



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

PAULO GOMES PEREIRA JÚNIOR

**UTILIZAÇÃO DE DOCKING MOLECULAR NA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIDIARREICO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Psidium guineense*
Swartz (MYRTACEAE)**

AREIA

2021

PAULO GOMES PEREIRA JÚNIOR

**UTILIZAÇÃO DE *DOCKING* MOLECULAR NA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIDIARREICO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE
Psidium guineense Swartz (MYRTACEAE)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Bacharelado em
Química da Universidade Federal da
Paraíba, como requisito parcial à obtenção
do título de Bacharel em Química.

Orientador: Profa. Dra. Yanna Carolina
Ferreira Teles.

AREIA

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

J95u Pereira Junior, Paulo Gomes.

Utilização de docking molecular na avaliação do potencial antidiarreico de metabólitos secundários de *psidium guineense swartz* (myrtaceae) / Paulo Gomes Pereira Junior. - Areia, 2021.

33 f. : il.

Orientação: Yanna Carolina Ferreira Teles.
TCC (Graduação) - UFPB/CCA.

1. Química. 2. *Psidium guineense* Swartz. 3. Myrtaceae. 4. Araçá. 5. Quercetina. 6. Docking molecular. I. Teles, Yanna Carolina Ferreira. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 54 (02)

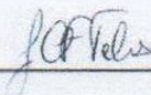
PAULO GOMES PEREIRA JUNIOR

**UTILIZAÇÃO DE DOCKING MOLECULAR NA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIDIARREICO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE
Psidium guineense Swartz (MYRTACEAE)**

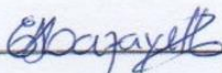
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de
Bacharelado em Química da
Universidade Federal da Paraíba,
como requisito parcial à obtenção do
título de Bacharel em Química.

Aprovado em: 02/12/2021.

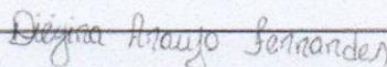
BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Yanna Carolina Ferreira Teles (Orientador)
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Prof^a. Dr^a. Elizabeth Almeida Lafayette
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Prof^a. Dr^a. Diégina Araújo Fernandes
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

*A minha mãe, **Heriberta Leal da Silva**, que me deu
amor e suporte; A **Tiago de Jesus Silva** (in
memorian), que estaria muito orgulhoso em me ver
formado. Com amor, dedico.*

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, **Heriberta Leal da Silva** e meu pai, **Paulo Gomes Pereira**, por cuidar de mim sempre me apoiando em minhas decisões. Sem vocês o caminho teria sido árduo, sou grato por todo sacrifício que foi feito.

Ao meu padrasto, **Tiago de Jesus Silva** (*in memorian*), que esteve presente durante quase todo o percurso me dando suporte.

Aos meus avós maternos, **Heriberto Leal da Silva** e **Honorina Leal da Silva** (*in memorian*), que sempre me apoiaram em meus sonhos e projetos.

A professora **Yanna Teles**, minha orientadora neste trabalho, por ter me acolhido com tão boa vontade e acreditado no meu potencial. A professora **Dayse Moreira**, minha primeira orientadora, por ter me introduzido na pesquisa. Por sua causa, com certeza, serei um profissional melhor. A professora **Betania Hermenegildo**, por todo o suporte durante o curso.

Aos meus grandes amigos: **Camila Macaúbas**, **Ellen Shirmene**, **Jefferson Bonifácio**, **Gabryella Monteiro**, **Larissa Veras** e **Maysa Dayane** que estiveram comigo nesta jornada. Obrigada por cada conselho, cada sorriso, cada palavra amiga. Obrigado por tornarem essa caminhada mais leve. A **Luciana Martins**, **Amanda Soares** e **Angelliana Azevedo** pela parceria no laboratório durante nossas pesquisas.

RESUMO

Espécies vegetais têm sido uma das principais fontes de recursos para a humanidade, sendo indispensáveis para o desenvolvimento das civilizações. Sua vasta aplicabilidade ocorre devido a diversidade de moléculas produzidas pelo seu metabolismo e pela capacidade de interagir em diferentes sistemas biológicos. A Fitoquímica, subárea da Química de Produtos Naturais, tem por objetivo estudar metabólitos secundários de origem vegetal. A espécie *Psidium guineense* Swartz pertence a família Myrtaceae e é popularmente conhecida como *araçá*, *araçazeiro*, *araçá-comum* ou *araçá-mirim*. No que tange o uso na medicina tradicional, o *P. Guineense* têm sido tradicionalmente utilizado no Brasil em preparações antidiarreicas, como diurético e contra má digestão. O *docking molecular* é uma ferramenta *in silico* utilizada para avaliação de interações entre um candidato a fármaco e seu alvo biológico. Tendo em vista relatos do uso popular do *P. guineense* para tratar casos de diarreia, o presente estudo teve objetivo de avaliar por *docking molecular*, as interações entre metabólitos da espécie *P. guineense* e a proteína intestinal humana 4U14, que quando ativada induz aumento da motilidade intestinal e diarreia. A estrutura da proteína alvo foi obtida do Protein Data Bank. As moléculas dos metabólitos ligantes, aracaína e quercetina, foram desenhados em 3D e submetidos à acoplagem “proteína rígida-ligante flexível” utilizando o sistema Autodock VINA do Software PyRx. Após o *docking*, os ligantes em conformação mais estável foram selecionados e as interações foram analisadas utilizando o Software Discovery. Os resultados obtidos para a Quercetina e a proteína-alvo indicaram uma energia de ligação de -8.0 kcal/mol, indicando uma elevada tendência de interação entre a molécula e a proteína alvo. O resultado obtido para a Araçaína mostrou uma energia de ligação de -6.7 kcal/mol indicando uma liberação de energia favorável para interação com o sítio ativo, porém menor do que aquela observada para a quercetina. Os resultados obtidos indicam provável ligação das moléculas Araçaína e Quercetina à proteína avaliada. A proteína 4U14 é o alvo de fármacos antidiarreicos como Lorapamida (-7.32 kcal/mol) e Triotopium (-9.2 kcal/mol). Os dados preliminares obtidos neste estudo sugerem que os metabólitos avaliados desenvolvem efeito antidiarreico com mecanismo similar ao observado para os fármacos Lorapamida e Triotopium, podendo ratificar o uso popular de frutos e infusões de araçá para o tratamento da diarreia.

Palavras-Chave: *psidium guineense*; myrtaceae; aracaína; quercetina; *docking molecular*.

ABSTRACT

Plant species have been one of the main sources of resources for humanity, being indispensable for the development of civilizations. Its wide applicability is due to the diversity of molecules produced by its metabolism and the ability to interact in different biological systems. Phytochemistry, a sub-area of Natural Products Chemistry, aims to study secondary metabolites from plants. The species *Psidium guineense* Swartz belongs to the Myrtaceae family and is popularly known as araçá, araçazeiro, common araçá or araçá-mirim. Its leaves have been traditionally used in Brazil as antidiarrheal, diuretic and against indigestion. Molecular docking is a *in silico* tool used to assess interactions between a drug candidate and its biological target. Considering the popular use of *Psidium guineense* Sw. (aráçá) to treat diarrhoea cases, the present study aimed to evaluate by molecular docking the interactions between metabolites from *P. guineense* and the human intestinal protein 4U14, which when activated induces increased intestinal motility and diarrhoea. The target protein structure was obtained from the Protein Data Bank. The binding molecules araçain and quercetin were designed in 3D and submitted to “rigid protein-flexible ligand” coupling using the Autodock VINA system of the PyRx Software. After the docking, the ligands in the most stable conformation were selected and the interactions analysed using the Discovery Software. The results obtained for Quercetin and the target protein showed a binding energy of -8.0 kcal/mol, indicating a high tendency of interaction between the molecule and the protein. The result obtained for Araçaine showed a binding energy of -6.7 kcal/mol indicating a favorable energy release for its interaction with the protein active site, but lower than that observed for quercetin. The results obtained indicate favourable binding of the molecules Araçaine and Quercetin to the evaluated protein. The 4U14 protein is the target of antidiarrheal drugs such as Lorapamide (-7.32 kcal/mol) and Triotopium (-9.2 kcal/mol). The preliminary data obtained in this study suggest that the evaluated metabolites may develop an antidiarrheal effect with a mechanism similar to that observed for the drugs Lorapamide and Triotopium, which may confirm the popular use of araçá fruits and infusions for the treatment of diarrhea.

Keywords: *psidium guineense*; myrtaceae; araçain; quercetin; molecular docking

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mapa de distribuição geográfica da ocorrência do <i>P. guineense</i> no Brasil	15
Figura 2 – Espécie <i>Psidium guineense</i> Swartz	16
Figura 3 – Frutos de <i>Psidium guineense</i> Swartz	16
Figura 4 – Estruturas químicas dos principais compostos presentes nos extratos de folhas de <i>Psidium guineense</i>	17
Figura 5 – Estrutura do receptor muscarínico de acetilcolina M3 (PDB: 4U14).....	21
Figura 6 – <i>Gridbox</i> no sítio ativo da proteína 4U14	23
Figura 7 – Complexo <i>ligante-proteína alvo</i> , formado pela proteína 4U14 e pela quercetina.....	23
Figura 8 – Interações observadas na ligação da quercetina com os aminoácidos do sítio ativo da proteína 4U14.....	24
Figura 9 – Complexo <i>ligante -proteína alvo</i> , formado pela proteína 4U14 e pela aracaína	25
Figura 10 – Interações observadas na ligação da aracaína com os aminoácidos do sítio ativo da proteína 4U14.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Tridimensional
ALA	Alanina
ASN	Asparagina
ASP	Aspartato
CYS	Cisteína
ILE	Isoleucina
PHE	Fenilalanina
<i>P. Guineense Sw.</i>	<i>Psidium Guineense Swartz</i>
Syn	Sinônimo
SER	Serina
THR	Tirosina
TRP	Tirosina
TYR	Triptofano
VAL	Valina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 OBJETIVO GERAL	13
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA MYRTACEAE.....	14
2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE PSIDIUM GUINEENSE SW.....	15
2.3 DOCKING MOLECULAR	18
2.4 INTERAÇÃO PROTEÍNA-LIGANTE	19
3. METODOLOGIA.....	21
3.1 TRATAMENTO DO RECEPTOR	21
3.2 TRATAMENTO DOS LIGANTES	21
3.3 CÁLCULO DO GRID E DOCKING	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5. CONCLUSÕES	27
6. REFERÊNCIAS	28

1. INTRODUÇÃO

As plantas têm sido a principal fonte de recursos para a humanidade, sendo indispensáveis para o desenvolvimento das civilizações. Registros históricos revelam exemplos da utilização dos produtos naturais pelas civilizações Oriental e Ocidental na alimentação, na medicina, no controle de pragas e em rituais religiosos (JAMSHIDI-KIA et al., 2018). A grande aplicabilidade dos vegetais é justificada pela diversidade de moléculas produzidas pelo metabolismo celular e sua capacidade de interagir em diferentes sistemas biológicos.

Desde o início do século passado, substâncias obtidas de fontes naturais vêm sendo utilizadas no desenvolvimento de bioprodutos tecnologicamente preparados, com eficácia, segurança e qualidade comprovadas, com aplicação nas mais diversas áreas (BAJAJ et al., 2020). Para tanto, é indispensável a realização de pesquisas multidisciplinares envolvendo áreas do conhecimento como Química de Produtos Naturais, fitoquímica, quimiotaxonomia, atividade biológica, toxicologia, ecologia, síntese química, biotecnologia (BOLZANI, 2016; BAJAJ et al., 2020).

A pesquisa fitoquímica tem por objetivo analisar a presença de constituintes químicos na espécie vegetal, podendo indicar os grupos de metabólitos secundários relevantes na mesma. Essas classes de substâncias são produzidas a partir do metabolismo secundário das plantas e muitas apresentam atividades biológicas importantes, tais como antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, antibacteriana, antifúngica, entre outras (SIMÕES et al., 2017).

Estes metabólitos apresentam estruturas complexas e se destacam nas espécies vegetais por serem substâncias importantes aos seus processos biológicos de regulação celular, comunicação e defesa. Realizando pesquisas multidisciplinares, busca-se a aplicação dessas substâncias, ou extratos, como medicamentos, fragrâncias, cosméticos, inseticidas e agroquímicos (BOLZANI, 2016; MACHADO et al., 2019).

Podemos citar como exemplo de produtos naturais historicamente utilizados para a saúde, o ácido salicílico (*Salix alba*), a morfina (*Papaver somniferum*), a quinina (*Cinchona*) (TELES et al., 2014) e o óleo de citronela (*Cymbopogon citratus*), este último utilizado como inseticida e repelente (COLPO et al., 2014; TEWARI et al., 2019).

Nas últimas décadas tem se observado um grande avanço de estudar espécies vegetais e seus metabólitos, com o intuito de identificar substâncias importantes na alimentação e saúde. O interesse da população também se encontra cada vez mais elevado para a utilização de produtos à base de plantas com finalidade preventiva e terapêutica (OLIVEIRA et al., 2016).

O Brasil ocupa posição de destaque mundial por ser o país detentor de uma das maiores biodiversidades do planeta e com maior potencial para pesquisa com espécies vegetais, pois detém a maior e mais rica diversidade genética do mundo. Estima-se que o país possua aproximadamente 60.000 espécies, correspondendo a cerca de 20% de toda a flora mundial e 75% de todas as espécies vegetais existentes nas grandes florestas (CARNEIRO et al., 2014). Estes dados revelam a vocação natural e o potencial do país no estudo de substâncias ativas de origem natural para o desenvolvimento de bioprodutos.

Um estudo feito pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2013, revela que a diarreia está associada ao aumento da frequência de fezes moles e pode ser acompanhada por câibras abdominais. Em muitas partes do mundo, a diarreia demonstrou ser uma doença crônica e também pode ser resultado de um quadro infeccioso. A infecção gastrointestinal pode ser causada devido à ingestão de bactérias, vírus ou parasitas transmitidos por água, comida, utensílios, mãos e moscas (OMS, 2009).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem incentivado estudos de tratamento e prevenção de doenças relacionadas ao trato intestinal utilizando práticas medicinais tradicionais (ATTA, 2004). Tais esforços para encontrar novos agentes medicinais com menos efeitos tóxicos podem levar a descoberta de medicamentos com melhores propriedades farmacológicas, ajudando, assim, substancialmente a estender a gama de terapias eficazes e seguras (AHMAD, 2020).

Atualmente a investigação do potencial farmacológico de moléculas envolve uma etapa inicial de avaliação *in silico* da interação da molécula com seu provável alvo biológico. O *docking molecular* é um método que prediz a melhor orientação de uma molécula que se acopla a uma segunda molécula (alvo), para formar um complexo que pode desenvolver uma atividade biológica (RODRIGUES et al., 2012).

O emprego de métodos computacionais para o reconhecimento em nível molecular da interação proteína-ligante é uma ferramenta importante para descoberta de novos fármacos, pois permitem analisar moléculas capazes de se ligar a determinados sítios receptores proporcionando diminuição de tempo e custo que estão relacionados no processo de desenvolvimento de novos medicamentos (COUTINHO et al., 2007).

Um dos maiores desafios no *docking molecular* está relacionado ao fato de não levar em consideração a flexibilidade molecular do receptor, devido à alta complexidade envolvida nesse processo, o que requer mais custos computacionais. Uma forma de otimização comum utilizada nos métodos de docking é utilizar grades de energia (*GRIDs*) que ficam centradas no sítio ativo do alvo molecular, esse método torna o resultado muito mais preciso e diminui o tempo de execução da análise (MENG et al., 2011).

Os métodos de *docking molecular* utilizam dois parâmetros para investigação da afinidade de ligação entre proteína-alvo: algoritmo de busca e avaliação das interações. Estes são responsáveis respectivamente por pesquisar diferentes conformações e orientações dos ligantes dentro da proteína alvo e por estimar as afinidades de ligação das conformações geradas, classificando e identificando o modo de ligação mais favoráveis do ligante ao receptor, que é caracterizado pelo pela formação do complexo com menor energia (COUTINHO et al., 2007).

Desta forma, tendo em vista os relatos do uso popular do *Psidium guineense* (Swartz) para tratar casos de diarreia, o presente estudo teve objetivo de analisar *in silico* interações entre metabólitos da espécie em estudo e uma proteína alvo de fármacos antidiarreicos, localizada no trato intestinal humano.

1.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo computacional por *docking* molecular de metabólitos secundários da espécie *P. guineense* com potencial atividade antidiarreica e analisar sua interação com o receptor 4U14.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o *docking molecular* de compostos obtidos de *P. guineense* para estimar sua afinidade com a proteína receptora e comparar com fármacos comerciais;
- Identificar os aminoácidos da proteína humana 4U14 envolvidos nas interações com os ligantes;
- Analisar as principais interações intermoleculares que resultam na formação do complexo proteína-ligante;

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA MYRTACEAE

A família Myrtaceae, alvo do presente estudo, está amplamente distribuída pelo hemisfério sul e compreende aproximadamente 4.630 espécies e 144 gêneros. No Brasil já foram relatadas 1.034 espécies e 23 gêneros (SILVA e MAZINE, 2016). Muitas mirtáceas apresentam elevado valor econômico, como o eucalipto (*Eucalyptus* spp.), utilizado na produção de madeira e de aromatizantes. Outra espécie bastante comercializada é a goiabeira (*Psidium guajava*), fruteira apreciada pelas características de seus frutos consumidos *in natura* ou industrializados, que apresenta elevados teores de vitamina C e compostos antioxidantes (ZAHIN *et al.*, 2017).

Existem muitas outras espécies da família Myrtaceae nativas da flora brasileira que também produzem frutos comestíveis. Entretanto, poucas são exploradas em escala comercial e, quando exploradas, são de pequena produção e limitada a certas regiões. Alguns exemplos são a pitangueira (*Eugenia uniflora*), as jabuticabeiras (*Plinia* spp.) e o araçazeiro (*Psidium guineense*) (FRANZON *et al.*, 2009).

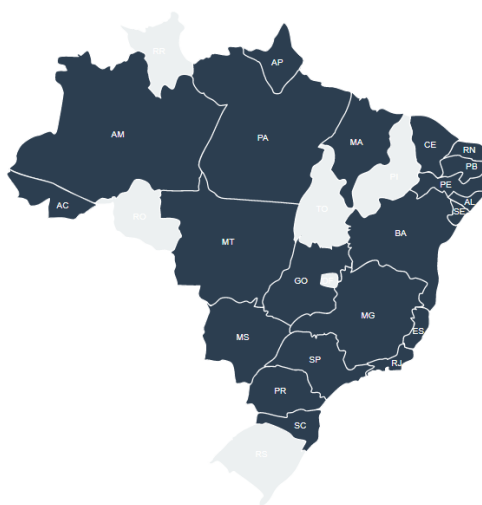
No que tange o uso na medicina tradicional, mirtáceas são empregadas principalmente em casos de distúrbios gastrointestinais, hemorrágicos, diabetes e doenças infecciosas. As partes mais usadas são as folhas, cascas e também os frutos (SILVA e MAZINE, 2016). Um estudo realizado por Cruz e Kaplan (2004) listou diversas espécies utilizadas na medicina popular no Brasil. Dentre estas, 37 espécies eram pertencentes a família Myrtaceae. Delas, 45% foram relatadas pela população com indicação para tratamento de diarreia ou disenteria.

Apesar da relevância e da vasta literatura científica a respeito de muitas plantas da família, existem espécies utilizadas pela população ainda pouco estudadas quanto ao seu potencial fitoquímico e farmacológico. É o caso da espécie *Psidium guineense*, vastamente encontrada na Paraíba e com diversos relatos de uso na medicina popular (LIMA *et al.*, 2020).

2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE *PSIDIUM GUINEENSE* SW

A espécie *P. guineense* Sw. (Syn. *Psidium araça*) é popularmente conhecida como *araçá*, *araçazeiro*, *araçá-comum* e *araçá -mirim*. O *araçazeiro* é de ampla disseminação no país, na região da Zona da Mata nordestina, florescendo praticamente durante todo o ano, com picos coincidindo com a época de menor pluviosidade. A frutificação em geral ocorre no período de janeiro a julho, com pico nos meses de março a abril (FRANZON *et al.*, 2009).

Figura 1. Distribuição geográfica da ocorrência do *P. guineense* no Brasil



Fonte: Adaptado de www.atacadaoflorestal.com.br. Acesso em 20/12/2021.

Trata-se de uma espécie arbustiva ou arvoreta que pode alcançar 1,5 metros de altura, com caule de casca lisa, folhas simples com enervações salientes e margens levemente onduladas e flores brancas e axilares. Os frutos são bagas ovoides ou oblongas, amarelas ou verdes, com polpa suculenta, possuindo de 22 a 250 sementes (MELO *et al.*, 2013).

Figura 2. *Psidium guineense* Swartz



Fonte: Disponível em www.arvores.brasil.com.br/new/araca/index. Acesso em 20/12/2020.

Os frutos de *P. guineense* são bastante apreciados na alimentação e preparação de sucos e geleias. Uma caracterização química e nutricional realizada por Silva et al. (2008) demonstrou que os frutos do araçá possuem baixo valor calórico, com elevada umidade, consideráveis tores de cálcio e elevado teor de fibras. As folhas têm sido tradicionalmente utilizadas no Brasil como antidiarreicos, diuréticos, má digestão, e a casca utilizada em curtumes devido ao alto teor de taninos (SILVA et al., 2015; RODRIGUES e ANDRADE, 2014).

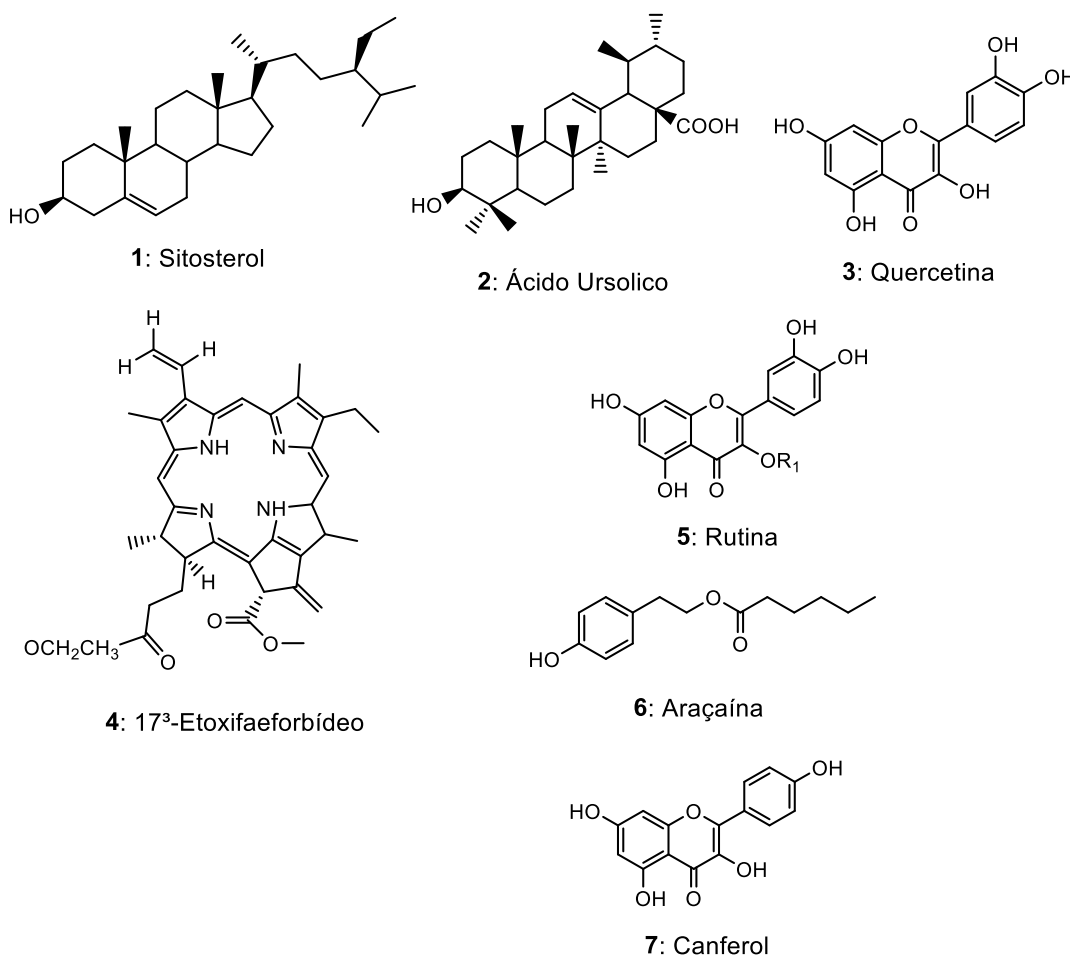
Figura 3. Frutos de *P. guineense*.



Fonte: Disponível em www.arvores.brasil.nom.br/new/araca/index. Acesso em 20/12/2021.

Um estudo demonstrou a ação sinérgica do extrato de *P. guineense* com vários agentes antimicrobianos contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes (FERNANDES *et al.*, 2012). Outra investigação recente relata a atividade antimicrobiana do extrato de folhas *P. guineense* frente a *Klebsiella pneumoniae* (MACAÚBAS *et al.*, 2019). Esses efeitos podem ser atribuídos à presença de compostos fenólicos, flavonoides, chalconas, fitoesteroides, derivados de tirosol e compostos de feoforbídeo isolados do extrato de folhas de *P. Guineense* (LIMA *et al.*, 2020). Um estudo realizado por Macaúbas (2019) listou alguns dos compostos naturais presentes no extrato de folhas de *P. Guineense*, dentre eles o esteroide sitosterol, amplamente relatado em plantas (RAJPUT *et al.*, 2012). Os fitos esteroides são componentes importantes das membranas vegetais, conhecidas como precursores da vitamina D e como agentes anti-inflamatórios (MACIEL *et al.* 2016).

Figura 4: Estruturas químicas dos principais compostos presentes nos extratos de folhas de *P. guineense*.



Fonte: Autoria própria através do software Chemdraw.

Triterpenos como o ácido ursólico, são comuns na família Myrtaceae. Possuem grande relevância quimiotaxonômica e são substâncias promissoras no desenvolvimento de novos compostos ativos de alvos múltiplos, apresentando atividade anti-inflamatória, citotóxica e antiplaquetária (BABALOLA e SHODE, 2013; GUPTA et al. 2017).

O derivado de éster de tirosol, Araçáína foi relatado na espécie *P. guineense* sendo o primeiro relato de sua ocorrência como produto natural (MACAÚBAS-SILVA et al., 2019). A síntese de vários derivados de éster de tirosol, incluindo o tirosil hexanoato, já foram relatados na literatura (BERNINI et al. 2008).

Dentre os flavonoides relatados na literatura, a quercetina, rutina e kaempferol estão presentes nos estudos mais recentes e são bem conhecidos por suas atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e antivirais (TAPAS et al., 2008; NAPOLITANO et al., 2012).

Metabólitos secundários isolados de *P. guineense* possuem grande potencial biológico e farmacológico devido suas atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas (HO et al., 2012; NAPOLITANO et al., 2012). Assim, os fitoconstituintes aqui relatados podem justificar o uso tradicional e as atividades biológicas atribuídas a *P. guineense*.

2.3 DOCKING MOLECULAR

O *docking molecular*, também conhecido como atracamento molecular ou ainda ancoragem molecular, é um experimento *in silico* (computacional) que visa simular a interação entre duas moléculas, gerando complexos proteína-ligante ou ainda proteína-proteína (VERLI, 2014).

O *docking molecular* gera estimativas do comportamento molecular a nível atômico de uma molécula dentro do sítio ativo de uma proteína caracterizando a conformação e orientação do ligante no sítio ativo e estimando a afinidade de ligação. Conhecer a localização do sítio de ligação antes dos processos de encaixe aumenta significativamente a eficiência do encaixe. Em muitos casos, o sítio de ligação é realmente conhecido antes de acoplar ligantes nele (MENG et al., 2011). O objetivo principal dos estudos de *docking* é obter diferentes conformações do modo de ligação do ligante dentro sítio ativo do receptor, e na quantificação da energia de ligação entre o complexo receptor-ligante (KITCHEN et al., 2004).

A energia envolvida na ligação entre o ligante (fármaco) e o sítio ativo proteico é calculada a partir das ligações não covalentes entre de grupos funcionais presentes na molécula bioativa e no sítio ativo proteico (receptor) (ANDREI et al., 2012). A técnica de ancoragem molecular gera estimativas de energias de ligação entre o ligante e a proteína alvo (RODRIGUES et al., 2012).

A utilização do *docking molecular* para investigar a afinidade de ligação de moléculas com atividade biológica com seus receptores são compostos por dois componentes: o algoritmo de busca e a função de avaliação, responsáveis respectivamente por pesquisar diferentes conformações e orientações dos ligantes dentro da proteína alvo; e responsável por estimar as afinidades de ligação das conformações geradas, classificando-as e identificando o(s) modo(s) de ligação mais favorável do ligante ao receptor, que é caracterizado pelo pela formação do complexo com menor energia (MORGON e COUTINHO, 2007).

No *docking* se avalia diferentes conformações espaciais do ligante, sendo possível identificar qual é a mais provável conformação do ligante ao acoplar no sítio ativo da proteína alvo. Para cada conformação se obtêm as respectivas energias livres de ligação entre o ligante e o alvo, onde a menor energia será considerada a mais provável para justificar a conformação da interação (KITCHEN et al., 2004).

O cálculo da energia livre de ligação não covalente entre o ligante e a proteína é obtido pela seguinte equação:

$$\Delta G_{\text{Ligação}} = G_{\text{Proteína-Ligante}} - [G_{\text{Proteína}} - G_{\text{Ligante}}]$$

A contribuição da energia livre é expressa como:

$$G = U - TS$$

Onde: U é a energia interna da molécula, T a temperatura absoluta do sistema (309K) e S é a entropia da molécula estudada (SMITH et al., 2004).

2.4 INTERAÇÃO PROTEÍNA-LIGANTE

Em 1984, Emil Fischer realizou estudos sobre a especificidade de enzimas e propôs a ideia de que enzimas eram estruturalmente complementares a seus substratos, e se encaixariam de forma específica como uma chave em uma fechadura (NELSON et. al, 2014). Esta característica também é aplicada para interações entre

fármacos e seus receptores, porém o modelo chave-fechadura induz a pensar que as proteínas e os ligantes são entidades rígidas, não levando em consideração a flexibilidade molecular.

Tanto proteínas como ligantes podem adquirir diversas conformações durante a interação. Uma das teorias que explica este fato é a teoria do encaixe induzido, essa teoria considera que durante a interação, o receptor biológico pode reconhecer diversas conformações do ligante dentro do sítio de ligação (VERLI et al., 2005).

O estudo da interação entre proteína-ligante é de extrema importância para o sucesso na descoberta e planejamento de novos fármacos. As proteínas são macromoléculas que exercem diversas funções biológicas por meio da interação com outras moléculas denominadas ligantes, que podem ser fármacos, metais, moléculas do solvente e também com outras macromoléculas tais como lipídios, peptídeos, ácidos nucleicos e outras proteínas (LIU et al., 2016).

A interação entre uma proteína e um determinado ligante resulta na formação de um complexo proteína-ligante. Este complexo só é formado com base na afinidade e especificidade de ligação entre a proteína e o ligante. A afinidade e especificidade entre o receptor e o ligante são dados por interações intermoleculares dentre as quais estão, forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas, π - π , interações iônicas ou eletrostáticas, ligações de hidrogênio e ligações covalentes (GURYANOV et al., 2016).

As ligações de hidrogênio são interações muito importantes que ocorrem em sistemas biológicos e são responsáveis por manter a estrutura das proteínas. As ligações covalentes em sistemas biológicos possuem elevado custo energético, e raramente são desfeitas. Os fármacos que interagem por meio de ligações covalentes inativam o sítio receptor ou inibem completamente a ação das enzimas (BARREIRO et al., 2015).

Com a perspectiva de melhor desenvolvimento do estudo e justificar o uso popular do araçá para tratar casos de diarreia, o receptor muscarínico de acetilcolina M3 (PDB: 4U14) foi selecionado para explorar a possível atividade antidiarreica de *P. guineense*.

A proteína alvo está envolvida no aumento da motilidade intestinal ocasionando diarreia, portanto ela configura-se como um alvo promissor para candidatos à fármacos anti-diarreicos, que podem se ligar à sua estrutura e inibir sua ação, levando ao efeito desejado antidiarreico (ADNAN et al., 2019).

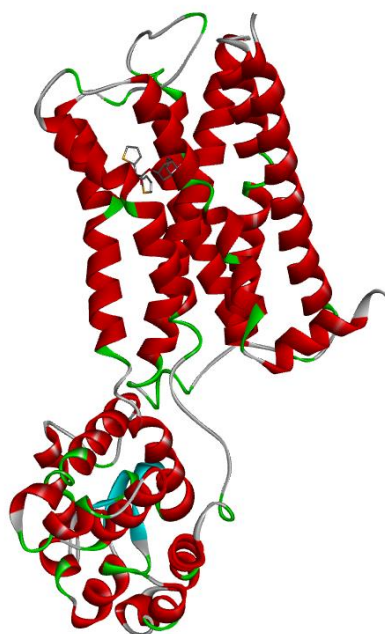
3. METODOLOGIA

3.1 TRATAMENTO DO RECEPTOR

O alvo de interesse escolhido a partir da revisão da literatura foram submetidos ao teste de *docking molecular* com as moléculas de quercetina e aracaína. A proteína alvo (PDB id: 4U14) com seu respectivo ligante foi obtida no Protein Data Bank. O PDB é um repositório de dados de proteínas e suas estruturas tridimensionais. Vários tipos de informações estão associados com cada entrada de arquivo PDB, incluindo coordenadas atômicas do espaço tridimensional, sequência de polímeros e metadados (BERMAN, 2000).

A remoção do inibidor da proteína e as moléculas de água da estrutura do receptor foram feitas no software CHIMERA.

Figura 5. Estrutura do receptor muscarínico de acetilcolina M3 (PDB: 4U14).



Fonte: Protein Data Bank.

3.2 TRATAMENTO DOS LIGANTES

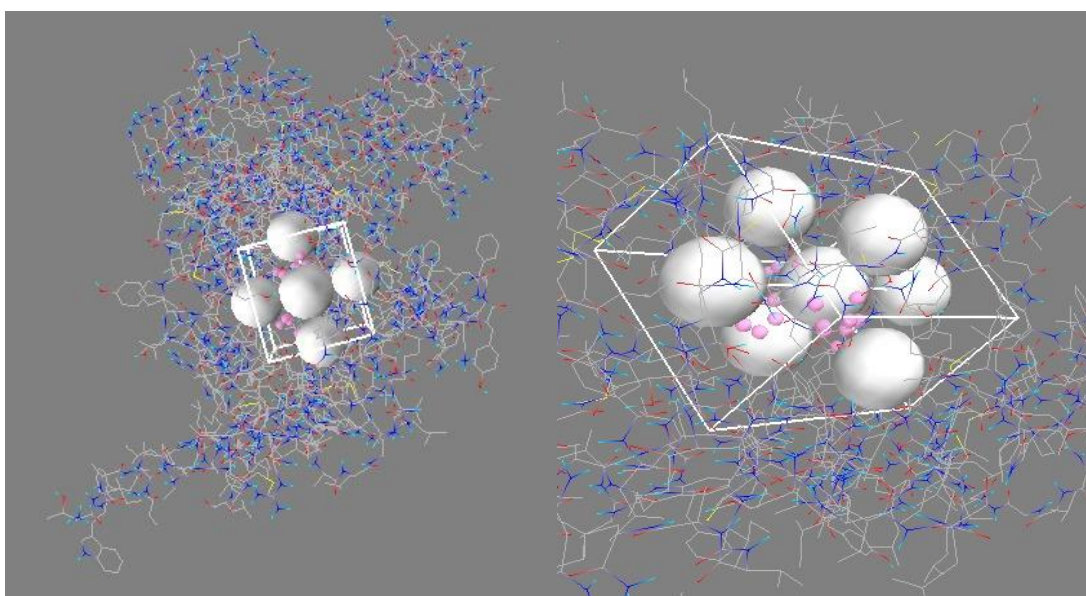
Dentro do contexto do uso popular do araçá para tratar casos de diarreia, os compostos quercetina e aracaína, foram selecionados para avaliação *in silico* por meio de *docking molecular*. Os dois ligantes selecionados para realização do estudo

foram desenhados em 3D no software Marvin Sketch 6.3.0, e submetidos à acoplagem “proteína rígida-ligante flexível” utilizando o sistema Autodock VINA do Software *PyRx*. Após o *docking*, os ligantes em conformação mais estável foram analisados utilizando o Software *Discovery*.

3.3 CÁLCULO DO GRID E DOCKING

O cálculo do *grid* foi processado com 100 conformações no software *PyRx*. Para o procedimento (ligante – proteína) o tamanho do *grid* foi ajustado nos eixos X, Y e Z (dimensões do grid em angstrom: x: 7,8823; y: 11,3534 e z: 11,0135). A definição do local do sítio de ligação foi baseada em ligantes conhecidos e previamente co-cristalizados com a proteína e disponíveis no Protein Data Bank.

Figura 6. *Gridbox* no sítio ativo da proteína 4U14.



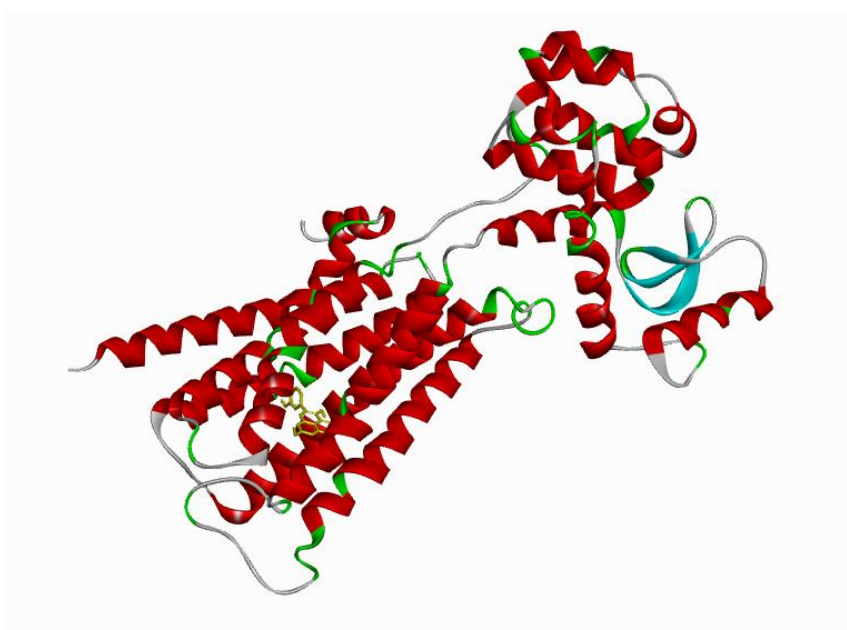
Fonte: Autoria própria através do software *PyRx*.

A realização dos cálculos de energia de interação entre os ligantes e os aminoácidos da proteína 4U14 foi realizado utilizando o software *Discovery Studio*. Este software fornece o cálculo de energia livre de ligação baseado em seus componentes energéticos, incluindo van der Waals, ligações eletrostáticas e ligações de hidrogênio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir do *docking* da molécula quercetina com a proteína alvo receptor intestinal M3 da acetilcolina (PDB: 4U14), indicaram uma energia de ligação para a quercetina e o alvo de -8,0 kcal/mol. Na Figura 9 é possível visualizar a estrutura do complexo quercetina-proteína alvo, formado pela proteína 4U14 (maior parte em vermelho) e pela quercetina (em amarelo).

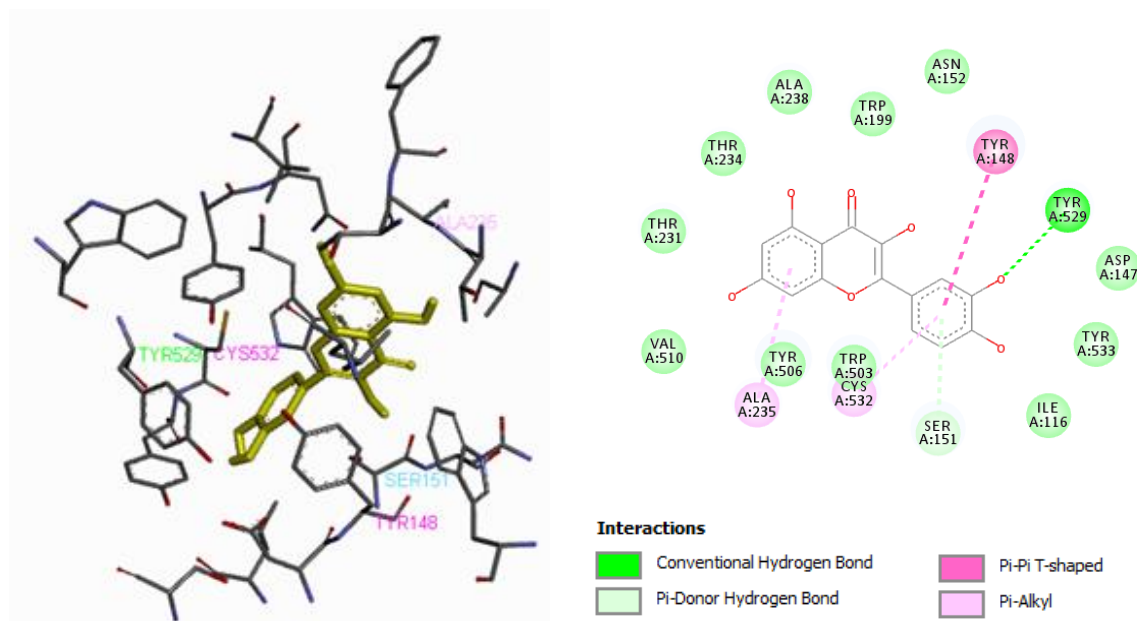
Figura 7. Complexo *ligante-proteína alvo*, formado pela proteína 4U14 (maior parte em vermelho) e pela quercetina (em amarelo)



Fonte: Autoria própria através do *software* Discovery Studio.

Como pode ser visualizado na Figura 10, os aminoácidos chave para interação com a quercetina foram a tirosina (148), serina (151), alanina (235), tirosina (529) e cisteína (532). Interessante observar a existência de interações polares, tais como as ligações de hidrogênio com a tirosina (529) e a serina (151), e apolares ocorrendo com os demais aminoácidos.

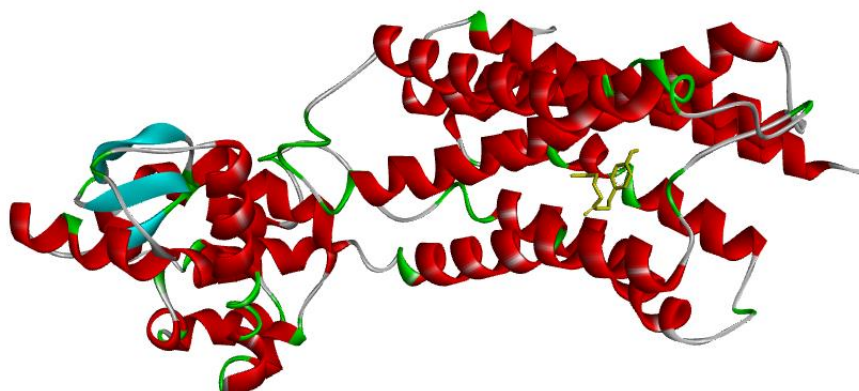
Figura 8. Quercetina interagindo com os aminoácidos do sítio ativo da proteína 4U14



Fonte: Autoria própria através do *software* Discovery Studio.

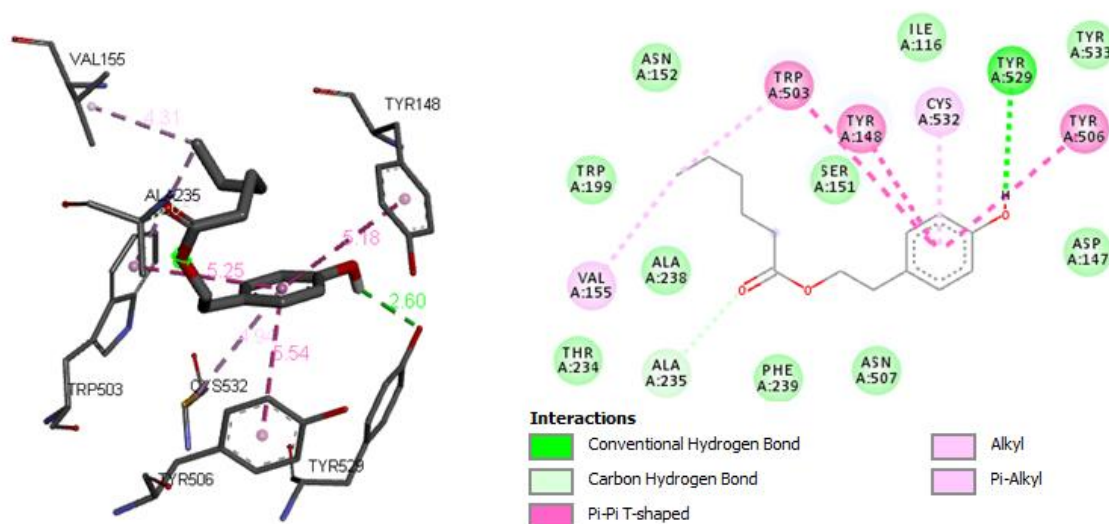
Os resultados obtidos a partir do *docking* da molécula araraína com a proteína alvo receptor intestinal M3 da acetilcolina (PDBID: 4U14) (Figura 11) indicaram uma energia de ligação de -6,7 kcal/mol, indicando uma liberação de energia favorável para interação da araraína com o sítio ativo, porém menor do que aquela observada para a quercetina (-8,0 kcal/mol).

Figura 9. Complexo *ligante -proteína alvo*, formado pela proteína 4U14 (maior parte em vermelho) e pela araquína (em amarelo)



Fonte: Autoria própria através do *software* Discovery Studio.

Figura 10. Interações observadas na ligação da araquína com os aminoácidos do sítio ativo da proteína 4U14



Fonte: Autoria própria através do *software* Discovery Studio.

Em comparação com as interações observadas para a quercetina, foi possível verificar uma maior prevalência de interações hidrofóbicas para a molécula da araquína (Figura 12), e foi possível determinar como aminoácidos chave para

interação com o sítio ativo: tirosina (529), alanina (235), tirosina (506), tirosina (148), triptofano (503), valina (155) e cisteína (532).

A proteína 4U14 está envolvida no aumento da motilidade intestinal ocasionando diarreia. Portanto, a proteína configura-se como um alvo promissor para candidatos à fármacos anti-diarreicos, que podem se ligar à sua estrutura e inibir sua ação, levando ao efeito desejado antidiarreico. Esta proteína é o alvo de atuação dos fármacos antidiarreicos Lorapamida e Triotopium, os quais apresentam energia de ligação com o mesmo sítio ativo de $-7,32$ kcal/mol e $-9,2$ kcal/mol, respectivamente (ADNAN et al., 2019).

A quantidade de energia necessária para que uma molécula se ligue a um determinado alvo molecular reflete na afinidade da molécula pelo receptor, pois quanto mais fácil for a interação entre o composto e o alvo, ou seja, quanto mais estável for o complexo formado, menor será a energia necessária para que esta interação ocorra (BARROS et al., 2015).

As análises realizadas indicam a possível ligação das moléculas quercetina e araquina com o sítio ativo da proteína 4U14, sendo a quercetina a molécula que estabelece uma interação com energia mais favorável. Estudos prévios já descreveram o potencial antidiarreico *in vivo* da quercetina (ROHINI e DAS, 2010; RAJEEV et al., 2010), apontando diversos mecanismos de atuação. De fato, o flavonoide quercetina foi descrito como principal responsável pelo efeito antiarreico *in vivo* da espécie *Psidium guajava* (goiaba) (EZEKWESILI et al., 2010), pertencente ao mesmo gênero da espécie *Psidium guineense* Sw. (araçá). Entretanto, esse é o primeiro estudo sobre possíveis efeitos farmacológicos para a molécula araquina, isolada em 2019 da espécie *P. guineense*.

5. CONCLUSÕES

Através do presente estudo foi possível observar a afinidade dos metabólitos de *P. guineense* (quercetina e araquína) com a proteína receptora 4U14. A energia livre de ligação obtida nos procedimentos de *docking molecular* foi favorável, indicando afinidade com a proteína receptora.

Foi possível avaliar as interações no sítio de ligação entre o receptor e os ligantes avaliados, podendo-se a partir disto, identificar aminoácidos que foram chave para a interação com o sítio ativo.

Os dados obtidos no estudo indicam a provável ligação entre os metabólitos estudados e a proteína 4U14 intestinal, indicando o possível mecanismo pelo qual a quercetina e a araquína podem desenvolver atividade antidiarreica, dando suporte ao uso popular de frutos e infusões de araçá para o tratamento à diarreia.

6. REFERÊNCIAS

- ADNAN M, NAZIM UDDIN CHY M, MOSTAFA KAMAL ATM, AZAD MOK, PAUL A, UDDIN SB, BARLOW JW, FARUQUE MO, PARK CH, CHO DH. Investigation of the Biological Activities and Characterization of Bioactive Constituents of *Ophiorrhiza rugosa* var. *prostrata* (D.Don) & Mondal Leaves through In Vivo, In Vitro, and In Silico Approaches. **Molecules**, v. 24(7), p. 1367, 2019.
- AHMAD, S.; NASRIN, S.; REZA, A. S. M.; CHAKRABARTY, N.; HOQUE, A.; ISLAM, S.; KABIR, M. S. H.; TAREQ, S. M.; ALAM, A. H. M. K.; HAQUE, A.; ARMAN, S. I. *Curculigo recurvata* W.T. Aiton exhibits anti-nociceptive and anti-diarrheal effects in Albino mice and an in silico model. **Anim Models Exp Med** v. 3, p. 169– 181. 2020.
- Atta AH, Mouneir SM. Antidiarrhoeal activity of some Egyptian medicinal plant extracts. **J Ethnopharmacol**, v.92, p.303-309, 2004.
- ANDREI, C. C.; FERREIRA, D. T.; FACCIONE, M.; FARIA, T. J. “Da Química Medicinal à Química Combinatória e Modelagem Molecular: Um Curso Prático”, São Paulo: **Manole**, 2012.
- BABALOLA, I.T.; SHODE, F.O. Ubiquitous ursolic acid: a potential pentacyclic triterpene natural product. **Journal of Pharmacogn Phytochem**, v.2(2), p.214–222, 2013.
- BAJAJ, S., ONG, S. T., CHANDY, K. G. Contributions of natural products to ion channel pharmacology. **Natural Product Reports**. 2020. doi:10.1039/c9np00056a
- BARREIRO, E. J; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. 3ª Edição. Porto Alegre: Editora ArtMed, 2015.
- BARROS, M.E.S. **Estudos de Docking Molecular, Síntese e Atividade Biológica de Análogos da (-)-Massoialactona e da Combretastatina A-4**. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de Pernambuco – Recife, 128f, 2015.
- BERNINI, R.; MINCIONE, E.; BARONTINI, M.; CRISANTE, F. Convenient synthesis of hydroxytyrosol and its lipophilic derivatives from tyrosol or homovanillyl alcohol. **Journal of Agric Food Chem**, v.56(19), p.8897–8904, 2008.
- BERMAN, H. M.; BHAT, T. N.; BOURNE, P. E.; FENG, Z.; GILLILAND, G. L.; IYPE, L.; FENG, Z.; SHINDYALOV, I. N.; WEISSIG, H.; WESTBROOK, J. The protein data bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 235-242, 2000. doi:10.1093/nar/28.1.235
- BOLZANI, V.S. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. **Cienc. Cult.**, v. 68, p.04-05, 2016.
- CARNEIRO, F. M.; SILVA, M. J. P.; BORGES, L. L.; ALBERNAZ, L. C.; COSTA, J. D. P. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência**, v. 3, n. 2, p. 44- 75, 2014.
- COLPO, J.F.; JAHNKE, S.M.; FÜLLER, T. Potencial inseticida de óleos de origem vegetal sobre *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae). **Rev. bras. plantas med**, v.16, n.2, 2014.

COUTINHO, K; MORGON, N. H. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. São Paulo: Livraria da Física, 2007.

CRUZ, A.V.M.; KAPLAN, M.A.C. “Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil”. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n.1, p.47-52, 2004.

EZEKWESILI, J.O., NKEMDILIM, U.U, OKEKE, C.U. Mechanism of antidiarrhoeal effect of ethanolic extract of *Psidium guajava* leaves. **Biokemistri**, v. 22, n. 2, p. 85-90, 2010.

FERNANDES, T.G. In vitro synergistic effect of *Psidium guineense* (Swartz) in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **The Scientific World Journal**, p. 1-7, 2012.

FRANZON, R.C.; CAMPOS, L.Z.O.; PROENÇA, C.E.B.; SOUSA-SILVA, J.C. Araças do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. Brasília: **Embrapa Cerrados**, p. 48, 2009.

GUPTA, A.; CHAUHAN R.; MAHETA, P.; PANDEY, S.; SHAH, S.; YADAV, J.S. Simultaneous quantification of bioactive triterpene acids (ursolic acid and oleanolic acid) in different extracts of *eucalyptus globulus* (L) by HPTLC method. **Pharmacogn Journal**, v.10(1), p.179–185, 2017.

GURYANOV, I.; FIORUCCI, S.; TENNIKOVA, T. Receptor-ligand interactions: Advanced biomedical applications. **Materials Science and Engineering**, v.68, p.890–903, 2016.

HIKAL W. M. et al. Botanical insecticide as simple extractives for pest control. **Cogent Biology**, n. 03, p. 1-16, 2017.

HO, R.; VIOLETTE, A.; CRESSEND, D.; RAHARIVELOMANANA, P.; CARRUPT, P.A.; HOSTETTMANN, K. Antioxidant potential and radical-scavenging effects of flavonoids from the leaves of *Psidium cattleianum* grown in French Polynesia. **Natural Products Research**, v.26(3), p.274–277, 2012.

JAMSHIDI-KIA, F.; LORIGOOINI, Z; AMINI-KHOEI, H. “Medicinal plants: Past history and future perspective”. **Journal of Herbmmed Pharmacology**, v. 7, p.1-7, 2018.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. DOCKING AND SCORING IN VIRTUAL SCREENING FOR DRUG DISCOVERY: methods and applications. **Nature Reviews**, v. 3, p. 935-949, 2004.

LIMA, E. M.; CARNEIRO, A. N.; FERNANDO, L.M.; FELIX, L.P.; OLIVEIRA, A. F.; MOURA, R. T. Jr.; TELES, Y. C. F. First complete NMR data and theoretical study of an antimicrobial formylated dihydrochalcone from *Psidium guineense* Sw. **Natural Product Research**, 2020. DOI: 10.1080/14786419.2020.1771709

LIU, Q. S.; DU, X.; LI, Y.; XIA, Y. L.; AI, S. M.; LIANG, J.; SANG, P.; JI, X. L. Insights into Protein–Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, p.144. 2016. doi:10.3390/ijms17020144

MACAUBAS, C. S.; FÉLIX, M.D.G.; AQUINO, A.K.S.; PEREIRA, P.G.; BRITO, E.V.O.; OLIVEIRA, A.A.; IGOLI, J.O.; WATSON, D.G.; TELES, Y. C. F. Araçain, a tyrosol derivative and other phytochemicals from *Psidium guineense* Sw. **Natural Products Research**, v. 33, p. 1-5, 2019.

MACHADO, C. D. Schinus molle: anatomy of leaves and stems, chemical composition and insecticidal activities of volatile oil against bed bug (*Cimex lectularius*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.29, p.1-10, 2019.

MACIEL, J.K.S.; BRITO, S.G.; CHAVES, O.S.; TELES, Y. C. F.; FERNANDES, M.G.; ASSIS, T. S.; ANDRADE, A.P.; FELIX, L.P.; SILVA, T.M.S; RAMOS, N.S.M.; SILVA, G.R.; SOUZA, M.F.V. New alcamide and antioxidant activity of *Pilosocereus gounellei* A. Weber ex K. Schum. Bly. exRowl. (Cactaceae). **Molecules**, v.21, p.11-23, 2016.

MENG, J.; LI, C.; HUANG, B.; SHE, Z.; ZHANG, G.; ZHANG, L.; ZHU, Q. Genome and Transcriptome Analyses Provide Insight into the Euryhaline Adaptation Mechanism of *Crassostrea gigas*. **Plos One**, v. 8, n. 3, 2013.

MELO, A.P.C.; SELEGUINI, A.; VELOSO, V.R.S. Caracterização física e química de frutos de araçá (*Psidium guineense* Swartz). **Comunicata Scientiae**, v.4, p.91-95, 2013.

MORGON, N. H.; COUTINHO, K. Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular. **São Paulo: Livraria da Física**, 2007.

NAPOLITANO, J.G.; LANKIN, D.C.; CHEN, S.N.; PAULI, G.F. Complete ¹H NMR spectral analysis of ten chemical markers of Ginkgo biloba. **Magn Reson Chem**, v.50(8), p.569–575, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. **Artmed**, 6 ed., 2014.

OLIVEIRA, I. M. A. **Fitoterapia: interações medicamentosas e toxicidade na Farmácia de Oficina**. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Fernando Pessoa, 2016.

RAJEEV K, RAM JS, KHEMRAJ B, RAM K R, ARUN K. Pharmacological review on natural antidiarrhoeal agents. **Der Pharma Chemica**, v. 2(2), p. 66-93, 2010.

RODRIGUES, A.P.; ANDRADE, L.H.C. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais utilizadas pela comunidade de Inhamã, Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, 16, 3,721-730, 2014.

RODRIGUES, R. P.; MANTOANI, S. P.; DE ALMEIDA, J. R.; PINSETTA, F. R.; SEMIGHINI, E. P.; DA SILVA, V. B.;* DA SILVA, C. H. P. Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos, **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 739-736, 2012.

ROHINI RM, DAS AK. Antidiarrheal and anti inflammatory activities of lupeol, quercetin, β -sitosterol, adene-5-en-3-ol and caffeic acid isolated from *Rhizophora mucronata* bark. **Der Pharmacia Lettre**, v. 2(5): p. 95-101, 2010.

- SHARMA, S.; SHARMA, Y.; BHARDWAJ, C. Development and Validation of HPLC Method for the Determination and Quantification of Colchicine in *Gloriosa superba*. **International Research Journal of Pure and Applied Chemistry**, 18, 1, 1-9. 2019.
- SILVA, A.T.; MAZINE, F.F. A família Myrtaceae na Floresta Nacional de Ipanema, Iperó, São Paulo, Brasil. **Rodriguésia**, v. 67, n.1, p. 203-224, 2016.
- SILVA, N. L. A.; MIRANDA, A. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem fitoquímica de plantas de cerrado, da área de proteção ambiental municipal de Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia plena**, v. 6, n.2, 2010.
- SILVA, M. R.; LACERDA, D. B. C. L.; SANTOS, G. G.; MARTINS, D. M. O. Caracterização química de frutos nativos do cerrado. **Cienc. Rural**, v.38(6), p.1790-1793, 2008.
- SILVA, S. M. S. **Esteroides antitumorais: desenvolvimento e avaliação biológica de esteroides estrogênicos potencialmente úteis no tratamento do cancro da mama**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade da Beira Interior - Covilhã, 128f, 2012.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, p. 848, 2017.
- SMITH, J. M.; VAN NESS, H. C.; ABBOTT, M. M. Introdução à Termodinâmica da Engenharia Química. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.
- TAPAS A.R.; SAKARKAR, D.M.; KAKDE, R.B. Flavonoids as nutraceuticals: a review. **Trop J Pharm Res**, v.7(3), p.1089–1099, 2008.
- TELES, Y.C.F.; GOMES, R. A.; OLIVEIRA, M. S.; LUCENA, K. L.; NASCIMENTO, J. S.; AGRA, M. F.; IGOLI, J.O.; GRAY, A.I.; SOUZA, M. F. V.; Phytochemical investigation of *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl and evaluation of its antibacterial activity. **Química Nova**, v.37(9), p.1491-1495, 2014.
- TEWARI, D.; ATANASOV, A. G.; CRISAN, G.; DEVKOTA, H. P.; ECHEVERRIA, J.; GOCAN, D.; MOCAN, A.; MOLDOVAN, C.; SAMOILA, O.; ZENGİN, G.; VODNAR, D.; SZABO, B. Medicinal Plants and Natural Products used in cataract management. **Front Pharmacol**, v.10, p.466, 2019.
- VALENTINI, S. R.; SOMMER W. A.; MATIOLI, G. **Validação de métodos analíticos**. **Arquivos do MUDI**, v. 11, n. 2, p.26-31, 2007.
- VERLI, H.; BARREIRO, E.J. UM PARADIGMA DA QUÍMICA MEDICINAL: A FLEXIBILIDADE DOS LIGANTES E RECEPTORES. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 95-102, 2005.
- VERLI, H. Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular. **Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 1. ed., 2014.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diarrhoeal Disease. Fact Sheet n. 330. Geneva, Switzerland: **World Health Organization**. 2013.
- ZAHIN, M.; AHMAD, I.; AQIL, F. Antioxidant and antimutagenic potential of Psidium guajava leaf extracts. **Drug Chem Toxicol**, v. 40, p.146-153, 2017.