

Avaliação *in silico* do potencial antiinflamatório de alcaloides indólicos presentes nas sementes de *Couroupita guianensis*

In silico evaluation of the antiinflammatory potential of indolic alkaloids present in the seeds of *Couroupita guianensis*

Evaluación *in silico* del potencial antiinflamatorio de alcaloides indolicos presentes en las semillas de *Couroupita guianensis*

Recebido: 30/01/2021 | Revisado: 05/02/2021 | Aceito: 08/02/2021 | Publicado: 15/02/2021

Camila Fortes Castelo Branco Magalhães

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4824-3952>

Cristo Faculdade do Piauí, Brasil

E-mail: camilafortes13@hotmail.com

José Gabriel Fontenele Gomes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6114-0726>

Cristo Faculdade do Piauí, Brasil

E-mail: jgabrielfontenele@gmail.com

Wesley Tiago Bitencourt de Andrade

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7232-320X>

Cristo Faculdade do Piauí, Brasil

E-mail: wesleybitencourt03@gmail.com

Yasmin Gomes do Nascimento

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7062-5741>

Cristo Faculdade do Piauí, Brasil

E-mail: yasmingomes@hotmail.com

Neirigelson Ferreira de Barros Leite

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6505-1368>

Cristo Faculdade do Piauí, Brasil

E-mail: neirigelson@hotmail.com

Resumo

Objetivo: Realizar um estudo de modelagem molecular para avaliar o potencial anti-inflamatório de metabólitos secundários provenientes nas sementes da espécie botânica *Couroupita guianensis*. **Metodologia:** Realizou-se um estudo do tipo quantitativo descritivo, com caráter experimental. A fim de se confirmar a capacidade preditiva da metodologia durante o acoplamento molecular, realizou-se um *redocking*. Utilizou-se a Nimesulida, por conta da sua capacidade já elucidada de interagir com aminoácidos da COX-1, como comparativo para as interações entre os alcaloides escolhidos para acoplamento. A obtenção das estruturas dos alcaloides ocorreu por meio da plataforma *PubChem*, e seu desenho foi realizado através do programa *ChemDraw*. Os alcaloides foram ainda submetidos a testes computacionais para avaliação de suas propriedades moleculares. **Resultados:** Constatou-se o potencial de atividade anti-inflamatória presente nos alcaloides estudados, além da identificação das interações dos compostos com aminoácidos. **Conclusão:** Pode-se concluir que os alcaloides identificados possuem promissora atividade anti-inflamatória, sendo esta, decorrente de sua capacidade de interação com o sítio ativo da COX-1.

Palavras-chave: Alcaloides; *Couroupita guianensis*; *In silico*; Acoplamento molecular; Anti-inflamatório.

Abstract

Objective: To carry out a molecular modeling study to assess the anti-inflammatory potential of secondary metabolites from seeds of the botanical species *Couroupita guianensis*. **Methodology:** A quantitative, descriptive study with an experimental character was carried out. In order to confirm the predictive capacity of the methodology during molecular coupling, a *redocking* was performed. Nimesulide was used, due to its already elucidated ability to interact with COX-1 amino acids, as a comparison for the interactions between the alkaloids chosen for coupling. The alkaloids structures were obtained using the *PubChem* platform, and their design was carried out using the *ChemDraw* program. The alkaloids were also subjected to computational tests to assess their molecular properties. **Results:** The potential of anti-inflammatory activity present in the studied alkaloids was verified, in addition to the identification of the interactions of the compounds with amino acids. **Conclusion:** It can be concluded that the alkaloids identified have promising anti-inflammatory activity, which is due to their ability to interact with the active site of COX-1.

Keywords: Alkaloids; *Couroupita guianensis*; *In silico*; Molecular coupling; Anti-inflammatory.

Resumen

Objetivo: Realizar un estudio de modelización molecular para evaluar el potencial antiinflamatorio de metabolitos secundarios de semillas de la especie botánica *Couroupita guianensis*. **Metodología:** Se realizó un estudio descriptivo cuantitativo de carácter experimental. Para confirmar la capacidad predictiva de la metodología durante el acoplamiento molecular, se realizó un re-acoplamiento. Se utilizó nimesulida, debido a su capacidad ya aclarada para interactuar con los aminoácidos COX-1, como comparación de las interacciones entre los alcaloides elegidos para el acoplamiento. Las estructuras de alcaloides se obtuvieron mediante la plataforma PubChem y su diseño se realizó mediante el programa ChemDraw. Los alcaloides también se sometieron a pruebas computacionales para evaluar sus propiedades moleculares. **Resultados:** Se verificó el potencial de actividad antiinflamatoria presente en los alcaloides estudiados, además de la identificación de las interacciones de los compuestos con los aminoácidos. **Conclusión:** Se puede concluir que los alcaloides identificados tienen una actividad antiinflamatoria prometedora, lo que se debe a su capacidad para interactuar con el sitio activo de la COX-1.

Palabras-clave: Alcaloides; *Couroupita guianensis*; *In silico*; Acoplamiento molecular; Antiinflamatorio.

1. Introdução

A grande quantidade de ecossistemas é o que torna possível haver biodiversidade, principalmente do reino vegetal. Os produtos oriundos de fontes naturais constituem a maior parte das substâncias orgânicas conhecidas e estudadas pelo homem, promovendo uma grande diversidade química. Esses produtos obtidos através de fontes vegetais podem atuar como novos padrões moleculares úteis para utilização no campo da farmacologia (Silva, et al., 2015).

As plantas são uma das mais valiosas fontes para o desenvolvimento de novos produtos como medicamentos. Praticamente em todas suas partes, folhas, flores, frutos, caule e raiz, pode-se encontrar compostos bioativos que são utilizados para fins terapêuticos. Dessa forma, as plantas medicinais garantem um extenso fornecimento de antibióticos, analgésicos, anti-inflamatórios, antifúngicos, além de outras diversas classes de medicamentos utilizados pela medicina (Barcelos, et al., 2017).

Grande parte dos princípios ativos utilizados nos mais diversos medicamentos e produtos afins é obtida a partir de fontes vegetais, esses ativos por sua vez são provenientes de metabólitos secundários (Silva, et al., 2015). Esses compostos produzidos pelas plantas como forma de defesa contra outras plantas e predadores possuem um grande valor agregado tanto para a ciência como para a indústria. Eles são amplamente utilizados para a produção de medicamentos, produtos cosméticos, alimentos e agroquímicos (Marques & Lopes, 2015).

A *Couroupita guianensis* é uma espécie amplamente utilizada na tradição chinesa, trata-se uma árvore tropical pertencente à família botânica *Lecythidaceae*, uma grande caducifólia e que no Brasil pode ser encontrada na região da Amazônia. Por ter uma aparência peculiar referem-se a essa planta como “árvore bala de canhão”, devido a presença de seus frutos capsulares que se assemelham a uma bala de canhão. Tradicionalmente, suas folhas são muito utilizadas para o tratamento de doenças de pele, mas, especificamente no Brasil, os povos nativos da Amazônia utilizam o chá feito a partir das folhas, flores e cascas para tratar problemas como hipertensão, tumores, dor e processos inflamatórios (Pandurangan, Sahadeven, Sunkar & Dhana, 2018).

A árvore de *C. guianensis* como um todo é constituída por diversos fitoquímicos como flavonoides, saponinas, quercetinas, alcaloides e compostos voláteis. Devido à presença desses metabólitos, a *C. guianensis* despertou grande interesse, e muitos estudos experimentais começaram a ser realizados com a finalidade de elucidar as possíveis atividades biológicas e ações farmacológicas que ela possui. Dessa forma, já pode ser encontrado muitos relatos na literatura que mencionam sobre suas ações como agente antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatório e citotóxico (Akther, Khan & Hemalatha, 2017).

A destacar os alcaloides presentes nessa planta, observa-se a presença de uma classe específica: os Alcaloides Indólicos. Essa classe de metabólitos é comumente encontrada em espécies botânicas brasileiras e são dotados de uma grande diversidade estrutural. Esses compostos são assim denominados devido sua estrutura química onde é possível observar a presença de um núcleo indol ou mesmo derivados de sua estrutura, além disso, grande maioria são compostos derivados do triptofano (Junior, 2018).

Em particular, sua atividade como agente anti-inflamatório chama muita atenção dos pesquisadores, visto que alguns estudos *in vitro* e *in vivo* implicam o papel da *C. guianensis* na neutralização da inflamação. Como exemplo, em um estudo *in vitro*, um extrato metanólico da flor consegue estabilizar a membrana das células vermelhas humanas em uma dose de 500 µg/mL em comparação com o extrato etanólico e o medicamento padrão, diclofenaco. Estes achados sugerem, à princípio, uma potente atividade anti-inflamatória que esse composto possui (Sheba & Anuradha, 2019).

Sabe-se que o processo inflamatório é algo primordial para a manutenção e proteção do organismo, sendo útil e benéfico. Contudo, em algumas situações, esses eventos podem acabar se tornando exacerbados, o que pode levar a danos e tendo uma repercussão sistêmica, o que leva a necessidade de serem combatidos. Para isso, algumas intervenções, como utilização de medicamentos com ação anti-inflamatória, são necessárias (Liu, et al., 2017).

Porém, por serem medicamentos de fácil acesso ao paciente, é comum deparar-se com situações de uso abusivo e imprudente desses medicamentos, acarretando em sérios problemas de saúde devido principalmente aos efeitos adversos que esses fármacos possuem. Além disso, mesmo utilizados sob orientação e de forma correta, essas terapias ainda apresentam muitos problemas para quem os utiliza, e assim, necessitam estarem em constante melhoramento. Os AINES e o Glicocorticoides são as principais classes dos agentes anti-inflamatórios, e ambas possuem diversas problemáticas e limitações a respeito de seus representantes (Yen, Chen, Wu, Wang & Wu, 2018).

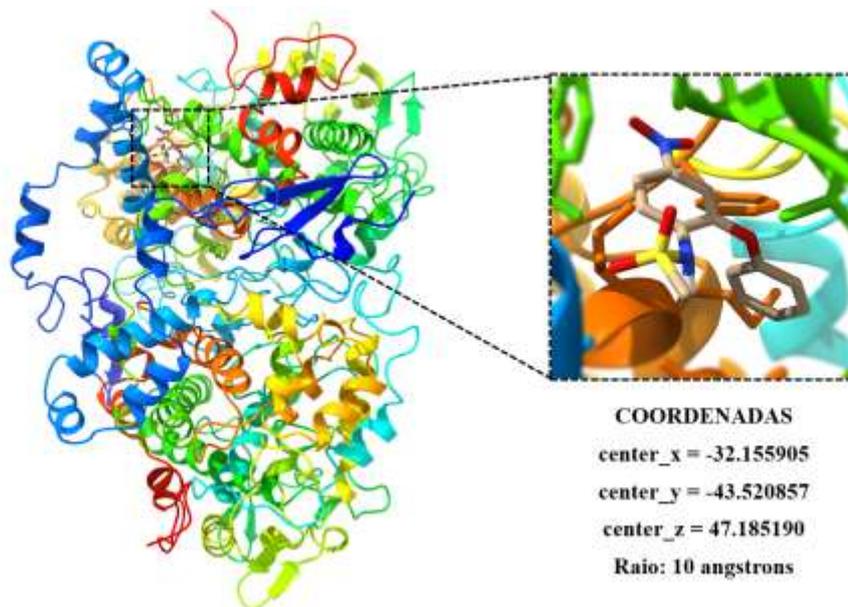
A modelagem molecular consiste em um conjunto de ferramentas computacionais e algoritmos que atualmente são utilizados em toda a comunidade de biociência. Esses métodos visam elucidar fenômenos relacionados as interações intermoleculares, e suas dependências conformacionais e energéticas. Dessa forma, é comum deparar-se com inúmeros estudos publicados e altamente elaborados que envolvem os estudos de simulação de modelagem molecular. A maior parte das técnicas experimentais são limitadas para fornecer uma resolução detalhada de alvos e moléculas e poder elucidar os recursos relacionados as propriedades conformacionais. Para isso, os estudos *in silico* utilizando essas ferramentas computacionais, tornaram-se a melhor alternativa para pesquisar possíveis novos candidatos a fármacos, sendo uma etapa preliminar aos estudos *in vitro* e *in vivo* por ser uma alternativa prática e rentável. (Quevedo & Zoppi, 2017).

A base de toda pesquisa científica é sustentada por um bom delineamento de estudos e observações de caráter experimental. Para que o pesquisador tenha sucesso em seus experimentos ele deve seguir uma linha de raciocínio onde, primeiramente, deve enquadrar seus objetivos ao seu tipo de pesquisa. Dessa forma, vários tipos de estudos foram estabelecidos e cada um possui sua relevância no meio científico (Estrela, 2018). A citar, por exemplo, os estudos *in vitro* e *in vivo*, são estudos laboratoriais e também denominados de pré-clínicos, onde podem mensurar a possível ação, eficácia e toxicidade de fármacos ou novas substâncias a tornarem-se candidatos. São uma alternativa para evitar que haja perdas na indústria ao desenvolver algum novo medicamento e que possa ser tóxicos ou mesmo ineficaz (Bednarczuk, Verdam, Miguel & Miguel, 2015).

Por se tratar de plantas que são encontradas em solo brasileiro, são muito consumidas tanto na alimentação quanto para uso medicinal pela população em geral. Portanto, é importante que seja incentivado o estudo e pesquisa desses vegetais com a intenção de conhecê-las melhor e se seu uso é realmente seguro e eficaz (Lopes, 2015). Além disso, devido algumas limitações que as terapias atuais apresentam, é necessário que haja estudos voltados a identificar e elucidar novos compostos na intenção de torna-los candidatos a novos fármacos e assim permitindo um aprimoramento dessas terapias.

Portanto, diante do que foi relatado, o presente estudo teve como objetivo realizar um estudo de modelagem molecular para avaliar o potencial anti-inflamatório de um metabólito secundário proveniente da espécie botânica *Couroupita guianensis*. Os fitoquímicos de escolha para a realização dos testes computacionais foram os alcaloides indólicos: Indigo, Indirubina e Triptantrina. E para avaliação do potencial anti-inflamatório foi observada a interação dos compostos de escolha com a COX-1 e posteriormente foram comparados com o fármaco padrão de escolha: Nimesulida. Ao final, as pesquisas realizadas tiveram como finalidade propor novas alternativas para o tratamento de processos inflamatórios.

Figura 2 – Estrutura cristalina da Ciclooxygenase 1.



Fonte: Autores (2021).

Após o preparo no BDS, a estrutura proteica foi submetida aos programas *AutoDock* e *AutoDock Vina*, para o acoplamento definitivo. A representação final dos complexos formados foi feita através do BDS.

Para se confirmar a capacidade preditiva da metodologia empregue no acoplamento molecular, realizou-se o *redocking*, técnica que consiste em submeter o ligante cristalografado nativamente ao acoplamento, afim de se obter um desvio médio quadrático (RMSD) (do inglês, *root-mean-square-deviation*) de menor valor possível. Gomes (2019), descreve que valores de RMSD abaixo de 2 angstroms comprovam a capacidade preditiva do experimento.

Sendo a Nimesulida um fármaco já conhecido cujos efeitos terapêuticos encontram-se cientificamente bem documentados, suas interações demonstradas com os aminoácidos da COX-1 serviram como comparativo para as interações entre os alcaloides selecionados para acoplamento.

A obtenção das estruturas bidimensionais e tridimensionais dos alcaloides foi realizada por meio da busca na plataforma *PubChem*, sendo seu desenho realizado posteriormente por meio do programa *ChemDraw*. As estruturas tridimensionais dos alcaloides foram ainda otimizadas para suas conformações de menor energia através do programa *Avogadro*.

Os alcaloides foram ainda submetidos a testes computacionais para avaliação de suas propriedades moleculares de acordo com a regra de Lipinski, por meio da plataforma *MolInspiration* (<https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>), com o intuito de analisar o potencial das moléculas de serem bons candidatos a novos fármacos.

3. Resultados e Discussão

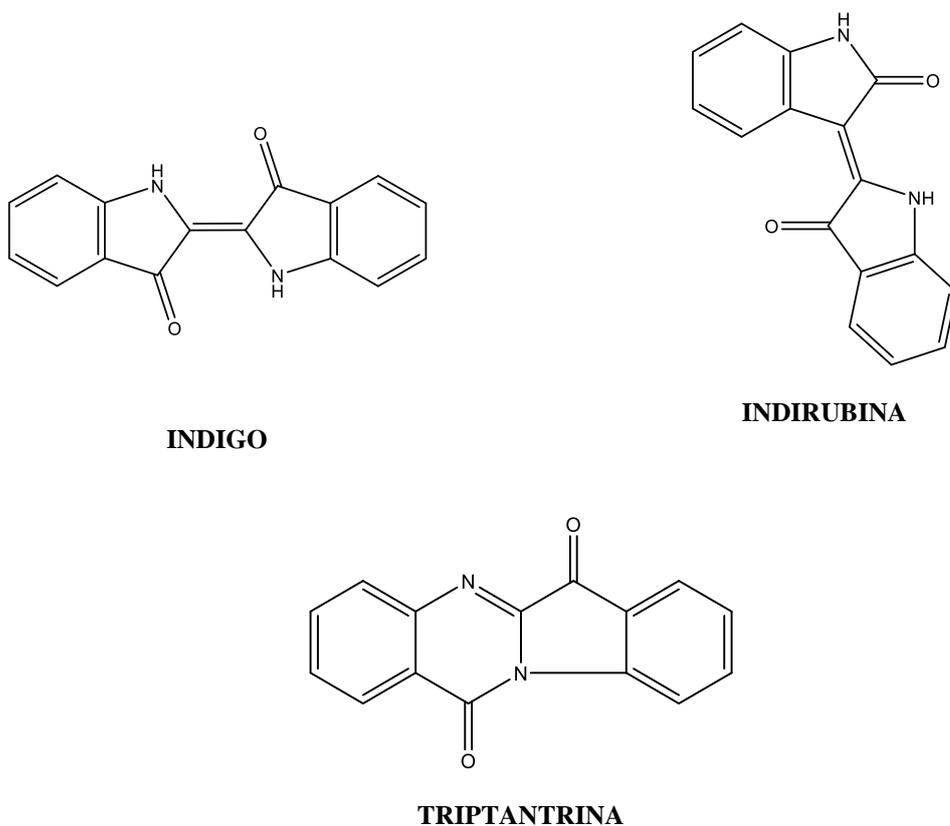
Sheba e Anuradha (2020), descreve que os alcaloides indólicos encontrados nas sementes da *C. guianensis*, são o Indigo, Indirubina e Triptantrina. Seus códigos de identificação no *PubChem*, bem como suas nomenclaturas de acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada, além de suas estruturas bidimensionais podem ser observadas na Tabela 1 e Figura 3 respectivamente.

Tabela 1 – Alcaloides indólicos presentes nas sementes da *C. guianensis*.

PUBCHEM ID	NOMENCLATURA IUPAC	NOMENCLATURA USUAL
10215	2-(3-hidroxi-1H-indol-2-il)indol-3-ona	Indigo
10177	2-(2-hidroxi-1H-indol-3-il)indol-3-ona	Indirubina
73549	indolo[2,1-b]quinazolina-6,12-diona	Triptantrina

Fonte: Autores (2021).

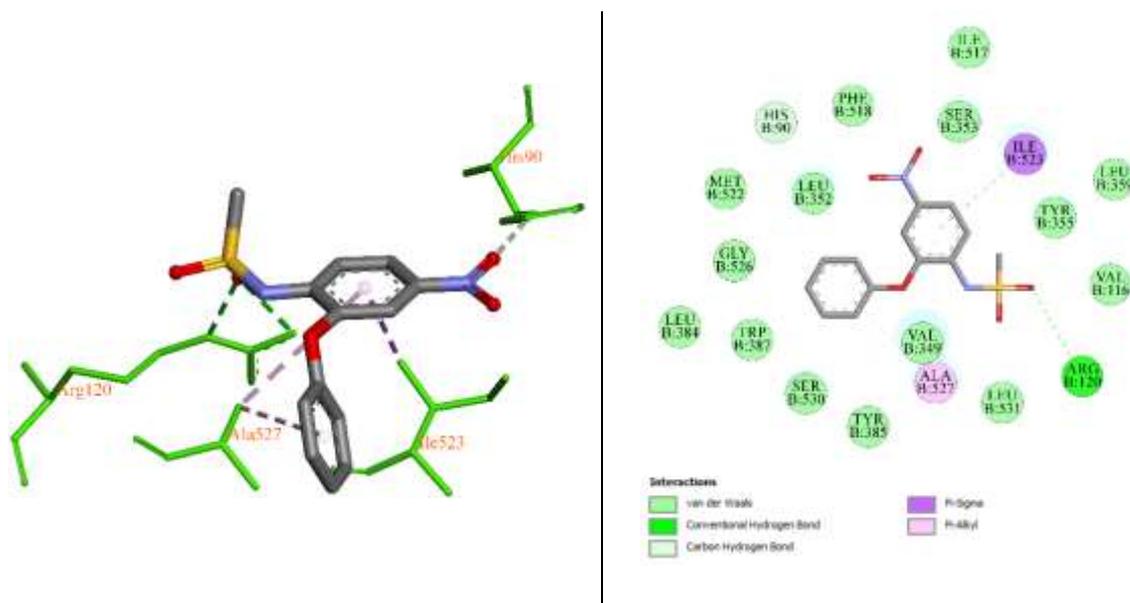
Figura 3 – Representação bidimensional dos compostos selecionados para acoplamento.



Fonte: Autores (2021).

As interações da Nimesulida com a enzima COX-1 encontram-se representadas na Figura 4.

Figura 4 – Interações da Nimesulida com a COX-1.



Fonte: Autores (2021).

Nota-se que as principais interações da Nimesulida com a enzima ocorrem nos aminoácidos ALA B: 527, ARG B: 120, ILE B: 523 e HIS B: 90, sendo do tipo Pi-Alquil, Ligação de Hidrogênio, Pi-Sigma e ligação Carbono-Hidrogênio respectivamente. As demais interações são do tipo van der Waals, com os aminoácidos MET B: 522, LEU B: 352, PHE B: 518, SER B: 353, ILE B: 517, LEU B: 359, TYR B: 355, VAL B: 116, LEU B: 531, VAL B: 349, TYR B: 385, SER B: 530, TRP B: 387, LEU B: 384 e GLY B: 526.

Por meio da técnica de *redocking*, obteve-se um RMSD de 1.114 angstroms, comprovando a validade da metodologia empregue. As poses obtidas do ligante nativo nesta etapa podem ser evidenciadas na Figura 5.

Figura 5 – Poses do acoplamento nativo (verde) e no *redocking* (violeta) da Nimesulida com a COX-1.



Fonte: Autores (2021).

Após a realização do acoplamento, os valores e as poses de maior afinidade entre os alcaloides com a COX-1 foram registrados, conforme pode-se observar na tabela abaixo.

Tabela 2 – Valores de afinidade entre as moléculas e a COX-1.

MOLÉCULA	AFINIDADE (kcal/mol)
Indigo	-7.3
Indirubina	-8.5
Triptantrina	-8.4

Fonte: Autores (2021).

Sendo os valores obtidos negativos, as interações ocorrem de maneira favorável, havendo gasto mínimo de energia. Indirubina e Triptantrina apresentam os valores mais satisfatórios.

Quanto à regra de Lipinski, os resultados obtidos pelos alcaloides encontram-se representados na Tabela 3.

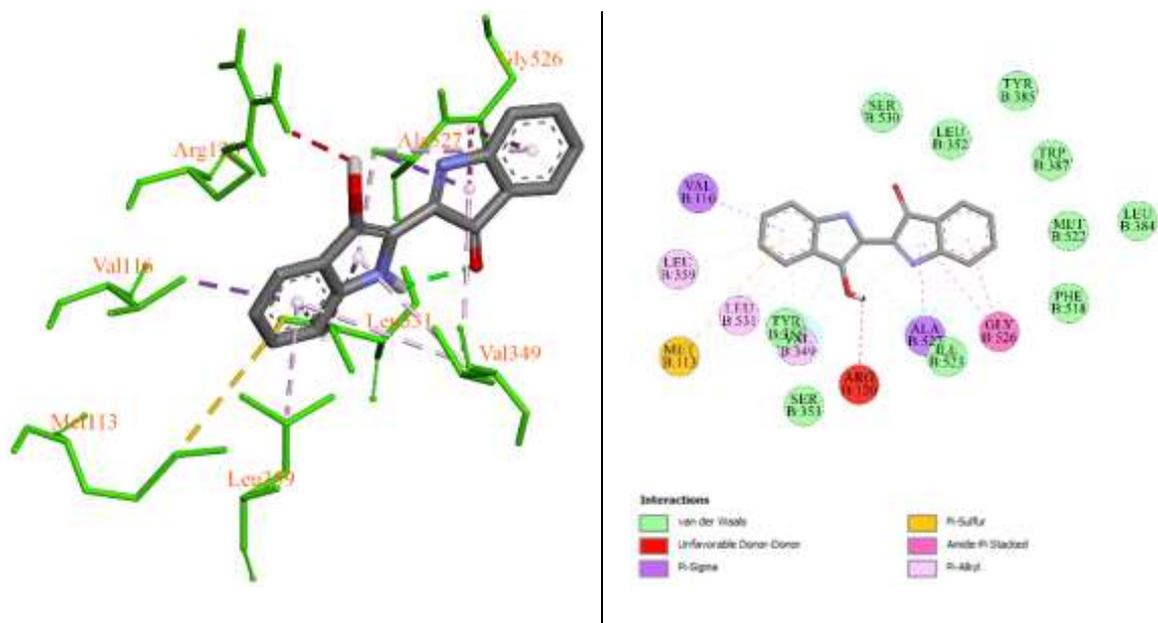
Tabela 3 – Parâmetros da Regra de Lipinski aplicada aos alcaloides.

MOLÉCULA	LogP (≥ 5)	MASSA MOLECULAR (≤ 500) (g/mol)	ACEPTORES DE LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO (≤ 10)	DOADORES DE LIGAÇÕES DE HIDROGÊNIO (≤ 5)
Indigo	2.90	262.27	2	2
Indirubina	2.90	262.27	2	2
Triptantrina	2.61	248.24	3	0

Fonte: Autores (2021).

Nota-se inicialmente que todos os alcaloides violaram o parâmetro de LogP. Todos os demais parâmetros demonstram-se satisfatórios para cada alcaloide. A regra de Lipinski descreve que para um composto ser considerado bom candidato a fármaco, permite-se apenas uma violação à regra, onde observa-se que todas as moléculas estudadas obedecem a esta exceção.

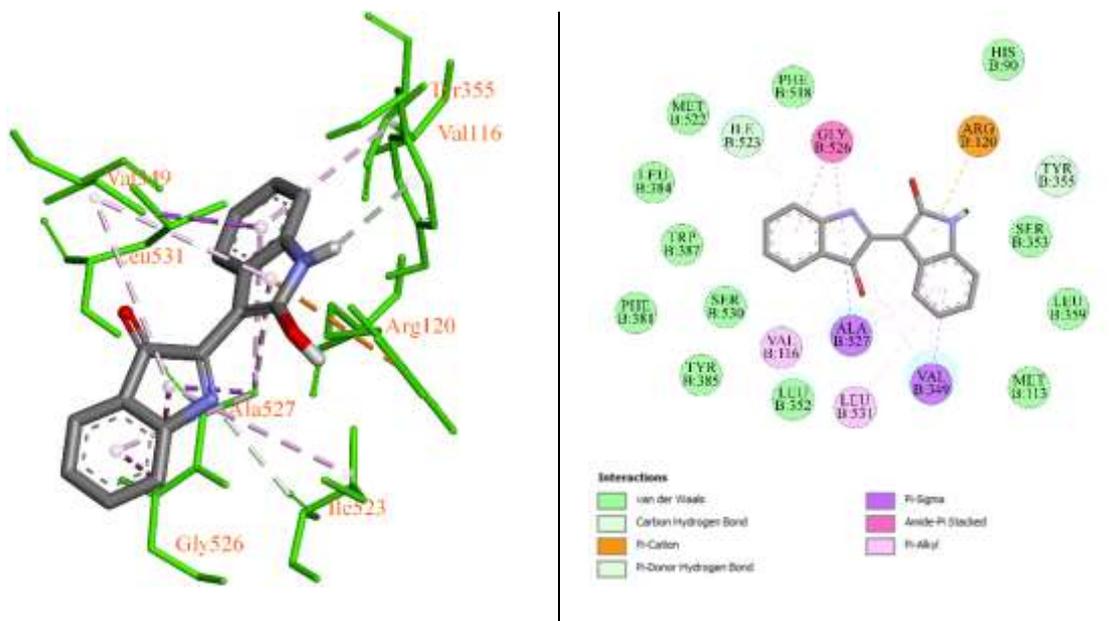
Figura 6 – Interações do Indigo com a COX-1.



Fonte: Autores (2021).

De forma semelhante à Nimesulida, o Indigo interage com os aminoácidos ALA B: 527, ARG B: 120 e ILE B: 523. Ocorrem ainda interações com os resíduos GLY B: 526, VAL B: 349, TYR B: 355, LEU B: 531, MET B: 113, LEU B: 359 e VAL B: 116. As demais interações que ocorrem são do tipo ligações de van der Waals. Nota-se ainda que apenas uma interação é desfavorável neste complexo, sendo com o aminoácido ARG B: 120, do tipo doador-doador.

Figura 7 – Interações da Indirubina com a COX-1.



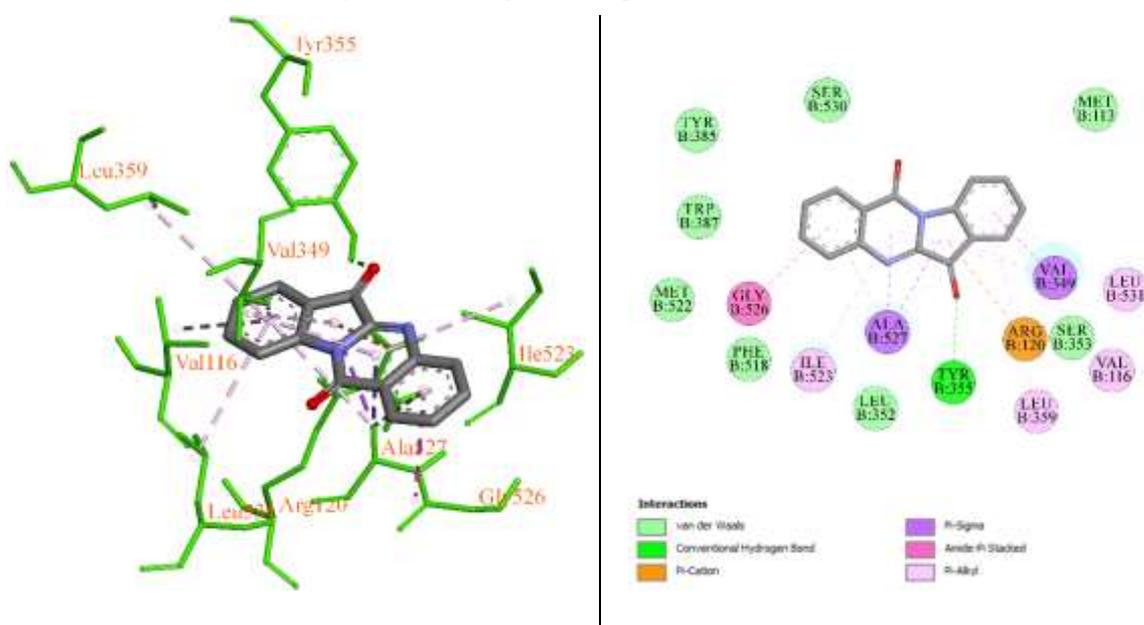
Fonte: Autores (2021).

A Indirubina interage com os aminoácidos ALA B: 527, ARG B: 120, ILE B: 523, GLY B: 526, TYR B: 355, VAL B: 116, VAL B: 349 e LEU B: 531. As demais interações, como pode-se observar na figura acima, são do tipo van der Waals.

Os alcaloides Indigo e Indirubina apresentam isomeria de posição, onde a variação de posição de um átomo de nitrogênio no Indigo, origina a Indirubina. Tal variação afeta diretamente a estabilidade das moléculas. O Indigo, possuindo isomeria do tipo trans, obtém um maior equilíbrio entre seus grupos atômicos em termos de massa e eletronegatividade, sendo portando uma molécula mais rígida, o que influencia nas suas interações com a COX-1, onde não sendo capaz de assumir conformações mais flexíveis, apresenta interação desfavorável.

A Indirubina, por outro lado, apresenta isomeria do tipo do tipo cis, sendo menos estável e mais flexível, podendo assumir conformações de maior ajuste à COX-1, gerando uma afinidade superior em relação ao Indigo. Sua flexibilidade estrutural influencia ainda nas suas interações com os aminoácidos, onde o arranjo molecular apresentado não demonstra interações desfavoráveis, com maiores interações com a enzima em comparação ao Indigo.

Figura 8 – Interações da Triptantrina com a COX-1.



Fonte: Autores (2021).

Com a COX-1, a Triptantrina interage com os aminoácidos GLY B: 526, ILE B: 523, ALA B: 527, TYR B: 355, ARG B: 120, VAL B: 349, SER B: 353, VAL B: 116, LEU B: 531 e LEU B: 359. As demais interações presentes são do tipo van der Waals.

Realizando-se um consenso entre as interações observadas, nota-se que em comparação à Nimesulida, todos os alcaloides testados realizam interações com os aminoácidos ALA B: 527, ARG B: 120 e ILE B: 523, com tipos de interações variadas. Apenas o alcaloide Indirubina apresentou interação com o resíduo HIS B: 90, assim como o fármaco nativo, sendo também a molécula de maior afinidade com a COX-1.

4. Conclusão

Com o estudo realizado, por meio da avaliação *in silico*, foi possível analisar o potencial anti-inflamatório de alcaloides indólicos presentes nas sementes de *C. guianense*. Mediante a utilização da Nimesulida e sua interação com a COX-1 como parâmetro, identificou-se que os compostos Indigo, Indirubina e Triptantrina, apresentaram interações com gastos mínimos de energia, conseqüentemente, com valores aceitáveis de afinidade.

Diante dos resultados obtidos pode-se concluir que os alcaloides identificados possuem promissora atividade anti-inflamatória, mediante a este estudo inicial, em decorrência da capacidade de interação com o sítio ativo da COX-1. Dessa forma, considera-se a obtenção dos resultados satisfatórios e promissores para estudos posteriores específicos relacionados à sua atividade anti-inflamatória, sejam estes através de métodos *in vivo* ou *in vitro*.

Referências

- Akther, T., Khan, M. S., & S. Hemalatha (2017). Extraction of Flavonoid from Various Parts of *Couroupita guianensis* and its Efficacy Against Pathogenic Bacteria. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10 (4), 354-358. https://www.researchgate.net/publication/315993621_Extraction_of_flavonoids_from_various_parts_of_couroupita_guianensis_and_its_efficacy_against_pathogenic_bacteria
- Barcelos, I. B., Bulian, A. L., Calazans, R. Da S. P., Degen, A. N., Alves, L. O., Sobral, F. O. S., & Salvi, J. O. (2017). Phytochemical analysis and antioxidant, cytotoxic and antibacterial activities of *Tabebuia serratifolia* flowers (Vahl) Nicholson. *Revista Fitos*, 11 (1), 09-23. <https://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/499>
- Bednarczuk, V.O., Verdam, M. C. S., Miguel, M. D., & Miguel, O. G. (2015). Testes In Vitro e In Vivo Utilizados na Triagem Toxicológica de Produtos Naturais. *Visão Acadêmica*, 11 (2), 1518-15192. <https://revistas.ufpr.br/academica/article/view/21366>
- Booth, W. C., Colomb, G. G., & Williams, J. M. (2005) *A arte da pesquisa* (2a ed.). Brasil: Martins Fontes.
- Estrela, C. (2018). *Metodologia Científica – ciência, ensino e pesquisa*. Artes Médicas.
- Franco, M. (2011). Como fazer mudas de Abricó-de-Macaco (*Couroupita guianensis*). <https://www.meucantinhoverde.com/2011/05/como-fazer-mudas-de-abrico-de-macaco.html>
- Gomes, J. N. S. (2019). Estudo in silico de derivados acrinídicos com potencial atividade antitumoral. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Brasil.
- Junior, A. R. C. (2018). *Estudo Químico das Espécies Psychotria Nuda Cham. & Schldl. E Psychotria Suerlla Müll. Arg. (Rubiaceae) e Avaliação de Atividades Biológicas*. Tese de Doutorado, Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.
- Liu Q. L., Chen A. H., Tang J. Y., Ma Y. L., Jiang Z. H., Liu Y. P., Chen G. Y., Fu Y. H., & Xu W. (2017). A new indole alkaloid with anti-inflammatory activity from *Nauclea officinalis*. *Nat Prod Res*, 31(18), 2107-2112. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28067066/>
- Lopes, M.A., Nogueira, I.S., Obici, S., & Albiero, A.L.M. (2015). Estudo das plantas medicinais, utilizadas pelos pacientes atendidos no programa “Estratégia saúde da família” em Maringá/PR/Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 17 (4), 702-706. https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1516-05722015000500702&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
- Marconi, M. A., & Lakatos, E. V. (2017) *Fundamentos de metodologia científica* (8a ed.). Brasil: Atlas/Gen.
- Marques, J., & Lopes, G. (2015). Alcaloides como Agentes Antitumorais: Considerações Químicas e Biológicas. *Revista Uningá Review*, 24(1). <http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/1674>
- Pandurangan, P., Sahadeven M., Sunkar S., & Dhana S. K. N. M. (2018). Comparative Analysis of Biochemical Compounds of Leaf, Flower and Fruit of *Couroupita guianensis* and Synthesis of Silver Nanoparticles. *Pharmacognosy Journal*, 10 (2), 315-323. https://www.researchgate.net/publication/322635788_Comparative_Analysis_of_Biochemical_Compounds_of_Leaf_Flower_and_Fruit_of_Couroupita_guianensis_and_Synthesis_of_Silver_Nanoparticles
- Quevedo, M. A., & Zoppi, A. (2017). Current trends in molecular modeling methods applied to the study of cyclodextrin complexes. *Journal Of Inclusion Phenomena And Macrocyclic Chemistry*, 90 (1-2), 1-14. https://www.researchgate.net/publication/320933217_Current_trends_in_molecular_modeling_methods_applied_to_the_study_of_cyclodextrin_complexes
- Severino, A. J. (2007) *Metodologia do trabalho científico* (23a ed.). Cortez.
- Sheba L. A., & Anuradha V. (2019). An updated review on *Couroupita guianensis* Aubl: a sacred plant of India with myriad medicinal properties. *Journal of Herbmed Pharmacology*, 9 (1), 1-11. <http://herbmedpharmacol.com/Article/jhp-20418>
- Silva, H. N., Diniz, T. C., Teles, R. B. A., Rabêlo, S. V., & Almeida, J. R. G. S. (2015). Prospecção Científica De Espécies Do Gênero *Annona* (Annonaceae) Com Atividade Antinociceptiva E Anti-Inflamatória. *Revista Geintec*, 5 (3), 2326-2334. <http://www.revistageintec.net/index.php/revista/article/view/710/582>
- Yen C. C., Chen Y. C., Wu M. T., Wang C. C., & Wu Y.T (2018). Nanoemulsion as a strategy for improving the oral bioavailability and anti-inflammatory activity of andrographolide. *Int J Nanomedicine*, 1, 669-680. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29440893/>