 3), sendo que a prospecção fitoquímica sugere que esta é a única amostra que não contém triterpenos e esteroides (Tabela 2, p. 44). Esse fato leva a pensar que a toxicidade da planta possa estar relacionada aos triterpenos e esteroides.

Os extratos (EEF e EEC) parecem possuir perfis cromatográficos semelhantes, porém existem diferenças significativa na toxicidade em *A. salina* (EEF- moderada toxicidade e EEC- baixa toxicidade). Fato semelhante foi observado para as FH (FHF- muito tóxica e FHC- moderada), sugerindo que possam existir variações quantitativas na composição química destas amostras, sendo mais concentradas nas folhas (Tabela 3). Na prospecção fitoquímica, detectou-se a presença de cumarina nas amostras obtidas do caule, talvez, a presença desta classe possa explicar as diferenças observadas na toxicidade para a *Artemia salina*, além de ser responsável pelo potencial tóxico dessa parte da planta.

Evidentemente, as amostras mais tóxicas foram as hexânicas, que devem conter compostos de baixa polaridade como terpenos e esteroides. Mais uma vez, reforça a hipótese que terpenos e esteroides são os responsáveis pela toxicidade. Em estudo feito com *Artemia salina*, a fração hexânica das partes aéreas da planta mostrou taxa de mortalidade muito elevada para o extrato hexânico em 6h de teste, neste mesmo estudo os extratos de diclorometano e acetato de etila foram considerados ativos, o que reforçou a possibilidade de os extratos conterem compostos bioativos (Sousa *et al.*, 2012).

Tabela 3 - Toxicidade em *Artemia salina* de extratos e frações de *D. ambrosioides*

AMOSTRAS	CL ₅₀ (µg/mL)	Classificação de toxicidade
EEF	259,8	Moderada
FHF	66,1	Muito tóxica
FMF	2194	Atóxica
EEC	600	Baixa
FHC	149,7	Moderada
FMC	740	Baixa

Legenda: EEF-Extrato Etanólico da Folha; FHF-Fração de Hexano da Folha; FMF-Fração de Metanol da Folha; EEC-Extrato Etanólico do Caule; FHC- Fração de Hexano do Caule; FMC- Fração de Metanol do Caule.

5.3. Determinação da citotoxicidade e genotoxicidade por bioensaio em *Allium cepa*

Utilizando o ensaio em *A. cepa*, avaliou-se o potencial citotóxico (índice mitótico - IM) e genotóxico (aberrações cromossômicas - IC) dos extratos e frações de folhas e caules de *D. ambrosioides* (Tabela 4 e 5, respectivamente). Quando se compara os controles positivos (CP) e negativos (CN), não se observa redução significativa do índice mitótico (IM) para a maioria das concentrações avaliadas e tempo de avaliação. Entretanto, em relação ao índice de aberrações cromossômicas, em todas as concentrações utilizadas de colchicina houve uma elevação neste índice em relação ao CN.

A colchicina afeta a dinâmica dos microtúbulos nas células, ocasionando uma desorganização celular. Os compostos que modulam a tubulina (TBA) podem se ligar em diferentes sítios receptores dos dímero de α/β tubulina, afetando a dinâmica de formação dos microtúbulos, interrompendo a segregação dos cromossomos e induzindo a morte celular (Parker *et al.*, 2017).

No CP nota-se intensa quantidade de interfase normal e interfase anormal, principalmente alterações como alongamento e extravasamento de núcleo (Figura 10-H), a quantidade de metáfase normal e anormal é aumentada em todas as concentrações, sendo característico do uso da colchicina que prolonga a duração da fase de metáfase e por consequência suprime anáfase (Dhooghe *et al.*, 2010). No CN, há a presença de interfase normal, e as quantidades de anáfase e telófase são maiores em relação a quantidade de metáfases, indicando que o ciclo celular está ocorrendo de forma ordenada. Estas observações permitem utilizar estes controles para a avaliação.

Inicialmente, avaliou-se o EEF e frações, utilizando as mesmas concentrações e mesmos tempos de exposição do CP. Em relação ao EEF, não foi observado uma

correlação direta entre a concentração utilizada e as alterações no IM, isto é, na maior e menor concentrações (100 e 6,25 µg/ml) houve um discreto aumento nos índices de mitoses, enquanto nas concentrações de 50 e 25 µg/ml houve uma elevação do IM em 72h. Em 12,5 µg/ml, em todos os tempos analisados, houve redução no IM. Em relação ao IA ocasionados pelo EEF, em todas as concentrações utilizadas no experimento, em todos os tempos analisados, o IA do EEF foi muito superior ao CN (Tabela 4).

De maneira geral, a amostra de EEF a se comporta de forma parecida ao CP, apresentando muitas células em interfase normal e anormal com núcleo alongado e extravasado (Figura 10-H), aumento da quantidade de metáfases e diminuição de anáfases, nas amostras 50 µg/ml (24h) e 25 µg/ml (24, 48 e 72h), há muitas interfases anormais quando comparada às outras concentrações, indicando que há falhas no processo normal de mitose e indicando que esta amostra é citotóxica.

Em EEF 100 µg/ml, nota-se que em 24h e 72h há grande quantidade de broto nuclear e em 48h há o aparecimento de necrose e diminuição dos brotos (Figuras 10-G e P). Em 50 µg/ml 24h novamente, há presença de necrose, mas nos tempos de 48h e 72h há predominância de micronúcleo e broto, sendo reduzida a presença de necrose. Em 25 µg/ml, nos tempos de 24h e 48h há grande quantidade de micronúcleo, já em 72h, há presença de broto (Figura 10-F e G). Foi observado em 12,5 µg/ml que o tempo não foi fator determinante na variação do IM e que este está, consideravelmente, menor que o CN em todos os tempos. Notou-se, também, que em 24h e 48h as principais alterações encontradas foram micronúcleo e broto nuclear e somente em 72h há o aparecimento de necrose havendo diminuição no percentual de IA. Em 6,25 µg/ml, foi observado que em 24h há, principalmente, quebra cromossômica (Figura 10-Q), em 48h grande quantidade de broto nuclear e micronúcleo e, em 72h, quebra e micronúcleo. Nessa última concentração, somente em 24h e 72h há significativa necrose celular.

Em relação ao IM de FAEF, nas duas menores concentrações em todos os tempos analisados houve uma elevação no IM, enquanto na maior concentração a elevação ocorreu, apenas, nas avaliações de 24 e 48h. Em 50 µg/ml do FAEF, os IM são menores que o CN e na concentração de 25 µg/ml do FAEF, houve redução do IM em 72h. Apesar da elevação dos IM, de forma geral, os IA das amostras tratadas com FAEF foram inferiores aos IA do EE (Tabela 4).

Em FAEF 100 µg/ml, somente nos dois primeiros tempos há um aumento na presença de prófase (Figura 10-B), sendo que este aumento ocorre, novamente, em FAEF 12,5 µg/ml e 6,25 µg/ml em todos os tempos (24h, 48h e 72h), influenciando diretamente no aumento do IM, apesar do aumento de prófase, não há aumento equivalente nas outras fases do ciclo nessas concentrações. As concentrações de 50 µg/ml e 25 µg/ml são equiparadas ao ciclo celular do CN.

Em FAEF 100 µg/ml, somente no tempo de 24h há presença de quebra (figura 10-O), nota-se que, nos tempos de 48h e 72h, há presença significativa de necrose (Figura 10-P) com o decaimento do aparecimento de alterações cromossômicas. Em FAEF 50 µg/ml em fase aguda há a incidência, principalmente, de micronúcleo e broto. Já em 48h, há uma queda de alterações e aparecem algumas células em necrose, observa-se que com o passar do tempo os parâmetros de aberrações diminuiu com o aparecimento da necrose, principalmente, no tempo de 72h (Figura 10-P). Em FAEF 25 µg/ml, 12,5 µg/ml e FAEF 6,25 µg/ml há o predomínio de micronúcleo até 72h (Figura 10-M), não havendo presença de necrose.

Em todas as concentrações e tempos de tratamento com FMF, houve aumento exagerado dos IM, porém não houve um aumento proporcional no IA (Tabela 4). Há predominância de células em prófase normal durante as fases do ciclo celular, todas as outras amostras seguem o mesmo padrão em relação a quantidade aumentada de prófase em todos os tempos, contudo, não há aumento proporcional da quantidade de telófases normal ou anormal (Figura 10-E e K), levando a dedução de que há alteração no ciclo celular normal. O micronúcleo foi a principal alteração encontrada, a considerar que não há presença de necrose.

Em FMF 100 µg/ml, há presença de necrose somente em fase aguda, em 72h. Todas as outras amostras aparentam seguir o mesmo padrão da persistência de micronúcleo em todos os tempos e concentrações, considerando-se a ausência de necrose, talvez, esse comportamento possa estar relacionado a presença de flavonóides nas amostras mais polares e indica que esta amostra apresenta possível potencial cicatrizante, que merece ser melhor investigado (Trindade *et al.*, 2021; Sérvio *et al.*, 2011; Trivellato-Grassi *et al.*, 2013).

Dessa forma, o IA aumentado do EEF em relação as outras amostras, pode estar relacionada a compostos de menor polaridade, ressaltando novamente, que a

atividade tóxica pode estar relacionada a presença de compostos terpênicos e de esteróides como apresentados em análise fitoquímica.

Tabela 4 - Índice mitótico e índice de aberrações cromossômicas em *Allium cepa* induzido por extratos e frações das folhas de *D. ambrosioides*.

Amostras (µg/ml)	Índice mitótico (%)			Índice de Aberrações (%)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
CN	5,6	4,3	5,2	0,87	0,85	0,54
CP						
100	14,8	5,9	5,3	3,9	7,7	3,3
50	5,7	5,1	4,0	5	5,8	5,1
25	7,6	5,0	5,8	3,5	6,3	3,0
12,5	6,0	5,8	7,4	3,0	5,2	3,0
6,25	4,1	4,6	6,9	5,5	3,8	4,5
EEF						
100	5,7	4,8	5,8	7,4	3,5	7,1
50	6,1	5,7	7,2	7,6	5,9	5,8
25	6,3	4,5	7,0	5,0	6,3	2,8
12,5	3,7	4,3	3,9	4,2	4,2	4,5
6,25	5,7	6,3	5,5	5,7	3,9	4,2
FAEF						
100	16,2	10,0	3,4	1,9	1,8	2,4
50	3,8	2,4	3,9	3,5	2,0	6,5
25	5,1	5,1	3,9	4,0	2,0	2,0
12,5	40,7	39,2	40,0	1,8	1,6	1,0
6,25	33,0	56,4	45,0	1,8	1,2	1,5
FMF						
100	13,4	13,4	29,3	3,1	2,0	1,8
50	ND	42,1	36,0	ND	2	2,8
25	45,2	23,3	42,0	1,2	6,4	2,7
12,5	23,7	21,6	30,0	4,4	5,3	1,4
6,25	37,8	24,0	32,3	0,8	1,7	2,9

Legenda: CN – água destilada; CP – colchicina; EEF – extrato etanólico da folha; FAEF – fração de acetato de etila da folha; FMF – fração metanólica da folha. ND – não determinado.

Ainda foram avaliados no modelo do *A. cepa* as amostras de caule (EEC) e frações (FDC e FAEC), sendo observados diferenças significativas nos IM e IA entre os extratos EEF e EEC (Tabelas 4 e 5). Em todas as concentrações avaliadas do FDC e FAEC, em todos os tempos avaliados, houve um aumento exagerado do IM, os IA foram inferiores aos observados para o EEC (Tabela 5).

Em EEC 100 µg/ml, somente nos dois primeiros tempos pode ser vista grande quantidade de necrose, além de IM reduzido. Em 72h há forte presença de micronúcleo e não são mais encontradas células em necrose. Em EEC 50 µg/ml, somente na fase aguda há presença principalmente de broto nuclear e micronúcleo. Em EEC 25 µg/ml, é seguido o padrão de alterações da amostra anterior, destaca-se

que em 48h houve grande aumento de percentual de broto nuclear, o que influenciou no aumento do IA. Em EEC 12,5 µg/ml e EEC 6,25 µg/ml, no tempo de 24h de ambas as amostras há principalmente micronúcleo e broto em interfase (Figura F e G).

De maneira geral, em EEC as amostras parecem seguir um padrão de alterações e não há como fazer correlação entre tempo e concentração, na maioria delas houve um aumento do IM em relação ao CP e diminuição do IA, apesar da predominância de broto nuclear e micronúcleo principalmente nas amostras de maior concentração (Figura N). Apesar da diferença significativa entre EEF e EEC, considera-se que os metabólitos que influenciam na toxicidade da planta estão em maior concentração nas folhas o que determinou menores IM e maiores IA.

Em FDC, há um considerável aumento do IM em todas as concentrações de teste além do aumento de células em prófase e em telófase em relação a EEC, apesar disso, o IA é reduzido.

Em FDC 100 µg/ml, há predominância de micronúcleo e broto, somente em 72h que há maior quantidade de quebra. Em FDC 50 µg/ml, há reduzida quantidade de alterações e somente em 24h há presença de maior número de quebra cromossômica (Figura L). Em FDC 12,5 µg/ml 24h há presença de quebra, micronúcleo e broto, em 48h há considerável aumento de micronúcleo e diminuição das outras alterações, já em 72h há aumento de broto em relação a 48h. Em 6,25 µg/ml há grande quantidade de ponte e micronúcleo em 24h, aumento de micronúcleo em 48h e em 72h há redução de todas as alterações presentes.

Nota-se que em FDC que há prevalência principalmente de micronúcleo em todas as concentrações apesar de serem encontradas alterações como quebra, broto nuclear e ponte, ainda assim não há correlação entre a presença dessas alterações e a variação dessa concentração, uma vez que independente de tempo e concentração as alterações ocorrem de forma desordenada.

Em FAEC, em 100 µg/ml, há aumento de quebra e micronúcleo em 24h e 48h, já em 72h além dessas duas há a presença de ponte (Figura T). Somente em FAEC 50 µg/ml, pode ser observado uma possível correlação tempo-dependente no aparecimento de micronúcleos. Em FAEC 25 µg/ml, há proeminente aumento de micronúcleo em fase aguda que diminui com o decorrer do tempo. Em 12,5 µg/ml, há principalmente quebra, ponte e micronúcleo. E em 6,25 µg/ml, em 48h há aumento

exagerado da quantidade de ponte e em 72h essa quantidade é decaída e há aumento de micronúcleo.

De maneira geral, há um aumento significativo do IM em todas as amostras, principalmente em menores concentrações, sem relação tempo-dependente, a considerar as amostras 50 µg/ml e 25 µg/ml, indiferente a concentração há a existência de quebra, ponte e micronúcleo, sendo em algumas concentrações de efeito agudo e na maioria aparecem tardiamente. Assim como em FAEF, as amostras FAEC tem aumento significativo do IM com a redução do IA, possivelmente devido a presença de compostos mais polares como os flavonóides encontrados nas plantas, o aumento do IM também indica atividade proliferativa destas frações.

Em teste de genotoxicidade, o extrato aquoso das partes aéreas de *D. ambrosioides* foram capazes de causar efeitos citotóxicos e genotóxicos em cultura de linfócitos humanos, em que foi detectado um aumento significativo da quantidade alterações cromossômicas em metáfases no ciclo celular destes linfócitos, além de haver diminuição do índice mitótico, estes resultados foram atribuídos a fração de cloreto de metileno, obtida após partição, que apresentava compostos mais apolares como o ascaridol (Gadano et al., 2002).

Tabela 5 - Índice mitótico e índice de aberrações cromossômicas em *Allium cepa* induzido por extratos e frações dos caules de *D. ambrosioides* (continua).

Amostras (µg/ml)	Índice mitótico (%)			Índice de aberrações (%)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
CN	5,6	4,3	5,2	0,87	0,85	0,54
CP						
100	14,8	5,9	5,3	3,9	7,7	3,3
50	5,7	5,1	4,0	5	5,8	5,1
25	7,6	5,0	5,8	3,5	6,3	3,0
12,5	6,0	5,8	7,4	3,0	5,2	3,0
6,25	4,1	4,6	6,9	5,5	3,8	4,5
EEC						
100	3,5	6,0	3,7	4,1	5,1	3,1
50	8,1	7,2	7,1	6,1	1,9	2,7
25	9,7	8,3	5,8	3,5	4,5	3,0
12,5	4,2	3,8	8,1	2,9	3,8	1,9
6,25	5,9	5,2	6,2	5,6	6,7	5,4
FDC						
100	26,2	32,8	36,8	1,6	3,0	2,6
50	40,7	26,0	33,0	1,8	1,9	1,4
25	33,9	26,7	34,2	1,2	3,7	1,6
12,5	33,7	30,4	27,0	2,5	2,9	2,3
6,25	23,7	23,8	35,0	2,0	2,3	1,5

Tabela 5 - Índice mitótico e índice de aberrações cromossômicas em *Allium cepa* induzido por extratos e frações dos caules de *D. ambrosioides* (conclusão).

Amostras (µg/ml)	Índice mitótico (%)			Índice de aberrações (%)		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
FAEC						
100	36,3	38,7	39,6	1,5	1,2	1,7
50	43,3	33,3	38,1	1,4	1,4	1,6
25	43,2	41,4	60,3	2,5	1,8	1,4
12,5	52,7	55,5	49,2	1,3	1,9	1,3
6,25	39,4	58,4	42,5	0,8	2	2,4

Legenda: CN – água destilada ; CP – colchicina; EEC – extrato etanólico do caule; FDC – fração diclorometânica do caule; FAEC – fração de acetato de etila do caule.

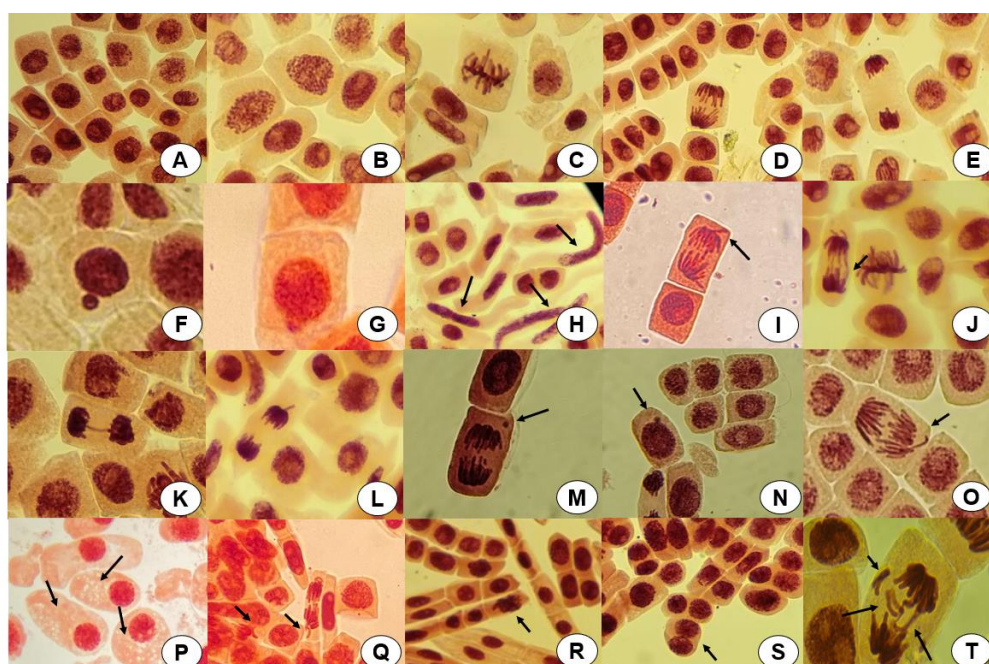


Figura 10 - Alterações celulares observadas por análise de células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*.

Legenda: A: interfase normal em controle negativo 24h; B: prófase normal em controle negativo 24h; C: metáfase normal em controle negativo 48h; D: anáfase normal em controle negativo 48h; E: telófase normal em controle negativo 72h; F: interfase com micronúcleo em EEF 25 µg/ml 72h; G: interfase com broto nuclear em EEC 25 µg/ml 72h; H: mudanças na forma em EEF 50 µg/ml 24h; I: anáfase com cromossomo retardatário em EEC 50 µg/ml 72h; J: anáfase com ponte cromossômica FAEC 100 µg/ml 72h; K: telófase com ponte cromossômica em FAEC 50 µg/ml 24h; L: telófase com quebra cromossômica em FDC 100 24h; M: metáfase com micronúcleo em FAEC 25 µg/ml 24h; N: prófase com broto nuclear em EEC 100 µg/ml 24h; O: anáfase com quebra cromossômica em EEF 6,25 µg/ml 24h; P: vacuolização sugestiva de necrose em FAEC 50 72h; Q: anáfase com quebra cromossômica em FDC 100 µg/ml 24h; R: metáfase com aderência cromossômica em FMF 25 µg/ml 48h; S: célula binucleada em FMF 50 µg/ml 72h; T: anáfase com quebra e ponte cromossômica em FAEC 100 µg/ml 24h.

5.4. Ensaio *in silico*

Os resultados dos estudos de toxicidade sugerem que os triterpenos e esteroides são os responsáveis pela toxicidade. Então, foram selecionados terpenos e flavonoides para a realização dos estudos *in silico*, buscando a predição da toxicidade. Todas as moléculas selecionadas já foram isoladas da espécie.

Nas primeiras análises, utilizando o modelo de alga para a predição, não se observou diferença entre os compostos da classe dos flavonoides e dos terpenos, sendo todos tóxicos. Essas algas têm grande sensibilidade a qualquer mudança no meio devido seu curto tempo de vida (Costa *et al.*, 2008), o que a torna pouco resistente a extensa quantidade de substâncias.

No modelo de predição utilizando a *Daphnia*, a maioria dos terpenos não foram tóxicos, assim como mais da metade dos flavonoides (5). O teste de toxicidade em organismo *Daphnia sp.* é utilizado para avaliar a toxicidade aguda e subcrônica, uma vez que este organismo é extremamente sensível a uma variedade de compostos, sendo utilizado como bioindicador (Beatrici *et al.*, 2006).

Tanto flavonoides, como terpenos foram classificados como muito tóxicos (Tabela 6). Os peixes são os principais representantes de consumidores secundários na cadeia alimentar. Na avaliação de toxicidade para peixes, as moléculas (3), (4), (10) e (24) apresentaram-se tóxicas para ambas as espécies de peixes, essas moléculas têm um logP baixo, indicando que, possivelmente, tem menor lipofilicidade mas, ainda assim, conseguem causar efeitos tóxicos nos organismos. Já o restante das moléculas se apresentou muito tóxico tanto para Medeka quanto para Minnow. As propriedades físico-químicas indicam que essas moléculas têm um bom padrão de absorção e que, possivelmente, tem maior lipossolubilidade, medidos a partir do logP e do TPSA e, dessa forma, facilidade em bioacumulação, o que pode causar intoxicação aguda e crônica em organismos mais complexos como os peixes.

Em contrapartida, nenhum composto parece apresentar a citotoxicidade (Tabela 6). Os estudos de citotoxicidade são feitos para estimar se os compostos testados apresentarão toxicidade em modelos *in vivo* servido como parâmetro de triagem (Greene *et al.*, 2010). Contudo, há relatos na literatura que indicam a citotoxicidade por parte de extratos, óleo essencial e compostos isolados de *D. ambrosioides* (Wang *et al.*, 2015) possivelmente, pelo fato de serem feitos testes a partir de similaridade com outras moléculas, as escolhidas neste estudo não tem os padrões de semelhança necessários para a dedução de atividade tóxica.

No modelo *in silico* de teste de Ames, a maioria das moléculas não foram consideradas mutagênicas por não causarem mutação em pelo menos uma cepa de bactérias. Já as moléculas (10), (14), (15) e (16) foram consideradas com maior potencial mutagênico por mutarem duas ou mais cepas (Gonçalves, 2016). Esses

estudos são essenciais para determinar se uma substância é capaz de causar danos no DNA propiciando a formação de micronúcleos (Varanda, 2006). O teste de Ames é um método simples para testar a mutagenicidade de compostos em que são utilizadas várias cepas de bactéria *S. typhimurium* com mutações no gene de síntese de histidina, assim sendo, a hipótese de mutação é a capacidade de o mutagênico causar reversão em um meio livre de histidina (Ames *et al.*, 1972).

A maioria dos flavonoides, exceto o (4), parecem ter potencial carcinogênico, sendo que alguns apresentaram resposta positiva em apenas 1 modelo e outros em 2 modelos. Em contrapartida, vários terpenos não parecem possuir potencial carcinogênico (10, 11, 12, 13, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 24). Vale destacar que as moléculas 19 e 20 não foram mutagênicas e ou carcinogênicas. Analisando todos os resultados da toxicidade, parece que os terpenos 19 e 20 possuem menor potencial tóxico, a 14 e a 15 parecem apresentar maior potencial tóxico.

Tabela 6 - Análise *in silico* de toxicidade de terpenos e flavonoides.

Moléculas	Toxicidade				Protox	Mutagenicidade	Carcinogenicidade		Protox
	Algas	Daphnia	Minnow	Medeka	Citotoxicidade		Camundongo	Rato	Carcinogenicidade
1	Tóxico	Tóxico	MT	MT	NC	M(1)	-	+	-
2	Tóxico	NT	MT	MT	NC	NM	-	-	+
3	Tóxico	NT	Tóxico	Tóxico	NC	M(1)	+	-	-
4	Tóxico	NT	Tóxico	Tóxico	NC	NM	-	-	-
5	Tóxico	NT	MT	MT	NC	M(0)	-	-	+
6	Tóxico	NT	MT	MT	NC	M(0)	-	-	+
7	Tóxico	Tóxico	MT	MT	NC	M(1)	-	+	-
8	Tóxico	Tóxico	MT	MT	NC	M(1)	-	+	+
9	Tóxico	Tóxico	MT	MT	NC	M(1)	-	+	+
10	Tóxico	NT	Tóxico	Tóxico	NC	M(3)	-	-	-
11	Tóxico	NT	MT	MT	NC	M(1)	-	-	-
12	Tóxico	NT	MT	MT	NC	M(1)	-	-	-
13	Tóxico	NT	MT	MT	NC	M(1)	+	-	-
14	Tóxico	NT	MT	MT	NC	M(2)	-	+	-
15	Tóxico	NT	MT	MT	NC	M(3)	-	+	-
16	Tóxico	Tóxico	MT	MT	NC	M(3)	-	-	-
17	Tóxico	Tóxico	MT	MT	NC	M(1)	+	-	+
18	Tóxico	NT	MT	MT	NC	M(0)	+	+	-
19	Tóxico	NT	Tóxico	Tóxico	NC	NM	-	-	-
20	Tóxico	NT	Tóxico	Tóxico	NC	NM	-	-	-
21	Tóxico	NT	MT	MT	NC	M(1)	-	-	-
22	Tóxico	NT	MT	MT	NC	M(0)	-	-	-
23	Tóxico	NT	Tóxico	MT	NC	M(1)	-	-	-
24	Tóxico	NT	Tóxico	Tóxico	NC	M(1)	+	-	-

Legenda: Teste Algas: < 1mg/L tóxico, > 1mg/L não tóxico (NT; Costa, *et al.*, 2008); Teste Daphnia: < 0,22 µg/mL tóxico, > 0,22 µg/mL não tóxico (NT; Guilhermino, *et al.*, 2000); Teste em peixes Medeka e Minnow: < 1mg/L muito tóxico (MT), 1-10 mg/L tóxico, 10-100 mg/L prejudicial (PREJ) e > 100mg/L não tóxico (NT; Zuncker, 1985). NC: Não citotóxico; NM: não mutagênico, M: mutagênico; M (0/1/2/3): número de cepas de Salmonella que foram positivas; (+) carcinogênico, (-) não carcinogênico. (1) Kaempferol; (2) Afzelina; (3) Kempferol-3-rhamnosideo-4'-xilósideo; (4) Kempferol-3-rhamnosideo-7-xilósideo; (5) Kempferol-7-rhamnosideo; (6) Quercetina-7-O-alfa-L-rhamnopiranosideo; (7) Isorhamnetina; (8) Patuletina; (9) Quercetina; (10) 4-hidroxi-4-metilciclohex-2-em-1-ona; (11) (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol; (12) (1R,4S)-p-met-2-em-1-ol; (13) Ascaridol; (14) Chenopanona; (15) Isoascaridol; (16) Carvacrol; (17) p-cimeno; (18) α-terpineno; (19) 1S,2S,3R,4S)-1-metil-4-(propan-2-il)ciclohexano-1,2,3,4-tetrol; (20) 1,2,3,4-tetrahidroxip-metano, (21) (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol, (22) (1R,4S)-p-met-2-en-1-ol, (23) 1,4-dihidroxip-met-2-eno, (24) 1-metil-4β-isopropil-1-ciclohexeno-4α,5α,6α-triol.

Na predição de toxicidade oral aguda, o flavonoide 9 e os terpenos 13 e 17 foram os mais tóxicos, sendo os flavonoides de 2 a 8 imunotóxicos (Tabela 7). Um estudo avaliou a toxicidade oral aguda em camundongos BALB tratados com p-cimeno (17) nas concentrações de 1,2,3 g/kg e não foram encontrados sinais de intoxicação ou morte, sendo impossível a determinação da DL₅₀ deste isolado (Kummer, 2015), divergindo dos resultados obtidos no presente estudo.

O isolado (13) foi classificado como classe 3 com uma DL₅₀ de 200 mg/kg, indicando que é tóxico quando ingerido. Já foi relatada intoxicação de humanos após a utilização de óleo essencial de *D. ambrosioides*, sendo referida a presença do ascaridol por ser o componente em maior concentração (Matos, 2011), mas não foram encontrados estudos que determinassem a DL₅₀ deste isolado em modelos animais. As demais moléculas apresentaram DL₅₀ muito altas, sendo classificadas como classe 5 e 6, pressupondo que devem ser administradas grandes quantidades de cada um dos isolados para conferir efeito tóxico, vale considerar que ainda há a possibilidade de não apresentarem efeitos tóxicos isoladas, mas em preparação podem trabalhar de forma sinérgica.

Nenhuma das moléculas apresentou hepatotoxicidade, apesar de um estudos *in vivo* de toxicidade aguda e sub-crônica, evidenciar que o extrato aquoso na concentração de 1,0 g/kg administrado por 15 dias foi capaz de causar efeitos tóxicos de intensidade leve no fígado, notou-se na histologia a presença de vacuolização de hepatócitos e congestão hepática leve (Silva *et al.*, 2014), estes resultados não foram associados a estruturas facilitadoras a este efeito tóxico, mas o estudo cita as moléculas carvacrol (16) e ascaridol (13) como capazes de inibir a cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias (Monzote *et al.*, 2009) causando efeitos indesejados, nesta análise, estes mesmo compostos não indicaram hepatotoxicidade.

A imunotoxicidade é definida por uma substância ser capaz de causar distúrbios ao sistema imunológico e são categorizadas de duas principais formas: imunossupressão (decaimento da imunocompetência) e imunoestimulação inapropriada (Schrey *et al.*, 2017). O software utilizado deduz que a probabilidade de imunotoxicidade real dos compostos testados é muito alta, podendo ocorrer poucos resultados falso-negativos, oito (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) das moléculas testadas neste estudo indicaram potencial tóxico para esse parâmetro, sendo todas elas isoladas das partes aéreas da planta e pertencentes a classe de glicosídeos flavônicos. No teste de

atividade biológica sete das moléculas testadas apresentaram atividade antioxidante, possivelmente, o risco tóxico destes compostos pode estar relacionado a dose administrada, uma vez que, somente em altas doses, substâncias antioxidantes podem começar a apresentar efeitos desse tipo (Silva *et al.*, 2015).

Tabela 7 - Predição da toxicidade de terpenos e flavonoides.

Moléculas	Toxicidade oral aguda		Hepatotoxicidade	Imunotoxicidade
	DL ₅₀ (mg/kg)	Classe		
1	3919	5	-	-
2	5000	5	-	+
3	5000	5	-	+
4	5000	5	-	+
5	5000	5	-	+
6	5000	5	-	+
7	5000	5	-	+
8	5000	5	-	+
9	159	3	-	-
10	9000	6	-	-
11	2340	5	-	-
12	2340	5	-	-
13	200	3	-	-
14	5000	5	-	-
15	7800	6	-	-
16	810	4	-	-
17	3	1	-	-
18	1680	4	-	-
19	2340	5	-	-
20	10000	6	-	-
21	2340	5	-	-
22	5000	5	-	-
23	2340	5	-	-
24	2340	5	-	-

Legenda: Classe 1: fatal se ingerido ($DL_{50} \leq 5$); classe 3: tóxico se ingerido ($50 < DL_{50} \leq 300$); classe 4: nocivo se ingerido ($300 < DL_{50} \leq 2000$); classe 5: pode ser nocivo se ingerido ($20000 < DL_{50} \leq 50000$); classe 6: não tóxico ($DL_{50} > 50000$); (+) positivo, (-) negativo. (1) Kaempferol; (2) Afzelina; (3) Kempferol-3-rhamnosideo-4'-xilósideo; (4) Kempferol-3-rhamnosideo-7-xilósideo; (5) Kempferol-7-rhamnosideo; (6) Quercetina-7-O-alfa-L-rhamnopiranosideo; (7) Isorhamnetina; (8) Patuletina; (9) Quercetina; (10) 4-hidroxi-4-metilciclohex-2-em-1-ona; (11) (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol; (12) (1R,4S)-p-met-2-em-1-ol; (13) Ascaridol; (14) Chenopanona; (15) Isoascaridol; (16) Carvacrol; (17) p-cimeno; (18) α -terpineno; (19) 1S,2S,3R,4S)-1-metil-4-(propan-2-il)ciclohexano-1,2,3,4-tetrol; (20) 1,2,3,4-tetrahidroxip-metano, (21) (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol, (22) (1R,4S)-p-met-2-en-1-ol, (23) 1,4-dihidroxip-met-2-eno, (24) 1-metil-4 β -isopropil-1-ciclohexeno-4 α ,5 α ,6 α -triol.

Na predição de atividades biológicas observou-se que todos os flavonoides apresentaram potencial antioxidante e parece que esta atividade pode estar relacionada ao sequestro de radicais livres, entretanto não foi observado potencial antioxidante para os terpenos (Tabela 8). A atividade antioxidante dos flavonoides se dá pela sua capacidade de estabilizar ou ativar estes radicais, que são moléculas orgânicas instáveis, que quando em excesso, ocasionam prejuízos na manutenção

das funções fisiológicas, como danos ao DNA, proteínas e organelas celulares (Sousa *et al.*, 2007).

A exposição celular a Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) pode desencadear a transcrição de genes inflamatórios e de fatores de transcrição reguladores de mecanismos redox-sensíveis (De Groot *et al.*, 2012) sendo que a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) leva a transcrição de genes que codificam citocinas inflamatórias e moléculas de adesão (Negro *et al.*, 2010; Seror *et al.*, 2014). Nesse contexto, esperava-se que somente os flavonoides tivesse potencial anti-inflamatório, porém alguns terpenos (11, 21, 22 e 23) mostraram-se promissores como anti-inflamatório (Tabela 8) e se deduz que o mecanismo desta atividade não está relacionado a atividade antioxidante.

Nenhuma molécula apresentou atividade antinociceptiva e cicatrizante, apesar de literaturas mostrarem estudos sobre estas atividades para as moléculas ascaridol e quercetina (Trivellato-Grassi *et al.*, 2013; Calado *et al.*, 2015; Moreski, Leite-Mello, Bueno, 2018; Polerá *et al.*, 2019). As alegações de uso de *D. ambrosioides* como cicatrizantes parece não estar relacionada aos flavonoides e terpenos (Moreski, Leite-Mello, Bueno, 2018). Somente um monoterpene (16; Tabela 8), apresentou atividade antipirética que pode estar relacionado à alteração na síntese de prostaglandinas (Ngo Bum *et al.*, 2011).

Todos os flavonoides parecem possuir propriedades antineoplásicas e parece que o mecanismo de ação envolve o processo de apoptose (Tabela 8). Estudos tem mostrado que a classe de flavonóides atua como inibidora de células tumorais, controla a proliferação celular e bloqueia a oncogênese por mecanismos que modulam enzimas da via metabólica carcinogênica, assim, parece que a capacidade antioxidante está diretamente relacionada a estes mecanismos para esta atividade (Hung *et al.*, 2009; Amado *et al.*, 2011; Santos e Rodrigues, 2017). Outro mecanismo que pode estar envolvido na inibição da proliferação celular tumoral é a inibição da função do transportador de glicose 1, limitando a chegada da glicose no interior da célula e, causando morte por falta de energia (Brito *et al.*, 2015). Por fim, a morte celular ocasionada pode estar relacionada aos flavonoides (Pereira *et al.*, 2015) e os incluídos neste estudo podem envolver um destes mecanismos. Para os flavonoides, o mecanismo de ação anticâncer inclui a inibição do crescimento celular, proliferação

celular, invasão e metástase, bem como a estimulação de apoptose e parada do ciclo celular (Çetinkaya *et al.*, 2022).

A evasão de apoptose é a principal característica dos cânceres que acometem os humanos, este processo é ativado, principalmente, por caspases e outros fatores regulatórios que influenciam na supressão de tumores ou na oncogênese (Olsson e Zhivotovsky, 2011). Os flavonóides aparentemente tem mais isolados ativos para a estimulação de caspases 3 (2, 3, 4, 5, 6) e caspases 8 (3,4), ainda é possível inferir que as moléculas (3) e (4) tem sítios comuns que reagem a ativação de ambas as caspases, possivelmente, influenciado pelo baixo logP que torna essas moléculas facilmente solúveis em meios mais aquosos.

As classes escolhidas para este estudo aparentaram ser ativas em diferentes vias de atividade contra câncer, sendo que os glicosídeos flavônicos atuaram em mais vias que os terpenos, que em sua maioria só tiveram atividade como antineoplásico e agonista apoptótico (Tabela 8). Um estudo destacou possíveis alvos moleculares e propriedades biológicas dos terpenos, indicando a capacidade de inibir a proliferação de células tumorais e induzir apoptose, principalmente, no tratamento de câncer de mama e de próstata (Yang *et al.*, 2011; Martins, 2013), dado que contribui com a ação descrita neste estudo.

Quando analisada a atividade biológica em microorganismo e parasitas, somente a molécula 13, o ascaridol, apresentou atividade antiprotozoária (Tabela 8), que pode estar relacionado ao grupamento peróxido do ascaridol que é relatado como o responsável por inibir o desenvolvimento de *P. falciparum* em concentrações muito baixas (0,05 μ M) (Pollack, Segal e Golenser, 1990). Entretanto, neste estudo o ascaridol, apesar de ativo para protozoários, não foi antimalárico. Outros monoterpenos, também, apresentam potencial atividade contra epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Kiuchi *et al.*, 2002), inferindo que o mesmo grupamento peróxido é efetivo contra estes tipos parasitários.

Como antifúngico, os flavonoides (2, 3, 4, 5 e 6) apresentaram esta atividade, entretanto nenhum terpeno foi ativo (Tabela 8). As plantas sintetizam os flavonoides para se defender contra insetos e microrganismos fitopatogênicos, como vírus, bactérias e fungos (Zuanazzi, 2000). A fungitoxidade depende da quantidade de grupos metilados no flavonoide e do número de substituintes na formação do anel aromático, o que os torna mais tóxicos, interferindo na membrana dos fungos

(Harbone, 1992; Zuanazzi, 2000). Todos os compostos ativos têm em sua estrutura anéis aromáticos com grande quantidade de grupos metilados, o que possivelmente os torna ativos para este tipo de microorganismo, uma vez que a quantidade de grupos hidroxila existentes nas estruturas conferem diferente polaridade e propriedades ácidas fracas às moléculas (Smale, Tarakhovsky e Natoli, 2014). Essa diferença de polaridades facilita a interação com a bicamada lipídica dos microorganismos, assim, o pH baixo dificulta a desprotonação de grupos polares ocasionando uma penetração mais profunda dos flavonóides na camada lipídica (Movileanu, Naegoe e Flonta, 2000).

Tabela 8 - Predição de atividades biológicas de terpenos e flavonóides.

Atividade	Moléculas																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Dor e inflamação																								
Anti-inflamatória	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Antipirética	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Câncer																								
Antineoplásica	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
Agonista Apoptótico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
Estimulador de Caspase 3	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estimulador de Caspase 8	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Microrganismos e parasitas																								
Antiprotozoária	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antifúngica	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Outras atividades																								
Antioxidante	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sequestrador de Radicais livres	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: (+) positivo; (-) negativo; (1) Kaempferol; (2) Afzelina; (3) Kempferol-3-rhamnosideo-4'-xilosideo; (4) Kempferol-3-rhamnosideo-7-xilosideo; (5) Kempferol-7-rhamnosideo; (6) Quercetina-7-O-alfa-L-rhamnopiranosideo; (7) Isorhamnetina; (8) Patuletina; (9) Quercetina; (10) 4-hidroxi-4-metilciclohex-2-em-1-ona; (11) (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol; (12) (1R,4S)-p-met-2-em-1-ol; (13) Ascaridol; (14) Chenopanona; (15) Isoascaridol; (16) Carvacrol; (17) p-cimeno; (18) α -terpineno; (19) 1S,2S,3R,4S)-1-metil-4-(propan-2-il)ciclohexano-1,2,3,4-tetrol; (20) 1,2,3,4-tetrahidroxip-metano, (21) (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol, (22) (1R,4S)-p-met-2-en-1-ol, (23) 1,4-dihidroxip-met-2-eno, (24) 1-metil-4 β -isopropil-1-ciclohexeno-4 α ,5 α ,6 α -triol.

Na avaliação de efeitos adversos, os terpenos apresentaram efeitos negativos em maior quantidade que os flavonóides, principalmente de vômitos, problemas visuais, gastrotoxicidade e ulcerogênicos. Para os flavonóides, as principais reações adversas causadas estão relacionadas a inflamação, hepatotoxicidade, hematotoxicidade, genotoxicidade e neurotoxicidade (Tabela 9).

Até o momento, não é bem fundamentado o mecanismo de reação adversa dos flavonóides, contudo, a administração destes em doses farmacológicas crônicas quando em excesso ao recomendado de 26 mg/dia a 1g/dia (Behling *et al.*, 2004), parecem favorecer estes processos.

Foi mostrado que concentrações elevadas de flavonóides causam alterações morfológicas nas membranas dos hepatócitos de camundongos favorecendo a necrose celular e a morte do animal (Verma *et al.*, 2013). Ainda, foi relatado que os flavonóides em altas concentrações inibiram a ação de citocromos P450, promovendo a alteração do funcionamento do fígado (Silva *et al.*, 2013), possivelmente, o mecanismo de reação adversa da hepatotoxicidade está associado a um desses efeitos.

Os compostos que apresentaram como reação adversa inflamação foram os mesmos a apresentarem atividade anti-inflamatória, deduzindo que os radicais que atuam na atividade biológica podem ser os mesmos lidos pelo programa *in silico*. Os flavonóides apresentam significativa ação anti-inflamatória atribuídas à inibição das enzimas fosfolipases A₂ (PLA₂), lipo-oxigenase, ciclo-oxigenase e inibição da produção de óxido nítrico pela modulação das enzimas iNOS (Kim *et al.*, 2004; Yoon e Baek, 2005; Santangelo *et al.*, 2007).

A quercetina (9) foi o único composto a não apresentar reação adversa neste estudo (Tabela 9), embora tenha sido observado que uma dieta com 2% de quercetina foi capaz de desencadear câncer de bexiga em ratos (Criqui e Ringel, 1994), o desenvolvimento do câncer pode ter relação direta com a reação de genotoxicidade quando é feita a utilização de forma crônica e altas concentrações.

Dos terpenos testados, o ascaridol tem registro bem documentados de casos de intoxicação em que o óleo essencial rico em ascaridol causou múltiplos danos orgânicos com predomínio de encefalopatia difusa, acidose metabólica, insuficiência renal e diversos efeitos inflamatórios nos sistemas respiratório e digestivo (Montoya-Cabrera *et al.*, 1996). Além desse estudo, não foram encontrados outros que

descrevessem reações adversas a terpenos e, assim como, o flavonoide, reações adversas referentes a estas classes metabólicas parecem estar envolvidas a questões como tempo de uso e dosagem.

Tabela 9 - Avaliação *in silico* dos efeitos adversos dos terpenos e flavonóides.

Efeitos adversos	Moléculas																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Inflamação	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Dor de cabeça	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Vômitos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Náuseas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Palpitação cardíaca	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hepatotoxicidade	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Nefrotoxicidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Convulsões	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hematotoxicidade	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Genotoxicidade	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Problemas visuais	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
Neurotoxicidade	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Gastrotoxicidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ulcerogênico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Disfunções reprodutivas	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+

Legenda: (+) positivo; (-) negativo; (1) Kaempferol; (2) Afzelina; (3) Kempferol-3-rhamnosideo-4'-xilosideo; (4) Kempferol-3-rhamnosideo-7-xilosideo; (5) Kempferol-7-rhamnosideo; (6) Quercetina-7-O-alfa-L-rhamnopiranosideo; (7) Isorhamnetina; (8) Patuletina; (9) Quercetina; (10) 4-hidroxi-4-metilciclohex-2-em-1-ona; (11) (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol; (12) (1R,4S)-p-met-2-em-1-ol; (13) Ascaridol; (14) Chenopanona; (15) Isoascaridol; (16) Carvacrol; (17) p-cimeno; (18) α -terpineno; (19) 1S,2S,3R,4S)-1-metil-4-(propan-2-il)ciclohexano-1,2,3,4-tetrol; (20) 1,2,3,4-tetrahidroxip-metano, (21) (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol, (22) (1R,4S)-p-met-2-en-1-ol, (23) 1,4-dihidroxip-met-2-eno, (24) 1-metil-4 β -isopropil-1-ciclohexeno-4 α ,5 α ,6 α -triol.

Na tabela 10 pode ser visto o resultado da avaliação das propriedades físico-químicas dos isolados em estudo, a partir da regra dos cinco de Lipinski, notou-se que 8 das moléculas violaram ao menos um parâmetro dos estipulados, sendo a sua maioria compostos flavônicos, o principal critério violado foi o de área de superfície topológica (TPSA).

Tabela 10 - Propriedade físico-química dos terpenos e flavonóides.

Moléculas	logP	TPSA	MM	nALH	nDLH	nROTB
1	2,17	111,12	286,24	6	4	1
2	1,13	170,05	432,38	10	6	3
3	-0,23	228,97	564,50	14	8	5
4	-0,23	228,97	564,50	14	8	5
5	1,39	170,05	432,38	10	6	3
6	0,90	190,28	448,38	11	7	3
7	1,99	120,3	316,2	7	4	2
8	1,70	140,5	332,2	8	5	2
9	1,68	131,3	302,2	7	5	1
10	0,20	37,30	126,16	2	1	0
11	1,45	40,46	170,25	2	2	1
12	2,80	20,23	154,25	1	1	1
13	2,65	18,47	168,24	2	0	1
14	1,42	43,38	182,22	3	0	3
15	1,99	25,06	168,24	2	0	1
16	3,81	20,23	150,22	1	1	1
17	3,90	0,00	134,22	0	0	1
18	3,36	0,00	136,24	0	0	1
19	0,23	80,91	204,27	4	4	1
20	0,23	80,91	204,27	4	4	1
21	1,45	40,46	170,25	2	2	1
22	2,80	20,23	154,25	1	1	1
23	2,80	20,23	154,25	1	1	1
24	0,77	60,68	186,25	3	3	1
Referência	logP ≤ 5	≤ 140Å	≤ 500 Da	≤ 10	≤ 5	≤ 10

Legenda: LogP - coeficiente de partição óleo-água; TPSA - área de superfície polarizada topológica; nALH - aceptores de ligação de hidrogênio; nDLH - número de grupos de doadores de hidrogênio; nROTB - número de ligações rotacionáveis; MM - massa molar. (1) Kaempferol; (2) Afzelina; (3) Kempferol-3-rhamnosideo-4'-xilosideo; (4) Kempferol-3-rhamnosideo-7-xilosideo; (5) Kempferol-7-rhamnosideo; (6) Quercetina-7-O-alfa-L-rhamnopiranosideo; (7) Isorhamnetina; (8) Patuletina; (9) Quercetina; (10) 4-hidroxi-4-metilciclohex-2-em-1-ona; (11) (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol; (12) (1R,4S)-p-met-2-em-1-ol; (13) Ascaridol; (14) Chenopanona; (15) Isoascaridol; (16) Carvacrol; (17) p-cimeno; (18) α-terpineno; (19) 1S,2S,3R,4S)-1-metil-4-(propan-2-il)ciclohexano-1,2,3,4-tetrol; (20) 1,2,3,4-tetrahidroxip-metano; (21) (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol; (22) (1R,4S)-p-met-2-em-1-ol; (23) 1,4-dihidroxip-met-2-eno; (24) 1-metil-4β-isopropil-1-ciclohexeno-4α,5α,6α-triol.

A área de superfície polarizada topológica (TPSA) é a soma das superfícies dos átomos polares (nitrogênio, oxigênio e heteroátomos) de um composto, assim, há uma correlação com o grau de absorção da molécula em membranas como barreira hematoencefálica, célula caco-2 e absorção intestinal (Ertl; Rohde; Selezer, 2000). Para ter uma boa permeação, os compostos não devem apresentar valores maiores que 140 Å, as moléculas não se adequam a esse padrão indicando possível

difículdade de interação com a superfície polar das membranas e sua permeação para a porção lipídica (Veber *et al.*, 2005) ficando mais retida no meio aquoso e por consequência há a probabilidade de baixa biodisponibilidade oral, ainda assim, apesar do alto valor de TPSA a quantidade de ligações rotacionáveis que elas apresentaram compensa o processo de permeabilidade desses compostos (tabela 10; Veber *et al.*, 2002).

Os outros parâmetros com maior quantidade de violações são o número de grupos aceptores de hidrogênio (nALH) e número de grupos doadores de hidrogênio (nDLH), estes também violados em maioria pela classe de flavonóides. Compostos que apresentam grande quantidade de nALH e nDLH tendem a ter uma má absorção (Lipinski; Lombardo; Dominy; Freeney, 1997), desta forma, esses flavonóides por serem moléculas grandes e com muitos grupos doadores e aceptores terão uma permeabilidade prejudicada em relação aos terpenos que são moléculas pequenas e com esses grupos bem equilibrados, uma vez que quanto menos rotações, mais estável a molécula (Veber *et al.*, 2005).

O logP influencia diretamente na condução de uma substância até a região interfacial de uma membrana, sendo necessário um balanço hidrofílico-lipofílico nas moléculas (Veber *et al.*, 2002), atuando diretamente nas interações entre fármaco-receptor, no metabolismo das moléculas e em sua toxicidade (Lipinski; Lombardo; Dominy; Freeney, 1997). 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, Crivoli, Reist e Carrupt, 2000), desta forma, quase todas as moléculas apresentam logP dentro do parâmetro estabelecido sendo bem absorvidas em meios orgânicos, a considerar (2) e (4) que apresentaram valores abaixo do esperado para o coeficiente de partição, indicando que estas são mais solúveis em meio aquoso e possivelmente denotam dificuldade de serem absorvidos pelas membranas plasmáticas por conta da relação entre TPSA e logP. Em sua maioria, a classe de monoterpenos apresenta melhor padrão de absorção do que os glicosídeos flavônicos.

O peso molecular dos compostos também influencia na absorção destas pelas membranas biológicas, quanto maior o peso molecular mais dificuldade o composto terá em permear membranas, indicando que possivelmente tem menos possibilidade de serem disponíveis de forma oral (Lipinski; Lombardo; Dominy; Freeney, 1997). A

maioria dos monoterpenos analisados apresentam baixo peso molecular, estando na faixa de 126,16 a 170,25 Da, sendo o parâmetro ideal de 180 a 500 Da (Lipinski; Lombardo; Dominy; Freeney, 1997), isso indica que estes terão mais facilidade em atravessar as membranas por serem moléculas pequenas.

De maneira geral, os terpenos apresentam melhor perfil de absorção quando considerada a regra de Lipinski, somente duas moléculas (17 e 18) dessa classe quebram a regra por não apresentarem heteroátomos influenciando nos resultados de TPSA e nDLH e nALH, somente 4 dos glicosídeos flavônicos respeitaram os parâmetros, as características estruturais dessas moléculas influenciam diretamente nesses por serem moléculas grandes violam parâmetros de TPSA, MM, nDLH e nALH e assim não apresentam um bom padrão de absorção oral.

O parâmetro farmacocinético é importante para ser observado os resultados terapêuticos ou efeitos adversos e para explicar a toxicidade de determinada molécula (Pereira, 2007), os resultados obtidos estão descritos na tabela 11.

Em células MDCK é avaliado o transporte de drogas no epitélio intestinal (Yazdanian *et al.*, 1998), a maioria dos glicosídeos flavônicos apresentou baixa absorção, enquanto os monoterpenos, em maior quantidade, apontaram alta absorção dado a diferença de tamanho estrutural entre as moléculas.

As células caco-2 se mostra útil no entendimento de mecanismo transporte de substâncias através do epitélio intestinal *in vitro* correlacionado à solubilidade (Chen, Singh, Kitts, 2020). Nesta avaliação *in silico*, somente os glicosídeos flavônicos (2,8 e 9) apresentaram baixa permeabilidade, todos têm propriedades físico-químicas correspondentes a boa absorção e estruturas químicas semelhantes indicando que possivelmente há um grupo funcional que influencia na absorção destas, enquanto o restante evidenciou média permeabilidade.

Para absorção intestinal humana, os monoterpenos parecem ter maior absorção possivelmente devido a sua característica lipofílica, baixo peso molecular e valores mais baixos de TPSA que influem diretamente nesta absorção. Este parâmetro representa proporcionalidade no processo de excreção das vias urinária, biliar e fecal quando se administra um fármaco por via oral e que sofrem efeito de primeira passagem pela veia porta hepática (Moura *et al.*, 2020).

Foi observado que a maioria dos glicosídeos flavônicos se ligam de forma fraca com as proteínas plasmáticas, por estes serem mais hidrossolúveis e terem maior

massa molar encontrando dificuldade de serem transportados pela corrente sanguínea até o seu local de ação, já a maioria dos monoterpenos se ligam de forma forte por terem características lipossolúveis significativa tendo maior interação com as proteínas e ficando menos biodisponível favorecendo efeitos adversos, a força de ligação entre a molécula e a proteína é determinante na permeabilidade do ativo e no transporte ao alvo (Ferreira *et al.*, 2020).

Todos os glicosídeos flavônicos tem dificuldade em transpor a barreira hematoencefálica por serem altamente hidrossolúveis e com TPSA elevado, dessa forma, não conseguem ter ação significativa a nível de SNC (Ajay, Bermis, Murko, 1999), enquanto os monoterpenos conseguem perpassar esta membrana de forma moderada a livre, a justificativa disso está associada ao baixo valor de TPSA associado a massa molecular e a pequena quantidade de aceptores de hidrogênio que contribuem para o caráter lipofílico das moléculas, facilitando a travessia e distribuição neste sistema.

A maioria das moléculas em estudo sofre metabolismo de fase 1 pela CYP3A4, assim, estas moléculas podem influenciar na competitividade por receptores quando metabolizadas (Gonzalez *et al.*, 2021). A inibição de uma isoforma por um composto pode modificar o metabolismo hepático de outro medicamento e gerar um possível acúmulo no organismo facilitando efeito tóxicos (Brunton, Chabner, Knollmann, 2012). O ideal é que uma molécula não interfira no metabolismo de outros fármacos e no estudo *in sílico* os glicosídeos flavônicos parecem ter maior atividade sobre as CYPs por inibirem três das principais isoformas, somente os monoterpenos (10) (11) (12) (13) inibiram até dois tipos das CYPs. Considerando os parâmetros farmacocinéticos, os terpenos parecem ser mais favoráveis a biodisponibilidade oral.

Tabela 11 - Análise *in silico* da farmacocinética dos terpenos e flavonóides.

Moléculas	Absorção		Distribuição			Metabolismo	
	MDCK (nm/sec)	Caco-2	HIA (%)	PP (%)	BHE	Fase 1	Inibição
1	MP	MP	AA	Fraca	MOD	CYP_3A4 -	CYP_2C19; CYP_2C9; CYP_3A4
2	MP	BP	MA	Fraca	Fraca	Fraco	CYP-2C19; CYP_2C9
3	BP	MP	BA	Fraca	Fraca	Fraco	CYP-2C19; CYP_2C9; CYP_3A4
4	BP	MP	BA	Fraca	Fraca	Fraco	CYP-2C19; CYP_2C9; CYP_3A4
5	BP	MP	MA	Fraca	Fraca	Fraco	CYP-2C19; CYP_2C9; CYP_3A4
6	BP	MP	MA	Fraca	Fraca	Fraco	CYP-2C19; CYP_2C9; CYP_3A4
7	MP	MP	AA	Fraca	Fraca	-	CYP-2C19; CYP_2C9; CYP_3A4
8	MP	BP	MA	Fraca	Fraca	Fraco	CYP-2C19; CYP_2C9; CYP_3A4
9	MP	BP	MA	Forte	MOD	-	CYP-2C19; CYP_2C9; CYP_3A4
10	MP	MP	AA	Fraca	MOD	-	CYP-2C19; CYP_2C9;
11	AP	MP	AA	Forte	Livre	Fraco	CYP_2C9;
12	AP	MP	AA	Forte	Livre	-	CYP_2C9;
13	MP	MP	AA	Forte	MOD	Fraco	CYP_3A4; CYP_2C9;
14	MP	MP	AA	Fraca	MOD	Fraco	CYP_3A4; CYP_2C9; CYP_2C19;
15	AP	MP	AA	Forte	MOD	Substrato	CYP_3A4; CYP_2C9; CYP_2C19;
16	AP	MP	AA	Forte	Livre	Fraco	CYP_3A4; CYP_2C9; CYP_2C19;
17	AP	MP	AA	Forte	Livre	Fraco	CYP_3A4; CYP_2C9; CYP_2C19;
18	AP	MP	AA	Forte	Livre	Substrato	CYP_2C9; CYP_2C19
19	BP	MP	MA	Fraca	MOD	Fraco	CYP 2C9
20	BP	MP	MA	Fraca	MOD	Fraco	CYP 2C9
21	AP	MP	AA	Forte	MOD	Fraco	CYP 2C9
22	AP	MP	AA	Forte	Livre	-	CYP 2C9; CYP 2C19
23	BP	MP	AA	Forte	MOD	-	CYP 2C9
24	MP	MP	AA	Fraca	MOD	Fraco	CYP 2C9

Legenda: MDCK – *Madin-Darby Canine Kidney*; Caco-2 – células de adenocarcinoma de cólon humano; HIA – Human intestinal absorption; PP – proteína plasmática; BHE – barreira hematoencefálica; CYP – citocromo P450. Parâmetros: MDCK e Caco-2: > 70 nm/sec alta permeabilidade (AP), 4-70 nm/sec média permeabilidade (MP), < 4 nm/sec baixa permeabilidade (BP; Yazdanian, *et al.*, 1998); HIA 0-20% baixa absorção (BA), 20-70% moderada absorção (MA), > 70% alta absorção (AA); ligação a PP: ligado fortemente à albumina > 90%, ligação de moderada a fraca à albumina < 90% (Preadmet, 2021); BHE: > 2,0 atravessa livremente, 2,0-0,1 atravessa de forma moderada a fraca (MOD), < 0,1 atravessa de forma fraca ou não atravessa (Ajay, *et al.*, 1999). (1) Kaempferol; (2) Afzelina; (3) Kempferol-3-rhamnosideo-4'-xilosideo; (4) Kempferol-3-rhamnosideo-7-xilosideo; (5) Kempferol-7-rhamnosideo; (6) Quercetina-7-O-alfa-L-rhamnopiranosideo; (7) Isorhamnetina; (8) Patuletina; (9) Quercetina; (10) 4-hidroxi-4-metilciclohex-2-em-1-ona; (11) (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol; (12) (1R,4S)-p-met-2-em-1-ol; (13) Ascaridol; (14) Chenopanona; (15) Isoascaridol; (16) Carvacrol; (17) p-cimeno; (18) α -terpineno; (19) 1S,2S,3R,4S)-1-metil-4-(propan-2-il)ciclohexano-1,2,3,4-tetrol; (20) 1,2,3,4-tetrahidroxip-metano, (21) (1R,2S)-3-p-meten-1,2-diol, (22) (1R,4S)-p-met-2-en-1-ol, (23) 1,4-dihidroxip-met-2-eno, (24) 1-metil-4 β -isopropil-1-ciclohexenoos a -4 α ,5 α ,6 α -triol.

Com base nos estudos *in silico* notou-se que para a atividade biológica os metabólitos secundários presentes na espécie (flavonóides e terpenos) parecem apresentar potencial antineoplásico, sendo um dos mecanismos apoptose por estimularem endoproteases como a caspase 8 (Tabela 8, p. 69). No ensaio com *A. cepa* verificou-se a presença de pontes e quebras cromossômicas como aberrações que pode estar relacionada ao mecanismo de apoptose. Entretanto, sabe-se que a topoisomerase II está envolvida na topologia do DNA de ações como quebra, liberação, transporte, reconstrução e taxa de proliferação (Arapallia *et al.*, 2018), estas foram selecionadas para o estudo de docagem. Na figura 11, as enzimas cristalografadas de caspase 8 (1QTN) e topoisomerase II-TOPO II (1ZXM).

Para a seleção das moléculas para a docagem molecular considerou-se, principalmente, a toxicidade, sendo selecionadas as três principais moléculas menos tóxicas (4,19 e 20) e as três mais tóxicas (14, 15 e 17). Como a premissa inicial foi que a toxicidade da planta estava relacionada aos terpenos e estes apresentam maior potencial tóxico nos estudos *in silico*, foram selecionados os três terpenos mais tóxicos (14, 15 e 17), dois menos tóxicos (19 e 20) e um flavonoide com menor potencial tóxico (4).

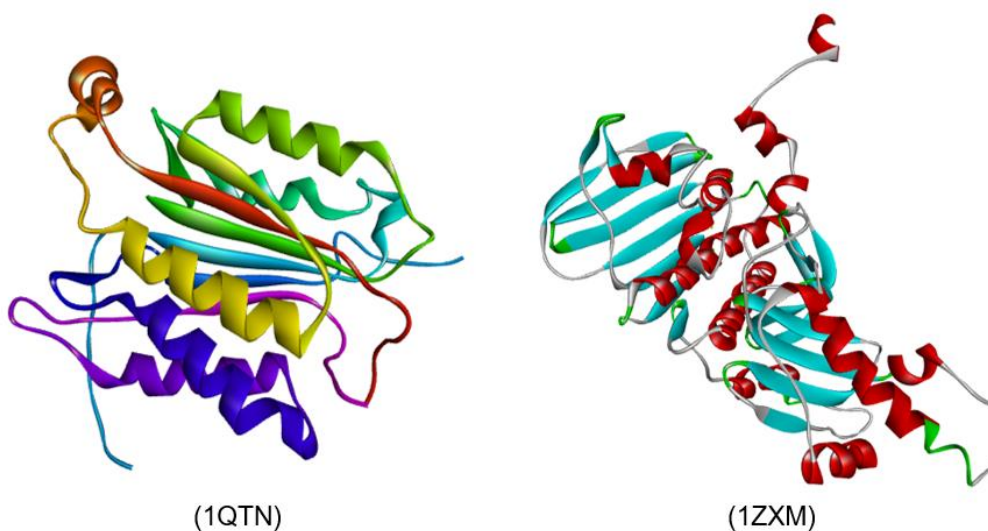


Figura 11 – Enzima cristalografada de caspase 8 (1QTN) e topoisomerase II (1ZXM).

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

sistema de estudo e foram obtidos os valores de desvio quadrático médio (RMSD) de 0,317 Å para o sítio da caspase 8 e 0,616 Å para o sítio da topoisomerase II. Ambos os complexos conservaram as distâncias interatômicas com os principais resíduos de aminoácidos dos receptores. Esses valores são considerados favoráveis pois são menores que 0,05 Å quando sobrepostos às estruturas experimentais (Barone *et al.*, 2014).

Desta forma, o sistema pode ser utilizado como parâmetro para comparar o grau de interação dos compostos escolhidos com o ligante cristalografado. Ainda, permite analisar as interações intermoleculares que ocorrem entre o sítio de ligação e os substratos. Para melhor observar esses fatores, foi feita a sobreposição dos ligantes no sítio de interação (Figura 12).

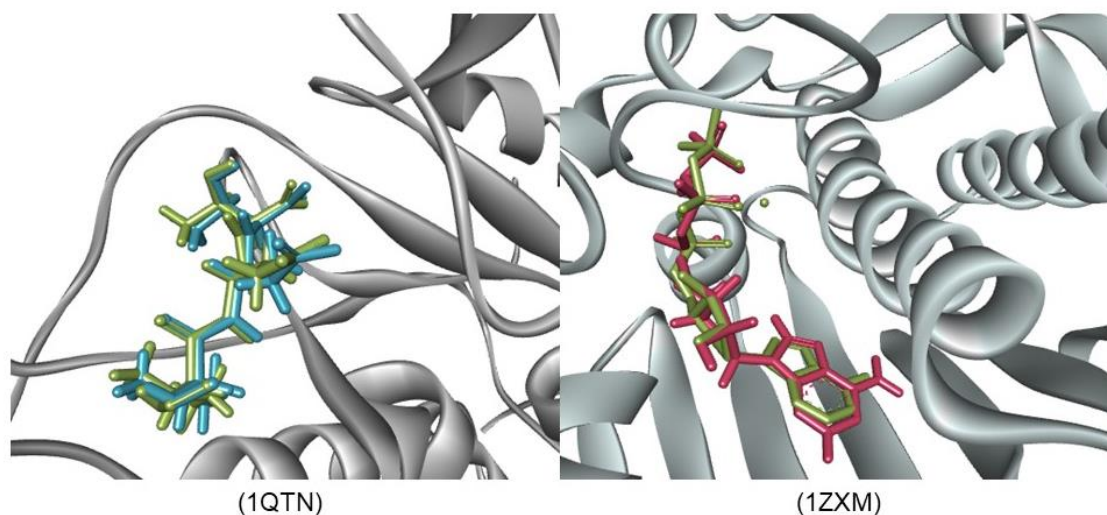


Figura 12 – Sobreposição das poses geradas no processo de re-docking com o ligante cristalografado.

Legenda: (1QTN) – em azul, confômero gerado no re-docking e em verde ligante cristalografado; (1ZXM) – em rosa, confômero gerado no re-docking e em verde ligante cristalografado.

Em seguida foram analisadas as ligações dos compostos selecionados (4, 14, 15, 17, 19, 20) ao sítio da caspase 8, sendo selecionadas as posições mais favoráveis, isto é, com a menor valor obtido pelo *MolDock Score* (Figura 13). Ao se selecionar estas posições, acredita-se que a ligação ao sítio receptor seja a mais favorável e estável (Tavares *et al.*, 2015).

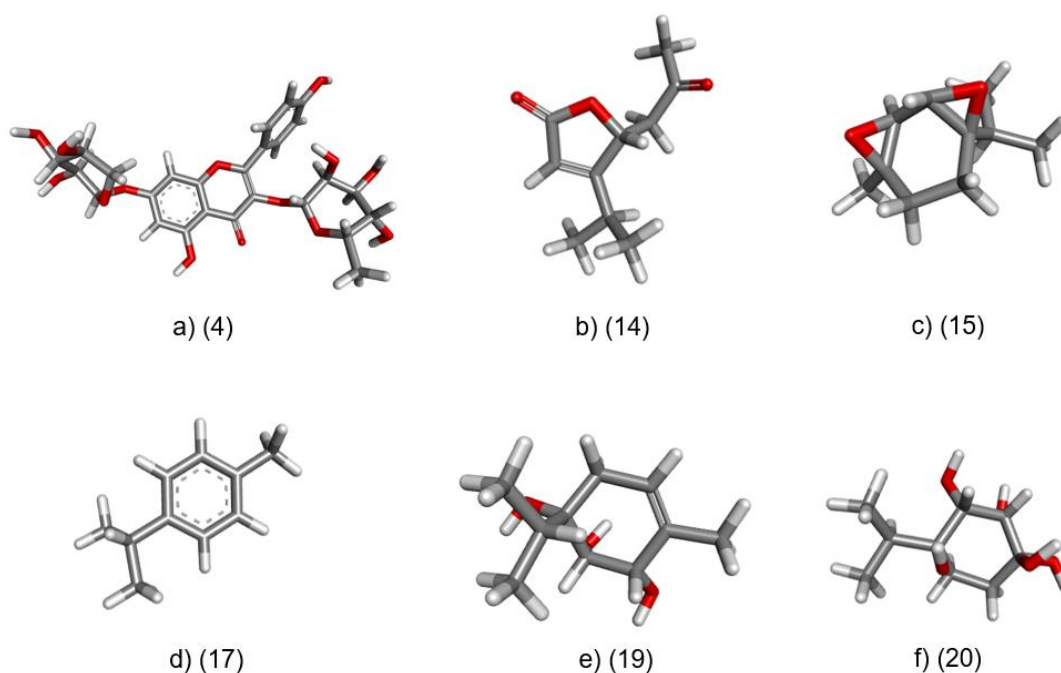


Figura 13 – Conformações dos compostos selecionados e sua configuração durante a ligação ao sítio 1QTN (caspase 8).

Legenda: a) (4) kempferol-3-rhamnosideo-7-xilosideo; b) (14) chenopanona; c) (15) isoascaridol; d) (17) p-cimeno; e) (19) 1S,2S,3R,4S-1metil-4-(propano-2-il) ciclohexano-1,2,3,4-tetrol; f) (20) 1,2,3,4-tetrahidroxip-metano.

Em termos de interação entre os compostos e o sítio da caspase 8, observa-se, principalmente, interações de van der Waals e ligações de hidrogênio (Figura 14). Avaliou-se os tipos de ligações estabelecidas entre os compostos e o sítio da caspase, o 14 (Figura 14-b) apresentou um melhor perfil de interações favoráveis, isso pode explicar, parcialmente, o elevado potencial tóxico do composto.

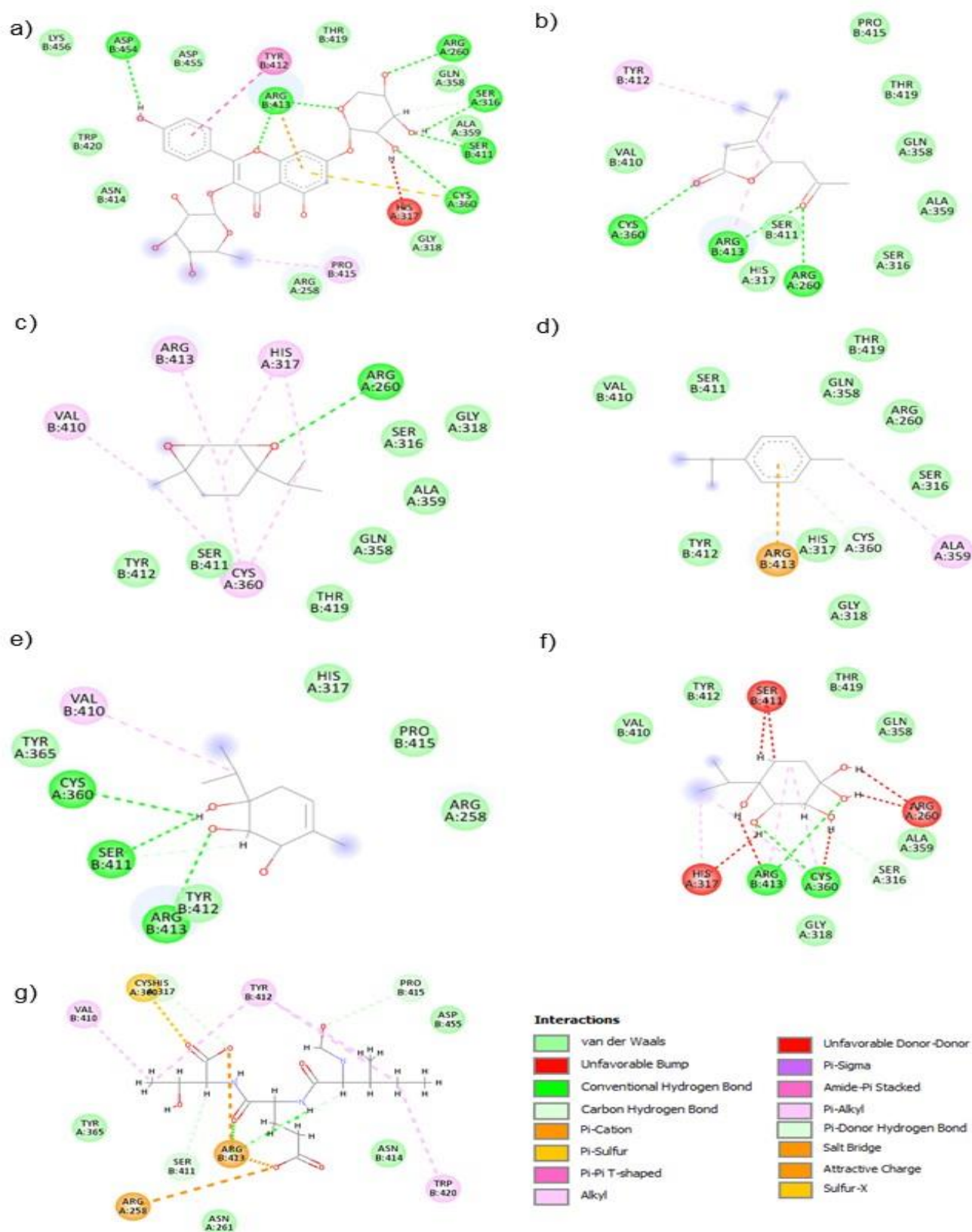


Figura 14 – Representação 2D das interações entre o sítio de ligação 1QTN da caspase 8 e os compostos.

Legenda: a) (4) kempferol-3-rhamnosideo-7-xilosideo; b) (14) chenopanona; c) (15) isoascaridol; d) (17) p-cimeno; e) (19) 1S,2S,3R,4S-1metil-4-(propano-2-il) ciclohexano-1,2,3,4-tetrol; f) (20) 1,2,3,4-tetrahidroxip-metano; g) (ligante cristalografado) acetil-ile-glu-thr-asp-aldeído.

Na figura 14 e na tabela 12 encontram-se todos os tipos de interações químicas estabelecidas entre os compostos e o sítio da caspase 8. Baseado na distância das ligações, pode-se sugerir que a ligação dos compostos 15 (c) e 17 (d) não parece ser muito estável, visto que, várias ligações possuem uma distância superior a 4Å. O composto 4 (a) tem um menor percentual de ligações com distância superior a 4 Å (Tabela 12), esse resultado correlacionado ao estudo de predição de atividade antitumoral mostra que pode haver o envolvimento da caspase 8 no potencial desta atividade para esse composto (Tabela 8), uma vez que há similaridade entre as interações que ocorrem entre o composto 4 e o ligante cristalografado com os aminoácidos do sítio de ligação da caspase 8.

Os resíduos que são determinantes na tríade catalítica da caspase 8 são: Cys 360, His 317 e Arg 258 (Watt *et al.*, 1999), destas, o composto 4 faz interações fortes do tipo ligação de hidrogênio e π -enxofre com Cys 360, além de interações de van der Waals (Asp B:445 e Asn B:414) comuns ao ligante cristalografado podendo estas estarem envolvidas na estabilidade do composto no sítio.

Enquanto o composto 15 (c), apesar do potencial antitumoral envolver apoptose, parece que a enzima responsável por essa atividade não é capase 8 (Tabela 8). O composto 17 (d), além da ligação desfavorável ao sítio da caspase, também, não apresentou potencial antitumoral no estudo de predição de atividades biológicas (Tabela 8).

Ainda, é importante considerar as interações de van der Waals, quando se analisada a classe de monoterpenos, muitos resíduos são comuns a elas, como: Thr B:419, Gln A:358, Ala A:359, Ser A:316, Ser B:411 e Tyr B:412. Esse pode ser um indício de que essas interações são importantes para o reconhecimento dessa classe de metabólitos com o sítio ativo desse receptor.

Tabela 12 – Energia e interação entre a enzima caspase 8 e os compostos selecionados (continuação).

Composto	Energia (kcal/mol)	Interação	Tipos	Distância (Å)	Interações de van der Waals
a) 4	-150,3	Asp B:453	LH	2,82	Lys B:456
		Tyr B:412	π - π em forma de T	4,33	Asp B:455
		Arg B:413	LH	3,39	Trp B:420
		Arg B:413	π -cátion	3,54	Asn B:414

Tabela 12 – Energia e interação entre a enzima caspase 8 e os compostos selecionados
(continuação).

Composto	Energia (kcal/mol)	Interação	Tipos	Distância (Å)	Interações de van der Waals
b) 14	-100,6	Arg B:413	LH	2,63	Thr B:419
		Arg B:413	LH	2,47	Arg A:258
		Ser A:360	LC-H	2,52	Gly A:318
		Ser A:360	LH	2,61	Ala A:359
		Ser B: 411	LH	3,16	Gln A:358
		Cys A:360	LH	2,93	
		Cys A:360	π -enxofre	5,88	
		His A:317	D-D DES.	2,38	
		Pro B:415	Alquil	3,69	
c) 15	-71,8	Tyr B:412	Alquil	4,81	Pro B:415
		Arg A:260	LH	2,77	Thr B:419
		Arg B:413	LH	2,89	Gln A:358
		Arg B:413	LH	3,18	Ala A:359
		Arg B:413	Alquil	4,44	Ser A:316
		Cys A:360	LH	3,19	His A:317
					Ser B:411
					Val B:410
d) 17	-71,2	Val B:410	Alquil	4,04	Tyr B:412
		Arg B:413	π -alquil	4,89	Ser B:411
		His A:317	π -alquil	5,22	Thr B:419
		His A:317	Alquil	4,25	Gln A:358
		Arg A:260	LH	3,10	Ala A:359
		Cys A:360	Alquil	3,52	Ser A:316
		Cys A:360	π -alquil	4,98	Gly A:318
		Cys A:360	Alquil	4,08	
e) 19	-56,9	Arg B:413	π -cátion	3,81	Val B:410
		Arg B:413	π -alquil	4,83	Ser B:411
		Ala A:359	alquil	4,31	Gln A:358
		Cys A:360	π -alquil	4,64	Thr B:419
					Arg A:260
					Ser A:316
					His A:317
					Gly A:318
f) 20	-72,4				Tyr B:412
		Arg B:413	LH	2,73	Tyr A:365
		Ser B:411	LC-H	2,68	Tyr B:412
		Ser B:411	LH	2,21	His A:317
		Cys A:360	Enxofre-X	3,20	Pro B:415
g) Redocking	-189,9	Val B:410	Alquil	4,59	Arg A:2258
		Arg B:413	LH	2,60	Val B:410
		Arg B:413	π -alquil	4,66	Tyr B:412
		Arg B:413	LD	1,88	Thr B:419
		His A:317	LD	2,05	Gln A:358
		His A:317	Alquil	5,23	Ala A:359
		Ser B:411	LD	1,75	Gly A:318
		Ser B:411	LD	2,25	
		Arg A:260	LD	2,11	
		Arg A:260	LD	1,74	
		Ser B:316	LC-H	2,76	
		Cys A:360	LD	2,15	
		Cys A:360	π -alquil	4,68	
		Cys A:360	alquil	5,24	
g) Redocking	-189,9	Val B:410	Alquil	3,74	Tyr A:365
		Cys A:360	Enxofre-	2,8	Asn A:261

Tabela 12 – Energia e interação entre a enzima caspase 8 e os compostos selecionados (conclusão).

Composto	Energia (kcal/mol)	Interação	Tipos	Distância (Å)	Interações de van der Waals
		His A:317	LC-H	3,37	Asn B:414
		Asj C:504	LD	2,04	Asp B:455
		Thr C:503	LD	2,21	
		Tyr B:412	π -alquil	4,47	
		Tyr B:412	π -alquil	5,27	
		Tyr B:412	π -alquil	4,72	
		Ace C:500	LD	2,15	
		Pro B:415	LC-H	3,22	
		Ile C:501	LD	1,35	
		Trp B:420	Alquil	5,11	
		Glu C:502	LD	2,21	
		Arg B:413	PS	2,88	
		Arg B:413	PS	2,60	
		Arg B:413	LC-H	3,03	
		Arg B:413	LH	1,75	
		Arg B:413	LH	2,86	
		Ser B:411	LC-H	2,50	
		Arg A:258	CA	5,48	

Legenda: 1QTN – caspase 8; LH- ligação de hidrogênio; LC-H – ligação carbono-hidrogênio; LD – ligação desfavorável; D-D Des. – Doador-doador desfavorável; PS – ponte salina; CA – carga atrativa. a) (4) kempferol-3-rhamnosideo-7-xilosideo; b) (14) chenopanona; c) (15) isoascaridol; d) (17) p-cimeno; e) (19) 1S,2S,3R,4S-1metil-4-(propano-2-il) ciclohexano-1,2,3,4-tetrol; f) (20) 1,2,3,4-tetrahidroxi-p-metano; g) (ligante cristalografado) acetil-ile-glu-thr-asp-aldeído.

Em outra análise, avaliou-se as ligações dos compostos selecionados (4, 14, 15, 17, 19, 20) ao sítio da topoisomerase II, sendo selecionadas as posições mais favoráveis, isto é, com menor valor obtido pelo *MolDock Score* (Figura 15). Ao se selecionar estas posições, acredita-se que a ligação ao sítio receptor seja a mais favorável e estável (Tavares *et al.*, 2015).

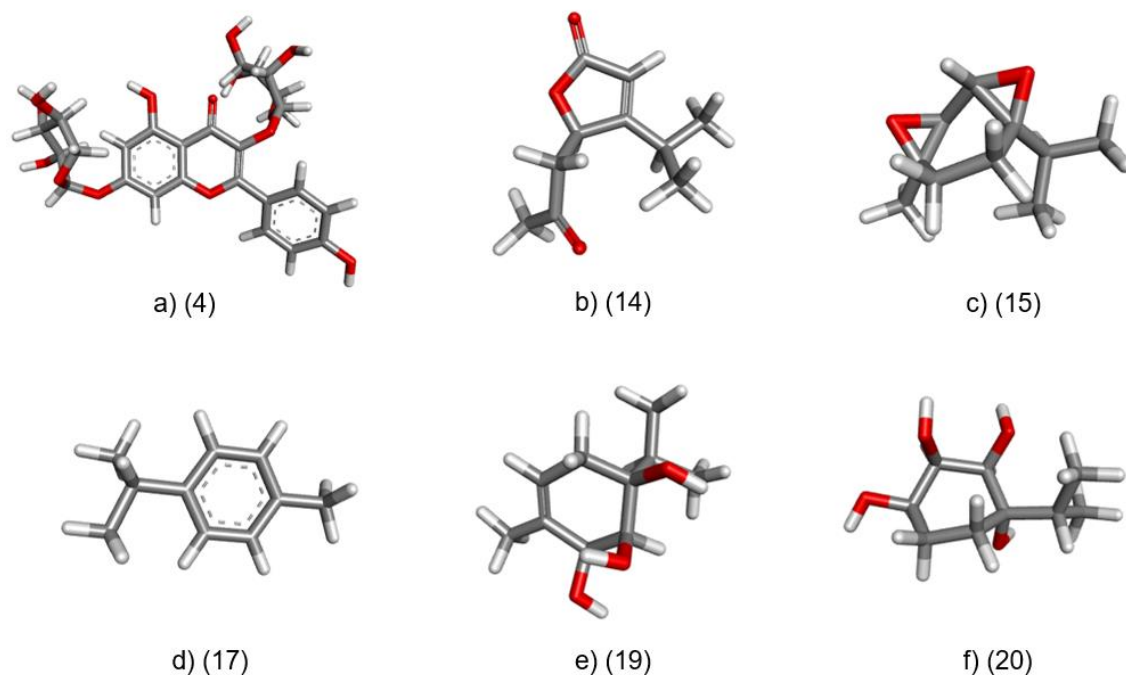


Figura 15 – Conformações dos compostos selecionados e sua configuração durante a ligação ao sítio 1ZXM (topoisomerase II). a) (4) kempferol-3-rhamnosideo-7-xilosideo; b) (14) chenopanona; c) (15) isoascaridol; d) (17) p-cimeno; e) (19) 1S,2S,3R,4S-1metil-4-(propano-2-il) ciclohexano-1,2,3,4-tetrol; f) (20) 1,2,3,4-tetrahidroxi-p-metano.

Os resultados da docagem molecular sugerem que as moléculas selecionadas são capazes de interagir com o sítio ativo da topoisomerase II. O composto 4 (a) apresentou um número significativo de ligações desfavoráveis (Figura 16), enquanto as demais moléculas apresentaram um melhor perfil nas interações com o sítio da TOPO II (Figura 16).

Quando se avaliou a distância das ligações dos compostos ao sítio de interação, os compostos 15, 17 e 19 apresentaram um elevado percentual de ligações maiores que 4,0 Å, já com o composto 14, as ligações foram menores que 4,0 Å. Os compostos 4 (a) e 20 (f) apresentaram poucas ligações superiores a 4,0 Å (Tabela 13).

Os principais resíduos de interação da topoisomerase II são: Glu-87, Asn-91, Asn-120, Ser-148, Lys-168, Lys 378 (Wei *et al.*, 2005), as moléculas 4, 14 e 20 são as únicas a formarem interações com estes resíduos, em que há interações mais favoráveis como ligação de hidrogênio e interações de van der Waals contribuindo na estabilização do sistema.

Até este momento, nenhum estudo avaliou a atividade antitumoral do composto 14 (b), isso explica a não predição desta atividade neste estudo. Como

a sua ligação a topoisomerase II parece ser muito favorável, é importante avaliar a atividade antitumoral em modelos *in vitro* e *in vivo*. Em relação ao composto 20 (f), que parece ligar de forma favorável a TOPO II, bem como no estudo de predição de atividades biológicas sugerem que a atividade antitumoral não deve ter relação com a apoptose (Tabela 8), é importante investigação que vise verificar se a TOPO II está envolvida na atividade antitumoral.

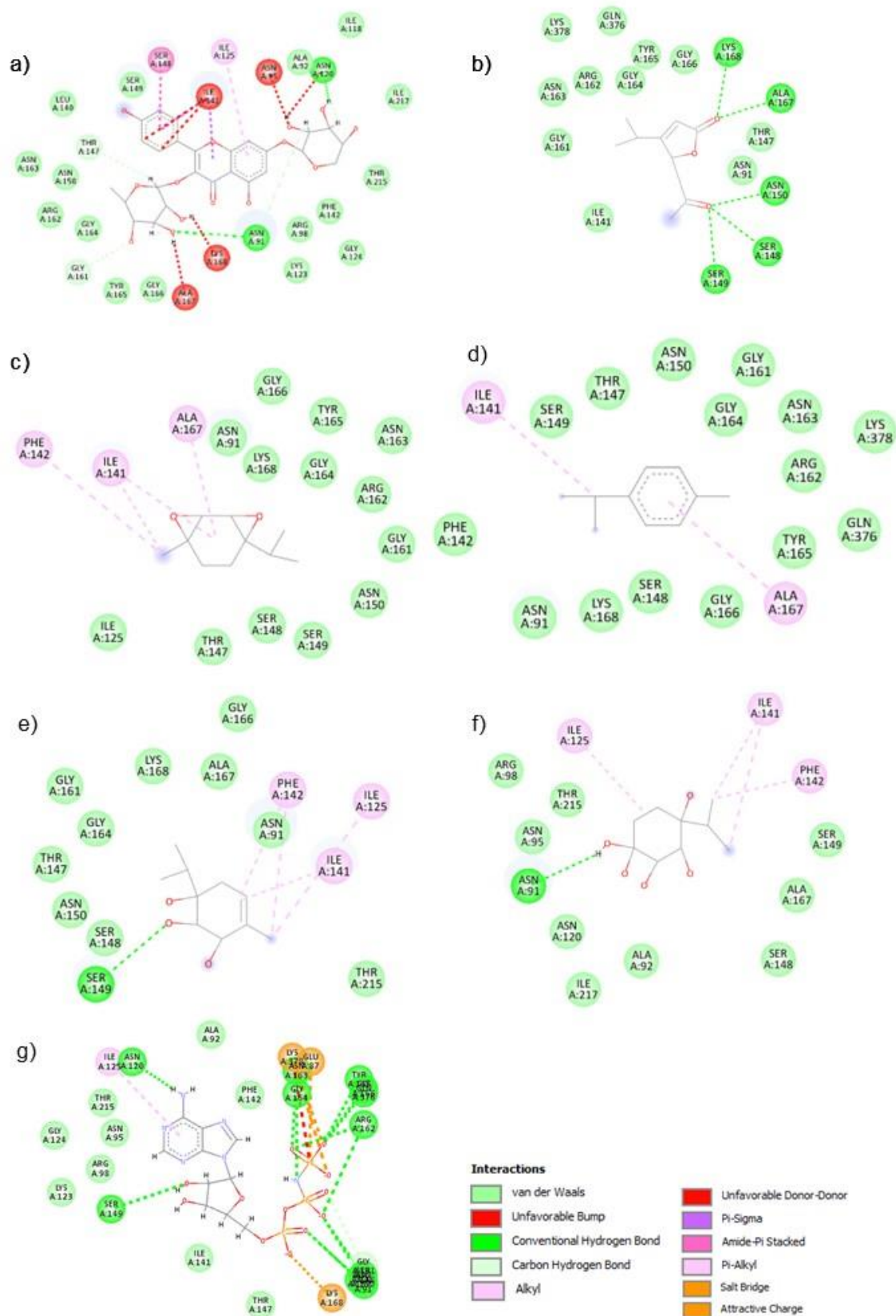


Figura 16 – Representação 2D das interações entre o sítio de ligação 1ZXN da topoisomerase II e os compostos.

Legenda: a) (4) kemperol-3-rhamnosideo-7-xilosideo; b) (14) chenopanona; c) (15) isoascaridol; d) (17) p-cimeno; e) (19) 1S,2S,3R,4S-1metil-4-(propano-2-il) ciclohexano-1,2,3,4-tetrol; f) (20) 1,2,3,4-tetrahidroxip-metano; g) (ligante cristalografado) estér de adenilato de ácido fosfoaminofosfônico.

Tabela 13 – Energia e interações entre a enzima 1ZXM (topoisomerase II) e os compostos selecionados (continuação).

Compostos	Energia (kcal/mol)	Interações	Tipos	Distância (Å)	Interações de van der Waals
a) 4	-121,75	Gly A:161	LC-H	3,33	Leu A:140
		Thr A:147	LC-H	1,78	Ser A:149
		Ser A:148	π -amida	3,16	Ala A:92
		Ile A:141	π -sigma	3,37	Ile A:118
		Ile A:141	LD	2,33	Ile A:217
		Ile A:141	LD	2,32	Thr A:215
		Ile A:141	π -sigma	3,84	Phe A:142
		Ile A:125	π -alquil	5,11	Gly A:124
		Asn A:95	LD	2,08	Lys A:123
		Asn A:120	LD	2,01	Arg A:98
		Asn A:120	LH	2,21	Gly A:166
		Asn A:120	LC-H	1,59	Tyr A:165
		Asn A:91	LC-H	3,06	Gly A:164
		Asn A:91	LH	2,74	Arg A:162
		Asn A:91	LC-H	2,93	Asn A:150
		Lys A:168	LD	1,59	Asn A:163
		Ala A:167	LD	2,37	
b) 14	-97,74	Lys A:168	LH	2,65	Lys A:378
		Ala A:167	LH	2,68	Gln A:376
		Asn A:150	LH	2,65	Asn A:163
		Ser A:148	LH	2,73	Arg A:162
		Ser A:149	LH	2,71	Gly A:164
		Ser A:149	LH	2,95	Tyr A:165
					Gln A:376
					Gly A:166
					Thr A:147
					Asn A:91
c) 15	-73,44	Phe A:142	π -alquil	5,09	Asn A:91
		Ile A:141	Alquil	4,91	Gly A:166
		Ile A:141	π -alquil	4,87	Lys A:168
		Ala A:167	π -alquil	4,40	Tyr A:165
					Gly A:164
					Asn A:163
					Arg A:162
					Gly A:161
d) 17	-73,18				Asn A:150
					Ser A:149
					Ser A:148
					Thr A:147
					Ile A:125
		Ile A:141	Alquil	4,30	Ser A:149
		Ala A:167	π -alquil	5,46	Thr A:147
					Asn A:150
					Gly A:164
					Gly A:161
					Asn A:163
					Lys A:378
					Gln A:376
					Tyr A:165
					Gly A:166
					Ser A:148
					Lys A:168
					Asn A:91
					Phe A:142

Tabela 13 – Energia e interações entre a enzima 1ZXM (topoisomerase II) e os compostos selecionados (conclusão).

Compostos	Energia (kcal/mol)	Interações	Tipos	Distância (Å)	Interações de van der Waals
e) 19	-75,78	Ser A:149	Lh	3,10	Ser A:148
		Phe A:142	π -alquil	4,60	Asn A:150
		Phe A:142	Alquil	5,28	Thr A:147
		Ile A:125	Alquil	4,93	Gly A:164
		Ile A:141	π -alquil	4,22	Gly A:161
f) 20	-73,38				Lys A:168
					Ala A:167
					Asn A:91
					Thr A:215
		Asn A:91	LH	2,51	Arg A:98
		Ile A:125	π -alquil	3,90	Thr A:215
		Ile A:141	Alquil	3,97	Asn A:95
		Ile A:141	Alquil	5,02	Asn A:120
		Phe A:142	alquil	3,78	Ile A:217
g) Redoc king	-232,4				Ala A:92
					Ser A:148
					Ala A:167
					Ser A:149
		Ile A:125	π -alquil	4,86	Gly A:124
		Asn A:120	LH	1,68	Lys A:123
		Gly A:164	LH	2,79	Thr A:215
		Asn A:163	LH	3,39	Asn A:95
		Lys A:378	CA	5,36	Arg A:93
		Lys A:378	CA	4,65	Ala A:92
		Lys A:378	CA	4,35	Phe A:142
		Glu A:87	CA	4,43	Ile A:141
		Tyr A:165	LH	3,20	Thr A:147
		Gly A:166	LH	2,86	
		Gln A:376	LH	2,59	
		Arg A:162	LH	2,58	
		Arg A:162	LH	3,30	
		Gly A:161	LC-H	3,19	
		Ser A:148	LH	2,87	
		Ala A:167	LH	3,05	
		Asn A:150	LH	3,36	
		Asn A:91	LH	3,34	
		Lys A:168	PS	2,44	
		Ser A:149	LH	2,83	

Legenda: 1ZXM – topoisomerase II; LH- ligação de hidrogênio; LC-H – ligação carbono-hidrogênio; LD – ligação desfavorável; D-D Des. – Doador-doador desfavorável; PS – ponte salina; CA – carga atrativa. a) (4) kempferol-3-rhamnosideo-7-xilosideo; b) (14) chenopanona; c) (15) isoascaridol; d) (17) p-cimeno; e) (19) 1S,2S,3R,4S-1metil-4-(propano-2-il) ciclohexano-1,2,3,4-tetrol; f) (20) 1,2,3,4-tetrahidroxi-p-metano; g) (ligante cristalografado) éster de adenilato de ácido fosfoaminofosfônico.

6. CONCLUSÃO

Os resultados mostram que os extratos e frações de *D. ambrosioides* apresentam potencial citotóxico e genotóxicos frente aos organismos-teste desse estudo, essa toxicidade parece estar relacionada principalmente a presença de compostos terpênicos que compõe a planta, uma vez que as

amostras de maior polaridade apresentam perfis mais tóxicos em comparação às demais. Dessa forma, o estudo *in silico* contribuiu ao esclarecer que dentre os compostos selecionados, os terpenos também apresentam maior toxicidade apesar de promissoras atividades biológicas, de maneira geral, a classe de flavonóides parece ser mais promissora a potencial biológico devido os seus parâmetros baixos de toxicidade, reações adversas e boa farmacocinética. Além disso, para os compostos utilizados na docagem molecular fica claro que o composto 4 é candidato a possuir atividade antitumoral por ativação da caspase 8 e que o composto 20, apesar de apresentar a mesma atividade, esta não está relacionada a qualquer uma das enzimas estudadas.

REFERÊNCIAS

- ABEL, P.D. **Water Pollution biology**. Ellis Horwood Ltd, Publishers, Chichester, 1989.
- AGUILAR, B.R.; DOMÍNGUEZ, S.R.; NIETO, J.C.; ALFARO, M.A.M. Las plantas medicinales. In: **Plantas, cultura y sociedade: estúdio sobre la relación entre seres humanos y plantas em los albores del siglo XXI**. México: Universidade Autônoma Metropolitana, 2001.
- AHMED, A.A. Highly oxygenated monoterpenes from *Chenopodium ambrosioides*. **J. Nat. Prod.** v.63, p. 989-991, 1999.
- AJAY, A.; BEMIS, G.W.; MURCKO, M.A. Designing libraries with CNS activity. **J Med Chem.** v. 42, n. 24, p. 4942-4951, 1999.
- ALONSO-CASTRO, A.J.; DOMÍNGUEZ, F.; RUIZ-PADILHA, A.J.; CAMPOS-XOLALPA, N.; ZAPATA-MORALES, J.R.; CARRANZA-ALVAREZ, C.; MALDONADO-MIRANDA, J.J. Medicinal plants from North and Central America and the Caribbean Considered Toxic for humans: the Other side of the coin. **Evidence-Based Complementary and Alternative medicine**. p. 1-28, 2017.
- AMADO, N. G.; FONSECA, B.F.; CERQUEIRA, D.M.; NETO, V.M.; ABREU, J.G. Flavonoids: potential wnt/beta-catenin signaling modulators in cancer. **Life Sci.** v. 89, n. 15-16, p. 545-554, 2011.
- AMARANTE, C.B.; MÜLLER, A.H.; PÓVOA, M.M.; DOLABELA, M.F. Phytochemical study bioassay-guided by tests of toxicity on *Artemia salina* and antiparasitic activity from stem of aninga (*Montrichardia linifera*). **Acta amazônica**. v. 41, n. 3, p. 431-434, 2011.
- AMES, B.N.; GURNEY, E.G.; MILLER, J.; BARTSCH, H. Carcinogens as frameshift mutagens: metabolites and derivatives of 2-acetylaminofluorene and Other aromatic amine carcinogens. **Proc. Natl Acad Sci USA**. V. 69, n. 11, p. 3128-3132, 1972.
- ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. **Animais de laboratório: criação e experimentação** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002, p. 388, 2002.
- ARAPITSAS, P. Identification and quantification of polyphenolic compounds from okra seeds and skins. **Food Chem**, v. 110, p. 1041-1045, 2008.
- ARAPALLIA, S.K.; LEE, C.; SIM, S.; LEE, K.; JO, H.; JUN, K.Y.; KWON, Y.; KANG, J.S.; JUNG, J.K.; LEE, H. Development of 13H-benzo[f]chromeno[4,3-b][1,7] naphthyridines and their salts as potent cytotoxic agents and topoisomerase I/IIa inhibitors. **Bioorg Med Chem**. V. 26, n. 18, p. 5181-5193, 2018.
- 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.

AS LIMITAÇÕES E OS PERIGOS DA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. O holocausto animal, 2014. Disponível em:

<https://oholocaustoanimal.wordpress.com/2014/03/31/as-limitacoes-e-os-perigos-da-experimentacao-animal>. Acesso: 15 de julho de 2022.

BADKE, M.R.; SOMAVILLA, C.A.; HEISLER, E.V.; ANDRADE, A.; BUDÓ, M.L.D.; GERLAT, T.M.B.; LAUTENSCHLERGER, G. Saber popular: uso de plantas medicinais como forma terapêutica no cuidado à saúde. **Revista de enfermagem da UFSM**. p. 190-200, 2016.

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.

BARBOSA, E.M. The toxicology in the environmental health: application of the toxicokinetics concepts. **Cad. Saúde colet.** v. 13, n. 4, p. 869-886, 2005.

BEATRICI, A.C.; ARENZON, A.; COIMBRA, N.J.; RAYA-RODRIGUEZ, M.T. Fertilidade e sensibilidade de *Daphnia similis* e *Daphnia magna* submetidas a diferentes cultivos. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.** v. 1, n. 2, p. 123-126, 2006.

BEDNARCZUK, V.O.; VERDAM, M.C.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Tests in vitro and in vivo used in toxicological screening of natural products. **Visão Acadêmica**. V. 11, n. 2, p. 43-50, 2010.

BEHLING, E.B.; SENDÃO, M.; C.; FRANCESCATO, H.D.C.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alim. Nutr.** v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

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.

BIANCHI, J.; FERNANDES, T. C.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. *Chemosphere*, v. 144, p. 475-83, 2016.

BIESKI, I.G.C.; LEONTI, M.; ARNASON, J.T.; FERRIER, J.; RAPINSKI, M.; VIOLANTE, I.M.P.; BALOGUN, S.O.; PEREIRA, J.F.C.A.; FIGUEIREDO, R.C.F.; LOPES, C.R.A.S.; SILVA, D.R.; PACINI, A.; ALBUQUERQUE, U.P.; MARTINS, D.T.O. Ethnobotanical study of medicinal plants by population of Valley of Juruena Region, Legal Amazon, Mato Grosso, Brazil. **Journal of ethnopharmacology**. v. 173, p. 383-423, 2015.

BORGES, A.R.; AIRES, J.R.A.; HIGINO, T.M.M.; MEDEIROS, M.G.F.; CITÓ, A.M.G.L.; LOPES, J.A.D.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Exp Parasitol.** v.132, n. 2, p. 123-8, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira. Brasília: ANVISA, 2016.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Biodiversidade Brasileira. 2022. Acesso em: <<https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade>>.

BRASIL. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas-SINITOX [Recursos eletrônico]. Disponível em: <https://sinitox.iciict.fiocruz.br/dados-regionais>. Acesso: Maio de 2023.

BRITO, A. F.; RIBEIRO, M.; ABRANTES, A.M.; GONÇALVES, A.C.; SARMENTO-RIBEIRO, A.B.; TRALHÃO, J.G.; BOTELHO, M.F. Ação anti-cancerígena da quercetina no carcinoma hepatocelular: o papel do GLUT-1. **Rev. Port. Cir.**, n. 25, p. 798-806, 2015.

CAETANO, N.L.B.; FERREIRA, T.F.; REIS, M.R.O.; NEO, G.G.A.; Carvalho, A.A. 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.; LOPES, A.J.O.; JÚNIOR, L.M.C.; LIMA, F.C.A.; SILVA, L.A.; PEREIRA, W.S.; AMARAL, F.M.M.; GARCIA, J.B.G.; CARTAGENES, M.S.S.; NASCIMENTO, F.R.F. *Chenopodium ambrosioides* L. Reduces Synovial Inflammation and pain in experimental osteoarthritis. **Plos One**. V. 10, n. 11, 2015.

CAMARGO, M.T.; SCAVONE, O. Plantas usadas como anti-helmíntico na medicina popular. **Rev. Científica da Diretoria de Pesquisas Sociais**. v.6, n.1, 1979.

CAMPOS, S.C.; SILVA, C.G.; CAMPANA, P.R.V.; ALMEIDA, V.L. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de plantas medicinais**. v.18, p.373-382, 2016.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**. v.72, p.722-725, 2008.

CECHINEL-ZANCHETT, C.C. Preclinical and clinical studies of selected plants species in Mercosul countries and toxicological aspects. **Infarma ciências farmacêuticas**. v. 29, p. 284-301, 2017.

ÇETINKAYA, S.; AKÇA, K.T.; SÜNTAR, I. Flavonoids and anticancer activity: structure-activity relationship. **Studies in natural products chemistry**. v. 74, p. 81-115, 2022.

CHEKEM, M.S.G.; LUNGA, P.K.; TAMOKOU, J.D.; KUIATE, J.R.; TANE, P.; VILAREM, G.; CERNY, M. Antifungal properties of *Chenopodium ambrosioides* essential oil against candida species. **Pharmaceuticals**. v. 3, n. 9, p. 2900-2909, 2010.

CHEMAXON. **MarvinSketch**, [s.d]. Disponível em: <<http://www.chemaxon.com/>>.

CHEN, X.; SINGH, A.; KITTS, D.D. In-vitro bioaccessibility and bioavailability of heavy metals in mineral clay complex used in natural health products. **Sci. Rep.** V. 10, n. 1, 2020.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quim. Nova.** v. 31, n. 7, p 1820-1830, 2008.

CRIQUI, M.H.; RINGEL, B.L. Does diet or alcohol explain the French paradox? **Lancet.** v. 344, p. 1719-1723, 1994.

CRUZ, G.V.B.; PEREIRA, P.V.S.; PATRÍCIO, F.J.; COSTA, G.C.; SOUSA, S.M.; FRAZÃO, J.B.; ARAGÃO-FILHO, W.C.; MACIEL, M.C.G.; SILVA, L.A.; AMARAL, F.M.M.; BARROQUEIRO, E.S.B.; GUERRA, R.N.M.; NASCIMENTO, F.R.F. Increase of cellular recruitment, phagocytosis ability and nitric oxide production induced by hydroalcoholic extract from *Chenopodium ambrosioides* leaves. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 111, p. 148-154, 2007.

CRUZ, J.H.A.; MOREIRA, I.C.S.; ALVES, M.F.V.; OLIVEIRA, H.M.B.F.; OLIVEIRA FILHO, A.A.; ALVES, M.A.S.G. Analysis of pharmacological and toxicological activity of neral monoterpene related to Dentistry: study in sílico. **Arch Health Invest.** v. 8, n. 11, p.674-680, 2019.

CRUZ, L.S.P.; GRASSI, N. Weed control in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) with herbicides. **Planta daninha.** v. 4, n.2, p. 73-77, 1981.

DE GROOT, L.; ABALOVICH, M.; ALEXANDER, E.K.; AMINO, N.; BARBOUR, L.; COBIN, R.H.; EASTMAN, C.J.; LAZARUS, J.H.; LUTON, D.; MANDEL, S.L.; MESTMAN, J.; ROVET, J.; SULLIVAN, S. Manegement of thyroid dysfunction during pregnancy and postpartum: an Endocrine Society clinical practice guideline. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 97, n. 8, p. 2543-2565, 2012.

DE MACEDO, K.G.; DE MELO FILHO, C.C.; ANDRADE, C.H. Avaliação in sílico da toxicidade de fármacos. **Revista Eletrônica de Farmácia.** v. 10, n. 1, p. 1, 2013.

DE MELO, D. B., DE MACEDO, L. M., DE ALMEIDA, I. O., PEREIRA, T. D. R. S., DA SILVA, T. M., LEAL, M. M. T., MELO, G. A., DE SANTANA, L. L. B. **Intoxicação por plantas no Brasil: uma abordagem cienciométrica.** *Brazilian Journal of Development*, 7(4), 40919-40937. 2021.

DE PASCUAL, T.J.; TORRES, B.C.; PEREZ, M.A. Essential oil of *Chenopodium ambrosioides*. **Rivista Italiana Essenze.** v. 62, p. 123-125, 1980.

DE SOUSA, G.A.; MARTINS, I.V.O.; PIMENTEL, V.D.; SOUSA, J.A. In sílico analysis of the pharmacodynamics, pharmacokinetics and toxicity of two compounds isolated from *Actinidia deliciosa* for investigation of their anti-hyperlipemic potential. **Research, Society and development.** v. 9, n. 7, p.1-20, 2022.

DE SOUZA, L.P.; ZAGO, H.B.; COSTA, A.V.; STINGUEL, P.; VALBON, W.R. Composição química e a atividade acaricida do óleo essencial de erva-de-santa-maria sobre o ácaro-rajado. **Revista Caatinga,** v. 28, n. 1, p. 160-166, 2015.

DEGENHARDT, R.T.; FARIAS, I.V.; GRASSI, L.T.; FRANCHI JR., G.C.; NOWILL, A.E.; BITTENCOURT, C. M. DA S.; WAGNER, T.M.; SOUZA, M.M. DE. CRUZ, A.B.; MALHEIROS, A. Characterization and evaluation of the cytotoxic potential of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 26, n. 1, p. 56-61, 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.

DHOOGHE, E.; DENIS, S.; EECKAUT, T.; REHUEL, D.; LABEKE, M.C.V. In vitro induction of tetraploids in ornamental *Ranunculus*. **Euphytica**. v. 168, p.30-40, 2009.

DRWAL, M.N.; BANERJEE, P.; DUNKEL, M.; WETTING, M.R.; PREISSNER, R. ProTox: a web server for the in sílico prediction of rodent oral toxicity. **Nucleic Acids Res.** v. 42, p. 1-6, 2014.

ERTL, P.; ROHDE, B.; SELZER, P. Fast calculation of molecular polar surface área as a sum of fragmente-based contributions ans its application to the prediction of drug transport properties. **J. Med. Chem.** v. 43, p. 3714-3717, 2000.

FERREIRA, F.G.; POLLI, M.C.; OSHIMA-FRANCO, Y.; FRACETO, L.F. Drugs: from development to withdrawal. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 6, n. 1, p. 14-24, 2009.

FERREIRA, L.S. **Análise da variação populacional e caracterização dos metabólitos secundários presentes nas folhas de *Lychnophora granmongolense* (Duarte) Semir & Leitão Filho.** Dissertação de mestrado (Mestrado em ciências farmacêuticas). Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo. p.114, 2010.

FERREIRA, S.A.M.; ROMÁRIO-SILVA, D.; OLIVEIRA, P.A.P.; SETTE-DE-SOUZA, P.H.; RODRIGUES, A.C.; SILVA, A.C.B. Medicinal plants: knowledge and use by users of Basic Health Units in Araruna-PB, Brazil. **Arch Health Invest.** v.10, n.8, p. 1231-1236, 2021.

FILHO, R.B. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química nova**. v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

FILIMONOV, D.A.; POROIKOV, V.V.; KARAICHEVA, E.I.; KAZARIAN, R.K.; BUDUNOVA, A.P.; MIKHAILOVSKII, E.M.; RUDNITSKIKH, A.V.; GONCHARENKO, L.V.; BUROV, LU.V. The computerized prediction of the spectrum of biological activity of Chemical compounds by their structural formula: the PASS system. Prediction of Activity Spectra for substance. **Eksp Klin Farmakol.** V. 58, n. 2, p. 56-62, 1995.

FRISCH, M.J. *et al.*. **Gaussian 09 (Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009).** 2009.

FRIESNER, R.A.; BANKS, J.L.; MURPHY, R.B.; HALGRAN, T.A.; KLICIC, J.J.; MAINZ, D.T.; REPASKY, M.P.; KNOLL, E.H.; SHELLEY, M.; PERRY, J.K.; SHAW, D.E.; FRANCIS, P.; SHENKIN, P.S. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. **Journal of Medicinal chemistry**. v. 47, n. 7, p. 1739-1749, 2004.

GADANO, A.; GURNI, A.; LÓPEZ, P.; FERRARO, G.; CARBALLO, M. In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of ethnopharmacology*. v.81, p. 11-16, 2002.

GADANO, A.B.; GURNI, A.A.; CARBALLO, M.A. Argentine folk medicine: Genotoxic effects of *Chenopodiaceae* Family. **Journal of ethnopharmacology**. v.103, p. 246-251, 2006.

GHAREEB, M.A.; SAAD, A.M.; ABDOU, 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.; MONZOTE, L.; STAMBERG, W.; STANIEK, K. Toxicity of ascaridole from *Chenopodium ambrosioides* in mammalian mitochondria. **BMC Pharmacol**. V. 10, n. 1, 2010.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Medicinal plants: factors of influence on the contents of secondary metabolites. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOLD, L.S.; SLONE, T.H.; MANLEY, N.B.; GARFINKEL, G.B.; HUDES, E.S.; ROHRBACH, L.; AMES, B.N. The carcinogenic potency database: analyses of 4000 chronic animal cancer experiments published in the general literature and by the U.S National Cancer Institute/National Toxicology Program. **Environ Health Perspect**. v. 96, p. 11-15, 1991.

GONÇALVES, L.S.D. **Teste de Ames: contributo para o estudo da genotoxicidade das águas**. Dissertação de mestrado - (mestrado em biologia humana e ambiente). Lisboa: ULisboa, p.48, 2016.

GONZALEZ, E.; JAIN, S.; SHAH, P.; TORIMOTO-KATORI, N.; ZAKHAROV, A.; NGUYEN, D.T.; SAKAMURU, S.; HUANG, R.; XIA, M.; OBACH, R.S.; HOP, C.E.C.A.; XU, X. Development of robust quantitative structure-activity relationship models for CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4 Catalysis and Inhibition. **Drug Metab Dispos**. v. 49, n. 9, p. 822-832, 2021.

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.
GUILHERMINO, L.; DIAMANTINO, T.; SILVA, M.; SOARES, A. Acute toxicity test with *Daphnia magna*: an alternative to mammals in the prescreening of Chemical toxicity. **Ecotoxicology and environmental safety**. v. 46, p. 357-362, 2011.

GUILHERMINO, L.; LOPES, M.C.; CARVALHO, A.P.; SOARES, A.M. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. **Chemosphere**. v. 32, n.4, p. 727-738, 1996.

GUPTA, M.P. (1995). **270 Plantas medicinales ibero-americanas**. Bogotá: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología, Cytel, Convenio Andres Bello, p. 233.

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 LAAK, 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.

HARBORNE, J.B. **Higher plant-lower plant interaction: phytoalexins and phytotoxins**. Introduction to Ecological Biochemistry. 4. ed. New York, Academic Press, 1992. p. 264-297.

HARRAZ, F.M.; HAMMODA, H.M.; EL GHAZOULY, M.G.; FARAG, M.A.; EL-ASWAD, A.F.; BASSAM, S.M. Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activities of the essential oils of *Conyza linifolia* and *Chenopodium ambrosioides*. **Natural product Research**. v.29, n. 9, 2014.

HEVENER, K.E.; ZHAO, W.; BALL, D.M.; BABAOGLU, K.; QI, J.; WHITE, S.W.; LEE, R.E. Validation of molecular docking programs for virtual screening Against dihydropterolate synthase. **J Chem Inf Model**. v. 49, n. 2, p. 444-460, 2009.

HODGSON, J. ADMET – turning chemicals into drugs. **Nature**. v. 19, p. 722-726, 2001.

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.

HUNG, J. Y.; HSU, Y.L.; KO, Y.C.; TSAI, Y.M.; YANG, C.J.; HUANG, M.S.; KUO, P.L. Dldymin, a dietary flavonoid glycoside from citrus fruits, induces fas-mediated apoptotic pathway in human non-small-cell lung cancer cells in vitro and in vivo. **Lung Cancer**. v. 68, n. 3, p. 366-374, 2009.

IBIRONKE, G.F.; AJIBOYE, K.I. Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Chenopodium ambrosioides* leaf extract in rats. *International Journal of Pharmacology*. v. 3, n. 1, p.111-115, 2007.

Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Re flora: Flora do Brasil 2020 - Algas, Fungos e Plantas. 2018.

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.

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.

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.; PIANA, M.; FREITAS, R.B.; BRUM, T.F.; ALVES, C.F.S.; BELKE, B.V.; MOSSMANN, N.J.; CRUZ, R.C.; SANTOS, R.C.V.; DALMOLIN, T.V.; BIANCHINI, B.V.; CAMPOS, M.M.A.; BAUERMANN, L.F. In vitro antimicrobial and antimycobacterial activity and HPLC-DAD screening of phenolics from *Chenopodium ambrosioides* L. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 49, n. 2, p. 296-302, 2018.

JORGE, L.; FERRO, V.; KOSCHTSCHAK, M.R.W. Diagnose comparativa das espécies *Chenopodium ambrosioides* L. (erva-de-santa-maria) e *Coronopus didymus* (L.) Sm (mastruço): principais características morfo-histológicas e químicas. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.1, n.2, p. 143-153, 1986.

KIM, P.K.; SON, K.H.; CHANG, H.W.; KANG, S.S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **J. Pharmacol. Sci.** v. 96, n. 3, p. 229-245, 2004.

KIUCHI, F.; ITANO, Y.; UCHIYAMA, N.; HONDA, G.; TSUBOUCHI, A.; NAKAJIMA-SHIMADA, J. *et al.* Monoterpene hydroperoxides with trypanocidal activity from *Chenopodium ambrosioides*. **Journal of Natural Products**. v. 65, n. 4, p. 509-512, 2002.

KLIKS, M.M. Studies on the traditional herbal anthelmintic *Chenopodium ambrosioides* L.: ethnopharmacological evaluation and clinical fields trials. **Social science & Medicine**. v. 21, n. 8, p. 879-886, 1985.

KUMMER, R. **Efeitos do p-cimeno e do alfa-pineno sobre a resposta inflamatória aguda**. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Maringá: Universidade estadual de Maringá, p. 59, 2015.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. allium cepa a test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutation Research*. 682, 71-81, 2009.

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.

LORENZI, H.; MATOS F.J.A (2002). **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa:Plantarum, p. 512.

MACDONALD, D.; CREY, K.V.; HARRISON, P.; RANGACHARI, P.K.; ROSENFELD, J.; WARREN, C.; SOGER, G. Ascaridole-less infusions of *Chenopodium ambrosioides*

contain a nematocide(s) that is (are) not toxic to mammalian smooth muscle. **J. ethnopharmacol.** v.92, n. 2-3, p. 215-221, 2004.

MACIEL, J.M.M.P. Análise retrospectiva das intoxicações por plantas no Brasil no período de 2000-2015. **Revista revinter.** v.11, n.3, p.74-86, 2018.

MAIA, E.H.B.; ASSIS, L.C.; OLIVEIRA, T.A.; SILVA, A.M.; TARANTO, A.G. Structure-based virtual screening: from classical to artificial intelligence. **Frontiers.** V. 8, p. 1-18, 2020.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Natural product analysis over the last decades. **Planta Med.** v. 75, p. 672-682, 2009.

MARTINS, B.X. **Ação inibitória de monoterpenos sobre bombas de prótons induzindo morte celular em melanoma.** Dissertação de mestrado (Mestrado em Biociências e biotecnologia). Campos de Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense. p. 87, 2013.

MATOS, J.A.L. **Potencial biológico de *Chenopodium ambrosioides* L. (erva-de-santa-maria).** Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Porto: Universidade Fernando Pessoa. p. 61, 2011.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of medicinal plant research planta medica.** v.45, p. 31-34, 1982.

MONTOYA-CABRERA, M.A.; ESCALANTE-GALINDO, P.; MECKES-FISHER, M.; SÁNCHEZ-VACA, G.; FLORES-ALVAREZ, E.; REYNOSO-GARCÍA, M.. Envenenamiento mortal causado por el aceite de epazote, *Chenopodium graveolens*. **Gaceta Medica de México,** v. 132, p. 433-438, 1996.

MONZOTE, L.; PASTOR, J.; SCULL, R.; GILLE, L. Antileishmanial activity of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and its main components Against experimental cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. **Phytomedicine.** v. 21, n. 8-9, p. 1048-1052, 2014.

MONZOTE, L.; STAMBERG, W.; STANIEK, C. GILLE, L. Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. **Toxicol. Appl Pharmacol.** v. 240, n. 3, p. 337-347, 2009.

MORESCHI, D.A.B.; LEITE-MELLO, E.V.S.; BUENO, F.G. Ação cicatrizante de plantas medicinais: um estudo de revisão. **Arq. Cienc. Saúde UNIPAR.** v. 22, n. 1, p. 63-69, 2018.

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.

MOURA, M.C.L.; ARAÚJO, V.L.L.; DE SOUSA, J.A. Análise farmacocinética, toxicológica e farmacodinâmica in sílico do flavonóide quercetina isolado das sementes de Bixa orellana L. **Research, Society and development**. v.9, n. 3, p. 1-27, 2020.

MOVILEANU, L.; NEAGOE, L.; FLONTA, M.L. Interaction of the antioxidant flavonoid quercetin with planar lipid bilayers. **Int J Pharm**. v.205, n. 1-2, p. 135-146, 2000.

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.

NASCIMENTO, F.R.F.; CRUZ, G.V.B.; PEREIRA, P.V.S.; MACIEL, M.C.G.; SILVA, L.A.; AZEVEDO, A.P.S.; BARROQUEIRO, E.S.B.; GUERRA, R.N.M. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by Chenopodium ambrosioides L. treatment. **Life Sci**. v. 78, n. 22, p. 2650-2653, 2006.

NEGRO, R.; SCHWARTZ, A.; GISMONDI, R.; TINELLI, A.; MANGIERI, T.; STAGNARO-GREEN, A. Increased pregnancy loss rate in thyroid antibody negative women with TSH levels between 2.5 and 5.0 in the first trimester of pregnancy. **J Clin Endocrinol Metab**. v. 95, n. 9, p. 44-48, 2010.

NGO BUM, E.; SOUDI, S.; AYISSI, E.R.; DONG, C.; LAKOULO, N.H.; MAIDAWA, F.; SEKE, P.F.E.; NANGA, L.D.; TAIWE, G.S.; DIMO, T.; NJIKAM, N.; RAKOTONIRINA, A.; RAKOTONIRINA, S.V.; KAMANYI, A. Anxiolytic activity evaluation of four medicinal plants from Cameroon. **Afr J Tradit Complement Altern Med**. v. 8, n. 5, p. 130-139, 2011.

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.

OLIVEIRA, R.B.; GODOY, S.A.P.; COSTA, F.B. **Plantas tóxicas: Conhecimento e prevenção de acidentes**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2003, 64 p.

OLSSON, M.; ZHIVOTOVSKY, B. Caspases and câncer. **Nature**. p. 1-9, 2011.

OOTANI, M.A.; AGUIAR, R.W.S.; RAMOS, A.C.C.; BRITO, D.R.; SILVA, J.B.; CAJAZEIRA, J.P. Use of essencial oils in agriculture. **Journal of biotechnology and biodiversity**. V.4, n. 2, p. 162-174, 2013.

OTTOBONI, M.A. **The dose makes the poison**. 2 ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991, 244 p.

PANDIANGAN, D.; LAMLEAN, P.Y.; MANINGKAS, P.F.; NAINGGOLAN, N.; UNITLY, A.J.A. Antioxidant and anticâncer activity test of "pasote" leaf water extracts (Dysphania ambrosioides L.) by in vitro method in Leukemia Cancer cells. **Journal of Physics**. v.1463, p. 1-9, 2020.

PARKER, A.L.; TEO, W.S.; MCCARROLL, J.A.; KAVALLARIS, M. An emerging role for tubulin isotypes on modulating cancer biology and chemotherapy resistance. **Int. J.Mol. Sci.**, v. 18, n. 7, p. 1434, 2017.

PATRÍCIO, F.J.; COSTA, G.C.; PEREIRA, P.V.S.; ARAGÃO-FILHO, W.C.; SOUSA, S.M.; FRAZÃO, J.B.; PEREIRA, W.S.; MACIEL, M.C.G.; SILVA, L.A.; AMARAL, F.M.M.; REBÊLO, J.M.M.; GUERRA, R.N.M.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. **Journal of ethnopharmacology**. v. 115, n.2, p. 313-9, 2008.

PENHA, E.S.; LACERDA-SANTOS, R.; CARVALHO, M.G.F.; OLIVEIRA, P.T. Effect of *Chenopodium ambrosioides* on the healing process of the in vivo bone tissue. **Microscopy Research e Technique**. v. 80, n. 11, p. 1167-1173, 2017.

PEREIRA, D.G. **Importância do metabolismo no planejamento de fármacos**. Química Nova. v. 30, n. 1, p. 171-177, 2007.

PEREIRA, N.L.F.; AQUINO, P.E.A.; SILVA, M.R.; NASCIMENTO, E.M.; GRANGEIRO, A.R.S.; OLIVEIRA, C.D.M.; TINTINO, S.R.; FIGUEIREDO, F.G.; VERAS, H.N.H.; MENEZES, I.R.A. Antibacterial and topical anti-inflammatory effect of metanol extract of *Chenopodium ambrosioides* L. **Revista fitos**. v. 9, n. 2, p. 73-159, 2015.

PEREIRA, W.S.; RIBEIRO, B.P.; SOUSA, A.I.P.; SERRA, I.C.P.B.; MATTAR, N.S.; FORTES, T.S.; REIS, A.S.; SILVA, L.A.; BARROQUEIRO, E.S.B. Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *Chenopodium ambrosioides* in mice. **Journal of ethnopharmacology**. v. 127, p. 602-605, 2010.

PEREIRA, W.S.; SILVA, G.P.; VIGLIANO, M.V.; LEAL, N.R.F.; PINTO, F.A.; FERNANDES, D.C.; SANTOS, S.V.M.; MARTINO, T.; NASCIMENTO, J.R.; AZEVEDO, A.P.S.; FONSECA, E.N.; VELOZO, L.S.M.; NETO, L.R.S.; BASTOS, F.F.; PORTARI, E.A.; SABINO, K.C.C.; NASCIMENTO, F.; COELHO, M.G.P. Anti-arthritic properties of crude extract from *Chenopodium ambrosioides* L. leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 70, n. 8, p. 1078-1091, 2018.

PEREIRA, W. L.; OLIVEIRA, T.T.; KANASHIRO, M.; COSTA, M.R. Ação antiproliferativa do flavonoide morina e do extrato da folha de oliveira (*Olea europaea* L.) contra a linhagem de célula H460. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 17, n. 4, p. 798-806, 2015.

PIRES, N.M.P.I.; SOUZA, I.R.P.; PRATES, H.T.; FARIA, T.C.L.; FILHO, I.A.P.; MAGALHÃES, P.C. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 13, n.1, p. 55-65, 2001.

POLERÀ, N; BADOLATO, M.; PERRI, F.; CARULLO, G.; AIELLO, F. Quercetin and its natural sources in Wound Healing Management. **Curr Med Chem**. v. 26, n. 31, p. 5825-5848, 2019.

POLLACK, Y.; SEGAL, R.; GOLENSER, J. The effect of Ascaridole on the in vitro development of Plasmodium falciparum. **Parasitology research**. v. 76, n. 7, p.570-572,1990.

PRASSAD, C.S.; SHUKLA, R.; KUMAR, A.; DUBEY, N.K. In vitro and in vivo antifungal activity of essential oils of Cybopogon martini and Chenopodium ambrosioides and their synergism against dermatophytes. **Mycoses**. v. 53, n. 2, p. 123-9, 2009.

RODRIGUES DA SILVA, L.; MARTINS, L.V.; BANTIM, F.C.L.; MEIRELES DE DEUS, M.S.; FERREIRA, P.M.P.; PERÓN, A.P. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Ato toxicológico argentino**. V. 23, n. 1, p. 36-43, 2015.

RUFFA, M.J.; FERRARO, G.; WAGNER, M.L.; CALCAGNO, M.L.; CAMPOS, R.H.; CAVALLARO, L. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant on human hepatocellular carcinoma cell line. **Journal of ethnopharmacology**. V. 79, p. 335-339, 2002.

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.

SÁ, R.D.; SOARES, L.A.L.; RANDAU, K.P. Óleo essencial de Chenopodium ambrosioides L.: estado da arte. **Journal of basic and Applied Pharmaceutical sciences**. v. 36, n. 2, p. 267-276, 2015.

SANTA ROSA, P.L.F.; HOGA, L.A.K.; SANTANA, M.F.; SILVA, P.A.L. Use of medicinal plants by black Women: ethnography study in a low-income Community. **Rer. Esc. Enferm USP**. v. 48, p. 46-53, 2014.

SANTANGELO, C.; VARÍ, R.; SCAZZOCCHIO, B.; DI BENEDETTO, R.; FILES, C.; MASELLA, R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. **Ann Ist Super Sanita**. v. 43, n. 4, p. 394-405, 2007.

SANTOS, E.J.R.; ASSIS, L.S.; LIMA, M.P.D.; MURATORI, M.C.S.; SANTOS, N.P.S. Uso de animais na experimentação animal: revisão. **Pubvet**. v. 15, n. 09, p. 1-8, 2021.

SANTOS, D. S.; RODRIGUES, M. M. F. Atividades farmacológicas dos flavonóides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**. v. 7, n. 3, p. 29-35, 2017.

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

SEROR, J.; AMAND, G.; GUIBOURDENCHE, J.; CECCALDI, P.F.; LUTON, D. Anti-TPO antibodies diffusion through the placental barrier during pregnancy. **PLoS One**. v. 9, n.1, p. e84647, 2014.

SÉRVIO, E.M.L.; ARAÚJO, K.S.; NASCIMENTO, L.R.S.; COSTA, C.L.S.; MENDES, L.M.S.; MAIA FILHO, A.L.M.; SANTOS, I.M.S.P. Cicatrização de feridas com a

utilização do extrato de *Chenopodium ambrosioides* (mastruz) e cobertura secundária estéril de gaze em ratos. **ConScientiae Saúde**. v. 10, n. 3, p. 441-448, 2011.

SGANZERLA, A.; XAVIER, B.H.R. Da filosofia da natureza à filosofia moral: análise de uma ética animal em Hans Jonas. **Dissertatio**. v. 52, p. 185-212, 2020.

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

SHAMEEM, A.S.; KHAN, K.Z.; WAZA, A.A.; SHAH, A.H. Bioactivities and chemoprofiling comparisons of *Chenopodium ambrosioides* L. and *Chenopodium botrys* L. growing in Kashmir, India. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**. v. 12, n. 1, p. 124, 2019.

SILVA, D.B.; ATAÍDE JÚNIOR, V.P. Consciousness and sentience as foundations of animal law. **Revista Brasileira de Direito e Justiça**. v. 4, p. 155-203, 2020.

SILVA, G.; FACHIN, A.L.; BELEBONI, R.O.; FRANÇA, S.C.; MARINS, M. In vitro action of flavonoids in the canine malignant histiocytic cell line DH82. **Molecules**. V. 18, n. 12, p. 5448-5463, 2013.

SILVA, G. M. ***Chenopodium ambrosioides* L.: estudos etnofarmacológicos no bairro do Maracanã, São Luís, Maranhão**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) –entro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão. São Luís, p. 70, 2012.

SILVA, M.G.C.; AMORIM, R.N.L.; CÂMARA, C.C.; FONTENELE-NETO, J.D.; SOTO-BLANCO, B. Acute and sub-chronic toxicity of aqueous extracts of *Chenopodium ambrosioides* leaves in rats. **Journal of medicinal food**. v. 17, n. 9, p. 979-984, 2014.

SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M.A.M.; ARRAIS, P.S.D. Pharmacovigilance and adverse reactions to the medicinal plants and herbal drugs: a reality. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.

SMALE, S.T.; TARAKHOVSKY, A.; NATOLI, G. Chromatin contributions to the regulation of innate immunity. **Annu Rev Immunol**. v. 32, p. 489-511, 2014.

ŠMELCEROVIĆ, A.; TOMOVIĆ, K.; ŠMELCEROVIĆ, Ž.; PETRONIJEVIĆ, Ž.; KOCIĆ, G.; TOMAŠIĆ, T.; JAKOPIN, Ž.; ANDERLUH, M. Xanthine oxidase inhibitors beyond allopurinol and febuxostat; an overview and selection of potential leads based on in silico calculated physico-chemical properties, predicted pharmacokinetics and toxicity. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 135, p. 491-516, 2017.

SMILLIE, W.G.; PESSÔA, S.B. A study of the anthelmintic properties of the constituents of the oil of *Chenopodium*. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**. v. 24, n.5, p. 359-370, 1924.

SOARES, C.D.; CARVALHO, M.G.F.; CARVALHO, R.A.; TRINDADE, S.R.P.; RÊGO, A.C.M.; ARAÚJO-FILHO, I.; MARQUES, M.M. *Chenopodium ambrosioides* L. extract prevents bone loss. **Acta Cirúrgica Brasileira**. V. 30, n.12, p. 812-818, 2015.

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.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA JR.; G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**. v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, Z.L.; OLIVEIRA, F.F.; CONCEIÇÃO, A.O.; SILVA, L.A.M.; ROSSI, M.H.; SANTOS, J.S.; ANDRIOLI, J.L. Biological activities of extracts from *Chenopodium ambrosioides* Lineu and *Kielmeyera neglecta* Saddi. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v. 11, n.20, 2012.

STEWART, J.J.P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and applications to 70 elements. **Journal of Molecular Modeling**. v. 13, n. 12, p. 1173-1213, 2007.

TAVARES, M.T.; PRIMI, M.C.; POLLI, M.C.; FERREIRA, E.I.; PARISE-FILHO, R. Interação fármaco-receptor: aplicações de técnicas computacionais em aula prática sobre a evolução dos inibidores da enzima conversora de angiotensina. **Química nova**. v. 38, n. 8, p. 1117-1124, 2015.

TESTA, B; CRIVORI, P.; REIST, M.; CARRUPT, P.A. The influence of lipophilicity on the pharmacokinetic behavior of drugs: concepts and examples. **Perspectives in drug Discovery and design**. v. 19, p. 179-211, 2000.

THOMSEN, R.; CHRSTENSEN, M.H. MolDock: a new technique for high accuracy molecular docking. **J. Med. Chem**. v. 49, p. 3315-3351, 2006.

TRÉZ, T. DE A. Considerações sobre o conceito dos 3R's e o potencial conflito com novas compreensões do animal experimental. **Zoociências**. v. 19, n. 2, p. 97-113, 2018.

TRINDADE, G.D.; FILHO, A.L.M.M.; RODRIGUES, J.S.; FERREIRA, D.C.L.; ARAÚJO, K.S. Effects of *Chenopodium ambrosioides* L. (mastruz) gel extract in the treatment of bone lesion in osteoporotic rats. **Eletronic Journal Dental Collection**. v. 3, p. 1-8, 2021.

TRIVELLATO-GRASSI, L.; MALHEIROS, A.; MEYRE-SILVA, C.; BUSS, Z.S.; MONGUILHOTT, E.D.; FRÖDE, T.S.; SILVA, K.A.B.S. 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, n. 1, p. 127-138, 2013.

VALE, V.V.; VILHENA, T.C.; TRINDADE, R.C.S.; FERREIRA, M.R.C.; PERCÁRIO, S.; SOARES, L.F.; PEREIRA, W.L.A.; BRANDÃO, G.C.; OLIVEIRA, A.B.; DOLABELA, M.F.; DE VASCONCELOS, F. Anti-malarial activity and toxicity assessment of *Himatanthus articulatus*, a plant used to treat malária in the Brazilian Amazon. **Malaria Journal**. v. 14, n. 132, p. 1-10, 2015.

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

VARANDA, E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**. v. 27, n. 1, p. 1-7, 2006.

VEBER, D.F.; JOHNSON, S.R.; CHENG, H.Y.; SMITH, B.R.; WARD, K.W.; KOPPLE, K.D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.

VERMA, M.; AMRESH, G.; SAHU, P.K.; MISHRA, N.; RAO, C.V.; SINGH, A.P. Pharmacological evaluation of hyperin for antihyperglycemic activity and effect on lipid profile in diabetic rats. **Indian J Exp Biol**. v. 51, n. 1, p. 141-149, 2008.

WATT, W.; KOEPLINGER, K.A.; MILDNER, A.M.; HEINRICKSON, R.L.; TOMASSELLI, A.G.; WATENPAUGH, K.D. The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis. **Structure**, v. 9, n. 9, p. 1135-1143, 1999.

WANG, Y.N.; LIANG, W.J.; MA, D.W.; LI, J.; ZHANG, D.Y. Anticancer effects of *Chenopodium ambrosioides* L. essential oil on human breast cancer MCF-7 cells in vitro. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. v. 14, n. 10, p. 1813-1820, 2015.

WEI, H.; RUTHENBURG, A.J.; BECHIS, S.K.; VERDINE, G.L. Nucleotide-dependent domain movement in the ATPase domain of a human type IIA DNA topoisomerase. **J Biol Chem**. v. 280, n. 44, p. 37041-37047, 2005.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). **South African Journal of botany**. v. 89, p. 164-175, 2013.

WINSOR, M. P. Cain on Linnaeus: The Scientist-Historian as Unanalysed Entity. **Studies in History and Philosophy of Biology and Biomedical Sciences**. v. 32, n. 2, p. 239-254, 2001.

YAZDANIAN, M.; GLYNN, S.L.; WRIGHT, J.L.; HAWI, A. Correlating partitioning and Caco-2 Cell Permeability of Structurally Diverse Small Molecular Weight Compounds. **Pharmaceutical Research**. v.15, n.9, p.1490-1494, 1998.

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.

YOON, J.H.; BAEK, S.J. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. **Yonsei Med J**. v. 46, n. 5, p. 585-596, 2005.

ZUANAZZI, J.S.S. - Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O. *et al.*-**Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Ver. Porto Alegre/Florianópolis. Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2000, p.489-515.

ZUCKER, E. Hazard Evaluation Division - Standard Evaluation Procedure - Acute Toxicity Test for Freshwater Fish. U.S.EPA Publication 540/9-85-006. 1985