



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



**REBECCA LUSTOSA SILVA DE ALMEIDA LUZ**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS  
ANTICOLINESTERÁSICO E NEUROPROTETOR DE  
COMPOSTOS ISOLADOS DE *Annona muricata*.**

Feira de Santana, BA  
2024

**REBECCA LUSTOSA SILVA DE ALMEIDA LUZ**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS  
ANTICOLINESTERÁSICO E NEUROPROTETOR DE  
COMPOSTOS ISOLADOS DE *Annona muricata*.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia,  
da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito para  
obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Mariana Borges Botura  
Coorientador: Profº Drº Alexsandro Branco

Feira de Santana, BA  
2024

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado - UEFS

L994a

Luz, Rebecca Lustosa Silva de Almeida

Avaliação *in vitro* dos efeitos anticolinesterásico e neuroprotetor de compostos isolados de *Annona Muricata* / Rebecca Lustosa Silva de AlmeidaLuz – 2024.

145 f.: il.

Orientadora: Mariana Borges Botura

Coorientador: Alexsandro Branco

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Feira de Santana, 2024.

1.Farmacologia. 2.Produtos naturais. 3.Annonaceae. 4. Doença de Alzheimer. I. Botura, Mariana Borges, orient. II. Branco, Alexsandro, coorient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

# REBECCA LUSTOSA SILVA DE ALMEIDA LUZ

## “Avaliação in vitro dos efeitos anticolinesterásico e neuroprotetor de compostos isolados de *Annona muricata*”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, área de concentração em Biotecnologia com ênfase em Recursos Naturais da Região Nordeste, como requisito para obtenção do grau de doutor, tendo sido aprovada pelos membros signatários abaixo.

Feira de Santana, Bahia, 21 de outubro de 2024.

Documento assinado digitalmente  
 MARIANA BORGES BOTURA  
Data: 22/10/2024 13:52:06-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. **Mariana Borges Botura**  
Universidade Estadual de Feira de Santana

Documento assinado digitalmente  
 VICTOR DIOGENES AMARAL DA SILVA  
Data: 23/10/2024 12:25:29-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Victor Diogenes Amaral da Silva**  
Universidade Federal da Bahia

Documento assinado digitalmente  
 ANDRE LACERDA BRAGA TELES  
Data: 21/10/2024 12:53:04-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **André Lacerda Braga Teles**  
Universidade do Estado da Bahia

Documento assinado digitalmente  
 GILDOMAR LIMA VALASQUEZ JUNIOR  
Data: 22/10/2024 15:17:57-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Gildomar Lima Velasquez Júnior**  
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Documento assinado digitalmente  
 CLAYTON QUEIROZ ALVES  
Data: 23/10/2024 14:31:51-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Clayton Queiroz Alves**  
Universidade Estadual de Feira de Santana

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida. E por se mostrar presente em todos os momentos, iluminando meus caminhos e minhas escolhas, intercedendo por mim e me dando coragem e força para enfrentar os obstáculos e as dificuldades

À minha avó, Ione (*in memoriam*), por ser meu exemplo de força e fé.

Aos os meus pais, Edson e Alcimeire, pelo apoio incondicional, pela base para chegar até aqui, além do incentivo sempre. E ao meu irmão, Edson, pelo amor.

À professora Dra. Mariana Botura, minha orientadora, pela dedicação na construção desse trabalho, por acreditar em meu potencial, por todo apoio , incentivo, atenção, paciência, gentileza e por abrir portas para as oportunidades.

Ao professor Dr. Alessandro Branco, meu co-orientador, pela disponibilidade, incentivo e solicitude no estudo químico e por toda contribuição na construção deste trabalho.

À professora Dra. Silvia Lima Costa (LabNq/UFBA), pela colaboração com esse estudo, pela oportunidade de aprendizado, e por me acolher tão bem no LabNq.

Ao professor Dr. Raimundo Braz Filho pela solicitude e pelas maravilhosas contribuições na elucidação estrutural.

Ao professor Dr. Ivo Curcino (UENF) pela realização das análises de Ressonância Magnética Nuclear.

Ao professor Dr. Josean Fechine, e ao Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (UFPB), pela realização das análises espectrométricas.

Ao professor Dr. Manoelito Coelho, ao Laboratório de Modelagem Molecular (UEFS), e a Matheus pela colaboração na realização dos ensaios de Acoplamento Molecular deste trabalho.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Biotecnologia/UEFS pelos valorosos ensinamentos.

À coordenação do programa de pós-graduação em Biotecnologia/UEFS.

Ao secretário da pós-graduação Alberto pela disponibilidade e eficiência.

A todos os membros do Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular (LabNq/UFBA), pelo aprendizado, pelo acolhimento. Em especial à Cleo por toda colaboração.

Ao Laboratório de Fitoquímica e a todos os agregados, especialmente a Annabel, Esther, Euder e Mara, por tornarem a rotina mais leve, o bom convívio, as boas discussões e, a alegria.

Aos amigos que sempre estiveram torcendo muito por mim, e me dando todo apoio e incentivo. Muito obrigada pelo carinho! Um agradecimento especial a Isabela, pela amizade pelo apoio nos momentos difíceis, bons conselhos e pelo incentivo.

À Universidade Estadual de Feira de Santana por me proporcionar mais uma oportunidade de crescimento profissional e na vida acadêmica.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu: há tempo de nascer e tempo de morrer; tempo de plantar e tempo de colher.”

Eclesiastes 3:1

## **RESUMO**

A doença de Alzheimer (DA) é uma patologia neurodegenerativa de grande impacto socioeconômico, que afeta principalmente a população idosa. Os fármacos disponíveis apresentam muitas reações adversas e elevado custo de terapia. O estudo de produtos naturais bioativos favorece a descoberta de compostos usados como matrizes para fármacos, sendo a família Annonaceae promissora pela composição química e distribuição no território nacional. Este trabalho foi dividido em dois capítulos. O primeiro capítulo faz uma revisão de literatura sobre espécies e fitocompostos da família Annonaceae que possuem ação no sistema nervoso central, com o objetivo de levantar as principais espécies e seus compostos bioativos. O conhecimento dessas atividades agrega para a exploração do potencial farmacológico dessa família. O segundo capítulo teve como objetivo avaliar *in vitro* e *in silico* a atividade anticolinesterásica e neuroproteção de compostos isolados da espécie *Annona muricata*. A determinação estrutural desses produtos naturais foi realizada através da análise dos espectros obtidos por espectrometria de massas (ESI-MS) e Ressonância Magnética Nuclear unidimensional (RMN 1D) e bidimensional (RMN 1D e 2D), possibilitando elucidar a estrutura de 22,23-dihidropiprenol-10 (1) e seu derivado esterificado (2). Ensaios *in vitro* avaliaram os poliprenois 1 e 2 frente a inibição da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase, a citotoxicidade em células PC12 e o efeito neuroprotetor em modelo de dano inflamatório com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS, 5 µg/mL) em células PC12 diferenciadas. O poliprenol 1 apresentou baixa atividade (36%) para a acetilcolinesterase enquanto o 2 mostrou alta seletividade para a inibição desta enzima (82%). Os resultados obtidos com o teste de viabilidade celular demonstraram que o poliprenol 1 não foi tóxico para células PC12 em nenhuma das concentrações testadas (0.3 a 200 µM) e o poliprenol 2 foi tóxico em concentrações maiores que 10 µM. Em baixas concentrações (0.3 µM), ambos os compostos atenuaram os efeitos da exposição ao LPS em células PC12 diferenciadas. A interação dos poliprenois com a enzima Acetilcolinesterase foi avaliada por ensaio de ancoragem molecular e o poliprenol 2 apresentou interações *in silico* importantes com a enzima. Este trabalho permitiu a elucidação estrutural de dois novos 22,23-dihidroprenois e forneceu evidências sobre a atividade anticolinesterásica e de proteção aos danos induzidos pelo LPS nas células PC12.

**Palavras-chave:** Annonaceae; Neuroproteção; Poliprenol; Acetilcolinesterase; Citotoxicidade.

## ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease with a major socioeconomic impact, mainly affecting the elderly population. Available drugs have many adverse reactions and high treatment costs. The study of bioactive natural products favors the discovery of compounds used as drug matrices, with the Annonaceae family being promising due to its chemical composition and distribution in the national territory. This work was divided into two chapters. The first chapter reviews the literature on species and phytocompounds of the Annonaceae family that act on the central nervous system, with the aim of identifying the main species and their bioactive compounds. Knowledge of these activities contributes to the exploration of the pharmacological potential of this family. The second chapter aimed to evaluate *in vitro* and *in silico* the anticholinesterase activity and neuroprotection of compounds isolated from the species *Annona muricata*. The structural determination of these natural products was performed by analyzing the spectra obtained by mass spectrometry (ESI-MS) and one- and two-dimensional Nuclear Magnetic Resonance (1D and 2D NMR), allowing the elucidation of the structure of 22,23-dihydropolypropenol-10 (1) and its esterified derivative (2). *In vitro* assays evaluated polypropenols 1 and 2 against the inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase, cytotoxicity in PC12 cells and the neuroprotective effect in an inflammatory damage model with Escherichia coli lipopolysaccharide (LPS, 5 µg/mL) in differentiated PC12 cells. Polypropenol 1 showed low activity (36%) for acetylcholinesterase, while 2 showed high selectivity for the inhibition of this enzyme (82%). The results obtained with the cell viability test demonstrated that polypropenol 1 was not toxic to PC12 cells at any of the concentrations tested (0.3 to 200 µM) and polypropenol 2 was toxic at concentrations higher than 10 µM. At low concentrations (0.3 µM), both compounds attenuated the effects of LPS exposure on differentiated PC12 cells. The interaction of polypropenols with the acetylcholinesterase enzyme was evaluated by molecular docking assay and polypropenol 2 showed important *in silico* interactions with the enzyme. This work allowed the structural elucidation of two new 22,23-dihydroproprenols and provided evidence of anticholinesterase activity and protection against LPS-induced damage in PC12 cells.

**Keywords:** Annonaceae; Neuroprotection; Polypropenol; Acetylcholinesterase; Cytotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

### Introdução Geral

Figura 1 - <i>Annona muricata</i> : árvores, frutos e galhos	16
Figura 2 – Transmissão neuronal da acetilcolina e hidrólise pela AChE	21
Figura 3- A) Complexo binário da Acetilcolinesterase humana (hAChE) nativa com Donepezil B) Estrutura cristalina da butirilcolinesterase humana totalmente glicosilada. PDB 4AQD.	22
Figura 4- Representação esquemática da formação da rede neuronal PC-12.	23

### Capítulo 1

Figura 01- Diagrama da pesquisa, com as etapas para seleção e análise dos artigos	34
Figura 2. Número de publicações por ano	35
Figura 3 – Distribuição da publicação nos países do mundo. O gráfico representou o número de publicações encontradas em cada país.	36
Figura 4 - Distribuição dos gêneros de Annonaceae nos estudos selecionados	36
Figura 5- Estrutura química de compostos isolados de espécies da família Annonaceae	40
Figura 6- Fonte para obtenção de compostos ativos em espécies de Annonaceae	42
Figura 7- Órgão vegetal utilizado para obtenção de extratos e compostos bioativos da família Annonaceae.	43

### Capítulo 2

Figura 1- Estrutura geral de poliprenois. Unidades t e c representam o número de resíduos isoprenoides nas configurações trans e cis, e $\alpha$ e $\omega$ são os resíduos isoprenoides terminais, respectivamente.	78
Figura 2- Estrutura química dos dihidropoliprenois 1 e 2 isolados de <i>Annona muricata</i>	89
Figura 3- Porcentagens de inibição da colinesterase por compostos isolados de <i>A. muricata</i> . Todos os resultados são apresentados com média e desvio padrão. * Diferença significativa para valor de $p > 0,05$ , em comparação com o controle negativo, etanol.	91
Figura 4- Estrutura da Acetilcolinesterase com domínios de ligação: em azul, sítio periférico aniónico; em vermelho,bolso acil; em amarelo, domínio aniónico ; em verde, aminoácidos da tríade catalítica ; e em roxo, espaço oxiânon.	93
Figura 5- A) Interações do Poliprenol 1 com a enzima acetilcolinesterase (6O4W). B) Interações do Poliprenol 2 com a enzima acetilcolinesterase (6O4W).	94
Figura 6- Efeito citotóxico do poliprenol 1 (A) de <i>A. muricata</i> (PP1). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT 24 h após o tratamento com PP1 (1 a 200 $\mu$ M); os resultados são expressos em porcentagem do controle (DMSO 0,1%), considerado 100% (* $p < 0,05$ , ANOVA seguida do teste de Dunnett). Imagens representativas da morfologia das células PC12 em condições controle ou após exposição ao PP1 (1 a 200 $\mu$ M) (B) por microscopia de contraste de fase; obj $\times 20$ ; barra de escala = 100 $\mu$ m.	98
Figura 7- Efeito citotóxico do poliprenol 2 (A) de <i>A. muricata</i> (PP2). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT 24 h após o tratamento com PP2 (0,3 a 30 $\mu$ M); os resultados são expressos em porcentagem do controle (DMSO 0,1%), considerado 100% (* $p < 0,05$ , ANOVA seguida do teste de Dunnett), IC50 = 10,83 $\mu$ M. Imagens representativas da morfologia das células PC12 em condições controle ou após exposição ao PP1 (1 a 200 $\mu$ M) (B) por microscopia de contraste de fase; obj $\times 20$ ; barra de escala =100 $\mu$ m.	99
Figura 8- Análise do efeito neuroprotetor induzida pelo poliprenol 1 de <i>A. muricata</i> em culturas de células PC12 contra danos inflamatórios. (A) A viabilidade celular foi determinada após coloração com SRB em culturas 24 h após tratamento com LPS (5 $\mu$ g/mL) + poliprenol 1 (0.3 a 10 $\mu$ M). Os resultados são expressos como uma porcentagem do controle (DMSO 0,1%), considerado 100% (* $p < 0,05$ , ANOVA seguido pelo teste de Dunnett). Os valores foram expressos como médias $\pm$ DP. (B) Fotomicrografias de contraste de fase representativas das culturas nas condições controle, tratadas com LPS e tratadas com LPS com PP1 (1 e 10 $\mu$ g/mL); Obj. $\times 20$ ; escala = 100 $\mu$ m.	100
Figura 9- Análise do efeito neuroprotetor induzido pelo poliprenol 2 de <i>A. muricata</i> em culturas de células PC12 contra danos inflamatórios. (A) A viabilidade celular foi determinada após coloração com SRB em culturas 24 h após tratamento com LPS (5 $\mu$ g/mL) + poliprenol 2 (0.3 a 10 $\mu$ M). Os resultados são expressos como uma porcentagem do controle (DMSO 0,1%), considerado 100% (* $p < 0,05$ , ANOVA seguido pelo teste de Dunnett). Os valores foram expressos como médias $\pm$ DP. (B) Fotomicrografias de contraste de fase representativas das culturas nas condições controle, tratadas com LPS e tratadas com LPS com PP2 (1 e 10 $\mu$ g/mL); Obj. $\times 20$ ; escala = 100 $\mu$ m.	101

## **LISTA DE TABELAS E QUADROS**

### **Capítulo 1**

Quadro 1 - Levantamento de espécies da família Annonaceae, principais metabólitos identificados e 50 atividades relacionadas ao Sistema Nervoso Central.

### **Capítulo 2**

Tabela 1 - RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) para poliprenóis 1 e 2 em  $\text{C}_6\text{D}_6$  como solvente, 90 incluindo dados HSQC ( $^1\text{JCH}$ ) e HMBC ( $^2\text{JCH}$  e  $^3\text{JCH}$ ). Deslocamentos químicos ( $\delta$ , ppm). [1] Misiak et al., Magn. Ressonância. Química, v. 47, p. 825-829, 2009.

Quadro 1 -Propriedades farmacocinéticas e toxicológicas avaliadas no perfil ADMET dos 95 poliprenois isolados da *Annona muricata*.

## **LISTA DE APÊNDICES/ MATERIAL SUPLEMENTAR**

<b>Figura 1S - Planilha de planejamento para cromatografia em coluna flash (Fair &amp; Kormos, 2008)</b>	108
<b>Figura 2S - Cromatograma teórico (Fair &amp; Kormos, 2008)</b>	109
<b>Figura 3S - Análise por cromatografia em camada delgada (CCD) dos poliprenois obtido nas frações 3 e 4 do extrato hexano de <i>Annona muricata</i>.</b>	110
<b>Figura 4S - Análise por Cromatografia Líquida de alta Eficiência (CLAE) acoplado com espectro UV e arranjo de diodos (UV-DAD) do poliprenol 1.</b>	111
<b>Figura 5S - Análise por Cromatografia Líquida de alta Eficiência (CLAE) acoplado com espectro UV e arranjo de diodos (UV-DAD) do poliprenol 2.</b>	112
<b>Figura 6S - Análise do poliprenol 1 por Espectrometria de massas.</b>	113
<b>Figura 7SA - Análise do poliprenol 2 por Espectrometria de massas.</b>	114
<b>Figura 7S-B - Poliprenol 2 por Espectrometria de massas de alta resolução. Fragmentação</b>	115
<b>Figura 8S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear. <math>^1\text{H}</math> (500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.</b>	116
<b>Figura 9S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear. Expansões do espectro <math>^1\text{H}</math> (500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.- Parte 1</b>	117
<b>Figura 10S- Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear. Expansões do espectro <math>^1\text{H}</math> (500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.- Parte 2</b>	118
<b>Figura 11S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear. DEPT <math>^{13}\text{C}</math> (125 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.</b>	119
<b>Figura 12S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear. Expansões do espectro de DEPT <math>^{13}\text{C}</math> (125 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.- Parte 1</b>	120
<b>Figura 13S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear. Expansões do espectro de DEPT <math>^{13}\text{C}</math> (125 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.- Parte 2</b>	121
<b>Figura 14S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear. Análise 2D- espectro HSQC (125 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.</b>	122
<b>Figura 15S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear. Expansões do espectro HSQC (125 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.- Parte 1</b>	123
<b>Figura 16S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear. Expansões do espectro HSQC (125 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.- Parte 2</b>	124
<b>Figura 17S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear. Análise 2D- espectro HMBC (125 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.</b>	125
<b>Figura 18S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear. Expansões do HMBC(125 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.- Parte 1</b>	126
<b>Figura 19S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear. Expansões do HMBC(125 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.- Parte 2</b>	127
<b>Figura 20S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear. Expansões do HMBC(125 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.- Parte 3</b>	128
<b>Figura 21S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear. Análise <math>^1\text{H}</math>-<math>^1\text{H}</math> COSY (500 MHz; 500MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.</b>	129
<b>Figura 22S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear. Análise NOESY (500 MHz; 500 MH), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub></b>	129
<b>Figura 23S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear. <math>^1\text{H}</math> (500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.</b>	130
<b>Figura 24S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear. Expansões do espectro <math>^1\text{H}</math> (500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.- Parte 1</b>	131
<b>Figura 25S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear. Expansões do espectro <math>^1\text{H}</math> (500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.- Parte 2</b>	132
<b>Figura 26S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear. Expansões do DEPT <math>^{13}\text{C}</math> (125 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.</b>	133
<b>Figura 27S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear. Expansões do espectro de DEPT <math>^{13}\text{C}</math> (125 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.- Parte 1</b>	134
<b>Figura 28S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear. Expansões do espectro de DEPT <math>^{13}\text{C}</math> (125 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.- Parte 2</b>	135
<b>Figura 29S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear. Expansões do espectro de DEPT <math>^{13}\text{C}</math> (125 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.- Parte 3</b>	136
<b>Figura 30S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear. Análise 2D- espectro HSQC (125 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.</b>	137
<b>Figura 31S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear. Expansões do espectro HSQC (125 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.- Parte 1</b>	138
<b>Figura 32S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear. Análise 2D- espectro HMBC</b>	139

(125 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.

**Figura 33S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear.** Expansões do HMBC(125 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.- Parte 1 140

**Figura 34S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear.** Expansões do HMBC(125 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.- Parte 2 141

**Figura 35S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear.** Expansões do HMBC(125 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.- Parte 3 142

**Figura 36S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear.** Análise COSY (500 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>. 143

**Figura 37S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear.** Análise NOESY (500 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>. 144

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

- HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência
- RMN - Ressonância magnética nuclear
- LC-ESI-MS - Cromatografia líquida-Ionização por Eletrospray-Espectrometria de massas
- AChE - Acetylcolinesterase
- BChE - Butirilcolinesterase
- CI50- Concentração inibitoria suficiente para inibir, *in vitro*, determinado processo ou componente biológico em 50% da quantidade inicial.
- DNs- Doenças neurológicas
- DTNB - Ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
- ACTI - Acetiltiocolina
- RMSD - Desvio quadrático médio
- ADMET - propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
- BBB - Barreira hematoencefálica
- DMEM - Meio Eagle modificado por Dulbecco
- PBS - solução salina tamponada com fosfato
- MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
- SRB - Sulforrodamina B
- NGF - Fator de crescimento neuronal
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- FBS - Soro Fetal Bovino
- RPM - Rotações por Minuto
- TCA- ácido tricloroacético
- PP1- Poliprenol 1
- PP2 - Poliprenol 2

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	13
1.1	FAMÍLIA ANNONACEAE	14
1.1.2	<i>Annona muricata</i>	16
1.2	PANORAMA GERAL DOENÇA DE ALZHEIMER	18
1.2.1	COLINESTERASES	20
1.2.2	CÉLULAS DA LINHAGEM PC12 E PESQUISA DE DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS CELULARES	22
2	OBJETIVOS	24
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
	REFERÊNCIAS	25
	<b>CAPÍTULO 1: PLANTAS DA FAMÍLIA ANNONACEAE ATUANDO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL: UMA REVISÃO PARA IDENTIFICAR ESPÉCIES POTENCIAIS</b>	29
1	INTRODUÇÃO	31
2	METODOLOGIA	32
3	ANÁLISE PROSPECTIVA DAS PUBLICAÇÕES	35
4	CONSIDERAÇÕES SOBRE GÊNEROS DA FAMÍLIA ANNONACEAE	36
5	MÉTODOS DE TRIAGEM USADOS PARA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS	38
6	FONTES DE OBTENÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE PLANTAS ANNONACEAE	41
7	AVALIAÇÃO DE PLANTAS ANNONACEAE COM AÇÃO NO SNC	44
8	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	49
	REFERÊNCIAS	50
	<b>CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA E DO EFEITO NEUROPROTETOR DE DOIS NOVOS 22,23-DIHIDROPRENOIS ISOLADOS DE ANNONA MURICATA</b>	74
1	INTRODUÇÃO	78
2	METODOLOGIA	80
3	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE POLIPRENOIS DO EXTRATO HEXANO DE <i>Annona muricata</i>	86
3.2	ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA	91
3.3	AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS E TOXICOLÓGICA (ADMET)	94
3.4	ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS PC12	97
4	CONCLUSÃO	103
	REFERÊNCIAS	103
	APÊNDICES/MATERIAL SUPLEMENTAR	108

## **INTRODUÇÃO GERAL**

## INTRODUÇÃO GERAL

Os produtos naturais representam uma importante fonte de obtenção de novos fármacos. Apesar da crescente descoberta de fármacos sintéticos, os produtos naturais oferecem a oportunidade de descobrir novos compostos que podem ser convertidos em fármacos dada a diversidade de sua estrutura química (Dzobo, 2022). Estes produtos conferem vantagens notáveis sobre as moléculas sintéticas convencionais, são dotados de rica diversidade e complexidade estrutural, proporcionando um espaço químico biologicamente relevante mais amplo (Clardy; Walsh, 2004; Huang; Zhang, 2022).

Os produtos naturais são conhecidos e utilizados desde a antiguidade pelas suas propriedades terapêuticas. Antes do advento das tecnologias de triagem pós-genômica de alta eficiência, mais de 80% dos medicamentos foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais. Os medicamentos fitoterápicos são obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais (Brasil, 2014), que podem ter menor toxicidade e menos efeitos colaterais do que os medicamentos sintéticos (Deshpande *et al.*, 2019).

Nos últimos anos, as atividades biológicas, os valores nutricionais e os potenciais benefícios terapêuticos e de saúde dos produtos naturais e seus compostos bioativos têm sido intensamente explorados e investigados. Com base em pesquisas experimentais anteriores, os produtos naturais podem ser eficazes no tratamento de doenças neurodegenerativas e têm sido sugeridos como um tratamento promissor e alternativo em comparação com as drogas sintéticas (Olasehinde *et al.*, 2019) e como potenciais agentes neuroprotetores (Sairazi; Sirajudeen, 2020). Múltiplas linhas de estudos provaram cientificamente que diferentes produtos naturais, incluindo derivados de plantas, promovem efeitos benéficos no tratamento da Doença de Alzheimer usando modelos animais adequados (Manoharan *et al.*, 2016) e exibem benefícios de melhoria no tratamento da DA em relação à disfunção mitocondrial (Jin *et al.*, 2021).

Os produtos naturais passam por uma redescoberta como fonte de novos medicamentos graças aos estudos que trazem eficácia dos metabólitos secundários e são uma nova abordagem terapêutica para o tratamento da doença de Alzheimer e no tratamento de outros distúrbios e de certas doenças que acompanham o envelhecimento, como a doença de Parkinson (Noori *et al.*, 2021).

## 1.1. FAMÍLIA ANNONACEAE

Annonaceae é uma das famílias mais diversas e primitivas das angiospermas, com cerca de 200 gêneros e 2500 espécies ao redor do mundo. *Annona* é o maior gênero, com aproximadamente 162 espécies, e amplamente distribuído nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, incluindo o Brasil (Maas *et al.*, 2001).

Cientificamente, destaca-se pelo grande número de espécies de importância para os diversos setores industriais. Muitas espécies apresentam interesse como frutíferas comerciais, em função de possuírem frutos comestíveis e saborosos, dos quais destacam-se as espécies dos gêneros *Annona*, *Rollinia*, *Duguetia*, *Uvaria* e *Asimina* (Nogueira *et al.*, 2005). O valor econômico dessas espécies está relacionado principalmente às propriedades nutricionais dos frutos que são consumidos *in natura*, mas também são amplamente utilizados em produtos processados ou semiprocessados (Lage, 2011; Diniz *et al.*, 2013).

O gênero *Annona L.* pertence à família Annonaceae e compreende cerca de 162 espécies de árvores e arbustos (Chatrou *et al.*, 2012). No Brasil, existem cerca de 60 espécies, com maior ocorrência em florestas e com poucos representantes em áreas abertas (Costa *et al.*, 2011). Das 13 espécies que produzem frutos comestíveis, 9 são cultivadas, 5 possuem maior importância econômica, sendo que, dessas, três se destacam no mercado: *Annona muricata*, *Annona squamosa* e *Annona cherimola* (São José *et al.*, 2014).

No Brasil, a graviola (*A. muricata*) é a Annonaceae com o maior potencial de industrialização, utilizada na produção de polpa para diversas finalidades, sendo plantada em escala comercial, principalmente nos estados da região Nordeste (Scaloppi-Junior; Martins, 2003; Dutra *et al.*, 2012), que é responsável pela maior parte da produção das principais anonáceas cultivadas no Brasil, como graviola e pinha. De acordo com o último censo agropecuário nacional, o Estado da Bahia lidera a produção nacional de graviola (59,6%), seguido dos estados de Pernambuco (19,1%) e Alagoas (7,7%) (IBGE, 2017).

Dentre os compostos bioativos identificados em espécies de *Annona*, a principal classe de constituintes relatadas é a das acetogeninas (ACGs) extensivamente investigadas por seus efeitos antitumorais. As acetogeninas também exibem efeitos imunossupressores, pesticidas, antiprotozoários, antimicrobianos, antimaláricos, anti-helmínticos e antivirais (Asare *et al.*, 2015, Barbalho *et al.* 2012). Além disso, alcaloides, óleos essenciais, flavonoides e terpenoides, entre outros, têm sido relatados como substâncias relacionadas com várias das atividades farmacológicas detectadas dessas espécies (Barbalho *et al.*, 2012; Quílez *et al.*, 2018).

As espécies de *Annona* têm sido usadas há muito tempo por povos nativos em áreas tropicais. Em diversos países, diferentes partes das plantas, principalmente folhas e sementes,

são utilizadas com finalidade medicinal, incluindo aplicações no tratamento de doenças parasitárias e infecciosas, câncer, diabetes, úlceras pépticas, ansiedade, convulsão, insônia, cistite, alterações hepáticas, hipertensão e anti-inflamatório. Muitas espécies dessa família possuem atividade farmacológica, tais como atividade antinociceptiva (Almeida *et al.*, 2012; Martínez-Vásquez *et al.*, 2012), antioxidante e antitumoral (Lima *et al.*, 2012), e atividade ansiolítica e sedativa sobre o sistema nervoso central em roedores (Diniz *et al.*, 2013).

Dentre as espécies com grande número de estudos pode-se destacar: *A. muricata*, *A. squamosa*, *A. cherimola*, *A. senegalensis*, *A. montana*, *A. glabra*, *A. crassiflora*, *A. reticulata* e *A. coriacea* (Quilez *et al.*, 2018). Anonaina, asimilobina, liriodenina e reticulina são alcaloides descritos em muitas espécies do gênero *Annona* e podem ser considerados marcadores quimiotaxonômicos deste gênero (Cruz *et al.*, 2011). A anonaína já foi considerada um agente antiepileptico por atuar no receptor GABA (ácido gama-aminobutírico) em ratos. O GABA é um importante neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central. Ratos epilépticos tratados com anonaína por 15 dias (250 mg/kg) apresentaram melhora associada à reversão das alterações no receptor GABA. Este alcaloide mostrou efeito semelhante ao da carbamazepina, uma droga padrão usada para o tratamento da epilepsia (Porwal; Kumar, 2015).

A administração do extrato alcaloide total das partes aéreas de *A. cherimola* em camundongos, em doses de 5 a 10 mg/kg, induziu efeitos antidepressivos. Os alcaloides liriodenina e nornuciferina foram identificados como os principais constituintes do extrato. Os efeitos da anomontina, um alcaloide isolado das raízes de *A. purpurea*, foram estudados no transtorno de ansiedade. A administração desse alcaloide a camundongos com doses de 1, 10 e 30 mg/kg induz, pelo menos com as doses mais altas, efeitos ansiolíticos comparáveis aos do diazepam, um fármaco comumente utilizado, na dose de 1 mg/kg (Egydio-Brandão *et al.*, 2017).

Anolobina e roemerolina, dois alcaloides aporfínicos, mostraram atividade inibitória moderada na acetilcolinesterase com valores de  $IC_{50}$  de 22,4 e 26,3  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Todos os alcaloides relatados para o caule de *A. glabra* (desidrocoridalamina, dehidrocoritenquina, palmatina, pseudocolumbamina e pseudopalmatina) inibiram a atividade da acetilcolinesterase com  $IC_{50}$  variando de 0,4 a 8,4  $\mu\text{M}$  (Lee; Tsai, 2015). Os alcaloides têm sido referidos como a principal classe de metabólitos secundários de plantas relacionados a efeitos anticolinesterásicos (Barbosa-Filho *et al.*, 2006). Bhalke e Chavan, (2011) concluíram que os extratos de acetato de etila, metanol e éter de petróleo da casca de *A. reticulata* L. possuíam atividades analgésicas e depressoras do SNC, em diferentes modelos animais. Os

extratos mostraram significativa atividade analgésica central avaliada pelo ensaio de atividade locomotora.

Embora uma grande variedade de alcaloides tenha sido identificada em espécies de *Annona*, a maioria deles não foi investigada por atividades biológicas. Entre 2005 e 2016, menos de 30% dos alcaloides relatados para várias espécies deste gênero possuíam alguma atividade biológica associada. A investigação de alcaloides da espécie *Annona* é promissora para a descoberta de atividades biológicas relacionadas a essas espécies (Egydio-Brandão *et al.*, 2017).

### **1.1.2. *Annona muricata***

A Graviola (*Annona muricata* L.), também conhecida como “soursop”, em inglês, pertence à família Annonaceae. Esta planta é bem cultivada por seu valor econômico. É uma árvore, ereta que pode crescer até 5-8 metros, com folhas largas e verde-escuras e aspecto suave e brilhante. É nativa nas regiões tropicais da América Central e regiões do norte da América do Sul, mas tem sido distribuída por todas as regiões tropicais (Freitas, 2012).

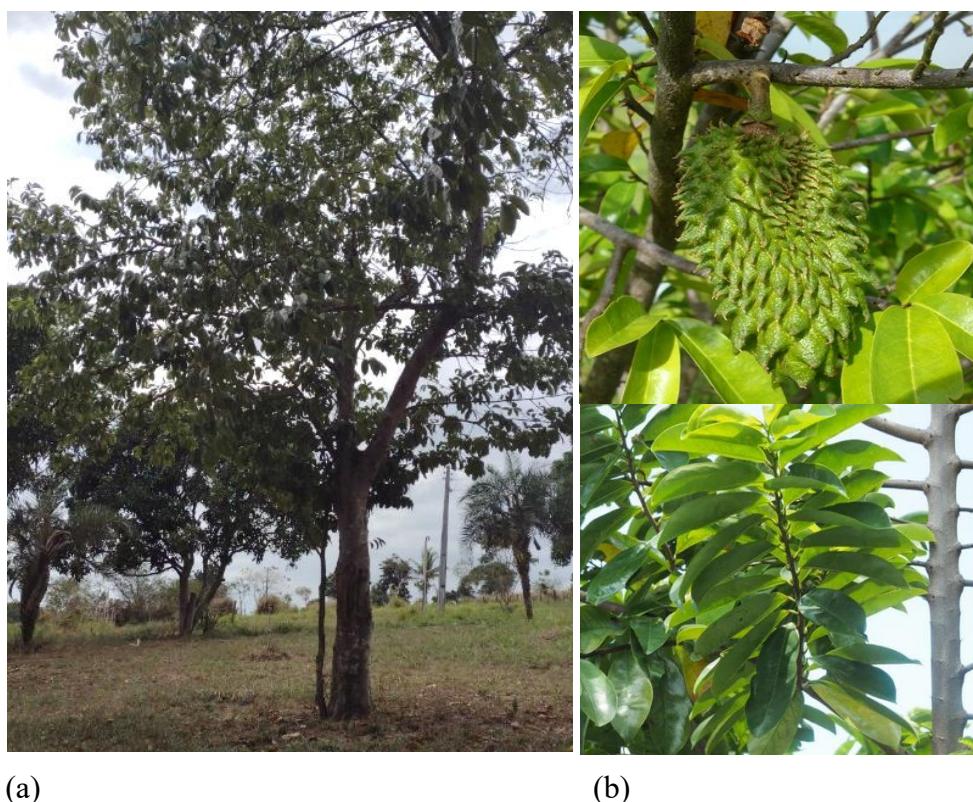


Figura 1 - *Annona muricata* : árvores (a), frutos e galhos (b)  
Fonte: (a) Autora; (b) National Parks -Flora Fauna Web, 2023

Seus frutos são processados principalmente como sucos, sorvetes, geleias e doces. As cascas, folhas, caules, raízes e sementes de frutos também são bastante conhecidas e

amplamente utilizadas na medicina tradicional, contendo uma grande variedade de compostos químicos conhecidos por suas propriedades medicinais (Matos; Lorenzi, 2008). Diferentes partes de *A. muricata* são amplamente utilizadas na medicina de muitos países para tratar doenças. A fruta é usada como remédio natural para nevralgias, artrite, diarreia, disenteria, febre, malária, parasitas, reumatismo, erupções cutâneas, e também é consumida para elevar o leite materno após o parto. As folhas são empregadas para tratar cistite, diabetes, dores de cabeça e insônia (Mishra *et al.*, 2013). A decocção das folhas é aplicada topicalmente por sua efeitos antirreumáticos e nevrálgicos, e para reduzir abcessos (Abdul *et al.*, 2018).

As folhas de *A. muricata* possuem compostos bioativos com alta capacidade antioxidante. Portanto, podem ser usados em uma série de produtos de alto valor agregado, como suplementos alimentares e fitoterápicos. Além disso, toneladas de folhas e galhos são descartados anualmente em países produtores porque a poda é uma prática indispensável para a colheita rápida dos frutos. A triagem fitoquímica de extratos de folhas de *A. muricata* revelou metabólitos secundários como alcaloides, saponinas, terpenoides, flavonoides, cumarinas e lactonas, antraquinonas, taninos, glicosídeos cardíacos, acetogeninas anonáceas, fenois e fitoesterois (Gavamukulya *et al.*, 2014; Moraes *et al.*, 2016).

Duzentos e doze compostos bioativos foram relatados para a *A. muricata*. Os compostos predominantes são as acetogeninas seguidas de alcaloides, fenóis e outros compostos. As folhas e as sementes são os principais órgãos estudados da espécie, provavelmente por serem os mais tradicionalmente utilizados. Nas investigações fitoquímicas anteriores, mais de 120 acetogeninas foram relatadas nas folhas, caules, cascas, sementes, polpa e casca do fruto de *A. muricata* e, aproximadamente 46 delas foram identificadas a partir das folhas (Coria-Téllez *et al.*, 2016).

Os compostos fenólicos, em sua maioria, são solúveis em água, tão logo, o extrato mais comumente utilizado na medicina tradicional é a infusão aquosa (Coria-Téllez *et al.*, 2016). Trinta e quatro compostos fenólicos foram isolados das folhas de *A. muricata*. A purificação do extrato de folhas de N-butanol de *A. muricata* levou ao isolamento de robinetina, quercetina, apigenina-6-C-glicosídeo, ácido gálico e luteolina -7,3'-di-O-glicosídeo (George *et al.*, 2012; Abdul *et al.*, 2018).

Uma investigação sobre extratos metanólicos de folhas de *A. muricata* registrou o isolamento de ácido cinâmico, daidzeína, galocatequina, genisteína, gliciteína, ácido isoferúlico e vitexina (George *et al.*, 2015), além de megastigmanos, rutina, vitaminas, amidas, e óleos essenciais. Os óleos são constituídos principalmente por derivados sesquiterpenos, o que torna a espécie muito promissora (Abdul *et al.*, 2018).

Um estudo jamaicano que investigou as percepções de pessoas diagnosticadas com câncer sobre a automedicação com plantas medicinais constatou que 60% dos participantes (n= 80) relataram usar *A. muricata* para o tratamento de diversos tipos de câncer, predominantemente câncer de mama e próstata. Os resultados de um estudo transversal sugerem que 14% dos pacientes com câncer de fígado no Peru (n = 88) ingeriram produtos oriundos de *A. muricata* para controlar seus sintomas relacionados ao câncer. Apesar desse uso prevalente, apenas um número limitado de ensaios clínicos randomizados para *A. muricata* foram publicados e relacionados ao câncer colorretal (Chan *et al.*, 2020).

A presença de compostos fenólicos confere potente capacidade antioxidante às folhas e seus extratos (Nawwar *et al.*, 2012). Bento *et al.* (2018) descreveu que as folhas de *A. muricata* apresentaram atividade antiulcerosa contra lesões gástricas. Em outra investigação, a espécie demonstrou possuir antioxidantes enzimáticos; superóxido dismutase e catalase, juntamente com não-enzimáticos, como as vitaminas C e E (Vijayameena *et al.*, 2013). O teste de DPPH revelou atividade antioxidante significativa dos extratos aquoso e etanólico de folhas da *A. muricata* (Gavamukulya *et al.*, 2014).

A graviola (*Annona muricata*) é uma das plantas medicinais mais comumente usadas no Caribe. A polpa da fruta é comida e usada como ingrediente em muitos alimentos e bebidas. O chá é bebido diariamente e frequentemente misturado com outras decocções de ervas (Patel *et al.*, 2016). Sobre os efeitos farmacológicos das acetogeninas presentes no extrato da folha de *A. muricata*, os efeitos hepatoprotetor, neurotóxico, antiulcerativo, antinociceptivo e quimiopreventivo foram observados em vários estudos. Bonneau *et al.* (2012) relataram acetogeninas neurotóxicas responsáveis pelo Parkinsonismo atípico de Guadalupe. O fruto de *A. muricata* contém alta concentração desses compostos e seu consumo se constitui como uma das principais fontes de exposição a esses compostos e potenciais fatores de risco para a neurodegeneração. A dose neurotóxica das acetogeninas é muito dependente da forma como a graviola é ingerida, uma vez que, as acetogeninas tem solubilidade muito baixa em água (Höllerhage *et al.*, 2009). Em um estudo realizado em Guadalupe, os participantes foram considerados consumidores significativos de produtos Annonaceae se tomassem frutas/sucos ou chás de ervas de *A. muricata*, *A. squamosa* e *A. reticulata* pelo menos uma vez por mês por um período mínimo de 2 anos (Langavant *et al.*, 2022).

## 1.2. PANORAMA GERAL DOENÇA DE ALZHEIMER

A doença de Alzheimer (DA) é uma patologia neurodegenerativa de grande impacto socioeconômico, que afeta principalmente a população idosa, sendo responsável por 60-70% dos casos de demência. No Brasil, a doença afeta 1,2 milhão de pessoas e 100 mil novos casos são diagnosticados por ano, segundo dados do Ministério da Saúde (2023). Além disso, houve um aumento de 49% no número de mortes pela doença de Alzheimer, entre 2009 e 2019, que a posicionou como a sétima maior causa de morte no Brasil (GBD, 2019). Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, o número de hospitalizações por DA aumentou 88% em relação 2010 a 2019, e o custo econômico total devido à DA aumentou 44%, no mesmo período. O custo total anual por indivíduo que vive com demência no país é maior que a média global independente do estágio da doença (Feter *et al.*, 2021). Portanto, a doença tem um impacto no sistema de saúde e na melhoria da qualidade da fase final da vida (Xie *et al.*, 2020).

Diferentes hipóteses a respeito das bases moleculares da DA têm sido levantadas, modificando-se gradualmente devido aos diversos avanços tecnológicos ocorridos ao longo do tempo. A hipótese mais antiga sobre a DA foi introduzida no início da década de 80, e descrita como a hipótese colinérgica na disfunção amnésica do idoso. Já na metade dessa década, há o surgimento da hipótese glutamatérgica, na qual se supõe que a alta concentração do neurotransmissor glutamato promova a entrada excessiva de íons cálcio no interior do neurônio levando-o à morte. Medicamentos como a memantina são utilizados no tratamento de pacientes com DA para impedir que o neurotransmissor atue sobre os receptores de glutamato evitando o fluxo descontrolado de íons cálcio (Sayeg, 2009). A hipótese colinérgica associa a redução da acetilcolina (ACh), no cérebro de pacientes com DA, ao declínio em habilidades mentais superiores e memória (Hampel *et al.*, 2018). O tratamento da DA é realizado principalmente com o uso de medicamentos anticolinesterásicos, e é sintomático, restaura os níveis de ACh através da inibição das colinesterases (AChE, BuChE), enzimas responsáveis pela hidrólise da acetilcolina em acetato e colina (Mota *et al.*, 2012).

Um número reduzido de fármacos dessa classe encontra-se disponível para o tratamento da DA, mas baseiam-se em retardar a sua progressão e reduzir os sintomas.: donezepila, rivastigmina, galantamina (Najafi *et al.*, 2017). A rivastigmina possui ação simultânea sobre as duas formas de colinesterases: acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE), o que pode representar benefícios ao tratamento, já que, os níveis de BuChE se encontram aumentados nos estágios mais avançados da DA (Engelhardt *et al.*, 2005). Os inibidores das colinesterases são recomendados para limitar a neurodegeneração em pacientes com DA. No entanto, a maioria destes medicamentos

comumente causa efeitos colaterais como hepatotoxicidade, insônia, diarreia ou enjoo (Ayaz et al., 2019; Tsai, 2019), por isso é necessário o desenvolvimento de novos agentes com diferentes estruturas e mecanismos de ação, inclusive inibidores multialvo (Sharma, 2019).

Esforços de pesquisa e desenvolvimento tanto da academia quanto da indústria farmacêutica estão em andamento para alcançar um avanço na geração eficaz de medicamentos para a DA. As proteínas  $\beta$ -amiloide e tau representam importantes alvos terapêuticos para a DA nos últimos anos. As estratégias primárias são inibição da produção de A $\beta$  por beta-secretase-1 (BACE-1) e Presenilina-1(PSEN-1), inibição da agregação de A $\beta$  e tau, depuração por anticorpos monoclonais (mAbs) (imunoterapia passiva), supressão da fosforilação da tau e abordagens de imunoterapia ativa, ou seja, vacinas. O primeiro medicamento potencialmente modificador da doença, um mAb contra A $\beta$  agregado (aducanumab), foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA em junho de 2021 (Tatulian, 2022).

A descoberta de produtos naturais bioativos constitui, portanto, não apenas uma necessidade de sua identificação própria, mas, principalmente, contribui para o conhecimento de novas entidades químicas (NCEs), que podem ser usadas como matrizes para a descoberta de novos fármacos (Montanari; Silva-Bolzani, 2001). Em relação à família *Annonaceae*, muitas espécies são utilizadas na medicina popular para o tratamento antiparasitário ou antitumoral, e têm sido intensamente estudadas para o isolamento e caracterização de suas diversas classes de compostos e propriedades farmacológicas. Os extratos de *A. crassiflora* e *A. coriacea* já apresentaram propriedades antiproliferativas e anticolinesterásicas (Formagio et al., 2015), o que abre novas possibilidades para medicamentos e estudo de novas espécies da família com este fim.

### **1.2.1. Colinesterases**

Anatomicamente, o sistema colinérgico corresponde a uma parte da porção autônoma do sistema nervoso periférico (SNP). É caracterizado pela presença de sinapses que têm como neurotransmissor a acetilcolina (ACh). As colinesterases são uma classe de enzimas que catalisam a hidrólise da ACh em ácido acético e colina na fenda sináptica, e assim, permitem que o neurônio colinérgico retorne ao seu estado de repouso após ser ativado. Existem dois tipos de colinesterases: a Butirilcolinesterase (BuChE, E.C.3.1.1.8) e a Acetilcolinesterase (AChE, E.C.3.1.1.7) (Falco et al., 2016).

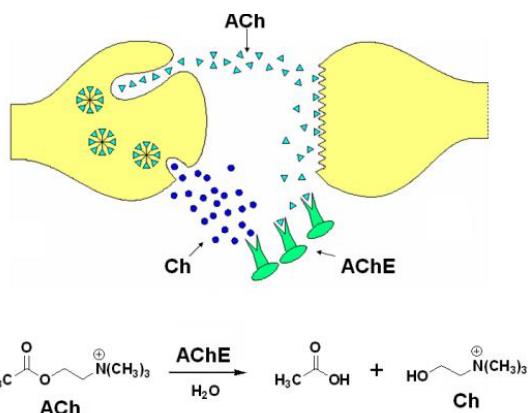


Figura 2 – Transmissão neuronal da acetilcolina (ACh) e hidrólise pela acetilcolinesterase (AChE) em Colina (Ch) e ácido acético.

Fonte: Petronilho, E. C.;Figueroa-Villar, J. D., 2014

Esse sistema tem como principal neurotransmissor a acetilcolina (ACh), que é uma molécula de sinalização formada pela colina e acetil, e, durante a passagem do impulso nervoso em cérebros saudáveis, ela é exocitada do neurônio pré-sináptico para a fenda sináptica a fim de se ligar e estimular os receptores nicotínicos do neurônio pós-sináptico (Mambro *et al.*, 2022), conforme demonstrado na figura 2. Embora sejam evolutivamente semelhantes, estas enzimas diferenciam-se quanto a sua distribuição nos tecidos, as suas propriedades cinéticas e pela especificidade para com os seus substratos. A AChE encontra-se mais abundantemente no sistema nervoso central, nos músculos esqueléticos e na membrana dos eritrócitos. Enquanto a BuChE encontra-se, em sua maioria, no plasma sanguíneo sendo por este motivo conhecida também como colinesterase plasmática (Falco *et al.*, 2016). A BuChE tem sido relacionada com a deposição de placas amiloïdes e sua inibição pode resultar em melhor resposta terapêutica (Huang *et al.*, 2014; Reid; Darvesh, 2015). Primeiro neurotransmissor a ser descoberto, a ACh é encontrada em todos os gânglios autônomos, inervados autonomicamente órgãos, junção neuromuscular e várias sinapses no SNC. O grupo colinérgico de neurônios funcionam para manter a atividade cortical, o fluxo sanguíneo cerebral, modular a cognição, aprendizagem, tarefa e memória, desenvolvimento do córtex cerebral e regulação do sono–ciclo de vigília (Anand *et al.*, 2014).

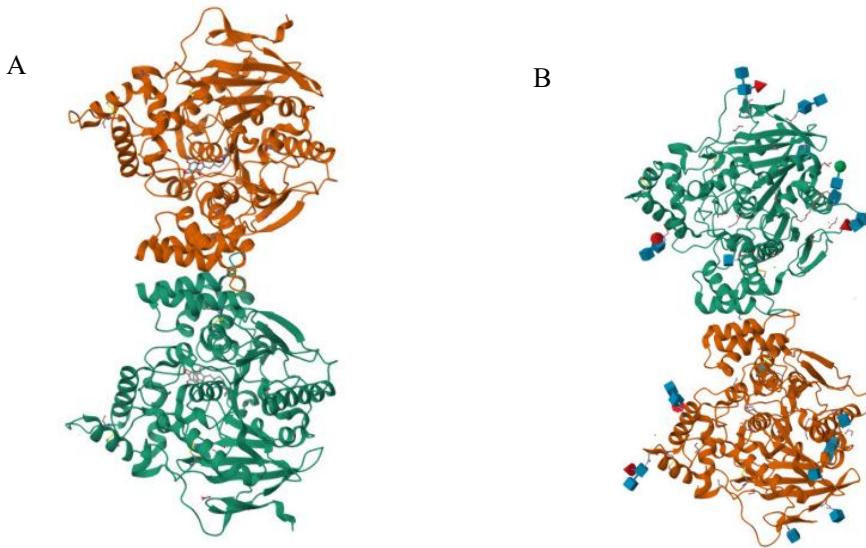


Figura 3- A) Complexo binário da Acetilcolinesterase humana ( hAChE) nativa acoplada com Donepezil  
B) Estrutura cristalina da butirilcolinesterase humana totalmente glicosilada. PDB 4AQD.  
Fonte: RCSB PDB, 2019

Na doença de Alzheimer, ocorrem alterações nas funções dos neurotransmissores clássicos, neuropeptídeos e fatores de crescimento, como ACh, somatostatina e fator neurotrófico derivado do cérebro. O sistema neurotransmissor da ACh foi foco de pesquisas no campo da DA por muito tempo, dado que pacientes com DA apresentavam baixos níveis de ACh no cérebro e que baixos níveis são associados a danos cognitivos (Câmara, 2019). Tal fato levou ao desenvolvimento de inibidores da colinesterase, que regulam a acetilcolina no cérebro, bloqueando as enzimas que a catalisam quimicamente (Zhao *et al.*, 2019). Nessa vertente, o desenvolvimento dos sintomas da doença de Alzheimer é relacionado principalmente a alterações estruturais nas sinapses colinérgicas, perda de subtipos específicos de receptores de acetilcolina (ACh), a morte de neurônios geradores de ACh e, consequentemente, a deterioração da neurotransmissão colinérgica. Essas questões levam a um acúmulo relativo da enzima que hidrolisa a ACh, a Acetilcolinesterase (AChE) (Stanciu *et al.*, 2019). A hipótese colinérgica, na qual as anormalidades sinápticas poderiam representar a causa da demência na doença de Alzheimer, admite uma melhor correlação entre o padrão e a severidade das alterações cognitivas em comparação às placas senis e novelos neurofibrilares (NFT) (Sereniki; Vital, 2008).

### **1.2.2. Células da linhagem PC12 e pesquisa de doenças neurodegenerativas celular**

As técnicas *in vitro* para estudar a neurodegeneração baseiam-se principalmente em efeitos induzidos por produtos químicos em linhagens celulares derivadas de roedores ou

humanos e permitem descobrir os impactos básicos e específicos tanto em células individuais como em vias moleculares importantes (Llorens *et al.*, 2012). A adequação de um modelo celular que será ótimo para responder a uma hipótese particular, depende principalmente da escolha correta da linhagem celular (Wiatrak *et al.*, 2020). Células PC12 são aplicadas em estudos de células neurais e danos neurotóxicos (Xie *et al.*, 2023).

As células PC12 são células de feocromocitoma adrenal de rato, uma linhagem celular monoclonal transplantada de adrenal de rato meduloblastoma por Greene e Tischler (Greene; Tischler, 1976). A popularidade das células PC12 é dada por sua extrema versatilidade para manipulação farmacológica, facilidade de cultura e grande conhecimento prévio sobre sua proliferação e diferenciação (Wiatrak *et al.*, 2020).

As células PC12 são divididas em dois tipos: indiferenciadas e diferenciadas. As células PC12 indiferenciadas são pequenas, formando aglomerados de células flutuantes de formato irregular ou levemente espalhados (Westerink; Ewing, 2008). As células PC12 cultivadas em condições normais são caracterizadas pela morfologia, fisiologia e bioquímica das células adrenais (Wiatrak *et al.*, 2020).

As células PC12 são sensíveis à proteína do fator de crescimento neuronal (NGF) (Greene; Tischler, 1976). Quando utilizado o NGF, padrão morfológico, fisiologia e bioquímica da célula PC12 diferenciam-se em neurônios dopaminérgicos. Por ser de fácil cultivo e passagem, após induzida é uma ferramenta de uso comum no estudo do sistema nervoso *in vitro* (Duan *et al.*, 2015).

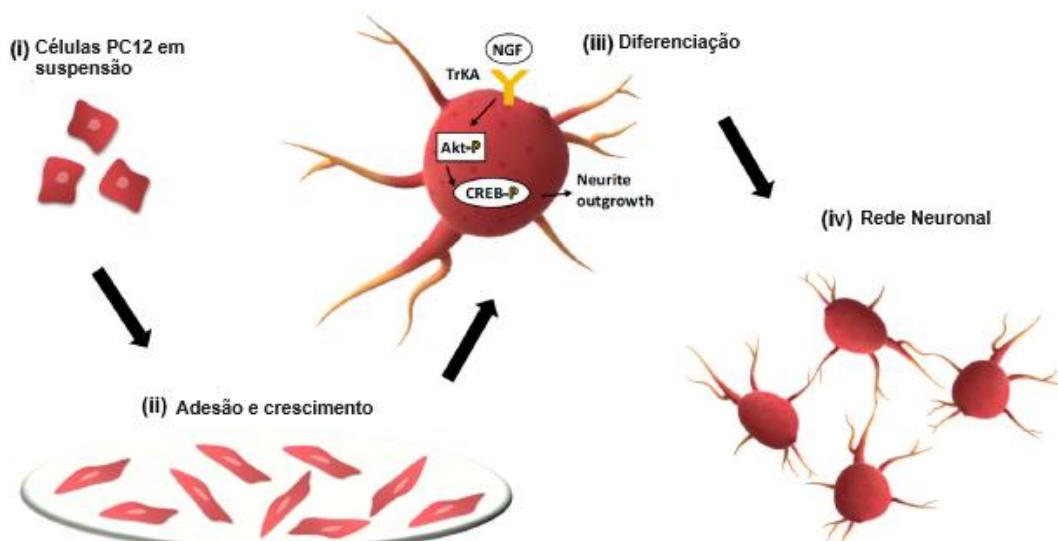


Figura 4- Representação esquemática da formação da rede neuronal em células PC-12, através do processo de diferenciação utilizando o fator de crescimento neuronal (NGF)

Fonte :Oprea *et al.*, 2022 (adaptada)

O tratamento dessas células com fator de crescimento neuronal (NGF) interrompe sua proliferação e promove a extensão de processos finos de ramificação, as neurites. Dessa forma, células PC12 são usadas como um modelo de citotoxicidade e para identificação de neuroprotetores, *in vitro*, além do uso em modelos de doenças neurodegenerativas, a exemplo da doença de Alzheimer pode ser modelada pela administração exógena do peptídeo  $\beta$ -amiloide (Chua; Lim, 2021; Wiatrak *et al.*, 2020; Zeng *et al.*, 2017).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar *in vitro* a atividade anticolinesterásica e o efeito citotóxico e de neuroproteção de compostos isolados da espécie *Annona muricata*, da família Annonaceae.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar levantamento sobre espécies da família Annonaceae com ação no Sistema Nervoso Central
- Isolar e identificar poliprenois presentes na espécie *Annona muricata* através das análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear;
- Avaliar *in vitro* o efeito dos poliprenois da espécie *Annona muricata* sobre a atividade das enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase através de ensaio espectrofotométrico e por testes *in silico* de acoplamento molecular;
- Avaliar *in vitro* o efeito citotóxico e de neuroproteção de poliprenois em cultura de células PC12.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J.R.G.S.; ARAÚJO, E. C.; RIBEIRO, L.A.; DE LIMA, J.T.; NUNES, X.P.; LÚCIO, A.S.; AGRA, M. DE F., BARBOSA FILHO, J. M. Antinociceptive activity of ethanol extract from *Duguetia chrysocarpa* Maas (Annonaceae). **ScientificWorldJournal**, v. 2012, p. 1-6, 2012. doi: 10.1100/2012/859210.
- ANAND, R., GILL, K.D., MAHDI, A.A. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. **Neuropharmacology**, v. 76, p. 27–50, 2014.
- BARBALHO, M. et al. Annona sp: Plants with multiple applications as alternative medicine - A Review. **Curr. Bioact. Compd.**, v. 8, p. 277-286, 2012.
- BARBOSA FILHO, J. M. et al. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, p.258-285, 2006.
- BENTO, E. B.; JÚNIOR, F. E. B.; DE OLIVEIRA, D. R.; FERNANDES, C.N.; DE ARAÚJO, D. G.; CESÁRIO, F.R.A.S.; RODRIGUES, C.K.S.; SALES, V.D.S.; DE FIGUEIREDO, F.R.S.D.N.; LEMOS, I.C.S.; MONTEIRO, Á.B.; DE MENEZES, I. R. A.; DA COSTA, J. G. M.; KERNTOPF, M. R. Antiulcerogenic activity of the hydroalcoholic extract of leaves of *Annona muricata* Linnaeus in mice. **Saudi J Biol Sci.**, v. 25, n. 4, p. 609-621, 2018. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.01.024.
- BHALKE, R. D., CHAVAN, M. J. Analgesic and CNS depressant activities of extracts of *Annona reticulata* Linn. bark. **Phytopharmacology**, v. 1, n. 5,p. 160-165, 2011.
- BRASIL, **RDC nº 26**, de 13 de maio de 2014. Regulamenta o registro de Medicamentos Fitoterápicos (MF) e o registro e a notificação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos (PTF). Diário oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 14 mai. 2014.
- CÂMARA, A. B. Receptores neurais e a doença de Alzheimer: uma revisão sistemática da literatura sobre as famílias de receptores mais associadas a doença, suas funções e áreas de expressão. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 68, n. 3 , pp. 161-176, 2019.
- CHAN, W-J. The safety and tolerability of *Annona muricata* leaf extract: a systematic review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 72, n. 1, 2020.
- CHITNIS, S., RAO, J. Rivastigmine in Parkinson's disease dementia. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology** , v. 5, p. 941–955, 2009.
- CHUA, P.; LIM, W.K. Optimisation of a PC12 cell-based in vitro stroke model for screening neuroprotective agents. **Sci Rep**, v. 11, p. 8096, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87431-4>
- CLARDY, J., WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, p. 829–837, 2004. <https://doi.org/10.1038/nature03194>
- COLOVIC, M. B.; KRSTIC, D. Z.; LAZAREVIC-PASTI, T. D.; BONDZIC, A.M.; VASIC, V.M. Acetylcholinesterase inhibitors: Pharmacology and toxicology. **Current Neuropharmacology**, v. 11, p. 315–335, 2013.
- CORIA-TÉLLEZ, A. V.; MONTALVO-GÓNZALEZ, E.; YAHIA, E. M.; OBLEDO-VÁZQUEZ, E. N. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. **Arabian Journal of Chemistry**, 2016.

DHANJAL, J. K.; GOYAL, S.; SHARMA, S.; HAMID, R.; GROVER, A. Mechanistic insights into mode of action of potent natural antagonists of BACE-1 for checking Alzheimer's plaque pathology. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 443, n. 3, p. 1054–1059, 2014. doi:10.1016/j.bbrc.2013.12.088

DESHPANDE, P.; GOGIA N, SINGH A. Exploring the efficacy of natural products in alleviating Alzheimer's disease. **Neural Regen Res.**, v. 14, n. 8, p 1321-1329, 2019. doi: 10.4103/1673-5374.253509.

DINIZ, T. C.; ARAÚJO, C. S.; SILVA, J. C. et al. Phytochemical screening and central nervous system effects of ethanolic extract of *Annona vepretorum* (Annonaceae) in mice. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 7, p. 2729-2735, 2013.

DUAN, X.-H.N.; WANG, W.-L.; DAI, R.; YAN, H.-W.; HAN, C.-N.; LIU, L.-S. Current Situation of PC12 Cell Use in Neuronal Injury Study. **Int. J. Biotechnol. Wellness Ind.**, v. 4, 61–66, 2015.

DZOBO, K. The Role of Natural Products as Sources of Therapeutic Agents for Innovative Drug Discovery. **Comprehensive Pharmacology**, v.2, n. 20 p. 408-422, 2022. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820472-6.00041-4>.

EGYDIO-BRANDÃO, A, P. M. et al. Alkaloids from Annona: Review from 2005 To 2016. **JSM Biochem Mol Biol**, v. 4, n. 3, p. 1031, 2017.

ENGELHARDT, E., et al. Treatment of Alzheimer's disease: recommendations and suggestions of the Scientific Department of Cognitive Neurology and Aging of the Brazilian Academy of Neurology. **Arq Neuropsiquiatr.**, v. 63, n. 4, p. 1104–1112, 2005.

FALCO, A. et al. Doença de Alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. **Quim. Nova**, v. 39.n. 1. p. 63-80, 2016.

FETER, N.; LEITE, J. S.; CAPUTO, E. L.; CARDOSO, R. K.; ROMBALDI, A. J. Who are the people with Alzheimer's disease in Brazil? Findings from the Brazilian Longitudinal Study of Aging. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 24, 2021.

FORMAGIO, A. S. N. et al. *In vitro* biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to Annonaceae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 308-315, 2015.

GBD 2019 Risk Factors Collaborators. Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **Lancet**, v. 396, p. 1223-49, 2020. doi: 10.1016/s0140-6736(20)30752-2

HÖLLERHAGE, M.; MATUSCH, A.; CHAMPY, P.; LOMBÈS, A. ; RUBERG, M.; OERTEL, W. H.; HÖGLINGER, G. U. Natural lipophilic inhibitors of mitochondrial complex I are candidate toxins for sporadic neurodegenerative tau pathologies. **Experimental Neurology**, v. 220, p. 133–142, 2009. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.08.004

HUANG, B.; ZHANG, Y. Teaching an old dog new tricks: Drug discovery by repositioning natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, v. 27, n. 7, p. 1936-1944, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.02.007>.

JIN, X.; GUO, J-L; WANG, L.; ZHONG, X.; YAO, W-F.; GAO, H.; LIU, M-Y. Natural products as pharmacological modulators of mitochondrial dysfunctions for the treatments of Alzheimer's disease: A comprehensive review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 218, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113401>.

KUMJU, Y.; WOO-SIK, J. M. J.  $\beta$ -Secretase (BACE1) inhibitory property of loganin isolated from Corni fructus , Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters, v. 27, n. 16, p. 1471-1474, 2013. DOI: 10.1080/14786419.2012.718774

LIMA, L. A. A. S.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 122, p. 1129 –1138, 2010.

LLORENS, J.; LI, A. A.; CECCATELLI, S.; SUÑOL, C. (2012). Strategies and tools for preventing neurotoxicity: To test, to predict and how to do it. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 4, 2012. doi:10.1016/j.neuro.2012.01.019

Mambro L, Souza NV, Silva WMB. Atividade de alcaloides inibidores da acetilcolinesterase no tratamento da doença de Alzheimer: uma revisão sistemática. **J Health Biol Sci.** 2022; 10(1):1-10.

MANOHARAN, S.; GUILLEMIN, G. J.; ABIRAMASUNDARI, R. S.; ESSA, M. M.; AKBAR, M.; AKBAR, M. D. The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Huntington's Disease: A Mini Review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1–15, 2016. doi:10.1155/2016/8590578

MONTANARI, C. A.; V. DA S. BOLZANI. Drug design based on natural products. **Química Nova**, v. 24, p. 105-111, 2001.

NAJAFI, Z. et al. Novel tacrine-1,2,3-triazole hybrids: *In vitro*, in vivo biological evaluation and docking study of cholinesterase inhibitors. European Journal of Medicinal Chemistry. v. 125. p. 1200-1212, 2017

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770-803, 2020. doi:10.1021/acs.jnatprod.9b01285.

NIELSEN, I. Flowers of Annonaceae: morphology, classification and evolution. **Nord. J. Bot.**, v. 13, n. 5, p. 500-500, 1993.

NIU, Y., MA, C., JIN, H., XU, F., GAO, H., LIU, P., XU, P. The Discovery of Novel  $\beta$ -Secretase Inhibitors: Pharmacophore Modeling, Virtual Screening, and Docking Studies. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 79, n. 6, p. 972–980, 2012. doi:10.1111/j.1747-0285.2012.01367.x

NOORI, T.; DEHPOUR, A. R.; SUREDA, A.; SOBARZO-SANCHEZ, E.; SHIROOIE, S. Role of natural products for the treatment of Alzheimer's disease. **Eur J Pharmacol.**, v. 5, 2021. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.173974.

OLASEHINDE, T.A.; OLANIRAN, A.O.; OKOH, A.I. Macroalgae as a Valuable Source of Naturally Occurring Bioactive Compounds for the Treatment of Alzheimer's Disease. **Drugs**, v. 17, p. 609, 2019. <https://doi.org/10.3390/md17110609>

OMS – Organização Mundial da Saúde. Demencia: a public health priority. Geneva: **OMS**, 2017.

OPREA, D.; SANZ, C. G.; BARSAN, M. M.; ENACHE, T. A. PC-12 Cell Line as a Neuronal Cell Model for Biosensing Applications. **Biosensors.**, v. 12(7), p. 500, 2022. doi: 10.3390/bios12070500.

- PILON, A. C. et al. NuBBE DB: an updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7215, 2017.
- Pohanka, M., 2011. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. **Biomedical Papers**, v. 155, p. 219–223, 2011.
- PORWAL M, KUMAR A. Neuroprotective effect of *Annona squamosa* & (-) Anonaine in decreased GABA receptor of epileptic rats. **J Appl Pharmaceut Science**, v. 5, p. 018-023, 2015.
- QUÍLEZ, A.M.; FERNÁNDEZ-ARCHE, M.A.; GARCÍA-GIMÉNEZ, M.D.; DE LA PUERTA, R. Potential therapeutic applications of the genus *Annona* Local and traditional uses and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, 2018.
- SÃO JOSÉ, A. R., PIRES, M. DE M., FREITAS, A. L. G. E. DE, RIBEIRO, D. P., PEREZ, L. A. A. Atualidades e perspectivas das Anonáceas no mundo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36(spe1), p. 86–93, 2014. doi:10.1590/s0100-29452014000500010
- SAIRAZIL, N. S. M.; SIRAJUDEEN, K. N. S. Natural Products and Their Bioactive Compounds: Neuroprotective Potentials against Neurodegenerative Diseases. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v., 2020.
- SANKARANARAYANAN, S. et al. In vivo beta-secretase 1 inhibition leads to brain A beta lowering and increased alpha-secretase processing of amyloid precursor protein without effect on neuregulin-1. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 324, p.957–969, 2008.
- STANTON, M.G. et al. Discovery of isonicotinamide derived betasecretase inhibitors: *in vivo* reduction of betaamyloid. **J Med Chem.**, 2007.
- TAÏWE, G. S.; KUETE, V. Neurotoxicity and Neuroprotective Effects of African Medicinal Plants. **Toxicological Survey of African Medicinal Plants**, v.14 p. 423-444, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800018-2.00014-5>.
- THAKURATHI, N., VINCENZI, B., HENDERSON, D.C. Assessing the prospect of donepezil in improving cognitive impairment in patients with schizophrenia. Expert Opinion on Investigational Drugs, v. 22, p. 259–265, 2013.
- THU, D.K., VUI, D.T., HUYEN, N.T.N., DUYEN, D.K., TUNG, B.T. The use of Huperziaspecies for the treatment of Alzheimer's disease. **J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.**, v. 1, 2019.
- VALLI, M. et al. Development of a natural products database from the biodiversity of Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 3, p. 439-444, 2013.
- YAO, L. J.; JALIL, J.; ALI ATTIQ, A.; HUI, C. C.; ZAKARIA, N. A. The medicinal uses, toxicities and anti-inflammatory activity of Polyalthia species (Annonaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 229, p. 303-325, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.10.001>.
- WIATRAK, B.; KUBIS-KUBIAK, A.; PIWOWAR, A.; BARG E. PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions. **Cells**, v. 9, n. 4, 2020. doi: 10.3390/cells9040958.
- XIE, D.; DENG, T.; ZHAI, Z.; SUN, T.; XU, Y. The cellular model for Alzheimer's disease research: PC12 cells. **Front Mol Neurosci.** v.15, 2023. doi: 10.3389/fnmol.2022.1016559.
- ZENG, Z.; XU, J.; ZHENG, W. Artemisinin protects PC12 cells against β-amylid-induced apoptosis through activation of the ERK1/2 signaling pathway. **Redox Biol.**, v. 12, p. 625–633, 2017.

## CAPÍTULO 1

Plantas da família Annonaceae atuando no Sistema Nervoso Central: Uma revisão integrativa  
para identificar espécies potenciais

## **Plantas da família Annonaceae atuando no Sistema Nervoso Central: Uma revisão para identificar espécies potenciais**

R. L. S. A. Luz<sup>1</sup>, A. Branco<sup>1</sup>, M. B. Botura<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana- Bahia

### Resumo

Doenças neurológicas são um desafio para a saúde pública devido à sua capacidade letal e incapacitante. Este grupo de doenças inclui acidente vascular cerebral, epilepsia, demência e várias doenças neurodegenerativas. A revisão se concentra em plantas da família Annonaceae e seus respectivos fitocompostos com atividades no Sistema Nervoso Central (SNC). A metodologia aplicada neste estudo foi realizar uma revisão da literatura usando os seguintes bancos de dados baseados na web: Google Scholar, PubMed e Science Direct. Os resultados revelaram 114 pesquisas correlacionando as espécies Annonaceae com ação no SNC. Foram encontrados estudos com mais de dez gêneros da família. Nos estudos, as atividades neurotóxicas foram relacionadas a acetogeninas, especialmente anonacina, e alcaloides. Atividades anticonvulsivantes, anestésicas e anticolinesterásicas também foram descritas em diferentes espécies e com compostos extraídos de diferentes partes das plantas (raiz, fruto, folha, caule). O conhecimento dessas atividades contribui para a exploração do potencial farmacológico desta família.

**Palavras-chave:** Annonaceae; Doenças neurodegenerativas; Sistema Nervoso Central; Acetogeninas.

### Abstract

Neurological diseases are a challenge to public health due to their lethal and disabling capacity. This group of illnesses includes stroke, epilepsy, dementia and various neurodegenerative diseases. The review focuses on plants from the Annonaceae family and their respective phytocompounds with activities on the Central Nervous System (CNS). The methodology applied in this study was to carry out a literature review using the following web-based databases: Google Scholar, PubMed and Science Direct. Findings revealed 114 researches correlating the Annonaceae species with action on CNS. Studies were found with more than ten genera of the family. In studies, neurotoxic activities were related to acetogenins, especially anonacin, and alkaloids. Anticonvulsant, anesthetic and anticholinesterase activities have also been described in different species and with compounds extracted from different parts of plants (root, fruit, leaf, stem). Knowledge of these activities adds to the exploration of the pharmacological potential of this family.

**Keywords:** Annonaceae; Neurodegenerative diseases; Central Nervous System; Acetogenins.

## 1. Introdução

Doenças neurológicas (DNs) são uma coleção diversificada de condições crônicas e progressivas, marcadas pela perda progressiva de neurônios no sistema nervoso central, resultando em deficiências em certos processos cerebrais (Yavarpour-Bali *et al.*, 2019; Dugger; Dickson, 2017). As DNs causam um impacto significativo na morbidade e mortalidade globais, sendo reconhecidas como um desafio global de saúde pública (Wahbeh *et al.*, 2024). À medida que a população mundial cresce e a expectativa de vida aumenta, há uma tendência de aumentar a incidência de DNs nas próximas décadas, e espera-se que a carga de condições neurodegenerativas crônicas pelo menos dobre nas próximas duas décadas e será um grande desafio manter o atendimento neurológico acessível a todos (Van Schependom; D'haeseleer, 2023).

Entre as DNs, a doença de Alzheimer, a doença de Parkinson, a esclerose múltipla e a esclerose lateral amiotrófica são as doenças neurodegenerativas mais comuns (Patel *et al.*, 2024). Ansiedade, insônia, depressão, epilepsia e dor crônica são os principais transtornos neuropsiquiátricos, que geralmente coexistem, tornando seu diagnóstico, manejo e tratamento ainda mais difíceis (Diniz *et al.*, 2019). No entanto, estudos epidemiológicos de DNs têm sido tradicionalmente restritos a transtornos específicos, como acidente vascular cerebral, demências e outras doenças neurodegenerativas (Feigin *et al.*, 2019).

A maioria dos tratamentos para DNs agora no mercado visam fornecer alívio temporário dos sintomas. Certos compostos farmacológicos convencionais usados para tratar DNs mostram efeitos colaterais inevitáveis. Além disso, a maioria desses medicamentos é de alto custo. Como resultado, há uma grande necessidade de desenvolvimento de tratamentos inovadores e substâncias neuroprotetoras com maior eficácia e menos efeitos fora do alvo para prevenir e interromper o desenvolvimento de DNs (Sharifi-Rad *et al.*, 2020).

Devido à complexidade do conteúdo químico e à variedade de bioatividades, os compostos naturais oferecem a perspectiva de polifarmacologia que é cada vez mais procurada para medicamentos. Existem inúmeros exemplos de medicamentos originários de plantas que têm efeitos no sistema nervoso central (SNC), como a fisostigmina (*Physostigma venenosum* Balf.) e a galantamina, de espécies de *Galanthus* e *Narcissus*.

Annonaceae é uma das famílias mais diversas e primitivas de angiospermas, com cerca de 200 gêneros e 2.500 espécies em todo o mundo. Annona é o maior gênero, com aproximadamente 120 espécies, e amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Maas *et al.*, 2001). Cientificamente, destaca-se pelo grande número de espécies de

importância para diferentes setores industriais. Muitas espécies são de interesse como frutíferas comerciais, devido aos seus frutos comestíveis e saborosos, dos quais se destacam espécies dos gêneros *Annona*, *Rollinia*, *Duguetia*, *Uvaria* e *Asimina* (Nogueira *et al.*, 2005).

Algumas espécies da família Annonaceae são bem conhecidas por seus efeitos no sistema nervoso central, como efeitos ansiolíticos e antinociceptivos de *Annona muricata* L. (Oviedo *et al.*, 2009; de Sousa *et al.*, 2010), atividade anticolinesterásica e inibição da morte celular neuronal relacionada à inflamação. (Rawal *et al.*, 2019; Shih *et al.*, 2010). No entanto, plantas da família Annonaceae contêm dois grupos principais de potenciais neurotoxinas: alcaloides isoquinolínicos e acetogeninas, uma classe grande, única e estruturalmente homogênea de policetídeos específicos para Annonaceae (Lannuzel *et al.*, 2003; Cavé *et al.*, 1997). A investigação de alcaloides em espécies do gênero *Annona* é promissora para descobrir atividades biológicas relacionadas a essas espécies (Egydio-Brandão *et al.*, 2017).

O objetivo desta revisão é discutir brevemente o uso potencial das espécies de Annonaceae no Sistema Nervoso Central, incluindo sua aplicação em doenças neurodegenerativas e distúrbios psicológicos, catalogar as espécies pesquisadas e identificar as principais ações dessas espécies. Esta revisão também fornece os métodos usados na detecção dos principais fitocompostos envolvidos nas atividades descritas nos estudos.

Espera-se que isso não apenas destaque o potencial das espécies no tratamento de distúrbios relacionados ao SNC, mas também ilustre a toxicidade potencial de alguns compostos e delineie sua ocorrência na natureza e as consequências do consumo indiscriminado de produtos de Annonaceae. Esta revisão, portanto, destaca importantes características e o efeito terapêutico das espécies de Anonaceae, juntamente com perspectivas futuras sobre seus efeitos no Sistema Nervoso Central.

## **2. Metodologia**

Mecanismos de busca (bancos de dados eletrônicos PubMed, Science-Direct e Google Scholar) foram usados para identificar artigos científicos originais. Para a busca, os seguintes descritores foram usados: “Annonaceae”; “neurodegenerative”, “Central Nervous System”; a estratégia de busca avançada foi o uso do operador booleano “AND” para combinar os descritores entre si. Todas as etapas metodológicas estão descritas na figura 1.

### **2.1. Critérios de elegibilidade**

Artigos de periódicos revisados por pares foram pesquisados usando palavras-chave específicas. Os títulos e resumos foram posteriormente examinados. Os artigos elegíveis foram então avaliados para inclusão no estudo usando os critérios de inclusão/exclusão. As publicações incluídas neste estudo eram todos manuscritos de texto completo e foram cuidadosamente lidas para garantir que os critérios de elegibilidade fossem atendidos.

#### 2.1.1. Questões de pesquisa

- A) Quais espécies da família Annonaceae têm atividade para doenças neurodegenerativas e do Sistema Nervoso Central?
- B) Quais são os fitocompostos relacionados às atividades descritas no SNC?

#### 2.1.2. Critérios de inclusão

- Publicações escritas em inglês, português e espanhol de 1994 ao primeiro semestre de 2024 foram utilizadas nesta revisão;
- Este estudo de revisão é imparcial e aceita artigos revisados por pares (pesquisa experimental) sem qualquer limitação geográfica;
- Em termos de atividade biológica, foram incluídas apenas espécies vegetais que apresentaram uma ou mais atividades relacionadas ao SNC;
- Em termos de propriedades fitoquímicas, foram incluídos estudos relatando o uso de extratos, compostos isolados ou compostos sintéticos contendo fitocompostos das espécies de Annonaceae como modelos.

#### 2.1.3. Critérios de exclusão

Os seguintes critérios foram utilizados para excluir alguns estudos:

- Pesquisas bibliográficas etnobotânicas e farmacobotânicas não foram incluídas nesta revisão;
- Artigos que não atenderam aos critérios de seleção foram excluídos, incluindo editoriais, cartas, capítulos de livros.

#### 2.2. Coleta de dados

Uma busca bibliográfica completa de publicações sobre plantas da família Annonaceae com atividade no Sistema Nervoso Central foi realizada e incluída neste estudo. Também foram incluídas triagens biológicas *in vivo*, *in vitro* e *in silico* de plantas Annonaceae especificamente para tratar distúrbios neurodegenerativos e fisiológicos.

Os seguintes dados foram coletados:

- Nome da espécie registrado na publicação;
- A parte da planta usada e o método de preparação;
- Os principais metabólitos identificados;
- O modelo de pesquisa: *in vivo*, *in vitro* e/ou *in silico*;
- Principais efeitos descritos no Sistema Nervoso Central.

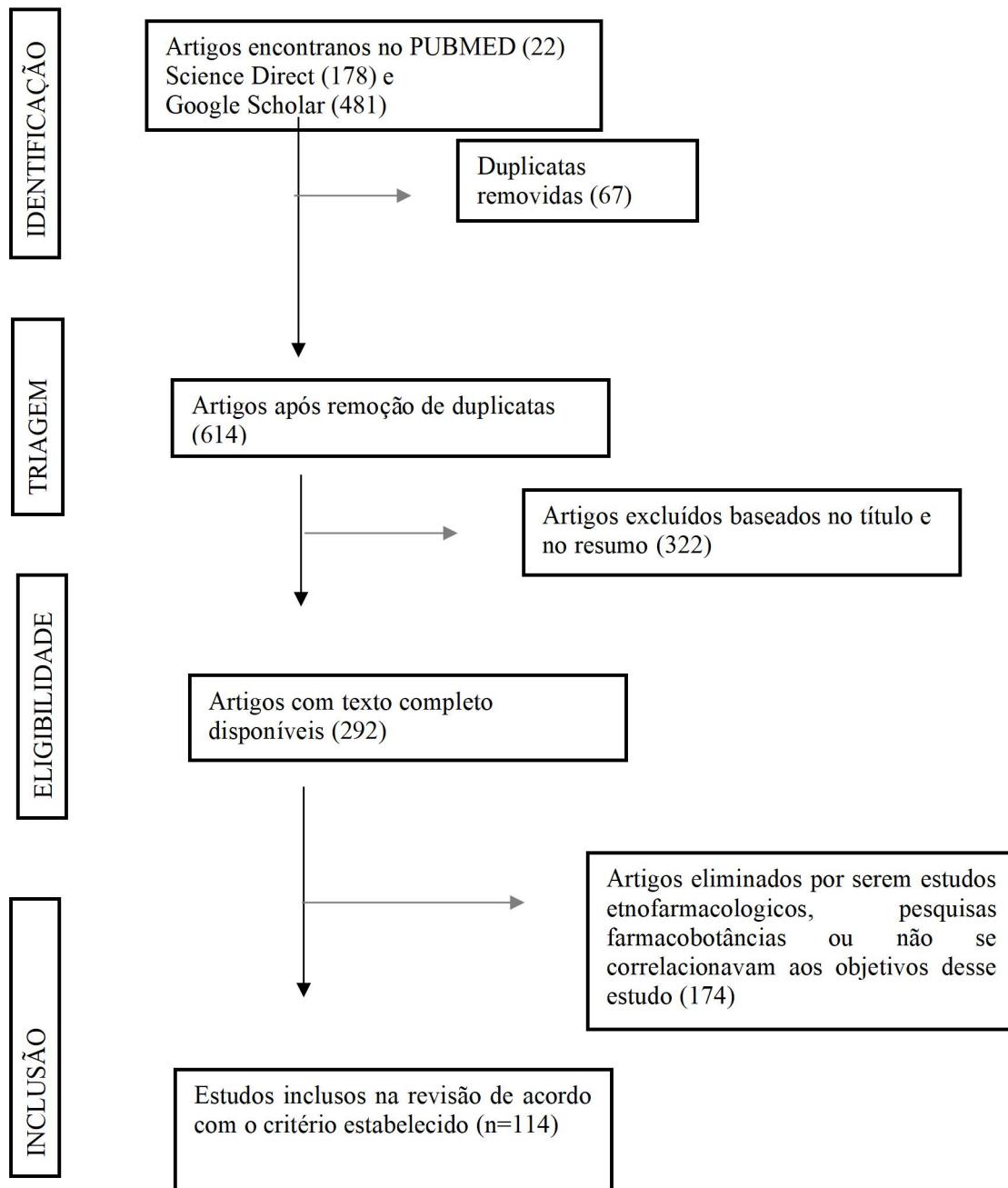


Figura 01- Diagrama da pesquisa, com etapas para seleção e análise dos artigos  
Fonte: Dados da pesquisa, 2024

### 3. Análise prospectiva das publicações

Uma busca bibliográfica identificou 114 artigos (Tabela 1) sobre as espécies de Annonaceae relatadas com atividade no Sistema Nervoso Central. Todos datam entre 1994 e abril de 2024. Os anos com maior número de publicações foram 2020 e 2022 (figura 2). O aumento do número de publicações ao longo dos anos mostra o despertar do interesse por diversos compostos bioativos dessas plantas.

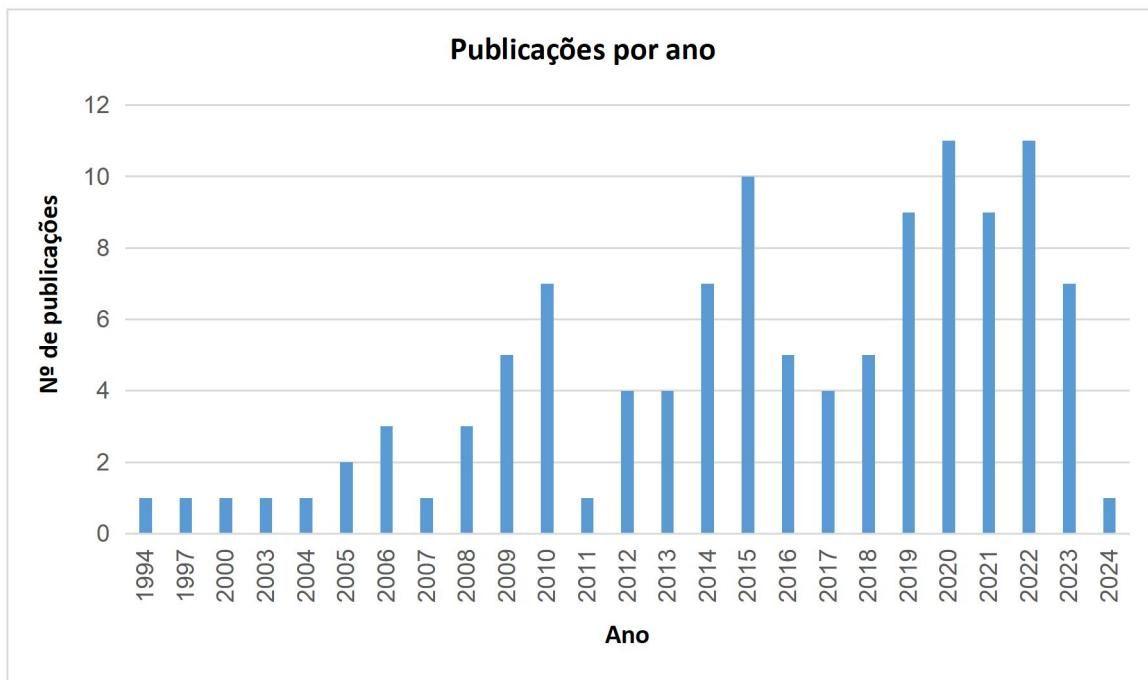


Figura 2. Número de publicações por ano

Os dados dos países em que os estudos foram realizados são apresentados na figura 3. O destaque na distribuição de publicação por país foram Nigéria e Brasil, seguidos por México e Índia. Esses dados podem estar relacionados à distribuição das plantas da família Annonaceae ao redor do mundo. As espécies da família estão distribuídas entre as áreas tropicais dos continentes americano, africano e asiático. A África é o continente que contém 27% do número de espécies das Annonaceae (404) (Erkens *et al.*, 2022). América Central e do Sul contêm mais da metade (61%) do número de espécimes (Erkens *et al.*, 2022). No Brasil, 29 gêneros e 392 espécies de Annonaceae, distribuídas principalmente na Amazônia, Mata Atlântica e Cerrado (Lopes e Silva, 2014; Maas *et al.*, 2017) é caracterizada por uma vasta biodiversidade, onde 20 espécies de *Annona* são relatadas, com destaque para *A. muricata* e *A. cherimola* (não nativas), e as espécies nativas *A. diversifolia* e *A. squamosa*, que são cultivadas comercialmente (Escobedo-Lopéz *et al.*, 2018).

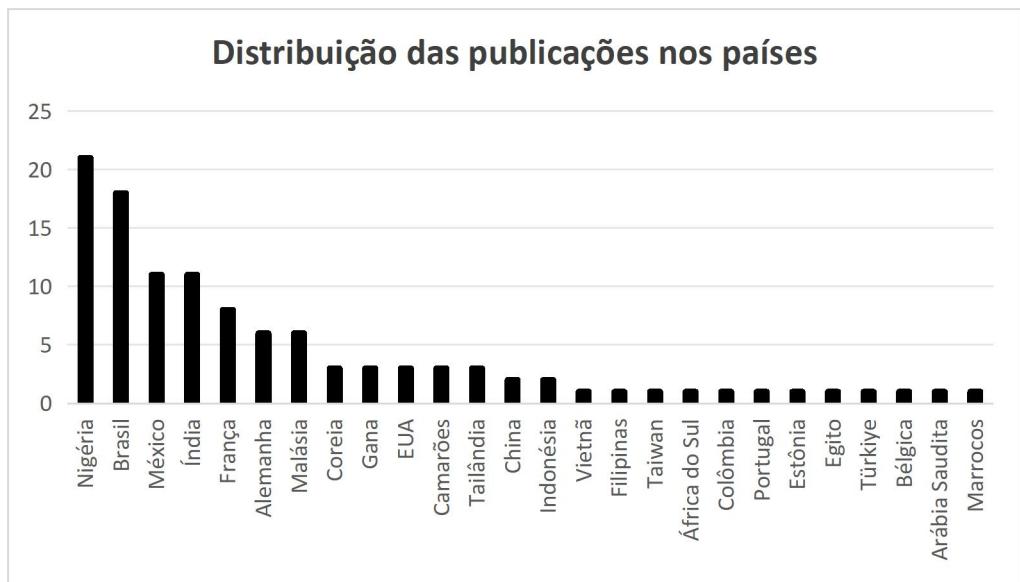


Figura 3 – Distribuição da publicação nos países do mundo. O gráfico representou o número de publicações encontradas em cada país.

#### 4.Considerações sobre gêneros da família Annonaceae

Annonaceae compreende cerca de 108 gêneros e mais de 2.400 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo. A família é classificada em quatro subfamílias: Ambavioideae, Anaxagoreoideae, Annoideae e Malmeoideae (Chatrou *et al.*, 2012).

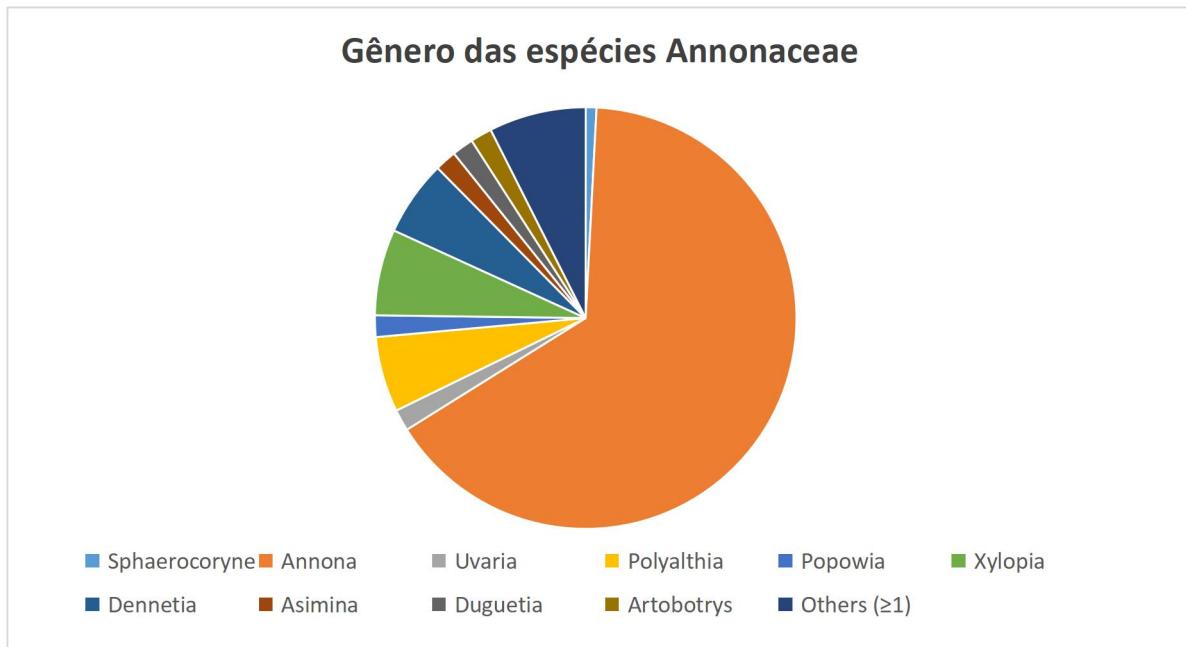


Figura 4 - Distribuição dos gêneros de Annonaceae nos estudos selecionados

Em relação ao gênero de Annonaceae, o *Annona* foi o mais relatado nesta revisão (Figura 4). *Annona* contém aproximadamente 175 espécies de árvores e arbustos, e também possui inúmeras frutas comerciais que são consumidas frescas, processadas ou usadas como medicamentos populares. Quimicamente, este gênero é caracterizado por bioproduzir esteroides, amidas, flavonoides, peptídeos, diterpenos, alcaloides e acetogeninas (ACGs) (Lopes; Silva, 2014; Brito *et al.*, 2008). Muitas espécies de *Annona* fornecem frutos muito apreciados no Brasil, como *Annona crassiflora*, *Annona cherimola*, *Annona squamosa* e *Annona muricata* (Correa, 1984).

Dentre as espécies do gênero *Annona*, a *Annona muricata* foi a espécie mais citada nos estudos desta pesquisa. A espécie, também conhecida como graviola ou guanabana, é cultivada em diversas regiões tropicais do planeta, como Venezuela, Colômbia, Porto Rico, Costa Rica, México, Panamá, Jamaica, Cuba, Espanha, Índia, Honduras, Guiana, Suriname, Brasil, Peru, Senegal e Cingapura.

O segundo gênero mais citado foi o *Xylopia*, que possui distribuição pantropical e constitui um dos maiores gêneros dentro da família Annonaceae (Chatrou *et al.*, 2012). Existem 70 espécies na África, 40 na Ásia e Oceania e 50 nas Américas, das quais 32 estão no Brasil (Lopes *et al.*, 2014; Maas *et al.*, 2013). Os estudos levantados com o gênero foram desenvolvidos em países onde ele ocorre: Gana e Malásia. Os frutos de algumas espécies do gênero *Xylopia* são popularmente usados como condimento por apresentarem odor semelhante ao da pimenta-do-reino (Bernardi; Spichiger, 1980). Várias de suas espécies são conhecidas por seu uso etnomedicinal e atividade farmacológica.

A seguir estão os gêneros *Polyalthia* e *Dennettia*. *Polyalthia* representa um importante gênero da família Annonaceae, com aproximadamente 346 espécies no The International Plant Names Index (Anon, 2012). O gênero *Polyalthia* é amplamente distribuído na área paleotropical. Na China, 17 espécies (seis endêmicas, uma introduzida) de *Polyalthia* são distribuídas (Lu *et al.*, 2009). A Malásia Peninsular é o centro de diversidade do gênero, com 30 espécies ocorrendo (Johnson; Murray, 1999). Não por coincidência, os estudos encontrados neste levantamento foram realizados na Malásia e em Taiwan. De acordo com investigações fitoquímicas, vários compostos com inúmeras atividades biológicas já foram isolados do gênero, como alcaloides diterpênicos, triterpenos, flavonoides e acetogeninas (Gupta *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2014; Boonpangrak *et al.*, 2015). Dentre as atividades biológicas, destacam-se os efeitos anti-inflamatórios (Attiq *et al.*, 2018), citotóxicos e antimicrobianos (Sashidhara *et al.*, 2010). O gênero *Dennettia* é representado por *Dennettia tripetala* G. Baker, a única espécie do gênero, comumente conhecida como fruta-pimenta na

Nigéria (Egwunyenga *et al.*, 1998). Este fato coincide com os estudos realizados na Nigéria, onde a planta é nativa e distribuída. O fruto da espécie é consumido fresco pelas pessoas do leste da Nigéria por sua pungência, enquanto outros o usam como condimento alimentar e para fins medicinais (Okonkwo; Okoye, 1996). O óleo essencial de *D. tripetala* tem um valor potencial como um agente aromatizante em alimentos, bebidas e produtos farmacêuticos (Daniyan *et al.*, 2021; Oyemitan *et al.*, 2019)

Embora a diversidade de espécies de Annonaceae com importância nutricional e farmacológica seja reconhecida, ainda há muitas lacunas no conhecimento sobre esta família. O crescente número de estudos demonstrando o potencial deixa claro que a biodiversidade pode ser aproveitada para melhorar o bem-estar humano.

## **5. Métodos de triagem usados para extração de compostos bioativos**

A família Annonaceae contém diferentes tipos de compostos químicos bioativos, como alcaloides, acetogeninas, flavonoides, terpenos e óleo essencial. A extração dessas substâncias é realizada usando solventes e técnicas apropriados. Os métodos de extração desempenham um papel crucial na obtenção de compostos bioativos de materiais vegetais. Técnicas tradicionais, como maceração, percolação e extração de Soxhlet, têm sido amplamente utilizadas (Saxena, 2023). A escolha dos solventes e da técnica de preparação depende dos metabólitos alvo. A extração de metabólitos específicos em solventes definidos depende da polaridade dos solventes e metabólitos. Na maioria das vezes, solventes polares (como água, metanol e etanol) ou uma proporção fixa desses solventes são usados para a extração dos metabólitos desejados (Aware *et al.*, 2019). Técnicas modernas, como extração assistida por micro-ondas, extração assistida por ultrassom, extração líquida pressurizada, extração com fluido supercrítico e extração assistida por enzimas, mostraram resultados promissores no aumento do rendimento da extração e na preservação da bioatividade dos compostos (Saxena, 2023).

A estrutura de qualquer composto tem uma influência significativa em seu nível de polaridade, conjugação e interação com a matriz da amostra. A extração exaustiva em série envolve o fracionamento de extratos brutos com solvente de maior polaridade de hexano (um solvente não polar) para butanol (um solvente polar) para obter a extração de uma gama mais ampla de fitoquímicos. Esta técnica não pode ser utilizada para extrair compostos termolábeis devido ao aquecimento prolongado (Alara; Abdurahman, 2019). Uma seleção sábia de uma estratégia de extração é vital para a descoberta de medicamentos, pois a extração constitui o primeiro passo básico na pesquisa de plantas medicinais, farmacognosia e fitoquímica para

obter a molécula alvo. Após a extração seletiva, o composto de interesse será isolado e caracterizado (Sruthi *et al.*, 2023).

Compostos fenólicos, como flavonoides, taninos e lignanas, são frequentemente extraídos de materiais vegetais em uma forma bruta, exigindo assim a modificação de um determinado método de extração para garantir a remoção de interferências indesejadas, como pigmentos, terpenos, gorduras e cera (Alara *et al.*, 2021). Os métodos de extração convencionais são principalmente designados pela utilização de maior volume de solventes de extração e procedimentos manuais que são principalmente dependentes do investigador e trabalhosos (Alara *et al.*, 2018). Além disso, a solubilidade e as propriedades de separação dos polifenois são afetadas por suas diferenças estruturais. A obtenção de compostos fenólicos de plantas como a graviola (*Annona muricata*) é geralmente realizada usando metanol, acetato de etila ou outro solvente orgânico. O uso do etanol, reconhecido como solvente GRAS (*Generally Recognized as safe*), pode levar à aplicação desses extratos na indústria farmacêutica ou alimentícia, e tem sido amplamente explorado para esse fim (Azmir *et al.*, 2013; Moraes *et al.*, 2016). Sohn *et al.* (2019) realizaram a extração de compostos como rutina e isoqueracetina da espécie *A. atemoya*, a partir do extrato etanólico. O ácido cafeico de *A. coriacea* foi obtido em uma extração hidroetanólica (Monteiro *et al.*, 2020). Souza *et al.* (2017) extraíram flavonoides (quercetina, isoquercitrina, rutina e kaempferol) e ácidos fenólicos (gálico, clorogênico, elágico e cafeico) de *A. muricata* por meio de uma extração hidroalcoólica. Alcaloides e ácidos orgânicos são tipos de produtos naturais cuja dissociação é sensível ao pH. Quando ácido ou base foi adicionado em um sistema de solvente de duas fases, a dissociação de alcaloides ou ácidos orgânicos seria afetada significativamente e afetaria a distribuição de alcaloides ou ácidos orgânicos em sistemas de solvente de duas fases (Sanaie; Haynes, 2006); portanto, os componentes desejados poderiam ser obtidos mais facilmente para enriquecer seletivamente alcaloides e ácidos orgânicos de produtos naturais (Yu *et al.*, 2020). Esta técnica foi usada para obter alcaloides em *A. cherimolia* (Martínez-Vázquez, 2012). Os alcaloides isoboldina, nornuciferina, anonaína e actinodafnina de *A. hypoglauca* foram obtidos usando técnicas ácido-base (Rinaldi *et al.*, 2017). A estrutura de alguns dos compostos isolados estão demonstradas na figura 5.

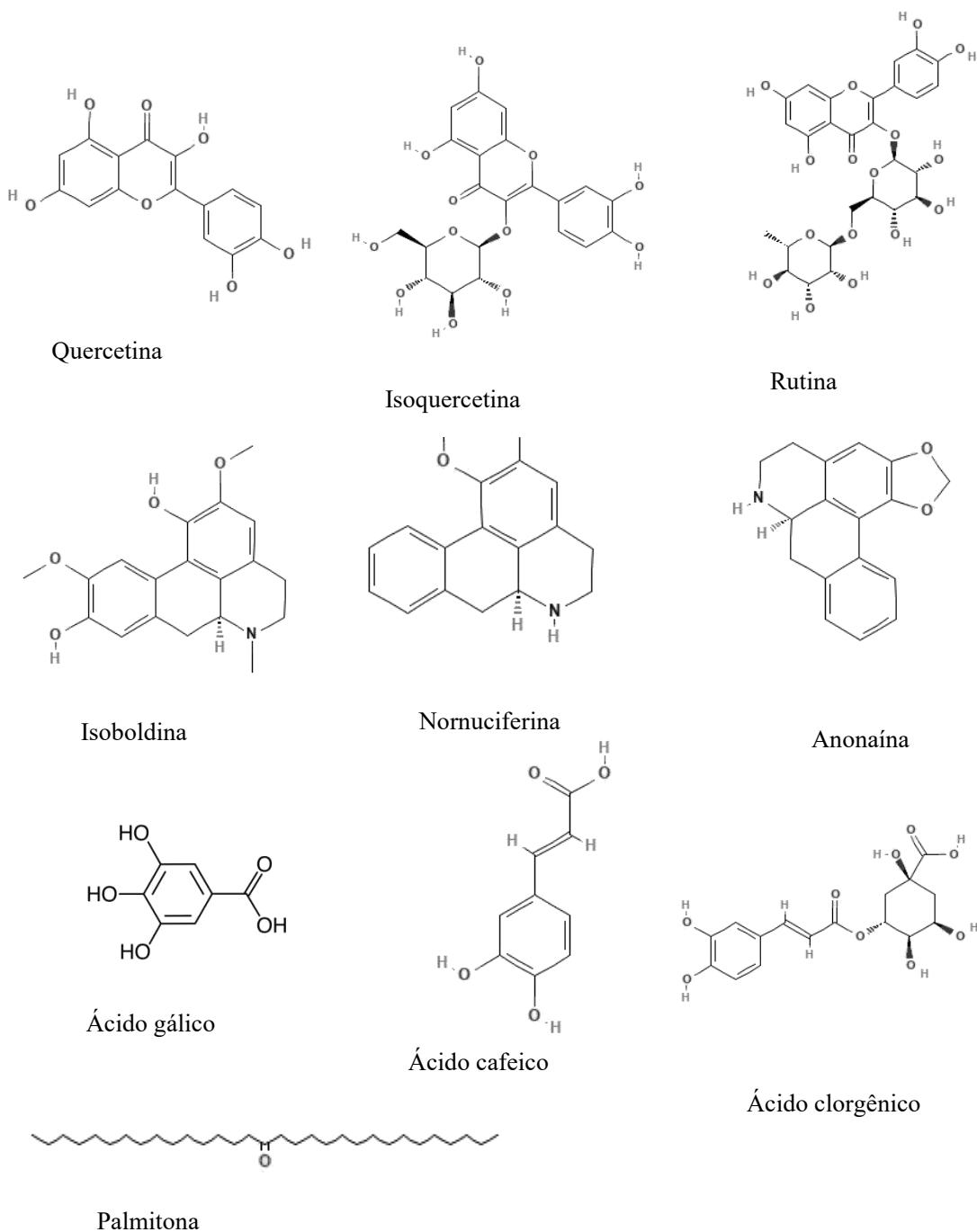


Figura 5- Estrutura química de compostos isolados de espécies da família Annonaceae

Alguns dos métodos comumente utilizados para extração de óleo essencial (OE) são hidrodestilação, hidrodifusão, enfleurage, prensagem a frio, destilação a vapor, extração por solvente, processo assistido por micro-ondas e extração por dióxido de carbono (Hamid *et al.*, 2011; Bezerra *et al.*, 2020). A escolha do método depende da parte das plantas, da estabilidade do óleo quando exposto ao calor e da suscetibilidade dos constituintes do óleo a

sofrer reações químicas. Os métodos de destilação foram os mais utilizados em estudos para obtenção de óleos essenciais. Por exemplo, a análise de flores secas e frescas de *Cananga odorata* por Hongratanaworakit e Buchbauer (2006), assim como a maioria dos estudos sobre *Dennettia tripelata*, utilizam diferentes partes da planta, como frutos, folhas e sementes (Daniyan *et al.*, 2021; Oyemitan *et al.*, 2019; Oyemitan *et al.*, 2008). A metodologia de alguns estudos (Salleh *et al.*, 2022; Adedayo *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2015; Bhalke *et al.*, 2009) descreve o uso de dispositivos de extração como o aparelho Clevenger e Soxhlet para diferentes espécies, como *A. hypoglauca*, *A. reticulata* e *D. tripetala*. A análise da composição do óleo essencial foi realizada com GC-MS nos estudos analisados.

Para buscar compostos com atividade no Sistema Nervoso Central, alguns estudos utilizaram o fracionamento bioguiado, que seleciona as frações mais bioativas e, na maioria dos casos, leva à identificação do composto responsável pela ação. Existem várias vantagens das estratégias de isolamento guiadas por bioensaio na descoberta de novos fármacos, como a redução do consumo de tempo no perfil químico dos extratos e da atividade dos compostos fracionados (Srivastava *et al.*, 2021). Esta metodologia foi adotada por Cano-Europa e colaboradores (2010) na espécie *A. diversifolia* e por Okoye e colaboradores (2013), isolando o ácido caurenoico em *A. senegalensis*.

## 6. Fontes de obtenção de compostos bioativos de plantas Annonaceae

Nesta revisão, vários compostos bioativos foram identificados em Annonaceae. As principais classes de metabólitos secundários relatadas foram alcaloides, flavonoides, acetogeninas, terpenos e fenólicos. A análise dos processos de obtenção dos metabólitos estudados (Fig. 6) mostrou que 89% dos estudos foram realizados com extratos e metabólitos isolados diretamente de espécies da família, 10% dos metabólitos foram sintetizados, utilizando um composto ou uma classe como modelo para a síntese, e 1% foram obtidos por meio de outras fontes, como néctar industrial e suco de frutas das espécies. Newman e Cragg (2016) demonstraram o papel dos produtos naturais em medicamentos aprovados pelo FDA entre 1981 e 2014. Neste período, o FDA aprovou 1.562 medicamentos, 64 (4%) eram produtos naturais inalterados, 141 (9,1%) eram medicamentos botânicos, em mistura, 320 (21%) eram derivados naturais e 61 (4%) eram medicamentos sintéticos, mas com moléculas naturais como farmacóforos.

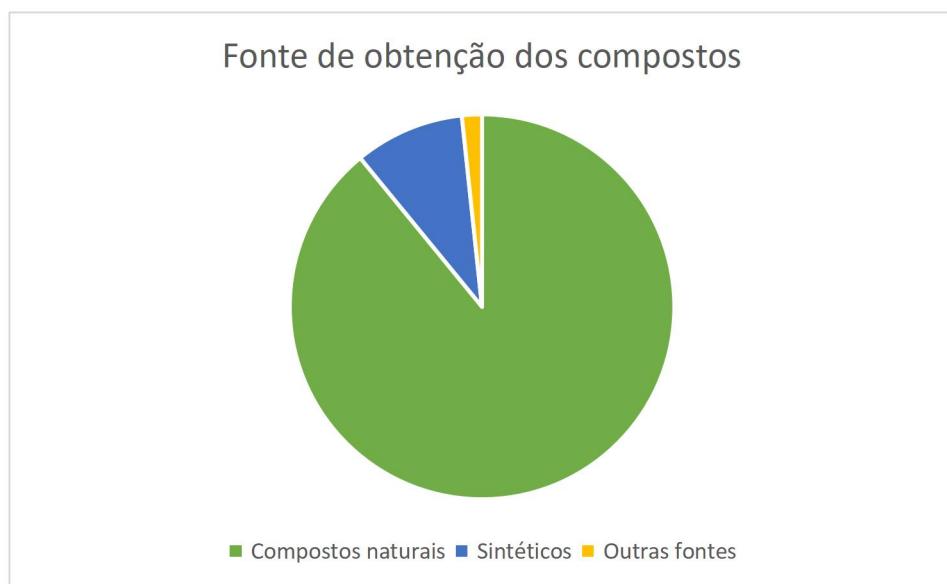


Figura 6- Fonte para obtenção de compostos ativos em espécies de Annonaceae

Os produtos naturais são de grande importância no desenvolvimento de medicamentos, particularmente para doenças crônicas. Muitas vezes, o processo de síntese envolve melhoria de acesso ao local de ação, como cruzamento da barreira hematoencefálica, metabolismo de primeira passagem e outros processos farmacológicos que podem diminuir a biodisponibilidade ou ação do medicamento (Newman; Cragg, 2020).

Produtos naturais derivados de plantas são frequentemente descritos como metabólitos secundários, produtos de expressão genética, que são necessários para reprodução, crescimento e desenvolvimento, mas são formados devido à adaptação ao ambiente ou como uma estratégia de proteção contra predadores. Em ambas as circunstâncias, esses metabólitos são sintetizados para suporte e força da planta (Dewick, 2009). A diversidade de substâncias está relacionada a vários fatores, e a enorme biodiversidade de espécies aquáticas e terrestres que sintetizam uma variedade de estruturas moleculares com muitas atividades biológicas é notável (Dias *et al.*, 2012).

Fitoquímicos, seja como compostos puros ou como extratos padronizados, fornecem oportunidades ilimitadas para novos fármacos devido às suas vastas diversidades químicas. Devido à crescente demanda por diversidade química em programas de triagem, a busca por fármacos terapêuticos de produtos naturais, com interesse principalmente em plantas, cresceu em todo o mundo (Sruthi *et al.*, 2023). As formulações de compostos naturais bioativos (CNB) não foram especificamente projetadas/ou purificadas com princípios ativos elucidados, e é por isso que a aceitação de formulações brutas foi rejeitada à medida que as pessoas se tornaram avançadas e científicas. Portanto, para manter a aceitabilidade da formulação baseada em

compostos naturais bioativos, a purificação em etapas viáveis é necessária. No entanto, o isolamento de compostos puros de extratos brutos ainda é muito desafiador (Srivastava *et al.*, 2021). Para a exploração de produtos naturais para desenvolvimento farmacêutico, uma abordagem equilibrada é necessária para sustentar a atividade (Tollefson; Gilbert, 2012). Nesse sentido, os estudos têm se concentrado em análises comparativas entre extratos brutos ou óleos essenciais e compostos isolados, como o idealizado por Oyemitan *et al.* (2019), que comparou os efeitos inibitórios da acetilcolinesterase e de melhoria da memória de diferentes amostras de óleos essenciais de *D. tripetala* e o composto isolado  $\beta$ -fenilnitroetano. Outro estudo, realizado por Okoye *et al.* (2013), adotou uma abordagem bioguiada para a atividade farmacológica, o que levou à associação do ácido caurenoico com os efeitos e propriedades anticonvulsivantes da casca da raiz de *A. senegalensis*.

Para obtenção de extratos e metabólitos, o órgão vegetal mais utilizado foram as folhas (51 publicações), seguido do fruto (25), sementes (10) e raízes (10), conforme mostrado na figura 7. Há evidências de que extratos de casca do caule, folha, raiz da semente, casca e polpa obtidos de diferentes espécies de Annonaceae têm sido utilizados na medicina tradicional para tratar diferentes doenças (Coria-Telléz *et al.*, 2018). As partes comestíveis dos frutos de Annonaceae são utilizadas em sucos, geleias, purês, sorvetes e as partes subutilizadas na produção de alimentos têm diversos usos medicinais e não medicinais (Escobedo-Lopéz *et al.*, 2018).

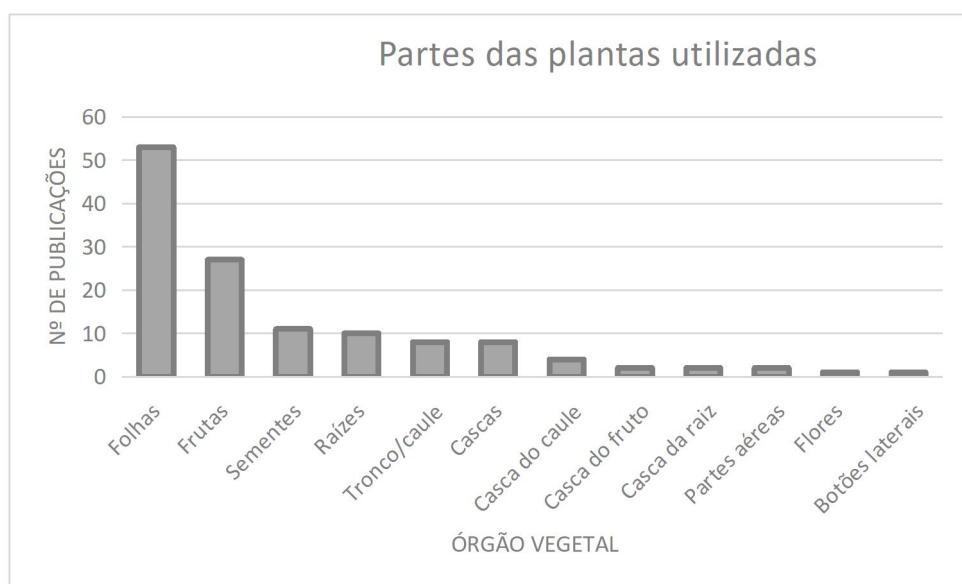


Figura 7- Órgão vegetal utilizado para obtenção de extratos e compostos bioativos da família Annonaceae.

## 7. Avaliação de plantas Annonaceae com ação no SNC

Mais de 50 compostos químicos foram isolados na família Annonaceae, incluindo fenólicos, acetogeninas e alcaloides (Coria-Téllez *et al.*, 2018). Metabólitos isolados de espécies da família Annonaceae são apresentados no Quadro 1, juntamente com as principais atividades avaliadas nos estudos. Como dito anteriormente, *A. muricata* foi a espécie mais citada neste levantamento.

### 7.1. Parkinsonismo de Guadalupe

Há relatos sobre a associação das espécies Annoneaceae com um conjunto de parkinsonismo atípico em Guadalupe. A hipótese, baseada em dados epidemiológicos, é que o consumo de produtos anonáceos, principalmente fontes alimentares (frutas e derivados) pode contribuir para a degeneração das células neuronais responsáveis pela doença (Caparros-Lefebvre *et al.*, 1999). Anonacina, a acetogenina mais abundante de *A. muricata*, é provavelmente a principal toxina relacionada a essa doença. No entanto, a contribuição de outros compostos da espécie, como outras acetogeninas e alcaloides isoquinolínicos, não pode ser descartada (Rieser *et al.*, 1992).

Os estudos de Champy *et al.* (2003), Lannuzel *et al.* (2003) e Yamada *et al.* (2014) mostraram neurotoxicidade da anonacina isolada de *A. muricata*. Essa acetogenina atua como um inibidor específico do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, sendo tóxica para neurônios dopaminérgicos e neurônios da cultura do mesencéfalo (Lannuzel *et al.*, 2003), e induziu uma distribuição de lesões em ratos semelhante à descrita para pacientes com parkinsonismo atípico (Champy *et al.*, 2003). Rottscholl *et al.* (2016) confirmaram que o consumo crônico de suco de fruta de *A. muricata* aumentou o acúmulo de fosfo-tau em camundongos mutantes R406W. As análises desse suco permitiram a identificação de 41 alcaloides e da acetogenina annonacina. Em um estudo realizado em Guadalupe, os participantes foram considerados consumidores significativos de produtos Annonaceae se tomassem frutas/sucos de *A. muricata*, *A. squamosa* e *A. reticulata* ou chás de ervas pelo menos uma vez por mês por um mínimo de 2 anos. (Langavant *et al.*, 2022). Em outro estudo de caso-controle, 75% dos guadeloupeanos com formas atípicas de parkinsonismo relataram um alto consumo cumulativo ao longo da vida de frutas/sucos de *A. muricata* acima de 10 anos-fruta (ou seja, uma fruta ou um copo de suco diariamente por 10 anos) (Lannuzel *et al.*, 2007).

## 7.2. Toxicidade neuronal e atividade neuroprotetora

Além dos sintomas descritos para o Parkinsonismo de Guadalupe, associados ao consumo de acetogeninas e seus efeitos nas células neuronais, outros estudos avaliaram a toxicidade de extratos e produtos derivados de Annonaceas nas células neuronais. Rinaldi e colaboradores (2017) demonstraram que o extrato bruto de *A. hypoglauca* apresentou citotoxicidade contra a linhagem celular neuronal SF-268-Glioblastoma. Suplementos alimentares contendo galhos ou folhas de espécies de Annonaceae (*A. muricata*, *A. squamosa*, *A. mucosa*, *A. squamosa x cherimola*) também foram testados e foram tóxicos para células neuronais. Este efeito foi atribuído às acetogeninas (anonacina e esquamocina) identificadas nos suplementos (Hollerhage *et al.*, 2015).

Por outro lado, pesquisas com folhas de *A. muricata* evidenciaram que o extrato facilita a neuroproteção ao prevenir o estresse oxidativo neuronal e promover vias de sinalização de sobrevivência celular (Kim *et al.*, 2020). Os compostos trigonelina e ácido gálico de *A. coriacea* também têm atividade neuroprotetora humana (Pinto *et al.*, 2023). O extrato hidroalcoólico de *A. squamosa* mostrou efeito *in vivo* em ensaio experimental de parkinsonismo lesionado por 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em ratos machos, talvez devido à sua potencial atividade antioxidante (Sivaraman, Kartika e Muralidharan, 2012). Uma forte atividade de neuroproteção também foi estabelecida para mangiferina, um polifenol xantona isolado de *Huberantha jenkinsii*, quando submetido a ensaios de atividade protetora contra 6-OHDA em células SH-SY5Y (San *et al.*, 2020).

## 7.2. Potencial anestésico e efeito antinociceptivo

A dor é uma resposta evolutiva adaptativa a estímulos nocivos para prevenir mais lesões ou danos (Julius; Basbaum, 2010). Os anestésicos são usados todos os dias para aliviar a dor neuropática periférica, a hiperalgesia e a síndrome dolorosa regional complexa (Paevel *et al.*, 2020; Gozalo-Marcilla *et al.*, 2014). Estudos sobre a espécie *A. muricata* mostraram bons resultados do potencial anestésico do extrato aquoso de sementes, caules, folhas e foi possível fornecer anestesia por mais de 1 hora em cães; o extrato metanolico das raízes foi mais tóxico em ratas, mas também causou anestesia local significativa (Kisani e Saganuan, 2022).

A nocicepção, o mecanismo sensorial que permite aos animais sentirem e evitar estímulos potencialmente prejudiciais aos tecidos, é crítica para a sobrevivência. A transmissão da dor está ligada aos nociceptores, que são um subconjunto especializado de neurônios sensoriais que mediam a dor e inervam densamente os tecidos periféricos (Di Maio

*et al.*, 2023). Esses neurônios respondem a vários estímulos, incluindo forças mecânicas severas, condições térmicas extremas e gatilhos químicos (Tracey, 2017). Foi demonstrado que produtos naturais desempenham um papel importante na descoberta de medicamentos analgésicos (Islam *et al.*, 2019). O óleo essencial de *X. laevigata* produziu significativamente um efeito antinociceptivo ao reduzir o comportamento nociceptivo em camundongos albinos suíços saudáveis. Terpenos, como  $\lambda$ -muuroleno,  $\delta$ -cadineno, biciclogermacreno e  $\alpha$ -copaeno, foram os principais constituintes desta espécie, de acordo com Queiroz e colaboradores (2014). Estefalagina, um alcaloide isolado da casca do fruto de *A. crassiflora*, também apresentou efeitos antinociceptivos e antiedematogênicos por alterar a atividade motora e possivelmente, pelo menos em parte, por modular os receptores de potencial transitório vaniloide tipo 1 (TRPV1) e anquirina 1 (TRPA1) (Justino *et al.*, 2020). Palmitona, o composto da classe das cetonas presente nos extratos etanólicos de *A. diversifolia*, também está relacionado com a atividade antinociceptiva e o mecanismo de ação pode envolver receptores 5HT1A e opioides endógenos (Carballo *et al.*, 2010). O extrato etanólico de *A. muricata* (Hamid *et al.*, 2012) teve atividade antinociceptiva usando testes de contorção abdominal e placa quente induzidos por ácido acético em camundongos e teste de formalina em ratos. O extrato da folha de *A. senegalensis* (Megwas *et al.*, 2020) apresentou os mesmos efeitos usando testes de constrição abdominal e movimento da cauda em camundongos. O óleo essencial de frutos frescos de *D. tripetala* tem efeitos antinociceptivos significativos nos modelos animais usados no estudo de Oyemitan e outros (2008). Os autores sugerem que os efeitos analgésicos podem ser mediados tanto nas vias centrais quanto periféricas. A discretemina, um alcaloide identificado em *Duguetia moricandiana*, reduziu significativamente o número de contorções e lambidas de pata durante a primeira fase do teste de formalina, indicando propriedades antinociceptivas deste alcaloide (Almeida *et al.*, 2010).

### 7.3. Inibição da Monoamina Oxidase A (MAO-A)

A MAO é uma enzima ligada à membrana mitocondrial, responsável pela degradação de aminas endógenas e exógenas (Bortolato *et al.*, 2008), e está envolvida principalmente na degradação da serotonina, melatonina, norepinefrina e epinefrina e é expressa quase onipresentemente no corpo humano (Hagenow *et al.*, 2022). Os inibidores da MAO-A são os primeiros medicamentos antidepressivos potentes desenvolvidos que demonstraram melhorar os sintomas da depressão (Otto *et al.*, 2015). Os compostos que inibem a MAO estão atualmente em uso clínico para o tratamento de transtornos afetivos e doença de Parkinson

(DP) (Finberg; Rabey, 2016). O chá herbal *A. muricata* apresentou capacidade inibitória para MAO-A, e os principais compostos identificados foram fenólicos e flavonoides: ácido 5-cafeoilquínico, quercetina-3-*O*-galactosídeo, quercetina-3-*O*-glicosídeo, quercetina-3-*O*-rutinosídeo e kaempferol-3-*O*-rutinosídeo (Grosso *et al.*, 2015).

#### 7.4. Atividade anticolinesterásica

As enzimas colinesterásicas catalisam a quebra da acetilcolina. O grupo colinérgico de neurônios funciona para manter a atividade cortical, o fluxo sanguíneo cerebral, modular a cognição, o aprendizado, as atividades relacionadas à tarefa e à memória, o desenvolvimento do córtex cerebral e a regulação do ciclo sono-vigília (Anand *et al.*, 2014). A inibição das colinesterases é uma estratégia comum para o tratamento de vários distúrbios, especialmente a doença de Alzheimer ou a demência senil. A doença de Alzheimer é a doença neurodegenerativa mais comum entre os idosos (Panek *et al.*, 2018). É clinicamente caracterizada por perda progressiva de memória, disfunção cognitiva, anormalidades comportamentais e dificuldades sociais (Yang *et al.*, 2019). Os extratos brutos de *A. squamosa* (Leite *et al.*, 2021), *A. muricata* e *P. longifolia* (Rawa *et al.*, 2019), *X. aethiopica* (Adefeghaa *et al.*, 2016) apresentaram efeitos inibitórios *in vitro* significativos sobre colinesterases. Compostos sintetizados a partir de modelos estruturais de moléculas presentes em espécies anonáceas também obtiveram bons resultados de inibição, como os derivados de alcaloides cleistofolina (Wu *et al.*, 2018) e derivados de alcaloides sampagina (Xie *et al.*, 2021). Na maioria das moléculas desses estudos, as alterações estruturais favoreceram a solubilidade em água e mantiveram ou melhoraram a permeabilidade na barreira hematoencefálica. Em um estudo de encaixe molecular com alcaloides isoquinolínicos de *Fissistigma polyanthum*, a oxoxilopina mostrou potente atividade de alvo duplo - inibição da acetilcolinesterase e agregação de amiloide-β (Aβ) - e dois compostos (desidrodiscretamina e (S)-1,2,3,4-tetra-hidro-7-metoxi-8-hidroxi-2-metil-13-metoxibenzilisoquinolina) com ação apenas sobre colinesterases, acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE) (Jiang *et al.*, 2023). O extrato metanólico, a pseudocolumbamina e a pseudopalmatina isolados de *Alphonsea tonkinensis* mostraram potencial atividade inibitória *in vitro* contra acetilcolinesterase (Nguyen *et al.*, 2021).

#### 7.5. Atividade anticonvulsivante

A epilepsia é uma das doenças neurológicas mais comuns e afeta pessoas de todas as idades, raças, classes sociais e localizações geográficas. A epilepsia é uma doença do cérebro

caracterizada por uma predisposição duradoura para gerar convulsões e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais das recorrências de convulsões (Beghi, 2019; Fisher *et al.*, 2005). Transtornos psiquiátricos são frequentemente encontrados em muitos distúrbios neurológicos, por exemplo, Alzheimer e Parkinson, e estão relacionados à epilepsia, enxaqueca, tremores essenciais e derrame (Penner; Paul, 2017). Essas comorbidades psiquiátricas aumentam a carga da doença e dificultam o manejo dos distúrbios. Para epilepsia, a convulsão induzida por pentilenotetrazol (PTZ) é um dos modelos de camundongo padrão ouro para uma avaliação rápida de novos anticonvulsivantes (Singh; Mishra; Goel, 2021). Esta metodologia foi aplicada em estudos para avaliar o potencial anticonvulsivante das espécies anonáceas, como o extrato aquoso de *A. senegalensis*, que apresentou efeitos anticonvulsivantes significativos em um estudo de Chipiti *et al.* (2021) e o ácido caurenoico, isolado da mesma espécie, em um estudo de Okoye *et al.* (2013). O óleo essencial da espécie *D. tripetala* também apresentou atividade quando avaliado pelo modelo de indução PTZ (Oyemitan *et al.*, 2013). O tratamento com extrato de folhas de *A. squamosa* e seu constituinte isolado (anonaína) potencializa um efeito terapêutico ao reverter as alterações na ligação geral do receptor GABA, GABAA, GABAB, subunidades do receptor GABAA, que ocorrem durante a epilepsia, resultando em um aumento da inibição mediada por GABA nos neurônios do córtex cerebral superestimulados e alteração no comportamento de ratos epilépticos. Além disso, esses tratamentos causaram efeitos de aumento da memória e recuperação da memória no braço radial e no modelo de labirinto em Y (Kumar; Porwal, 2015). O extrato de hexano de *A. diversifolia* e palmitona isolados de espécies exibiram propriedades anticonvulsivantes e retardaram o estabelecimento de um estado de inflamação em camundongos (González-Trujano *et al.*, 2009).

#### 7.6. Transtornos de depressão e ansiedade

Os transtornos de depressão e ansiedade são altamente prevalentes (Organização Mundial da Saúde, 2022), estão associados a uma perda considerável de qualidade de vida para pacientes e seus familiares, e a uma enorme carga de doenças e custos econômicos no nível populacional (Whiteford *et al.*, 2015). A depressão é um grande transtorno de humor que se apresenta com um sentimento persistente de tristeza, mau humor debilitante, cognição prejudicada e perda de interesse, e tem um efeito profundo no funcionamento da pessoa afetada, individual, biológica e socialmente (Dobrek; Głowacka). Os transtornos de ansiedade são caracterizados por sintomas que incluem preocupação, medos sociais e de desempenho, ataques de pânico inesperados e/ou desencadeados, ansiedade antecipatória e comportamentos

de evitação (Szuhany; Simon, 2022). O Estudo Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors (GBD) 2019 mostrou que os dois transtornos mentais mais incapacitantes foram depressão e transtornos de ansiedade classificados entre as principais causas de sobrecarga em todo o mundo (GDB 2019, 2020).

Os compostos presentes na *A. cherimolia* parece interagir com receptores GABA e, portanto, induzir as ações ansiolíticas dos extratos de folhas, e essa ação foi associada à presença de β-sitosterol e palmitona (López-Rubacalva *et al.*, 2006). A palmitona também é o composto relacionado à atividade antinociceptiva de *A. diversifolia*, em um estudo realizado por Carballo *et al.* (2008). *A. coriacea* também mostrou efeitos ansiolíticos, atribuídos, em parte, à presença de ácido cafeico (Monteiro *et al.*, 2020). O óleo essencial de *A. vepretorum* teve um efeito ansiolítico, bem como efeitos sedativos, antiepilepticos e antidepressivos (Diniz *et al.*, 2019). O extrato aquoso de *A. muricata* mostrou atividade ansiolítica e um efeito colateral mínimo na microanatomia cerebral (Okoronkwo *et al.*, 2018). 1-Nitro-2-feniletano, encontrado em *Dennettia tripetala*, mostrou efeitos ansiolíticos significativos (Oyemitan *et al.*, 2013). O mesmo composto também exibiu altas atividades de melhoria da memória em outro estudo do mesmo autor (Oyemitan *et al.*, 2019).

## 8. Conclusões e perspectivas futuras

Por meio deste levantamento, foi possível demonstrar que diversos compostos de diferentes classes (terpenos, acetogeninas, alcaloides, fenólicos, flavonoides), encontrados em diferentes componentes vegetais (frutos, sementes, folhas e raízes) de diversas espécies da família Annonaceae, têm ação no Sistema Nervoso Central. Em todos os estudos avaliados não foi relatada a presença de poliprenois nas espécies Annonaceae. Pesquisas *in vivo*, *in vitro* e *in silico* mostraram que eles têm potencial para tratar diversas condições atuando tanto em transtornos psiquiátricos, como a epilepsia, quanto em doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer. Além disso, foram encontradas atividades de analgesia, anestesia e citotoxicidade em linhagens de tumores cerebrais, juntamente com a descrição de atividades neuroprotetoras para células neuronais. No entanto, estudos relatam o potencial neurotóxico de algumas classes, especialmente as acetogeninas. O conhecimento dessas atividades pode ajudar a promover e ampliar o potencial farmacológico dessa família.

Quadro 1 - Levantamento de espécies da família Annonaceae, principais metabólitos identificados e atividades relacionadas ao Sistema Nervoso Central.

Espécies	Principais metabólitos identificados	Parte usada	Tipo de estudo	Principais atividades	Referências
<i>Alphonsea tonkinensis</i>	Liriodenina, pseudopalmatina, pseudocolombaminae	Caules e folhas	<i>In vitro</i> . Avaliação da inibição da acetilcolinesterase (AChE).	Extratos totais de MeOH, pseudocolombamina e pseudopalmatina apresentaram potencial atividade inibitória contra a acetilcolinesterase.	Nguyen <i>et al.</i> , 2021
<i>Annona atemoya</i>	Rutina e isoquerçitrina	Folhas	<i>In vivo</i> . Modelo de rato com déficit cognitivo induzido por escopolamina.	Melhora na disfunção do sistema colinérgico, memória, efeito antioxidante e neuroprotetor.	Sohn <i>et al.</i> , 2019
<i>Annona cherimolia</i>	Palmitone e β-sitosterol	Folhas	<i>In vivo</i> . Testes comportamentais com ratos	O extrato de hexano interage com o complexo receptor GABA-A para induzir suas ações ansiolíticas.	López-Rubacalva <i>et al.</i> , 2006
<i>Annona cherimolia</i>	1,2-dimetoxi-5,6,6a,7-tetrahidro-4H-dibenzoquinolina-3,8,9,10-tetraol, anonaína, liriodenina e nornuciferina.	Partes aéreas	<i>In vivo</i> . Teste de natação forçada e campo aberto com ratos.	O extrato alcalóide produziu efeitos semelhantes aos antidepressivos em ratos.	Martínez-Vázquez, 2012
<i>Anona coriacea</i>	Ácido gálico; Anonalida; Catequina; Campferol; Quercetina e Trigonalina	Compostos isolados	<i>In silico</i> . Docking para investigar novos candidatos a transtornos psiquiátricos.	A trigonalina e o ácido gálico podem atenuar os sintomas da disfunção cognitiva através da supressão do estresse oxidativo e neuroinflamatório causado pelo lipopolissacárido (LPS).	Pinto <i>et al.</i> , 2023
<i>Anona coriacea</i>	ácido cafeico	Folhas	<i>In vivo</i> . Modelos comportamentais em ratos	O extrato hidroetanólico apresentou efeitos sedativos, ansiolíticos e antidepressivos, em parte devido à presença de ácido cafeico.	Monteiro <i>et al.</i> , 2020
<i>Annona crassiflora</i>	Estefalagina	Casca de fruta	<i>In vivo</i> . Testes com mouse	Estefalagina tem efeitos antinociceptivos e antiedemogênicos.	Justino <i>et al.</i> , 2020
<i>Annona crassiflora</i>	estefalagina, liriodenina e aterospermidina	Casca de fruta	<i>In vitro</i> e <i>in silico</i> . Ensaio de inibição de AChE e BuChE	Estefalagina exibiu <i>in vitro</i> melhor atividade inibitória de BuChE. No docking molecular, todos os ligantes apresentaram potenciais interações, principalmente com AChE.	Barbosa <i>et al.</i> , 2022
<i>Annona diversifolia</i>	Palmitona	Folhas	<i>In vivo</i> . Modelo de comprometimento funcional induzido pela dor em ratos e	O extrato de etanol tem efeito na nociceção artrítica e visceral. Palmitona é o composto relacionado na atividade antinociceptiva	Carballo <i>et al.</i> , 2010

			teste de contorções em camundongos		
<i>Annona diversifolia</i>	Palmitona	Folhas	<i>In vivo</i> . Modelo de convulsão de pentilenotetrazol (PTZ). <i>In vitro</i> . Avaliação de células neuronais	A palmitona não previu a convulsão causada pelo PTZ, mas o palmitone previne o dano neuronal causado pelo PTZ na região CA3 do hipocampo.	Cano-Europa <i>et al.</i> , 2010
<i>Annona diversifolia</i>	Palmitona	Folhas	<i>In vivo</i> . Convulsões comportamentais induzidas por descargas elétricas	O extrato de hexano e a palmitona exibiram propriedades anticonvulsivantes e retardaram o estabelecimento de um estado de inflamação.	González-Trujano <i>et al.</i> , 2009.
<i>Annona diversifolia</i>	Palmitona	Folhas	<i>In vivo</i> . Coordenação motora e testes anticonvulsivantes (ratos)	Eficaz na diminuição das convulsões tônico-clônicas e da toxicidade induzidas por PTZ.	González-Trujano <i>et al.</i> , 2000.
<i>Annona diversifolia</i>	Palmitona	Folhas	<i>In vivo</i> . Testes comportamentais de ansiedade em ratos.	Palmitona produziu um efeito ansiolítico dose-dependente significativo com diminuição da coordenação motora acompanhada de interrupção do desempenho de tração.	González-Trujano <i>et al.</i> , 2006.
<i>Annona foetida</i>	Liriodenina	Sintético	<i>In vivo</i> . Ensaios com <i>Anopheles gambiae</i> , <i>Drosophila melanogaster</i> e <i>Periplaneta americana</i>	A liriodenina exibiu toxicidade tópica moderada para mosquitos <i>A. gambiae</i> . A liriodenina foi neuroexcitatória em larvas de <i>D. melanogaster</i> . A liriodenina bloqueou o efeito do GABA em neurônios isolados de <i>P. americana</i> .	Coquerel <i>et al.</i> , 2021
<i>Annona hipoglauca</i>	Isoboldina, nornuciferina, anonaína, actinodafnina	Tronco/haste	<i>In vitro</i> . Teste de citotoxicidade com glioblastoma SF-268	O extrato bruto apresentou citotoxicidade contra a linhagem celular do sistema nervoso central SF-268-Glioblastoma	Rinaldi <i>et al.</i> , 2017
<i>Annona hipoglauca</i>	ácido oleico ω-9 e ácido linoléico ω-6	Sementes (óleo)	<i>In vitro</i> . Teste de AChE	O óleo teve um potente efeito anticolinesterásico.	Santos <i>et al.</i> , 2015
<i>Annona muricata</i>	Anonacina	Raízes	<i>In vitro</i> . Cultura do mesencéfalo <i>In vivo</i> . Ratos	A anonacina inibiu o complexo I em homogeneizados cerebrais, promoveu perda de neurônios dopamínergicos, acompanhada de aumento no número de astrócitos e células microgliais.	Champy <i>et al.</i> , 2004
<i>Annona muricata</i>	Coclaurina, reticulina, asimilobina, nornuciferina, anonaína, anonacina	suco de frutas	<i>In vivo</i> . Camundongos superexpressando tau de tipo selvagem humano ou tau mutante R406W.	O consumo crônico de suco aumentou o acúmulo de fosfo-tau e a reatividade à 3-nitrotirosina (3NT), e reduziu a imunoreatividade da sinaptofisina. Promoveu a geração de espécies reativas de nitrogênio.	Rottscholl <i>et al.</i> , 2016
<i>Annona muricata</i>	Saponinas, flavonóides, taninos, alcalóides, glicosídeos e fenóis	Folhas, sementes,	<i>In vivo</i> . Estudos de anestesia em ratos e cães albinos Wister.	O extrato aquoso tem efeitos anestésicos locais e gerais em cães. O extrato metanolico foi mais tóxico	Kisan; Saganuan,

		caule, casca do caule, casca da raiz e raiz			em ratas e causou anestesia local significativa.	2022
<i>Annona muricata</i>	Ácido 5-cafeoilquínico, quercetina-3-O-galactosídeo, kaempferol-3-O-rutinosídeo	Folhas	<i>In vitro</i> . espectrofotométrico inibição da MAO-A	Ensaio para	O chá de folhas de <i>A. muricata</i> apresentou capacidade inibitória para MAO-A.	Grossó <i>et al.</i> , 2015
<i>Annona muricata</i>	Anonacina	Raízes	<i>In vitro</i> . Cultura primária de células do mesencéfalo		A anonacina atuou como inibidor específico do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial utilizando homogenatos de córtex cerebral de ratos adultos. A anonacina é tóxica para neurônios dopaminérgicos e neurônios mesencéfalos cultivados.	Lannuzel <i>et al.</i> , 2003
<i>Annona muricata</i>	Alcaloides: coreximina, reticulina	Raízes	<i>In vitro</i> . Cultura primária de células do mesencéfalo		Os alcaloides modulam a função e a sobrevivência das células nervosas dopaminérgicas <i>in vitro</i> .	Lannuzel <i>et al.</i> , 2002
<i>Annona muricata</i>	reticulina, anonacina	coreximina, Raízes	<i>In vivo</i> e <i>in vitro</i> . Estudo de toxicidade crônica com ratos		A anonacina pode atravessar a barreira hematoencefálica e induzir neurodegeneração dos gânglios da base nestes animais, semelhante ao observado em animais parkinsonianos atípicos.	Lannuzel <i>et al.</i> , 2006
<i>Annona muricata</i>	Não identificado	Folhas	<i>In vivo</i> . Testes de atividades antinociceptivas em camundongos.		O extrato etanólico exibiu atividade antinociceptiva significativa e dose-dependente.	Hamid <i>et al.</i> , 2012
<i>Annona muricata</i>	Anonacina	Polpa da fruta	<i>In vivo</i> . Experimentos com camundongos transgênicos R406W <sup>+/+</sup>		A exposição à anonacina produziu níveis aumentados e fosforilação da proteína tau, alteração das tau quinases e aumento do somatodendrítico neuronal em camundongos transgênicos.	Yamada <i>et al.</i> , 2014
<i>Annona muricata</i>	Quercetina, rutina, kaempferol e ácidos fenólicos: gálico, clorogênico, elágico e cafeico	Folhas	<i>In vivo</i> . Ensaios ansiolíticos, sedativos, anticonvulsivantes e neuroquímicos em ratos.		O extrato hidroetanólico apresentou efeitos sedativos, ansiolíticos e anticonvulsivantes. Além disso, sua indução diminuiu o nível de norepinefrina e dopamina no corpo estriado do cérebro do camundongo.	Souza <i>et al.</i> , 2017
<i>Annona muricata</i>	Anonacina	Polpa da fruta, folhas	<i>In vitro</i> . Testes em cultura celular de neurônios do estriado		A anonacina pode induzir uma patologia tau relacionada com alterações do parkinsonismo atípico em Guadalupe. A redução de ATP induzida pela anonacina está associada à toxicidade celular, redistribuição de tau e transporte mitocondrial anormal.	Escobar-Khondiker <i>et al.</i> , 2007
<i>Annona muricata</i>	Polifenois e flavonoides	Fruta	<i>In vivo</i> . Amnésia induzida por escopolamina (SCO) e dano		O extrato melhorou as alterações do hipocampo e exerce seu potencial efeito antiamnésico	Al Omairi <i>et al.</i> , 2019

			oxidativo no hipocampo de ratos	principalmente através da ativação do sistema colinérgico e da via Nrf2/HO-1.	
<i>Annona muricata</i>	Não identificado	Folhas, frutos e sementes	<i>In vitro</i> . Teste de viabilidade com glioblastoma U251-MG.	O extrato de folhas e frutos exibiu efeitos citotóxicos na proliferação celular e alterou o padrão de expressão do gene indutor de morte relacionado a Mu-2 (MuD) em astrogliomas.	Gopal <i>et al.</i> , 2019
<i>Annona muricata</i>	Alcaloide, fenol, saponina, flavonoide, taninos.	Folhas	<i>In vivo</i> . Labirinto mais elevado com ratos	O extrato apresentou atividade ansiolítica e efeito colateral mínimo na microanatomia cerebral.	Okoronkwo <i>et al.</i> , 2018
<i>Annona muricata</i>	Não identificado	Folhas	<i>In vivo</i> . Desenho de estudo experimental usando um desenho de grupo de controle pós-teste para ver a expressão de Bax do hipocampo gyrus dentatus de rato neurônio ( <i>Rattus norvegicus</i> )	O extrato aquoso teve efeito subcrônico na expressão do gene Bax no giro denteadoo do hipocampo de ratos.	Mônica; Handayani, 2023
<i>Annona muricata</i>	Não identificado	Folhas	<i>In vivo</i> e <i>in vitro</i> . Estudo experimental com ratas	O extrato aquoso aumenta a neuroglia do córtex cerebral e a degeneração do fígado em ratas.	Handayani <i>et al.</i> , 2015
<i>Annona muricata</i>	Galactose, glicose, manose, fucose e galactosamina.	Folhas	<i>In vitro</i> . Ensaio em linhagem celular neuronal do hipocampo de camundongo	O extrato de lipopolissacarídeo facilita a neuroproteção, prevenindo o estresse oxidativo neuronal e promovendo vias de sinalização de sobrevivência celular.	Kim <i>et al.</i> , 2020
<i>Annona muricata</i>	Não identificado	Folhas	<i>In vivo</i> . Avaliação neurocomportamental da memória e coordenação locomotora (ratos)	Extrato de etanol mostrou potencial de neuroproteção e melhora da coordenação de locomoção	Adeoye <i>et al.</i> , 2023
<i>Annona muricata</i>	Anonaina, nomuciferina e asimilobina	Frutas	<i>In vitro</i> . Determinação da atividade agonista do receptor AMP cíclico e 5-HTIA	<i>A. muricata</i> tem efeitos antidepressivos, possivelmente induzidos por compostos identificados.	Bruyne <i>et al.</i> , 1997
<i>Annona muricata</i>	Não identificado	Folhas	<i>In vivo</i> . Avaliação dos efeitos protetores na lesão do nervo ciático em ratos.	O extrato de <i>Annona muricata</i> pode melhorar bioquímica e histomorfologicamente a lesão do nervo ciático na fase aguda.	Keskin <i>et al.</i> , 2022
<i>Annona muricata</i>	Não identificado	Folhas	<i>In vivo</i> . Teste com ratos	O extrato aumenta o número de gânglios da base, corpos celulares, núcleos e fibras com necrose de neurônios. O alto consumo do extrato pode resultar em efeitos colaterais extrapiramidais.	Obioma <i>et al.</i> , 2019

<i>Annona muricata</i>	Não identificado	Frutas, sucos, chás	<i>In vivo.</i> Análise de dados neurológicos de 180 pacientes parkinsonianos caribenhos	O baixo consumo cumulativo de frutas/sucos (>0,2 anos-frutos) ou qualquer consumo de chá de ervas Annonaceae piora a gravidade da doença e os déficits cognitivos no parkinsonismo degenerativo.	Langavant <i>et al.</i> , 2022
<i>Annona muricata</i>	Quercetina, rutina, kaempferol e ácidos gálicos, clorogênicos, elágico e cafeico	Folhas	<i>In vivo.</i> Efeitos comportamentais em ratos	O extrato hidroalcoólico apresentou efeitos sedativos, ansiolíticos e anticonvulsivantes.	Souza <i>et al.</i> , 2018
<i>Anona vepretorum</i>	Não identificado	Folhas	<i>In vivo.</i> Modelos de dor em roedores	O extrato etanólico bruto reduziu o número de contorções e diminuiu o tempo de lambedura da pata em ambas as fases do teste da formalina. Nos testes de placa quente e movimento de cauda o tempo de reação aumentou, consequentemente reduzindo o comportamento doloroso.	Silva <i>et al.</i> , 2015
<i>Anona reticulata</i>	Alcaloides, saponinas, glicosídeos, taninos, esteroides, triterpenos e flavonóides.	Casca	<i>In vivo.</i> Avaliação da atividade antiepileptica	O extrato hidroalcoólico protegeu os animais da perda de adesão muscular e aumentou o tempo de imobilidade, com efeito antiepileptico.	Mali <i>et al.</i> , 2022
<i>Anona reticulata</i>	Não identificado	Folhas	<i>In vivo.</i> Modelo de convulsão PTZ e teste de antidepressivo (natação forçada).	O extrato etanólico de <i>A. reticulata</i> aumentou a latência e diminuiu a gravidade das crises e reduziu o comportamento depressivo.	Báron-Flores <i>et al.</i> , 2021
<i>Anona reticulata</i>	Não identificado	Casca	<i>In vivo.</i> Indução do sono com fenobarbital, teste de atividade motora em ratos.	Redução da atividade locomotora no grupo tratado com extrato de éter de petróleo, com atividade depressora do SNC.	Bhalke <i>et al.</i> , 2009
<i>Anona reticulata</i>	Terpenos, esteróides, alcaloides flavonoides, taninos.	Casca	<i>In vivo.</i> Método da placa quente e indução do sono com pentobarbital em camundongos.	O extrato de éter de petróleo exibiu atividade analgésica central no método da placa quente, atividade depressora do sistema nervoso central de leve a moderada.	Bhalke; Chavan, 2011
<i>Annona squamosa</i>	Antocianidinas, flavonois alcaloides, ácido linoleico, oleico, palmítico e esteárico	Fruta Sementes	<i>In vitro.</i> Ensaio de inibição da acetilcolinesterase em microplacas.	O extrato da fruta demonstrou maior atividade inibitória da AChE.	Leite <i>et al.</i> , 2021
<i>Annona squamosa</i>	Alcaloides	Sementes	<i>In vivo.</i> Testes motores e analgésicos espontâneos, hipnose induzida por fenobarbital (ratos)	O extrato etanólico produziu efeito depressor do sistema nervoso central, atividades hipnóticas e anticonvulsivantes e aumentou o limiar de dor.	Saluja; Santani, 1994
<i>Annona squamosa</i>	Anonaina	Folhas	<i>In vivo.</i> Testes de coordenação com ratos e análise microscópica do receptor GABA (região do	Anonaina causou testes de coordenação de efeitos de melhoria e recuperação de memória. Foram observadas alterações no comportamento de ratos	Kumar; Porwal, 2015

			córtex).	epilépticos e diminuição de seus receptores GABA.	
<i>Annona squamosa</i>	Não identificado	Folhas	<i>In vivo</i> , Teste com roedores.	O extrato apresentou propriedade anticonvulsivante ao alterar o nível de catecolaminas e aminoácidos cerebrais em camundongos.	Porwal; Sharma; Sharma, 2008
<i>Annona squamosa</i>	Não identificado	Folhas e botões laterais	<i>In vivo</i> . Teste de suspensão da cauda e teste de natação forçada em ratos	O extrato de metanol produziu efeitos antidepressivos.	Vijayabhaskar et al., 2017
<i>Annona squamosa</i>	Alcaloides; Fenois, Flavonoides; Flavonas; Glicosídeos e Taninos	Folhas	<i>In vivo</i> . Testes de coordenação com ratos lesionados por indução de 6-OHDA	Atividade neuroprotetora promissora contra parkinsonismo experimental induzido por 6-OHDA. O efeito potenciador do extrato pode ser devido à sua potencial atividade antioxidante.	Sivaraman et al., 2012
<i>Annona senegalensis</i>	Alcaloides, flavonoides, terpenóides, saponinas e taninos	Casca de raiz	<i>In vivo</i> . Modelo de convulsão PTZ, indução do sono por fenobarbital, teste de coordenação motora rota-rod (ratos)	O extrato exibiu um atraso não dependente da dose no início da fase tônica da convulsão induzida por PTZ. Diminuiu a latência e aumentou o tempo de sono induzido pelo fenobarbital e causou alterações na coordenação motora.	Okoye et al., 2010
<i>Annona senegalensis</i>	Não identificado	Cascas	<i>In vivo</i> . Efeito hipnótico em ratos adultos e modelos de hipnose de pintinhos de um dia de idade.	O extrato tem pronunciado efeito depressor do sistema nervoso central, que se manifesta na forma de sedação seguida de sono. Também potencializou o efeito depressor do fenobarbital.	Otimeniyin et al., 2014
<i>Annona senegalensis</i>	Saponinas, taninos, esteroides, terpenoides, alcaloides, flavonoides e glicosídeos.	Folhas	<i>In vivo</i> . Modelo de convulsão PTZ, sono induzido por pentobarbital, estereotipia induzida por apomorfina, campo aberto, labirinto em cruz elevado (LCE) e testes de desempenho rotarod (roedores).	O extrato e as frações inibiram as convulsões induzidas por PTZ, prolongaram o sono induzido por pentobarbital, reduziram o comportamento estereotipado e melhoraram a locomoção e a coordenação. Além disso, o extrato e as frações aumentaram o tempo de permanência no braço aberto do LCE e reduziram o tempo médio de permanência no rotarod.	Okoli et al., 2015
<i>Annona senegalensis</i>	Ácido Caurenoico (AS2)	Casca de raiz	<i>In vivo</i> . Modelo de apreensão PTZ (camundongos e ratos).	O composto isolado, AS2, possui potentes efeitos anticonvulsivantes e é responsável pelos efeitos antiepilépticos do extrato.	Okoye et al., 2013
<i>Annona senegalensis</i>	alcaloides, saponinas, taninos, flavonoides, terpenoides.	Folhas	<i>In vivo</i> . Testes de contorção abdominal e movimento da cauda	O extrato de folhas exibiu atividades analgésicas.	Megwas et al., 2020
<i>Annona</i>	Não identificado	Partes aéreas e	<i>In vivo</i> . Modelo de indução de	O extrato aquoso apresentou efeito anticonvulsivante.	Chipiti et al.,

<i>senegalensis</i>		raízes	convulsão por PTZ em peixe-zebra adulto ( <i>Danio rerio</i> )		2021
<i>Annona senegalensis</i>	Flavonoides, taninos, saponinas, esteróides e triterpenos	Casca do caule	<i>In vivo</i> . Testes de contorção induzida por ácido acético e placa quente em camundongos	Inibição significativa, dependente da dose, das contorções induzidas pelo ácido acético, ao mesmo tempo que aumenta a latência da reação nociceptiva no teste da placa quente.	Suleiman <i>et al.</i> , 2014
<i>Annona vepretorum</i>	(E)-β-ocimeno, biciclogermacreno, germacreno D e limoneno	Folhas	<i>In vivo</i> . Modelos comportamentais em ratos	O óleo essencial tem efeitos ansiolíticos, sedativos, antiepilepticos e antidepressivos.	Diniz <i>et al.</i> , 2019
<i>Annona vepretorum</i>	fenois, esteroides, terpenoides e flavonóides.	Folhas	<i>In vivo</i> . Testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado, placa perfurada e rota-rod.	Houve diminuição da atividade espontânea, ptose palpebral e diminuição da resposta ao toque e do número de deambulações e elevação, além de aumento do tempo de imobilidade no teste de campo aberto.	Diniz <i>et al.</i> , 2013
<i>Annona muricata, A. squamosa., A. mucosa, squamosa cherimola x</i>	Anonacina, escamocina	Suplementos dietéticos contendo materiais vegetais	<i>In vitro</i> . Viabilidade celular e neurotoxicidade em células LUHMES (neurônios mesencefálicos humanos de Lund).	Suplementos dietéticos contendo galhos ou folhas de espécies de Annonaceas são tóxicos para as células neuronais.	Hollerhage <i>et al.</i> , 2015
<i>Annona cherimola x Annona squamosa</i>	Não identificado	Folhas	<i>In vivo</i> . Testes de contorção induzidos por ácido acético, formalina, placa quente e rota-rod em camundongos.	O extrato etanólico reduziu o número de contorções e reduziu a lambedura da pata em ambas as fases do teste da formalina. No teste da placa quente a latência foi significativa, reduzindo o estímulo doloroso.	Silva <i>et al.</i> , 2017
<i>Annona muricata; Polyalthia longifolia</i>	Não identificado	Folhas	<i>In vitro</i> . Ensaio de inibição de AChE e BChE	Extratos de ambas as espécies apresentaram inibição da colinesterase, sendo <i>P. longifolia</i> mais ativa	Rawa, <i>et al.</i> , 2019
<i>Annona cherimola, A. diversifolia, A. muricata, A. purpurea; A. reticulata</i>	Não identificado	Folhas	<i>In vitro</i> . Estresse oxidativo em culturas neuronais primárias induzidas por excitotoxicidade	A família Annonaceae apresentou efeitos citotóxicos	Pineda-Ramírez <i>et al.</i> , 2020
<i>Annona muricata; Annona senegalensis</i>	Não identificado	Caule, folha e semente	<i>In vivo</i> . Modelo de apreensão PTZ em camundongos	Extrato de caule de <i>A. muricata</i> e extratos de caule e folhas de <i>A. senegalensis</i> atrasaram as convulsões.	Dongmo Nguepi <i>et al.</i> , 2015

<i>Annona muricata;</i> <i>Annona senegalensis</i>	Não identificado	Folhas, caules e sementes	<i>In vitro.</i> Toxicidade induzida por aminocromo em humanos glioblastoma/astrocitoma (células U373MG)	Os extratos de <i>A. muricata</i> e <i>A. senegalensis</i> podem proteger contra a toxicidade induzida pelo aminocromo em células de astrocitoma humano.	Ngoungoue et al., 2019
<i>Annona cherimola;</i> <i>A. diversifolia;</i> <i>A. muricata;</i> <i>A. purpurea;</i> <i>A. reticulata</i>	Não identificado	Folhas	<i>In vitro.</i> Avaliação da morte neuronal induzida por excitotoxicidade com o ensaio de tetrazólio.	Os extratos de Annonaceae foram altamente citotóxicos.	Pineda-Ramírez et al., 2020
<i>Annonaceae (família)</i>	Derivados de alcaloides N-aciltriptamina	Sintético	<i>In vitro.</i> Cultura primária do mesencéfalo.	Atividade antioxidante identificada, que se correlaciona com o efeito neuroprotetor. No entanto, os compostos sintéticos não foram capazes de proteger os neurônios dopaminérgicos da morte.	Schmidt et al., 2010
<i>Annonaceae (família)</i>	Derivados de 4-alquilaminosampangina (SD-1)	Sintético	<i>In vitro.</i> Cultura de células microgliais BV2 e linhagem SH-SY5Y (neuroblastoma humano)	SD-1 supriu a formação de espécies $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta$ , aliviou a neurotoxicidade induzida por espécies $\text{Cu}^{2+}\text{-A}\beta$ e inibiu a produção de espécies reativas de oxigênio, em células SH-SY5Y.	Su et al., 2020
<i>Annonaceae (família)</i>	Anonacina, anonacinona, isoanonacina, rolliniastatina 2, solamina e escamocina	Sintético	<i>In vitro.</i> Cultura de células primárias do estriado de rato	Todos os compostos reduziram os níveis de ATP celular, induziram a morte celular neuronal e causaram a redistribuição da tau somadendrítica.	Höllerhage et al., 2009
<i>Annonaceae (família)</i>	Derivados de azaantraquinona	Sintético	<i>In vitro.</i> Ensaio em células SH-SY5Y da proteína precursora $\beta$ -amilóide (APPsw). Inibição de AChE e BChE	Eles mostraram efeito inibitório na agregação auto-induzida de $\text{A}\beta42$ , secreção de $\text{A}\beta42$ em células APPsw SH-SY5Y, atividade anticolinesterásica, penetração da barreira hematoencefálica e baixa toxicidade.	Wang et al., 2019
<i>Annonaceae (família)</i>	Derivados do alcaloide cleistofolina	Sintético	<i>In vitro.</i> Estudos de inibição de AChE e BChE.	A cadeia lateral introduzida na cleistofolina nas posições 6 e 9 aumentou a solubilidade em água, a permeabilidade da barreira hematoencefálica e as atividades biológicas dos derivados (anticolinesterásico, agregador anti- $\text{A}\beta$ )	Wu et al., 2018
<i>Annonaceae (família)</i>	Derivados de Sampagina Substituídos	4- Sintético	<i>In vitro.</i> Ensaio anticolinesterásico. Ensaio de citotoxicidade com células SH-SY5Y. Ensaio de permeabilidade da barreira	A introdução de cadeias laterais de alquilamino na sampagina (posição 4) aumentou a solubilidade em água dos derivados, a atividade anticolinesterásica, a permeabilidade da barreira hematoencefálica e reduziu a sua toxicidade.	Chen et al., 2018

			hematoencefálica.		
<i>Annonaceae</i> (família)	Derivados do alcaloide Sampagina	Sintético	<i>In vitro</i> . Ensaio de inibição de AChE. Ensaio de permeação de membrana artificial Cultura de células BV2 (microglia).	Os derivados sintetizados possuem capacidade de penetrar a barreira hematoencefálica e forte atividade anticolinesterásica, além de alta afinidade de ligação e seletividade para Cu <sup>2+</sup> . Um dos compostos (11) supriu a formação de complexos Cu <sup>2+</sup> -Aβ, aliviando a neurotoxicidade induzida por Cu <sup>2+</sup> .	Zou <i>et al.</i> , 2021
<i>Annonaceae</i> (família)	Derivados do alcaloide Sampagina	Sintético	<i>In vitro</i> . Inibição da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BChE)	Derivados sintetizados com capacidade de penetração na barreira hematoencefálica e forte atividade anti-AChE, além de alta afinidade de ligação e seletividade ao Zn <sup>2+</sup> .	Xie <i>et al.</i> , 2021
<i>Annonaceae</i> (família)	Acetogeninas	Sintético	<i>In vivo</i> : Indução de isquemia cerebral da artéria carótida <i>In vitro</i> : estimativa da atividade da AChE em todo o cérebro	O efeito neuroprotetor das acetogeninas foi mediado pela atividade antioxidant, eliminando radicais livres e também devolvendo o nível de marcadores bioquímicos próximos aos valores normais.	Narkhede; Kulkarni, 2015
<i>Anaxagorea luzonensis</i>	Derivados de prenilnaringenina	8- Sintético	<i>In vitro</i> . Cultura do prosencéfalo embrionário de camundongo (MEF)	Os prenilflavonoides induzem diferenciação em células precursoras neurais quando analisados em um sistema de triagem de luciferase e não parecem ser tóxicos para as células MEF.	Urmann <i>et al.</i> , 2013
<i>Artobotrys spinosus</i>	Alcaloides aporfínicos	Raízes	<i>In vitro</i> . Ensaio de inibição de AChE e BChE <i>In silico</i> . Ancoragem molecular	Dois compostos 4 e 6 exibiram maior atividade contra AChE e BChE, respectivamente, como inibidores de modo misto, confirmados por análise de ancoragem molecular.	Sichaem <i>et al.</i> , 2018
<i>Asimina triloba</i>	9-O-Anolobina, glucopiranósideo, anolobina, norushinsunina, liriodenina, escamolona e coclaurina.	D- Galhos	<i>In vitro</i> . Ensaio de neurotoxicidade em neurônios corticais de ratos.	O extrato alcaloide não mostrou toxicidade para os neurônios, mas os alcaloides puros foram tóxicos para os neurônios de maneira dependente da concentração.	Majrashi, <i>et al.</i> , 2021.
<i>Asimina triloba</i>	Anonacina	Frutas	<i>In vitro</i> . Análise de toxicidade em neurônios corticais de ratos	A fruta contém alta concentração de anonacina, que é tóxica para os neurônios corticais. O extrato bruto da fruta também induziu neurotoxicidade.	Potts <i>et al.</i> , 2015
<i>Cananga odorata</i>	benzoato de metila 4-metilanisol e benzoato de benzila	Flores secas e frescas	<i>In vivo</i> . Testes com voluntários humanos 40	O óleo de ylang ylang causou diminuição da pressão arterial e aumento da temperatura da pele. Os akit; indivíduos avaliaram-se como mais calmos e relaxados, e esses efeitos podem causar alívio da depressão e do estresse em humanos.	Hongratananawor Buchbauer, 2006

<i>Dennettia tripetala</i>	Não identificado	Fruta fresca	<i>In vivo.</i> Teste de placa quente, contorções induzidas por ácido acético e teste de formalina em camundongos	O óleo essencial tem efeitos antinociceptivos, provavelmente devidos a mecanismos centrais e periféricos.	Oyemitan et al., 2008
<i>Dennettia tripetala</i>	Não identificado	Fruta fresca	<i>In vivo.</i> Indução do sono por fenobarbital, suspensão da cauda em camundongos	O óleo apresentou efeitos sedativos, hipotérmicos e relaxantes musculares.	Oyemitan et al., 2008
<i>Dennettia tripetala</i>	1-nitro-2-feniletano (BPNE)	Folhas e frutas	<i>In vivo.</i> Modelos experimentais de ansiedade e convulsão em ratos	O BPNE exibiu efeitos hipnóticos, anticonvulsivantes e ansiolíticos.	Oyemitan et al., 2013
<i>Dennettia tripetala</i>	1-nitro-2-feniletano, linalol, óxido de cariofileno, benzilnitrila e elemol	Sementes	<i>In vivo.</i> Testes com fêmeas Wistar	A administração oral repetida do óleo essencial a ratos resultou na redução das atividades de higiene e locomoção. As células gliais foram vistas esparsamente distribuídas dentro do neurópilo. Potencial tóxico foi identificado em tecidos hepáticos e renais.	Daniyan et al., 2021
<i>Dennettia tripetala</i>	BPNE; linalol; β-ocimeno, β-fenilnitroetano e humuleno	Frutas, sementes folhas	<i>In vitro.</i> Ensaio de inibição de AChE em placas.	Os óleos e o BPNE inibiram a atividade da AChE, mas o composto isolado foi menos ativo. O óleo essencial de sementes secas mostrou o melhor resultado na melhoria da memória. O BPNE também exibiu atividade de melhoria da memória.	Oyemitan et al., 2019
<i>Dennettia tripetala</i>	Não identificado	Frutas maduras e verdes	<i>In vitro.</i> Ensaio de inibição de AChE e BChE.	O óleo essencial de pimenta verde teve um efeito inibitório mais forte sobre a AChE do que o da pimenta madura, e não houve diferença significativa nas propriedades inibitórias da BChE.	Adedayo et al., 2020
<i>Dennettia tripetala</i>	1-nitro-2-feniletano; ácido cis-vacênico, linalol	Frutas	<i>In vitro.</i> Atividade de AChE no cérebro. A análise lipídica foi realizada com amostras congeladas de cérebro de camundongo.	O extrato da fruta pode ser potencialmente tóxico para o tecido cerebral dos mamíferos ao longo do tempo. A redução acentuada na atividade da AChE na dosagem elevada do extrato vegetal poderia potencialmente levar à manifestação de distúrbios neurodegenerativos. .	Oyeniyi et al., 2022
<i>Duguetia crisocarpa</i>	Ácido 3-metoxi-4-etoxybenzoico, alcaloides	Frutas	<i>In vivo.</i> Modelos químicos e térmicos de nocicepção em camundongos.	A administração intraperitoneal do extrato etanólico mostrou inibição das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, em ambas as fases do teste da formalina e aumento do tempo de reação no teste da placa quente.	Almeida et al., 2012

<i>Duguetia moricandiana</i>	Discretamina	Frutas	<i>In vivo.</i> Testes antinociceptivos e antiinflamatórios em camundongos	Discretamina reduziu o número de contorções em todas as doses testadas e o número de lambidas nas patas durante a primeira fase do teste de formalina.	Almeida <i>et al.</i> , 2010
<i>Fissistigma polyanthum</i>	Alcaloides Isoquinolina	Raízes	<i>In vitro.</i> Ensaio de inibição de AChE e BChE. <i>In silico.</i> Estudo de docking molecular com AChE.	O Composto 1 mostrou atividade de alvo duplo mais potente na inibição de AChE e na inibição da agregação de A $\beta$ , e dois compostos exibiram inibições de AChE e BChE.	Jiang <i>et al.</i> , 2023
<i>Huberantha Jenkinsii</i>	Alantoína, oxilopinina, N-trans-feruloil tiramina e mangiferina	Tronco	<i>In vitro.</i> Atividade contra neurotoxicidade induzida por 6-hidroxidopamina em células SH-SY5Y	A mangiferina foi o composto líder mais promissor avaliado para atividades neuroprotetoras.	San <i>et al.</i> , 2020
<i>Meiocarpidium lepidotum</i>	Triterpenos	Casca do caule	<i>In vivo.</i> Testes de nociceção e natação forçada em ratos	O extrato contendo triterpeno foi capaz de prevenir a nociceção e a depressão.	Bouchra <i>et al.</i> , 2013
<i>Monodora Myristica</i>	Não identificado	Frutas	<i>In vivo.</i> Tratamento em ratos.	<i>M. myristica</i> induziu um efeito protetor na neurotoxicidade mediada por chumbo e alumínio de maneira dose-dependente.	Lawyer; Orish, 2023
<i>Onychopetalum amazonicum</i>	Estelidina	Folhas	<i>In vitro.</i> Ensaio de inibição de AChE. <i>In silico.</i> Ancoragem molecular	A estelidina tem atividade de inibição da AChE <i>in vitro</i> e <i>in silico</i>	Lima <i>et al.</i> , 2019
<i>Polyalthia longifolia</i>	Triterpenoides, esteroides e saponinas; compostos fenólicos, taninos condensados	Folhas	<i>In vivo.</i> Teste de contorções induzidas por ácido acético em camundongos.	Todos os extratos de teste exibiram atividade analgésica significativa. O extrato metanólico foi considerado o mais potente, seguido pelos extratos de acetato de etila e benzeno, respectivamente.	Chatterjee <i>et al.</i> , 2014
<i>Polyalthia longifolia</i>	Não identificado	Casca	<i>In vivo.</i> Testes antinociceptivos em camundongos, tempo de sono induzido por fenobarbital	O extrato metanólico bruto exibiu atividade antinociceptiva periférica e central. Inibiu as contorções induzidas por produtos químicos, aumentou o tempo de latência do movimento da cauda e reduziu o tempo de sono induzido.	Islam <i>et al.</i> , 2014
<i>Polyalthia stenopetala</i>	Laurotetanina, reticulina, liriodenina, yangambina, siringaresinol.	Casca do caule	<i>In vitro.</i> Atividade anticolinesterásica.	Todos os compostos isolados inibem a atividade da AChE (40,2 a 80,6% de inibição). A liriodenina apresentou a maior atividade inibitória.	Salleh <i>et al.</i> , 2023
<i>Polyalthia sumatrana</i>	Boldina, norboldina, predicentrina, laurotetanina	Folhas	<i>In vitro.</i> Atividade anticolinesterásica.	Todos os alcaloides isolados foram capazes de inibir a atividade da AChE (45,0 a 80,6% de inibição).	Salleh <i>et al.</i> , 2022
<i>Polyalthia longifolia</i>	16-Hidroxiclerode-3,13-dien-15,16-olida (PL3)	Casca	<i>In vitro.</i> Cultura de células HAPI de microglia de camundongo,	O PL3 inibe a inflamação mediada pela microglia e a morte celular neuronal relacionada à inflamação.	Shih <i>et al.</i> , 2010

			cocultura com células de neuroblastoma humano SH-SY5Y e cultura de microglia primária		
<i>Polyalthia suberosa</i>	D-limoneno, $\alpha$ -copaeno, E- $\beta$ -cariofileno, 24-noroleano-3,12-dieno, $\beta$ -pineno e $\alpha$ -humuleno	Folhas	<i>In vitro</i> . Ensaio de inibição de AChE. <i>In silico</i> . Ancoragem molecular	O óleo testado inibiu a AChE (IC50: 91,94 $\mu$ g/mL). O acoplamento molecular <i>in-silico</i> revelou que o ácido palmítico, o fitol, o $\alpha$ -cimeno e o óxido de cariofileno demonstraram os maiores escores de ajuste nos sítios ativos da AChE humana.	Mahmoud <i>et al.</i> , 2024
<i>Popowia odoardi</i>	O-metildauricina e popisidina	Casca	<i>In vitro</i> . Ensaio de ligação ao receptor radioligante 5-HT1As	A O-metildauricina e a popisidina influenciam a atividade dos receptores 5-HT1A através de ligação competitiva como agonistas ou antagonistas e podem ter efeitos ansiolíticos e antidepressivos.	Chung <i>et al.</i> , 2009
<i>P. odoardoi Artabotrys roseus</i>	Não identificado	Casca, folha e caule	<i>In vitro</i> . Teste com receptor de serotonina (5HT1a)	Os extratos de metanol foram ativos no receptor 5HT1a.	Chung <i>et al.</i> , 2005
<i>Rollinia Mucosa</i>	Palmitona Lignanas Furafurânicas	Folhas	<i>In vivo</i> . Testes comportamentais com ratos	O extrato hexânico (rico em palmitona) produziu ações ansiolíticas em dois modelos animais de ansiedade.	Estrada-Reyes <i>et al.</i> , 2010
<i>Sphaerocoryne affinis</i>	Não identificado	Fruta	<i>In vivo</i> . Modelo knocked down por dUCH em <i>Drosophila melanogaster</i> .	O extrato aquoso pode melhorar o desempenho locomotor, deficiências e degeneração de neurônios dopamíngicos.	Nghi <i>et al.</i> , 2022
<i>Uvaria alba</i>	3-(3,4-dihidroxibenzoil)-3',4',6-grandifloracina, dichamanetina	Folhas	<i>In vitro</i> . Ensaio de inibição de AChE <i>In silico</i> . Ancoragem molecular (AChE)	O subextrato de diclorometano apresentou propriedades anticolinesterásicas <i>in vitro</i> . 3-(3,4-dihidroxibenzoil)-3',4',6-tri-hidroxi-2,4-dimetoxicalconina e grandifloracina demonstraram ligação favorável à AChE no teste <i>in silico</i> .	Quimque <i>et al.</i> , 2021
<i>Uvaria chamae</i>	Taninos, flobataninos, saponinas, flavonoides, fenois, terpenoides	Raízes	<i>In vivo</i> . Modelo de analgesia de rato	O extrato hidroetanólico produziu redução no número de contorções, mas não apresentou efeito significativo na dor induzida pela formalina.	Popoola <i>et al.</i> , 2016
<i>Xylopia aethiopica</i>	Ácido xilópico	Frutas	<i>In vivo</i> . Rota rod, convulsão induzida por PTZ e testes de sono induzidos por pentobarbital em camundongos.	O extrato e o ácido xilópico apresentaram efeitos depressores do sistema nervoso central na hipnose induzida por pentobarbital e no teste de atividade espontânea. O extrato aumentou o limiar convulsivo na convulsão induzida por PTZ.	Biney <i>et al.</i> , 2014
<i>Xylopia aethiopica</i>	Terpineno-4-ol, $\alpha$ -terpineol, ciclohexanometanol e $\beta$ -	Sementes	<i>In vitro</i> . Ensaio de inibição de AChE	O óleo essencial apresentou atividade anticolinesterásica.	Sulaimon <i>et al.</i> , 2020

	copaeno.				
<i>Xylopia aethiopica</i>	Ácido xilópico	Frutas	<i>In vivo</i> . A ansiedade foi avaliada em camundongos usando modelos de campo aberto (OFT), hipofagia induzida por novidade (NIH) e labirinto em cruz elevado (EPM) e em peixe-zebra usando novos modelos de tanque (NT) e escototaxia (ST).	O ácido xilópico reduziu a latência de alimentação em camundongos no teste de hiponeofagia e também reduziu a tigmotaxia no OFT, todos os camundongos passaram significativamente mais tempo nos braços abertos do LCE. O peixe-zebra exibiu redução no tempo gasto no fundo do novo tanque, atenuando o aumento na permanência no fundo induzido pela abstinência de álcool no peixe-zebra.	Biney <i>et al.</i> , 2016
<i>Xylopia aethiopica</i>	Não identificado	Frutos verdes	<i>In vivo</i> . FST (teste de nado forçado), teste de suspensão da cauda (TST) e campo aberto com ratos	A exposição aguda de camundongos ao extrato da fruta resultou em efeitos semelhantes aos antidepressivos, predominantemente através de interações com a neurotransmissão serotoninérgica.	Biney <i>et al.</i> , 2016
<i>Xylopia aethiopica</i>	Eugenol	Frutos	<i>in vitro</i> . Ensaios de inibição de AChE e BChE	O óleo essencial inibiu as atividades de AChE e BChE de maneira dependente da concentração.	Adefeghaa <i>et al.</i> , 2016
<i>Xylopia aethiopica</i>	Cumarinas	Caule	<i>In vivo</i> . Neurotoxicidade induzida em ratos expostos ao glifosato	<i>Xylopia aethiopica</i> e vitamina C, em conjunto, possuem propriedades para combater a neurotoxicidade do glifosato	Adewale <i>et al.</i> , 2023
<i>Xylopia laevigata</i>	$\lambda$ -muuroleno, $\delta$ -cadineno, biciclogermacreno e $\alpha$ -cpaeno	Folhas	<i>In vivo</i> . Teste de contorções induzidas por ácido acético em camundongos, Rotarod.	O óleo essencial produziu efeito antinociceptivo ao reduzir o comportamento nociceptivo.	Queiroz <i>et al.</i> , 2014
<i>Xilopia parviflora</i>	Não identificado	Frutas	<i>In vivo</i> . Testes com ratos	<i>X. parviflora</i> pode ser benéfica no combate à neurotoxicidade induzida pelo alumínio nos níveis bioquímico e comportamental.	Dibacto <i>et al.</i> , 2022

## REFERÊNCIAS

- ADEDAYO, B. C., ADEBAYO, A. A., OBOH, G. *in vitro* Antioxidant and Anti-Cholinesterase Properties of Essential Oils from Pepper Fruits (*Dennettia Tripetala* G. Baker). **Tropical Journal of Natural Product Research**. v. 4(9), p. 596-600, 2020.
- ADEFEGHAA, S. A. , OBOHAT, G., ODUBANJOA,O., OGUNSUYIA, B. A comparative study on the antioxidative activities, anticholinesterase properties and essential oil composition of Clove (*Syzygium aromaticum*) bud and Ethiopian pepper (*Xylopia aethiopica*). **La rivista itaLiana deLLe sostanze grasse**, v. 17, p. 257-268, 2015.
- ADEOYE, A. D., AMADIKE, K.A., ADEOYE, B. O., OYEBANJO, O. T., ADELAKIN , L. A. Effect of Ethanol Extract of *Annona muricata* on Lipopolysaccharide Induced Neuroinflammation in Wistar Rats. **Scholars International Journal of Anatomy and Physiology**, v. 6, p. 153-161, 2023.
- ADEWALE, O.O., ADEBISI, O. A., OJURONGBE, T. A., ADEKOMI, D. A., BABATUNDE, I. O., ADEBAYO, E. O. *Xylopia aethiopica* suppresses markers of oxidative stress, inflammation, and cell death in the brain of Wistar rats exposed to glyphosate. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 30, p. 60946-60957, 2023.
- ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N. H. Kinetics studies on effects of extraction techniques on bioactive compounds from *Vernonia cinerea* leaf. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, p. 580-588, 2019.
- ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N. H. Microwave-assisted extraction of phenolics from *Hibiscus sabdariffa* calyces: Kinetic modelling and process intensification. **Industrial Crops and Products**, v. 137, p. 528–535, 2019.
- ALARA, O. R., ABDURAHMAN, N. H., UKAEGBU, C. I. Extraction of phenolic compounds: A review. **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 200–214, 2021.
- ALLAN, S. M.; N. J. ROTHWELL. Cytokines and acute neurodegeneration. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, p. 734–744, 2001.
- ALMEIDA, J. R. G. DA S., ARAÚJO, E. C. DA C., RIBEIRO, L. A. DE A., DE LIMA, J. T., NUNES, X. P., CARNEIRO LÚCIO, A. S. S., BARBOSA FILHO, J. M. Antinociceptive Activity of Ethanol Extract from *Duguetia chrysocarpa* Maas (Annonaceae). **The Scientific World Journal**, 2012, p. 1–6, 2012.
- ALMEIDA, J. R. G. S., DE LIMA, J. T., DE OLIVEIRA, H. R., DE OLIVEIRA, M. R., MEIRA, P. R. M., LÚCIO, A. S. S. C., QUINTANS JÚNIOR, L. J. Antinociceptive activity of discretamine isolated from *Duguetia moricandiana*. **Natural Product Research**, v. 25(20), p. 1908–1915, 2011.
- AL OMAIRI, N. E., AL-BRAKATI, A. Y., KASSAB, R.B., LOKMAN, M. S., ELMAHALLAWY, E. K., AMIN, H. K., ABDEL MONEIM, A. E. Soursop fruit extract mitigates scopolamine-induced amnesia and oxidative stress via activating cholinergic and Nrf2/HO-1 pathways. **Metabolic Brain Disease**, v. 34, p. 853-864, 2019.
- ANDREWS, G., HOBBS, M. J., BORKOVEC, T. D., BEESDO, K., CRASKE, M. G., HEIMBERG, R. G., et al. Generalized Worry Disorder: a Review of DSM-IV Generalized Anxiety Disorder and Options for DSM-V. **Depress. Anxiety**, v. 27, p. 134–147, 2010.
- BARBOSA, M. F., JUSTINO, A. B., MARTINS, M. M., BELAZ,K. R. A., FERREIRA, F. B.; OLIVEIRA, R. J., DANUELLO, A., ESPINDOLA, F. S., MARCOS PIVATTO, M., 2022.Cholinesterase inhibitors assessment of aporphine alkaloids from *Annona crassiflora* and molecular docking studies, **Bioorganic Chemistry**, v. 120, 2022.

BARÓN-FLORES, V., MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, E. HERNÁNDEZ-LÓPEZ, D. ROMERO-PAREDES, M. , GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E., DÍAZ-RUIZ, A., RIOS, C. Efecto anticonvulsivo y antidepresivo del extracto etanólico de hojas de *Annona reticulata* en rata . **Archivos de neurociencias**, v. 23, 2023.

BHALKE, R. D.; . NIRMAL, S. A., GIRME, A. S., S.C. PAL, S. C., MANDAL,S. C. Bhalke et al. CNS depressant activity of *Annona reticulata* bark. **Pharmacology online**, v. 1, p. 52-55, 2009.

BHALKE1, R. D., CHAVAN, M. J. Analgesic and CNS depressant activities of extracts of *Annona reticulata* Linn. Bark . **Phytopharmacology**, v. 1, p. 160-165, 2011.

BEGHI, E. The Epidemiology of Epilepsy. **Neuroepidemiology**, p. 1–7, 2019 .

BEZERRA, F.W.F.; DE OLIVEIRA, M.S.; BEZERRA, P.N.; CUNHA, V.M.B.; SILVA, M.P.; DA COSTA, W.A.; PINTO, R.H.H.; CORDEIRO, R.M.; DA CRUZ, J.N.; CHAVES NETO, A.M.J.; et al. Extraction of bioactive compounds. In Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, p. 149–167, 2020.

BINEY, R. P.,MANTEL,P. K., BOAKYE-GYASI, E., KENNEDY E. KUKUIA, K. E., ERIC WOODEL, E. Neuropharmacological effects of an ethanolic fruit extract of *Xylopia aethiopica* and xylopic acid, a kaurene diterpene isolate, in mice.**West African Journal of Pharmacy**, v. 25, p.106-117, 2014.

BINEY, R. P.; BENNEH, C. K.; AMEYAW, E. O.; BOAKYE-GYASI, E.; WOODE, E., 2016. *Xylopia aethiopica* fruit extract exhibits antidepressant-like effect via interaction with serotonergic neurotransmission in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 184, p. 49-57, 2016.

BINEY, R. P., BENNEH, C. K., KYEKYEKU, J. O., AMEYAW, E. O., BOAKYE-GYASI, E., ERIC WOODE, E., 2018. Attenuation of Anxiety Behaviours by Xylopic Acid in Mice and Zebrafish Models of Anxiety Disorder. **Pharmaceutical and Biosciences Journal**, v. 6, p. 07-16, 2018.

BIRKS, J. S. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, p. 1-69,2006

BONNEAU, N., SCHMITZ-AFONSO, I., BRUNELLE, A., TOUBOUL, D., CHAMPY, P. Quantification of the environmental neurotoxin annonacin in Rat brain by UPLC-MS/MS. **Toxicon**, v. 118, p. 129–133, 2016.

BORTOLATO, M.; CHEN, K.; SHIH, J. C. Monoamine oxidase inactivation: from pathophysiology to therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 1527-33, 2008.

BOUCHRA, M., MAMADOU, G., TIENDREBEOGO1, R., LIMAS-NZOUZI, N-L.,MIANTEZILA, J., CHERRAH, Y., FAOUZI1, M. A., BRUNO ETO, E. Analgesic, anti-inflammatory and antidepressant activities of triterpene from *Meiocarpidium lepidotum* (Annonaceae) bark. **International Journal of Phytopharmacology**, v. 4, p. 133-140, 2013.

BUSTOS, A. V. G; JIMÉNEZ, M. G.; MORA, R. M. S. The *Annona muricata* leaf ethanol extract affects mobility and reproduction in mutant strain NB327 Caenorhabditis elegans. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 282-286, 2017.

CANO-EUROPA, E., GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E., REYES-RAMÍREZ, A., HERNÁNDEZ-GARCÍA, A., BLAS-VALDIVIA, V., ORTIZ-BUTRÓN, R. Palmitone prevents pentylenetetrazole-caused neuronal damage in the CA3 hippocampal region of prepubertal rats. **Neuroscience Letters** , v. 470(2), p. 111–114, 2010.

CAPARROS-LEFEBVRE, D.; ELBAZ, A. Possible relation of atypical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: a case-control study. **Lancet**, v. 54, p. 281–286, 1999.

CARBALLO, A. I.; MARTÍNEZ, A. L.; GONZÁLEZ-TRUJANO,M. E.; PELLICER, F.; ROSA VENTURA-MARTÍNEZ,R.; DÍAZ-REVAL, M. I.;LÓPEZ-MUÑOZ, F. J. Antinociceptive activity of *Annona diversifolia* Saff. leaf extracts and palmitone as a bioactive compound. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 95, p. 6-12, 2010.

CAVÉ, A.; FIGADÈRE, B.; LAURENS, A.; CORTES, D. Acetogenins From Annonaceae. In: Herz, W.; Kirby, G. W.; Moore, R. E.; W Steglich, W. ; Tamm, C.. **Progress in the chemistry of organic natural products**. Vienne, New York: Springer, p.81–288, 1997.

CHAMPY, P.; HÖGLINGER, G.U.; FÉGER, J.; GLEYE, C.; HOCQUEMILLER, R.; LAURENS, A.; GUÉRINEAU, V.; LAPRÉVOTE, O; MEDJA, F.; LOMBÈS, A.; MICHEL, P. P.; ANNIE LANNUZEL, A.; HIRSCH, E. C.; RUBERG, M.. Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. **Neurochemistry** v. 88, p. 63–69, 2004.

CHAMPY, P., MELOT, A., GUÉRINEAU ENG, V., GLEYE, C., FALL, D., HÖGLINGER, G. U., HOCQUEMILLER, R. Quantification of acetogenins in *Annona muricata* linked to atypical parkinsonism in guadeloupe. **Movement Disorders**, v. 20, p. 1629–1633, 2005.

CHATTERJEE, S., BHATTACHARYA, S., PANDEY, J. N, BISWAS, M.. Analgesic activity of Polyalthia longifolia leaf extracts in mice. **Journal of Advanced Pharmacy Education and Research**, v. 4, p. 308-310, 2014

CHEN, K-L. LING GAN, L.; ZHEN-HUA WU, Z-H.; JIN-FANG QIN, J. F.; LIAO,W-X; TANG, H. 4-Substituted sampaagine derivatives: Novel acetylcholinesterase and  $\beta$ -myloid aggregation inhibitors, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 2725-2729, 2018.

CHIPITI, T.; VILJOEN, A. M.; CORDERO-MALDONADO, M. L. ;CLINTON G.L. VEALE, C.;FANIE R. VAN HEERDEN;MAXLEENE SANDASI;WEIYANG CHEN;ALEXANDER D. CRAWFORD;GILL M. ENSLIN. Anti-seizure activity of African medicinal plants: The identification of bioactive alkaloids from the stem bark of *Rauvolfia caffra* using an *In vivo* zebrafish model . **Journal of Ethnopharmacology**, v. 279, p. 1-13, 2021.

CHUNG, L. Y., GOH, S. H., IMIYABIR, Z. Central Nervous System Receptor Activities of Some Malaysian Plant Species. **Pharmaceutical Biology**, v. 43, p. 280-288, 2005.

CHUNG, L. Y., SOO, W. K., MUSTAFA, M. R., GOH, S. H., & IMIYABIR, Z. 5 Hydroxytryptamine 1A receptor binding activity of bisbenzyltetrahydroisoquinoline alkaloids from *Popowia odoardi*. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, 1130–1136, 2009.

CORIA-TÉLLEZ, A.V.; MONTALVO-GÓNZALEZ, E.; YAHIA, E.M.; OBLEDO-VÁZQUEZ, E.N. *A. muricata*: A Comprehensive Review on Its Traditional Medicinal Uses, Phytochemicals, Pharmacological Activities, Mechanisms of Action and Toxicity. **Arabian Journal of Chemistry** , v. 11, p. 662–691, 2018.

DANIYAN, M. O.; ADEYIPO, T. F.; OYEMITAN, I. A.; OKWUESE, P. B.; EKUNDINA, V. O.; AKANMU, M. A. *In vivo* and *In silico* studies of *Dennettia tripetala* essential oil reveal the potential harmful effects of habitual consumption of the plant seed. **Toxicology Reports**, v. 8, p. 1488-1497, 2021.

DIBACTO, R. E. K.; AMBAMBA, B. D.A.; ELLA, F. A.; CHRISTINE FERNANDE BIYEGUE NYANGONO ,C. F. B.; NANHAH, J. V. K.; FONKOUA, M.; MINKA, R. S.; NGONDI, J. L. The neuroprotective effect of *Xylopia parviflora* against aluminum chloride-induced neurotoxicity in rats. **Heliyon**, v. 8 , p. 1-10, 2022.

DI MAIO, G.; VILLANO, I.; ILARDI, C.R.; MESSINA, A.; MONDA, V.; IODICE, A.C.; PORRO, C.; PANARO, M.A.; CHIEFFI, S.; MESSINA, G.; et al. Mechanisms of Transmission and Processing of Pain: A Narrative Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 20, p. 3064, 2023.

DINIZ, T. C.; DE OLIVEIRA JÚNIOR, R. G.; MEDEIROS, M. A. M. B.; SILVA, M. G.; TELES, R. B. A.; MENEZES, P. P.; DE SOUSA, B. M. H.; FRANK, L. A.; ARAÚJO, A. A. S.; SERAFINI, M. R.; GUTERRES, S. S.; NUNES, C. E. P.; SALVADOR, M. J.; ALMEIDA, J. R. G.S., 2019 Anticonvulsant, sedative, anxiolytic and antidepressant activities of the essential oil of *Annona vepretorum* in mice: Involvement of GABAergic and serotonergic systems. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 1074-1087, 2019.

DINIZ, T. C., ARAÚJO, C. S., SILVA, J. C., OLIVEIRA JÚNIOR, R. G., LIMA-SARAIVA, R. G., QUINTANS JÚNIOR, L. J., NUNES, X. P., ALMEIDA, J. R.G. S. Phytochemical screening and central nervous system effects of ethanolic extract of *Annona vepretorum* (Annonaceae) in mice. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, p. 2729-2735, 2013.

DOBREK, L.; GŁOWACKA, K.. Depression and Its Phytopharmacotherapy—A Narrative Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, p. 4772, 2023.

DONGMO NGUEPI, M., FOKUNANG, C., BOYOM, F. F., TAZOACHA, A. Anticonvulsant activity of extracts from six Cameroonian plants traditionally used to treat epilepsy. **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, v. 8(6), p. 2407, 2015.

DUGGER, B. N.; DICKSON, D. W. Pathology of Neurodegenerative Diseases. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 9, p.1-22, 2017.

ERKENS, R. H. J.; BLANPAIN, L. M. P.; CARRASCOSA J. I.; RUNGE, K.; VERSPAGEN, N.; COSIAUX, A.; COUVREUR, T. L. P. Spatial distribution of Annonaceae across biomes and anthromes: Knowledge gaps in spatial and ecological data. **Plants, People, Planet**, v. 5, p. 520–535, 2023

ESCOBAR-KHONDIKER, M., HÖLLERHAGE, M., MURIEL, M. P., CHAMPY, P., BACH, A., DEPIENNE, C., RESPONDEK, G., YAMADA, E. S., LANNUZEL, A., YAGI, T., HIRSCH, E. C., OERTEL, W. H., JACOB, R., MICHEL, P. P., RUBERG, M., HÖGLINGER, G. U. Annonacin, a natural mitochondrial complex I inhibitor, causes tau pathology in cultured neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 27(29), p. 7827-37, 2007.

ESTRADA-REYES, R.; LÓPEZ-RUBALCAVA, C.; ROCHA, L.; HEINZE, G.; GONZÁLEZ E., ALMA R.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M. Anxiolytic-like and sedative actions of *Rollinia mucosa*: Possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, p. 70–75, 2010.

FEIGIN, V. L; VOS, T.; NICHOLS, E.; OWOLABI, M. O.; CARROLL, W. M.; DICHGANS, M.; DEUSCHL, G.; PARMAR, P.; BRAININ, M.; MURRAY, C. The global burden of neurological disorders: translating evidence into policy. **The Lancet Neurology**, v. 19, p. 255-265, 2019.

FINBERG, J. P. M.; RABEY, J. M. Inhibitors of MAO-A and MAO-B in Psychiatry and Neurology. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, p. 1-15, 2016.

FRIEDRICH, M. J. Depression Is the Leading Cause of Disability Around the World. **JAMA**, v. 18, p. 1517, 2017.

FISHER, R. S.; VAN EMDE B. W., BLUME, W., ELGER, C.; GENTON, P.; LEE, P.; ENGEL, J. Jr. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, p. 470-2, 2005.

GBD 2019. Disease and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **Lancet**, v. 396, p. 1204–22, 2020.

- GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E., LÓPEZ-MERAZ, L., REYES-RAMÍREZ, A., AGUILÓN, M., & MARTÍNEZ, A.. Effect of repeated administration of *Annona diversifolia* Saff. (ilama) extracts and palmitone on rat amygdala kindling. **Epilepsy & Behavior**, v. 16(4), p. 590–595, 2009.
- GOPAL, J., LEE, Y.-M., SHIN, J., MUTHU, M., JUNG, S., JEONG, S., OH, J.-W. The graviola impact on human astrogloma cells: functional significance of MUDENG. **RSC Advances**, v. 9, p. 8935–8942, 2019.
- GROSSO, C.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, C.; ANDRADE, P. B. HPLC–DAD analysis and *in vitro* enzyme inhibition: An integrated approach to predict herbal binary mixture behaviour employing median effect equation. **Microchemical Journal**, v. 119, p. 176–182, 2015.
- GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E., NAVARRETE, A., REYES, B., CEDILLO-PORTUGAL, E., HONG, E. Anticonvulsant properties and bio-guided isolation of palmitone from leaves of *Annona diversifolia*. **Planta Medica**, v. 67(2), p. 136–41, 2001.
- GOZALO-MARCILL, M.; GASTHUYSEN, F.; SCHAUVLIEGE, S. Partial intravenous anaesthesia in the horse: a review of intravenous agents used to supplement equine inhalation anaesthesia. Part 1: lidocaine and ketamine. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 41, p. 335–45, 2014.
- GUILLOPÉ, R; M. ESCOBAR-KHONDIKER; V. GUÉRINEAU; O. LAPRÉVOTE; G. U. HÖGLINGER; P. CHAMPY. Kaurenoic Acid from Pulp of *Annona cherimolia* in regard to Annonaceae-induced Parkinsonism., **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 1861–1864, 2001.
- HAGENOW, J.; HAGENOW, S.; GRAU, K. ; KHANFAR, M.; HEFKE, L.; PROSCHAK, E.; STARK, H. Reversible Small Molecule Inhibitors of MAO A and MAO B with Anilide Motifs. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 14, p. 371–393, 2001.
- HALLISON, DO N. S., SUZANA, V. R., TAMARA, C. D., FERNANDA, G. DA S. O., ROXANA, B. DE A. T., JULIANE, C. S., JACKSON, R. G. DA S. A. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of ethanolic extract from atemoya (*Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L.). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology** v. 11, p. 224–232, 2017.
- HAMID, A. A.; AIYELAAGBE, O.; USMAN, L. A. Essential oils: Its medicinal and pharmacological uses. **International Journal of Current Research**, v. 3, p. 86–98, 2011.
- HAMID, R. A., FOONG, C. P., AHMAD, Z., & HUSSAIN, M. K. Antinociceptive and anti-ulcerogenic activities of the ethanolic extract of *Annona muricata* leaf. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 630–641, 2012.
- HANDAYANI, E. S., NUGRAHA, Z. S., & PAHLEVAWATI, P. R. Soursop leaf extract increases neuroglia and hepatic degeneration in female rats. **Universa Medicina**, v. 34(1), p. 17–24, 2015.
- HASRAT, J. A., BRUYNE, T., BACKER,J.-P., VAUQUELIN, G.,A. J VLIETINCK, A. J. Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5-HTergic 5-HT1A receptor agonists in rats: unexploited Antidepressive (Lead) Products. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 49, p. 1145-1 149, 1997.
- HOLLERHAGE, M.; ROSLER, T. W.; BERJAS, M.; LUO, R.; TRAN, K.; RICHARDS, K. M.; SABAA-SRUR, A. U.; MAIA, J. G. S.; MORAES, M. R. D.; GODOY, H. T.; HOGLINGER, G. U.; SMITH, R. E. Neurotoxicity of Dietary Supplements from Annonaceae Species. **International Journal of Toxicology**, v. 34, p. 543–550, 2015.
- HÖLLERHAGE, M.; MATUSCH, A.; CHAMPY, P.; LOMBÈS, A. ; RUBERG, M.; OERTEL, W. H.; HÖGLINGER, G. U. Natural lipophilic inhibitors of mitochondrial complex I are candidate toxins for sporadic neurodegenerative tau pathologies. **Experimental Neurology**, v. 220, p. 133–142.

HONGRATANAWORAKIT, T., BUCHBAUER, G. Relaxing effect of ylang ylang oil on humans after transdermal absorption. **Phytotherapy Research**, v; 20, p. 758–763, 2006.

ISLAM; N. U.; AMIN, R.; SHAHID, M.; AMIN, M.. Gummy gold and silvernanoparticles of apricot (*Prunus armeniaca*) confer high stability and biological activity. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12 , p. 3977–3992, 2019.

ISLAM, R., SIKDER, A. A., KHAN, R. A., AHMED, M., RASHID, M. A. Membrane stabilizing, thrombolytic, analgesic, anti-diarrheal and CNS activities of *Polyalthia longifolia* (Sonn.) **South Asian Journal of Experimental Biology**, v. 4, p. 104-109, 2019.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203–10, 2001.

JUSTINO,A. B.;BARBOSA, M. F; NEVES, T. V.; SILVA, H. C. G.; BRUM, E. S.; FIALHO,M. F. P.; COUTO, A. C.; SARAIVA, A. L.; AVILA, V. M. R.; OLIVEIRA, S. M.; PIVATTO, M.; ESPINDOLA, F. S.; SILVA, C. S. Stephalagine, an aporphine alkaloid from *Annona crassiflora* fruit peel, induces antinociceptive effects by TRPA1 and TRPV1 channels modulation in mice. **Bioorganic Chemistry**, v. 96, 2020.

KESKIN, E., ELMAS, O., KESER, S. H. H, TONGE, C., GUNAYDIN, E. The neuroprotective and anti-inflammatory effects of *Annona muricata* (Graviola) on radiation-induced rat sciatic nerve injury. **Marmara Medical Journal**, v. 35, p. 211-218, 2022.

KISANI, A. I., SAGANUWAN, S. A. Investigation of anaesthetic potentials of various extracts of *Annona muricata* (sour sop) in Wister albino rat and dog. **Journal of King Saud University - Science**, v. 34, 2022.

KIM, W. S., KIM, Y.-E., CHO, E.-J., BYUN, E.-B., PARK, W. Y., SONG, H.-Y.,BYUN, E.-H. Neuroprotective effect of *Annona muricata*-derived polysaccharides in neuronal HT22 cell damage induced by hydrogen peroxide. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** v. 84, p. 1–12, 2020.

LANNUZEL, P.P M., HÖGLINGER,G.U.; CHAMPY, P.; JOUSSET, A.; MEDJA, F.; LOMBÈS, A.; DARIOS, F.; GLEYE, C.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R.; HIRSCH, E. C.; RUBERG, M. The mitochondrial complex i inhibitor annonacin is toxic to mesencephalic dopaminergic neurons by impairment of energy metabolism. **Neuroscience** v. 121, p. 287-296, 2003.

LANNUZEL, A., HÖGLINGER, G. U., CHAMPY, P., MICHEL, P. P., HIRSCH, E. C., & RUBERG, M. Is atypical parkinsonism in the Caribbean caused by the consumption of Annonaceae? **Parkinson's Disease and Related Disorder**, v. 70, p. 153–157, 2006.

LANNUZEL, A., MICHEL, P. P., CAPARROS-LEFEBVRE, D., ABAUL, J., HOCQUEMILLER, R., RUBERG M. Toxicity of Annonaceae for dopaminergic neurons: potential role in atypical parkinsonism in Guadeloupe. **Movement Disorders**, v. 17, p. 84-90, 2002.

LARS W. CHATROU, L. W.; ROY H. J. ERKENS, R. H. J.; JAMES E. RICHARDSON,J. E.; RICHARD M. K. SAUNDERS, R. K.; MICHAEL F. FAY, M. F. The natural history of Annonaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.169, p. 1–4, 2012.

LAWYER, T., ORISH, C. N. Neuroprotective Effect of Monodora Myristica on the Lead and Aluminium Induced Injury of the Cerebral Cortex, Cerebellum, and Hippocampus of Male Wistar Rats. **Depress Anxiety Open**, v. 2, p. 1005, 2023.

LEITE, D.O.D.; CAMILO, C.J.; NONATO, C.D.F.A.; CARVALHO, N.K.G.D.; SALAZAR, G.J.T.; DE MORAIS, S.M.; COSTA, J.G.M.D. Chemical Profile and Evaluation of the Antioxidant and Anti-Acetylcholinesterase Activities of *Annona squamosa* L. (Annonaceae) Extracts. **Foods**, v. 10, 2021.

LEONTI, M.; SAHPAZ, S.; KARIOTI, A., JANTAN, I., WAHAB, A.S., MARIAM, A. W. S.; AREEFUL, H. M.; ARSHAD L. Exploring the Leaves of *A. muricata* L. as a Source of Potential Anti-Inflammatory and Anticancer Agents. **Frontiers in Pharmacology**, v. 1, p. 661, 2018.

LIMA, B. R., LIMA, J. M., MACIEL, J. B., VALENTIM, C. Q., NUNOMURA, R. DE C. S., LIMA, E. S., DA SILVA, F. M. A. Synthesis and Inhibition Evaluation of New Benzyltetrahydroprotoberberine Alkaloids Designed as Acetylcholinesterase Inhibitors. **Frontiers in Chemistry**, v. 7., 2019

LÓPEZ-RUBALCAVA, C.; PIÑA-MEDINA, B.; ESTRADA-REYES, R.; HEINZE, G.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M. Anxiolytic-like actions of the hexane extract from leaves of *Annona cherimolia* in two anxiety paradigms: possible involvement of the GABA/benzodiazepine receptor complex. **Life Sciences**, v. 78(7), p. 730-7, 2006.

MAHMOUD, O.A., AYOUB, I.M., ELDAHSAN, O.A. et al. The impact of seasonal variation on the composition of the volatile oil of *Polyalthia suberosa* (Roxb.) Thwaites leaves and evaluation of its acetylcholinesterase inhibitory activity. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 24, p. 159, 2024.

MAJRASHI, T. A., ASHPOLE, N. M., KHAN, S. I., SANDERS, M., FANTOUKH, O. I., & KHAN, I. A. *In vitro* cytotoxicity and neurotoxicity assessment of the alkaloidal constituents derived from *Asimina triloba* twigs. **South African Journal of Botany**, v. 140, p. 204–209, 2021.

MALI, K. K., GAIKWAD, S. C., DIAS, R. J., HAVALDAR, V. D. , REDASANI, V. K. Antiepileptic activity of *Annona reticulata* linn on pentylenetetrazol induced seizures in albino mice. **Pharmaceutical Resonance**, v. 4, p. 21-27, 2022.

MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M., ESTRADA-REYES, R., ARAUJO ESCALONA, A. G., LEDESMA VELÁZQUEZ, I., MARTÍNEZ-MOTA, L., MORENO, J., HEINZE, G. Antidepressant-like effects of an alkaloid extract of the aerial parts of *Annona cherimolia* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139(1), p. 164–170, 2012.

MEGWAS, A. U., AKUODOR, G. C., CHUKWU, L. C., AJA, D. O., OKORIE, E. M., OGBUAGU, E. C., EKE, D. O., & CHUKWUMOBI, A. N. Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of ethanol extract of *Annona senegalensis* leaves in experimental animal models. **International Journal of Basic & Clinical Pharmacology**, v. 9, p. 1477–1484, 2020.

MUHAMMAD, N. H. Chemical composition, antioxidant, and anticholine esterase activities of essential oil of *xylopia aethiopica* seeds. **Pharmacognosy Research**, v. 12, p. 112-8.

MEHTA, A.; PRABHAKAR, M.; KUMAR, P.; DESHMUKH, R.; SHARMA, P. L. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. **European Journal of Pharmacology**, v. 698, p. 6–18, 2013.

MONICA, D., HANDAYANI, E. S. The subchronic effect of water extract leaves of soursop (*Annona muricata* L.) bax expression of neuron rat hippocampus gyrus dentatus (*Rattus norvegicus*). **Journal of Social Science**, v. 3, p. 59–64, 2023.

MONTEIRO, A. B.; RODRIGUES,C. K. S.; NASCIMENTO, E. P.; SALES, V. S.; DELMONDES, G. A.; COSTA, M. H. N.; DE OLIVEIRA, V. A. P.; MORAIS,L. P.;BOLIGON, A. A.; BARBOSA, R.;S DA COSTA, J. G. M.; DE MENEZES, I. R. A.; FELIPE, C. F. B.; KERNTOPF, M. R. Anxiolytic and antidepressant-like effects of *Annona coriacea* (Mart.) and caffeic acid in mice, **Food and Chemical Toxicology**, v. 136, 2020.

MCCALL, J. G., SIUDA, E. R., BHATTI, D. L., LAWSON, L. A., MCELLIGOTT, Z. A., STUBER, G. D. Locus Coeruleus to Basolateral Amygdala Noradrenergic Projections Promote Anxiety-like Behavior. **Elife**, v. 6, 2017.

- NARKHEDE, K., KULKARNI, A. R. Neuroprotective effect of acetogenin on experimentally induced cerebral ischemic rats. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 4, p. 1757-1769, 2015.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629-661, 2016.
- NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, p. 770-803, 2020.
- NGHI, N. B. T; UYEN,T. T.; ANH, H. M.; LINH, D. M.; THAO, D. T. P., 2022. Rumdul (*Sphaerocoryne affinis*) Antioxidant Activity and Its Potential for Parkinson's Disease Treatment. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 1, 2022.
- OBIOMA, N. E. , CHINEDU, A. F. The effect of ethanolic extract of *Annona muricata* leaf on the basal ganglia. **GSC Biological and Pharmaceutical Sciences**, v. 06, p. 040–044, 2019.
- OKOLI, C. O., ONYETO, C. A., AKPA, B. P., EZIKE, A. C., AKAH, P. A., & OKOYE, T. C. Neuropharmacological evaluation of *Annona senegalensis* leaves. **African Journal of Biotechnology** , v. 9, p. 8435-8444, 2010.
- OKOYE, T. C.; AKAH, P. A.; OMEJE, E. O.; OKOYE, F. B. C.; NWORU, C. S. Anticonvulsant effect of kaurenoic acid isolated from the root bark of *Annona senegalensis*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 109, p. 38-43, 2013.
- OVIEDO, V.; GARCÍA, M.; DÍAZ, C.; MAR DER, M.; COSTA, M.; RINCÓN, J.; SÁNCHEZ, C.; GUERRERO, M. Extracto y fracción alcaloidal de *Annona muricata* con actividad de tipo ansiolítica en ratones. **Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas**, v. 38, p. 105–20, 2009.
- OTIMENYIN, S.O., OMERI, F. N. Hypnotic effect of methanolic extracts of *Annona senegalensis* bark and *Ficus thonningii* leaves in mice and chicks. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Human** , v. 1, p. 1-12, 2014.
- OYEMITAN, I. A., IWALEWA, E. O., AKANMU, M. A., OLUGBADE , T. A. Antinociceptive and antiinflammatory effects of essential oil of *Dennettia tripetala* g.baker (Annonaceae) in rodents. **African Journal Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 5, p. 355 - 362, 2008.
- OYEMITAN, I. A., IWALEWA,E. O., AKANMU, M. A., T.A. OLUGBADE, T. A. Sedative, hypothermic amd muscle relaxant effects of the essential oils of *Dennettia tripetala* G. Baker (Annonaceae) and its mechanisms in mice. **Ife Journal of Science**, v. 10, p. 1-9, 2008.
- OYEMITAN, I. A.; ELUSIYAN, C. A.; AKANMU, M. A.; OLUGBADE, T. A. Hypnotic, anticonvulsant and anxiolytic effects of 1-nitro-2-phenylethane isolated from the essential oil of *Dennettia tripetala* in mice. **Phytomedicine**, v. 15, p. 1315-22, 2013.
- OYEMITAN, I. A.; ELUSIYAN, C. A.; AKINKUNMI, E. O.; OBUOTOR, E. M.; AKANMU,M. A.; OLUGBADE, T. A. Memory enhancing, anticholinesterase and antimicrobial activities of  $\beta$ -phenylnitroethane and essential oil of *Dennettia tripetala* Baker f. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 229, p. 256-261, 2019.
- OYENIYI, E. A., SORGI, C. A., GARDINASSI, L. G., AZEVEDO, L. F., ADEYEMI, J. A., OMOTOSO, O. T., FACCIOLI, L. H., ANTUNES, L. M. G., BARBOSA, F. Phospholipids modifications, genotoxic and anticholinesterase effects of pepper fruit (*Dennettia tripetala* G. Baker) extract in Swiss mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 165, 2022.
- PANEK, D.; WIĘCKOWSKA, A.; PASIEKA, A.; GODYŃ, J.; JOŃCZYK, J.; BAJDA, M.; KNEZ, D.; GOBEC, S.; MALAWSKA, B. Design, synthesis, and biological evaluation of 2-(benzylamino-2-

hydroxyalkyl)isoindoline-1,3-diones derivatives as potential disease-modifying multifunctional anti-Alzheimer agents. **Molecules**, v. 23, p. 347–362, 2018.

PAVEL, M. A.; PETERSEN, E. N.; WANG, H.; LERNER, R. A.; HANSEN, S. B. Studies on the mechanism of general anesthesia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, p. 13757-13766, 2020.

PATEL,M.; GOYAL, L.; RAJ,K.; SINGH, S. Chapter 62 - Neuroprotective role of garlic constituents against neurological disorders. **Natural Molecules in Neuroprotection and Neurotoxicity**, Academic Press, p. 1507-1523, 2024.

PENNER, I.-K.; PAUL, F. Fatigue as a Symptom or Comorbidity of Neurological Diseases. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, p. 662–675, 2017.

PINTO, T. N., SILVA JÚNIOR, W. F. DA, BORGES, L. L. *In silico* investigation of Annona coriacea species candidates with effect on the central nervous system. **Revista Brasileira Militar De Ciências**, v. 9, p.1-11, 2023.

PINEDA-RAMÍREZ, N., CALZADA, F., ALQUISIRAS-BURGOS, I., MEDINA-CAMPOS, O. N., PEDRAZA-CHAVERRI, J., ORTIZ-PLATA, A., AGUILERA, P. Antioxidant Properties and Protective Effects of Some Species of the Annonaceae, Lamiaceae, and Geraniaceae Families against Neuronal Damage Induced by Excitotoxicity and Cerebral Ischemia. **Antioxidants**, v. 9, 253, 2020.

POPOOLA, T. D.; OLUFUNSHO, A.; OMISANYA, A.; OBI, N.; UMEZINWA, C.; FATOKUN, A. A. Three indigenous plants used in anti-cancer remedies, *Garcinia kola* Heckel (stem bark), *Uvaria chamae* P. Beauv. (root) and *Olax subscorpioidea* Oliv. (root) show analgesic and anti-inflammatory activities in animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, v.194 , p.440-449, 2016.

PORWAL, M.,KUMAR, A. Neuroprotective effect of *Annona squamosa* & (-) Anonaine in decreased GABA receptor of epileptic rats. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, p. 018-023, 2015.

PORWAL, M., SHARMA, K., SHARMA, P.K. Estimation and evaluation of brain biogenic amines for anticonvulsant activity of *Annona squamosa* linn. leaves in mice. **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development**, v. 1, p. 92-95, 2013 .

POTTS, L. F., LUZZIO, F. A., SMITH, S. C., HETMAN, M., CHAMPY, P., & LITVAN, I. Annonacin in *Asimina triloba* fruit: Implication for neurotoxicity. **NeuroToxicology**, v. 33(1), p. 53–58, 2012.

QUEIROZ, J. C. C., ANTONIOLLI, Â. R., QUINTANS-JÚNIOR, L. J., BRITO, R. G., BARRETO, R. S. S., COSTA, E. V., QUINTANS, J. S. S. Evaluation of the Anti-Inflammatory and Antinociceptive Effects of the Essential Oil from Leaves of *Xylopia laevigata* in Experimental Models. **The Scientific World Journal** , v. 2014, p. 1–11, 2014.

RAWA, M. S. A.; ZURINA, H.; VIKNESWARAN, M.; TOSHIHIKO, N.; WAHAB, A. H. Anti-cholinesterase potential of diverse botanical families from Malaysia: Evaluation of crude extracts and fractions from liquid-liquid extraction and acid-base fractionation. **Journal of Ethnopharmacology** v. 245, p. 1-17, 2019.

RINALDI, M.V. N.; DÍAZ,I. E. C.; SUFFREDINI, I. B.; MORENO, P. R. H. Alkaloids and biological activity of beribá (*Annona hypoglaucia*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 77-83, 2017.

RIESER, M. J., HUI, Y. H., RUPPRECHT, J. K., et al. Determination of absolute configuration of stereogenic carbinol centers in Annonaceous acetogenins by <sup>1</sup>H and <sup>19</sup>F-NMR analysis of Mosher ester derivatives. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, p. 10203–10213, 1992.

ROTTSCHELL, R.; HAEGELE, M.; JAISCH, B.; XU, H.; RESPONDEK, G.; HÖLLERHAGE, M.; RÖSLER, T. W.; BONY, E.; LE VEN, J.; GUÉRINEAU, V.; SCHMITZ-AFONSO, I.; CHAMPY, P.; OERTEL, W. H.; YAMADA, E. S.; HÖGLINGER, G. U. Chronic consumption of *Annona muricata* juice

triggers and aggravates cerebral tau phosphorylation in wild-type and MAPTtransgenic mice. **Journal of Neurochemistry**, v.139, p. 624–639, 2016.

SALLEH, W. M. N. H. W., SHAKRI, N., NAFIAH, M., KHAMIS, S. Chemical constituents and acetylcholinesterase activity from *Polyalthia sumatrana* (Miq.) Kurz. **Latin American Applied Research**, v. 52, 2022.

SALLEH, W. M. N. H. W., SHAKRI, N., NAFIAH, M., GHANI, N., ABED, S., ABDEL-AAL, A. Secondary metabolites from the stem bark of *Polyalthia stenopetala* (Hook. F. & Thomson) Ridl. and their acetylcholinesterase activity. **Bulletin of Pharmaceutical Sciences Assiut University**, v. 46, p. 217-223, 2023.

SAN, H. T., CHAOWASKU, T., MEKBOONSONGLARP, W., RODSIRI, R., SRITULARAK, B., BURAPHAKA, H., LIKHITWITAYAWUID, K. Constituents of Huberantha jenkinsii and Their Biological Activities. **Molecules**, v. 25, p. 3533,2020.

SANAIE, N.; HAYNES, C. A. A multiple chemical equilibria approach to modeling and interpreting the separation of amino acid enantiomers by chiral ligand-exchange chromatography, **Journal of Chromatography A**, v. 1132, p. 39-50, 2006.

SANTOS, R. C., MELO FILHO, A. A., CHAGAS, E. A., TAKAHASHI, J. A., FERRAZ, V. P., COSTA, A. K. P., MELO, A. C. G. R., MONTERO, I. F., RIBEIRO, P. R. E. 5. Fatty acid profile and bioactivity from *Annona hypoglauca* seeds oil. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 2377-2382.

SAXENA, R. Exploring approaches for investigating phytochemistry: methods and techniques. **Medalion Journal: Medical Research, Nursing, Health and Midwife Participation**, v.4, p. 65–73, 2023.

SHARIFI-RAD, M.; LANKATILLAKE, C.; DIAS, D. A.; DOCEA, A. O.; MAHOMOODALLY, M. F.; LOBINE, D.; SHARIFI-RAD, J., 2020. Impact of Natural Compounds on Neurodegenerative Disorders: From Preclinical to Pharmacotherapy. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, p. 106, 2020.

SHIH , Y-T., HSU, Y-Y ,CHANG, F-R , WU, Y-C , LO, Y-C. 6-Hydroxycleroda-3,13-dien-15,16-olide Protects Neuronal Cells from Lipopolysaccharide-Induced Neurotoxicity through the Inhibition of Microglia-Mediated Inflammation. **Planta Medica**, v. 76, p. 120-127, 2010.

SILVA, J. C., ARAÚJO, C. DE S., DE LIMA-SARAIVA, S. R. G., DE OLIVEIRA-JUNIOR, R. G., DINIZ, T. C., WANDERLEY, C. W. DE S., ALMEIDA, J. R. G. DA S. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract of *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae) in rodents. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 197, 2015.

SIVARAMAN , D., KARTIKA, B., MURALIDHARAN, P. Neuroprotective Effect of Hydro Alcoholic Extract of *Annona squamosa* Linn Against 6-Ohda-Lesion Model of Parkinson's Disease in Male Sprague-Dawley Rats: A Behavioral, Biochemical and Histological Study. **Global Journal of Medical Research**, v. 7, 2012.

SOHN, E.; LIM, H.-S.; KIM, Y.J.; KIM, B.-Y.; JEONG, S.-J. *Annona atemoya* Leaf Extract Improves Scopolamine-Induced Memory Impairment by Preventing Hippocampal Cholinergic Dysfunction and Neuronal Cell Death. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 20, p. 1019, 2019.

SOUSA, O., VIEIRA, G., DE PINHO, J., YAMAMOTO, C., ALVES, M. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of *Annona muricata* L. leaves in animal models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 2067- 2078, 2010.

SCHMIDT, F.; DOUARON, G. L.; CHAMPY, P.; AMAR, M.; SÉON-MÉNIEL, B. ;RAISMAN-VOZARI, R.; FIGADÈRE, B. Tryptamine-derived alkaloids from Annonaceae exerting neurotrophin-like properties on primary dopaminergic neurons. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v. 18, p. 5103–5113, 2010.

- SOUZA, D. O., SALES V. S. , RODRIGUES C. K. S., OLIVEIRA, L. R., SANTIAGO, I. C. L., et al. Phytochemical Analysis and Central Effects of *Annona Muricata Linnaeus*: Possible Involvement of the Gabaergic and Monoaminergic Systems. **Iran Journal Pharmaceutical Research**, v.17, 2018.
- SU, C.; CHEN, Y.; CHEN, K.; LI, W.; TANG, H. Inhibitory Potency of 4- Substituted Sampangine Derivatives toward Cu<sup>2+</sup> mediated aggregation of amyloid  $\beta$ -peptide, Oxidative Stress, and Inflammation in Alzheimer's Disease. **Neurochemistry International**, v. 139, p. 104794, 2020.
- SULAIMON, L. A., ADISA, R. A., OBUOTOR, E.M., LAWAL, M. O., MOSHOOD, A. I., MUHAMMAD, N.H. Chemical composition, antioxidant, and anticholine esterase activities of essential oil of *Xylopia aethiopica* seeds. **Pharmacognosy Research**, v.12, p. 112-8, 2020.
- SRIVASTAVA, N., SINGH, A., KUMARI, P., NISHAD, J. H., GAUTAM, V. S., YADAV, M., et al. Advances in extraction technologies: isolation and purification of bioactive compounds from biological materials. **Natural Bioactive Compounds**, p. 409–433, 2021.
- SRUTHI, D.; DHANALAKSHMI, M.; YASHAVANTHA RAO, H. C.; PARTHASARATHY, R.; JAYABASKARAN, C. Chapter 1 - Extraction, isolation, and characterization of phytochemicals, the bioactive compounds of plants. **Recent Frontiers of Phytochemicals**, Elsevier, 1-8, 2023. ISBN 9780443191435.
- SZUHANY, K. L.; SIMON, N. M. Anxiety Disorders: A Review. **JAMA**, v. 328, p.2431–2445, 2022.
- TRACEY, W. D. Nociception. **Current Biology**, v. 27, p. 129–133, 2017.
- URMANN, C.; OBERBAUER, E.; COUILLARD-DESPRÉS, S.; AIGNER, L.; RIEPL, H. Neurodifferentiating Potential of 8-Prenylnaringenin and Related Compounds in Neural Precursor Cells and Correlation with Estrogen-Like Activity. **Planta Medica** v. 81, p. 305–311, 2015.
- VAN SCHEPENDOM, J.; D'HAESELEER, M. Advances in Neurodegenerative Diseases. **Journal of Clinical Medicine** v. 21 , p. 1709, 2023.
- VIJAYABHASKAR, K., PADMA, B., MATHUKUMALLI SAI LAXMI, M. S., KUMAR, N. S. Evaluation of antidepressant activity of *Annona squamosa* l. shoot extract using animal models. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 6, p.1336-43, 2017.
- YAMADA, E. S.; RESPONDEK, G.; MÜSSNER, S.; DE ANDRADE, A.; HÖLLERHAGE, M.; DEPIENNE, C.; RASTETTER, A.; TARZE, A.; FRIGUET, B.; SALAMA, M.; CHAMPY, P.; OERTEL, W. H.; HÖGLINGER, G. U. Annonacin, a natural lipophilic mitochondrial complex I inhibitor, increases phosphorylation of tau in the brain of FTDP-17 transgenic mice. **Experimental Neurology** v. 253, p. 113–125, 2014.
- YANG, Z., SONG, Q., CAO, Z., YU, G., LIU, Z., TAN, Z., DEN, Y., KISHORE, N., KUMAR, P., SHANKER, K., VERMA, A. K. Human disorders associated with inflammation and the evolving role of natural products to overcome. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 179, p. 272–309, 2019.
- YU, P., MA, J., DU, Y., WANG, Q., CHEN, C., BAI, X. et al. An efficient strategy based on liquid-liquid extraction and pH-zone-refining counter-current chromatography for selective enrichment, separation and purification of alkaloid and organic acid from natural products. **Journal of Separation Science**, v. 43, p. 3607–3614, 2020.
- WAHBEH, F.; RESTIFO, D.; LAWS, S.; PAWAR, A.; NEAL S PARIKH, N. S. Impact of tobacco smoking on disease-specific outcomes in common neurological disorders: A scoping review, **Journal of Clinical Neuroscience** 122, 10-18, 2024.

WANG, J., LI, W.; QIN, J.; WANG, L.; WEI, S., TANG, H. Assessment of novel azaanthraquinone derivatives as potent multi-target inhibitors of inflammation and amyloid- $\beta$  aggregation in Alzheimer's disease. **Bioorganic Chemistry** 83, 477-486, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World mental health report; Transforming mental health for all. Geneva: **World Health Organization**, 2022.

WU, Z.; WENXIA LIAO, W.; KELIN CHEN, K.; JINGFANG QIN, J.; HUANG TANG, H. Synthesis of derivatives of cleistopholine and their anti-acetylcholinesterase and anti- $\beta$ -amyloid aggregation activity. **Bioorganic Chemistry**, v. 76, p. 228-236, 2018.

XIAO, X.; WANG, X.; GUI, X.; CHEN, L.; HUANG, B. Natural flavonoids as promising analgesic candidates: a systematic review. **Chemistry & Biodiversity**, v.13, p. 1427–1440, 2016.

XIE, R.; SU, C.; LI, W.; ZOU, X--Y; CHEN, Y-S.; TANG, H. Synthesis and biological evaluation of novel 8- substituted sampagine derivatives as potent inhibitor of Zn<sup>2+</sup>-A $\beta$  complex mediated toxicity, oxidative stress and inflammation. **Bioorganic Chemistry**, v.109, 1-11, 2021.

YAVARPOUR-BALI, H.; GHASEMI-KASMAN, M.; PIRZADEH, M. Curcumin-loaded nanoparticles: a novel therapeutic strategy in treatment of central nervous system disorders. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 4449-4460, 2019.

ZHANG, L.; YONG, Y.Y.; DENG, L.; WANG, J.; BETTY YUEN-KWAN LAW, B. Y-K; HU, M-L.; WU, J-M.; A, YU, L.; WONG, V. K-W.; YU, C-L A, DA-LIAN QIN, D-L.; ZHOU, X-G.; AN-GUO WU, A-G. Therapeutic potential of Polygala saponins in neurological diseases . **Phytomedicine**, v. 108, p. 154483, 2023.

ZOU, X-Y; XIE,R-R.; LI, W.; SU, C-L.; CHEN, Y-S.; TANG, H. Novel sampagine derivatives as potent inhibitors of Cu<sup>2+</sup>-mediated amyloid- $\beta$  protein aggregation, oxidative stress and inflammation, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 174, p. 1-10, 2021.

## CAPÍTULO 2

Avaliação da atividade anticolinesterásica e do efeito neuroprotetor de dois novos 22,23-dihidroprenois isolados de *Annona muricata*

## Avaliação da atividade anticolinesterásica e do efeito neuroprotetor de dois novos 22,23-dihidroprenois isolados de *Annona muricata*

Luz, Rebecca L. S. A.<sup>1</sup>; Santos, Cleonice, C.<sup>2</sup>; Santos, Matheus C.<sup>1</sup>; Albuquerque, M. M. S.<sup>1</sup>; Tavares, Josean F.<sup>3</sup>; Braz-Filho, R.<sup>4,5</sup>; Vieira, Ivo J. C.<sup>5</sup>; Costa, Silvia L.<sup>2</sup>; Santos Jr., Manoelito C.<sup>1</sup>; Branco, Alessandro<sup>1</sup>; Botura, Mariana B.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brazil;

<sup>2</sup> Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil;

<sup>3</sup> Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil;

<sup>4</sup> Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil;

<sup>5</sup> Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brazil.

### Resumo

Poliprenois, polímeros lineares formados por unidades isoprenoides encontrados em plantas, bactérias e fungos, tem despertado interesse por apresentar diversificadas atividades biológicas. O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* e *in silico* a atividade anticolinesterásica e de neuroproteção de dois novos poliprenois isolados da espécie *Annona muricata*. As folhas secas e pulverizadas de *A. muricata* foram submetidas a extração em solução hidroetanólica (80%, v/v) e, em seguida, particionado com hexano, para obtenção da fração hexânica. A fração hexânica foi analisada exaustivamente por cromatografia em camada delgada para a escolha do melhor eluente para a separação de 1 e 2, dos demais componentes da fração. Em seguida, esta fração foi submetida a Cromatografia em Coluna *flash* e eluída com hexano/acetato de etila (70:30, v/v) de forma isocrática, para fornecer dois compostos purificados (1 e 2). A determinação estrutural desses produtos naturais foi realizada através da análise dos espectros obtidos por espectrometria de massas (ESI-MS) e Ressonância Magnética Nuclear uni e bidimensional (RMN 1D e 2D), possibilitando elucidar a estrutura de 22,23-dihidroprenol-10 (1) e seu derivado esterificado (2). Ensaios *in vitro* avaliaram os poliprenois 1 e 2 frente a inibição da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase, a citotoxicidade em células PC12 e o efeito neuroprotetor em modelo de dano inflamatório com lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS, 5 µg/mL) em células PC12 diferenciadas. O poliprenol 1 apresentou baixa atividade (36%) para a acetilcolinesterase enquanto o 2 mostrou alta seletividade para a inibição desta enzima (82%). Os resultados obtidos com o teste de viabilidade celular demonstraram que o poliprenol 1 não foi tóxico para células PC12 em nenhuma das concentrações testadas (0.3 a 200 µM) e o poliprenol 2 foi tóxico em concentrações maiores que 10 µM. Em baixas concentrações (0.3 µM), ambos os compostos atenuaram os efeitos da exposição ao LPS em células PC12 diferenciadas. A interação dos poliprenois com a enzima Acetilcolinesterase foi avaliada por ensaio de ancoragem molecular e o poliprenol 2 apresentou interações *in silico* importantes com a enzima. Este trabalho permitiu a elucidação estrutural de dois novos 22,23-dihidroprenois e forneceu evidências sobre a atividade anticolinesterásica e de proteção aos danos induzidos pelo LPS nas células PC12.

Palavras-chave: Annonaceae; Acetilcolinesterase; Neuroproteção; Citotoxicidade; Células PC12.

## Abstract

Polyproprenols, linear polymers formed by isoprenoid units found in plants, bacteria and fungi, have aroused interest due to their diverse biological activities. The aim of this study was to evaluate in vitro and in silico the anticholinesterase and neuroprotective activity of two new polyproprenols isolated from the species *Annona muricata*. The dried and pulverized leaves of *A. muricata* were subjected to extraction in hydroethanolic solution (80%, v/v) and then partitioned with hexane to obtain the hexane fraction. The hexane fraction was analyzed exhaustively by thin layer chromatography to choose the best eluent for the separation of 1 and 2 from the other components of the fraction. Then, this fraction was subjected to flash column chromatography and eluted with hexane/ethyl acetate (70:30, v/v) in an isocratic manner to provide two purified compounds (1 and 2). The structural determination of these natural products was performed through the analysis of the spectra obtained by mass spectrometry (ESI-MS) and one- and two-dimensional Nuclear Magnetic Resonance (1D and 2D NMR), allowing to elucidate the structure of 22,23-dihydropolypropenol-10 (1) and its ester derivative (2). In vitro assays evaluated polyproprenols 1 and 2 against acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibition, cytotoxicity in PC12 cells and neuroprotection effect in an inflammatory damage model with *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS, 5 µg/mL) in differentiated PC12 cells. Polypropenol 1 showed low activity (36%) for acetylcholinesterase while 2 showed high selectivity for the inhibition of this enzyme (82%). The results obtained with the cell viability test demonstrated that polypropenol 1 was not toxic to PC12 cells at any of the concentrations tested (0.3 to 200 µM) and polypropenol 2 was toxic at concentrations higher than 10 µM. At low concentrations (0.3 µM), both compounds attenuated the effects of LPS exposure in differentiated PC12 cells. The interaction of polyproprenols with the enzyme Acetylcholinesterase was evaluated by molecular docking assay and polypropenol 2 showed important in silico interactions with the enzyme. This work allowed the structural elucidation of two new 22,23-dihydroprenols and provided evidence on the anticholinesterase activity and protection against LPS-induced damage in PC12 cells.

Keywords: Annonaceae; Acetylcholinesterase; Neuroprotection; Cytotoxicity; PC12 cells.

## 1. INTRODUÇÃO

Os poliprenois, polímeros lineares lipídicos compostos por várias unidades isoprenoides, são amplamente encontrados em leveduras, plantas, bactérias e fungos (Hartley; Imperiali, 2012). Esses produtos naturais consistem em moléculas hidrofóbicas de cadeia longa, com fórmula geral  $H-(C_5H_8)_n-OH$ , onde  $n$  representa o número de unidades de isopreno, ligados cabeça-cauda, que variam na configuração geométrica (*cis/trans*) de suas duplas ligações, com um grupo hidroxila em uma extremidade (resíduo  $\alpha$ ) e um átomo de hidrogênio na outra (extremidade  $\omega$ ) (Swiezewska; Danikiewicz, 2005), conforme apresentado na figura 1. Esses compostos podem ser encontrados na forma de álcoois livres ou ésteres com ácidos carboxílicos (Rip *et al.*, 1985). As plantas exibem a maior diversidade (Hartley; Imperiali, 2012), sendo as principais fontes vegetais as coníferas como *Abies sibirica* L., *Picea abies* L., *Pinus sibirica* L., *Pinus sylvestris* L. e a *Ginkgo biloba* (Vanaga *et al.*, 2020). Entretanto a presença de poliprenois é notada em outras espécies de plantas como nas sementes de *Coluria geoides* (Rosaceae) (Skorupinska *et al.*, 2003), na *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae) (Tateyama *et al.*, 1999) e na *Ficus elastica* (Moraceae) (Stone *et al.*, 1967).

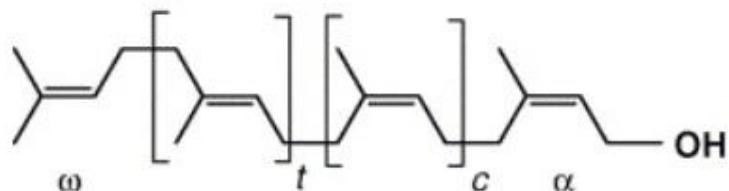


Figura 1- Estrutura geral de poliprenois. Unidades  $t$  e  $c$  representam o número de resíduos isoprenoides nas configurações *cis* e *trans*, e  $\alpha$  e  $\omega$  são os resíduos isoprenoides terminais, respectivamente.

Fonte: Swiezewska; Danikiewicz, 2005

Um dos primeiros relatos do estudo da descrição química de poliprenois na literatura foi o Solanesol, composto que contém nove unidades isoprénicas (C45), isolado das folhas de *Nicotiana tabacum* (tabaco) curadas em estufa, em 1956 (Rowland *et al.*, 1956). Entretanto, somente em 1966, foi publicada por Wellburn e Hemming, da Universidade de Liverpool, a ocorrência de poliprenois de cadeia longa com 11 ou 12 unidades isoprénicas em plantas. Dando continuidade a pesquisa sobre a química de poliprenois, podemos destacar a investigação realizada pelo grupo de Pesquisa do Instituto de Bioquímica e Biofísica, em Varsóvia, o qual investigava carreadores bioquímicos formados por lipídeos ligados a moléculas de açúcares, se deparou com a existência de poliprenois em amostras de investigação desses lipídeos glicosilados em plantas. A partir desse achado foi catalogado, por este grupo, uma coletânea de informações sobre a distribuição e o teor de poliprenois

inicialmente em plantas tropicais, se estendendo posteriormente a plantas de clima ameno, frio e plantas aquáticas, em um trabalho denominado “Collection of Polyproprenols”. Vale ressaltar que essa pesquisa culminou em duas teses de autoria de Sasak (1976) e Swiezewska (1990) sobre o tema. Dando continuidade a esse estudo, Ewa Swiezewska e outros pesquisadores publicaram, em 1994, uma extensa investigação sobre a existência desse compostos em mais de 390 espécies de plantas distribuídas em famílias diversas, como por exemplo, Rosaceae, Moraceae, Lauraceae, Euphorbiaceae, Annonaceae, entre outras. Nesse contexto, a presença de poliprenois em 4 espécies da família Annonaceae é descrita: em *Anaxagorea brevipens* foram encontrados poliprenois que variaram entre 10 a 14 unidades isoprénicas, e em *Annona reticulata* a quantidade de unidades isoprenoides variou entre 9 e 12 unidades. Já na espécie *Asimina triloba* foram encontrados poliprenois tanto na forma livre, que continham entre 10 e 13 unidades isoprenoides, bem como na forma esterificada, enquanto na espécie *Polyathia longifolia* foram encontrados poliprenois com 11 ou 12 unidades de isopreno (Swiezewska *et al.*, 1994). Vale a pena ressaltar que esse grupo de pesquisa utilizou estratégias de cromatografia em camada delgada para a dedução das unidades isoprénicas, bem como para estimar a porcentagem desses poliprenois nas folhas. Geralmente, esses compostos, quando obtidos de fontes vegetais, se apresentam em misturas complexas contendo entre 6 e 10 unidades poliprenólicas, sendo de difícil separação tanto por técnicas convencionais e/ou cromatográficas (Carlson *et al.*, 2000). Por outro lado, a determinação estrutural desses compostos, quando em mistura, é realizada principalmente pela união das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) juntamente com a espectrometria de massas. A RMN fornece o ambiente químico das saturações e insaturações, bem como a presença de metilas ligadas às duplas ligações, enquanto a Espectrometria de massas apresenta dados sobre o número de unidades isoprénicas que compõem a cadeia do poliprenol, através do íon molecular (Rezanka *et al.*, 2001; D'Alexandri *et al.*, 2009).

Os poliprenois estão presentes principalmente nos tecidos fotossintéticos das plantas (Basyuni *et al.*, 2020) desempenhando diversos papéis biológicos, dentre eles o aumento da permeabilidade, da fluidez, e também, na melhora da adesão das membranas (Sviderskii *et al.*, 2005). Há evidências de que esses compostos estão envolvidos no transporte do retículo endoplasmático (RE) (Valtersson *et al.*, 1985) e de proteínas vacuolares (D'Alexandri *et al.*, 2009) e, também podem promover a conectividade entre células e tecidos (Zhang *et al.*, 2015). Sobre a biogênese de poliprenois, especialmente em plantas, os mesmos são formados a partir da união da via metileritritol fosfato (MEP), que ocorre em plastídios, juntamente com a via do mevalonato (MVA), localizada no citoplasma (Optiz *et al.*, 2014). Acreditava-se que a via

do mevalonato era a fonte exclusiva de isopentenil difosfato (IPP), mas a via do metilerititol fosfato, independente do ácido mevalônico, foi reconhecida como uma rota adicional para a formação de IPP (Swiezewska; Danikiewicz, 2005). O IPP sofre a ação de uma enzima isomerase formando o seu isômero — dimetilalil pirofosfato (DMAP) — os quais são blocos de construção que permitem a formação de todos os poliprenois, a partir da ligação entre o IPP e o DMAP. O IPP e o DMAP são inicialmente condensados para produzir os *trans*-(*E*)-prenila difosfato, conhecidos como farnesil difosfato (FPP, C<sub>15</sub>) e geranilgeranil difosfato (GGPP, C<sub>20</sub>), que sofre condensações subsequentes com um número específico de moléculas de isopentenil difosfato (IPP). Esta reação é catalisada por *cis*-preniltransferases (CPTs) e produz poliprenil difosfato, que então sofre desfosforilação para a síntese do poliprenol (Lipko *et al.*, 2023). Dessa forma, a biossíntese de poliprenois deve ser considerada como um processo contendo duas fases (plastídios e citosol): fase 1 de formação de isopentenil difosfato e de dimetilalil difosfato e a fase 2 da síntese da estrutura principal do poliprenol (Swiezewska; Danikiewicz, 2005).

Dentre as atividades farmacológicas tem sido investigadas suas propriedades anti-inflamatórias (Fedotova *et al.*, 2016), hepatoprotetoras (Yang *et al.*, 2011), imunomoduladoras (Vanaga *et al.*, 2020), antiviral, antioxidante e antitumorais (Wang *et al.*, 2006, Tao *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2020). Os poliprenois também podem auxiliar no tratamento da hipertensão, colesterol alto, diabetes e distúrbios da função imunológica (Zhang *et al.*, 2015). Uma formulação, conhecida como Ropren® foi desenvolvida pela indústria farmacêutica e tem sido utilizada como um hepatoprotetor de origem natural, cujo princípio ativo é formado a partir da fração neutra do extrato de *Picea abies* (L.) Karst. e pertence ao grupo dos poliprenois com propriedades hepatoprotetora e hipolipidêmica, que promove a restauração das membranas dos hepatócitos pela inibição seletiva dos processos oxidativos. Estudos relatam um possível papel protetor contra o ataque de radicais livres oxidativos nos lipídios insaturados da membrana (Bizzarri *et al.*, 2003). A partir da evidência de proteção contra radicais livres o Ropren® foi investigado frente à proteção dos danos causados na Doença de Alzheimer (DA), Fedotova *et al.* (2016) sugere que há melhora das deficiências cognitivas em modelo de rato β-amiloide (25-35) gonadectomizado para a doença de Alzheimer. Assim como Wang *et al.* (2014) investigou o efeito de poliprenois de *P. massoniana* em um modelo de camundongo com DA, e verificou uma melhora cognitiva produzida pelos poliprenois e que pode ser devida, pelo menos em parte, à redução da Aβ cerebral, podendo ser um tratamento promissor para a DA.

Este capítulo teve como objetivo apresentar o isolamento e determinação estrutural de dois 22,23-dihidroprenois, a partir da fração hexânico de *Annona muricata*. A determinação estrutural foi realizada através da espectrometria de massas e Ressonância Magnética Nuclear (1D e 2D) e, tendo em vista o valor farmacológico potencial desta classe de metabólitos, foi realizada a avaliação das suas atividades biológicas, frente à atividade de inibição *in vitro* e *in silico* das colinesterases e a avaliação da toxicidade e neuroproteção em células da linhagem PC12.

## 2.MÉTODOS

### 2.1.OBTENÇÃO DAS FOLHAS DE *Annona muricata*

As folhas da espécie *Annona muricata*, foram coletadas no município de Conceição da Feira, no estado da Bahia (GPS 12°29'32.0"S 38°58'29.6"W), e identificadas pelo Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS), onde as exsicatas foram depositadas, sob número HUEFS 258223. O projeto está cadastrado no SISGEN através do número A176C13.

### 2.2.OBTENÇÃO DE EXTRATO HEXÂNICO DE *Annona muricata*

As folhas (800g) foram secas em estufa com temperatura controlada (40°C) e moídas em moinho de facas (tipo Wiley). O extrato bruto foi obtido por maceração em solução hidroetanólica (EtOH/H<sub>2</sub>O, 80:20) por 72h, filtrado e o volume reduzido utilizando evaporador rotativo. E em seguida, esse extrato foi submetido a uma partição líquido-líquido com hexano. A fração hexânica foi rotovaporada para retirada do solvente e após a secagem, com rendimento de 12 gramas.

### 2.3. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A CCD foi realizada em placa de sílica gel 60 com suporte de alumínio (50 mm × 40 mm- Merck®). Foram utilizados diversos sistemas de eluição, sendo selecionado Hexano/Aacetato de Etila (70:30; v/v). As placas foram reveladas através de lâmpada UV (366 nm) e revelador ácido sulfúrico/metanol (10%, v/v) com aquecimento.

### 2.4 ISOLAMENTO DE POLIPRENOIS USANDO CROMATOGRAFIA DE COLUNA FLASH

O extrato hexânico (4 g) foi submetido a purificação utilizando Cromatografia Líquida aberta *flash* (FCC) (Fair e Kormos, 2008). Para este procedimento, foi utilizada uma coluna

para cromatografia flash com 50 cm de comprimento, 38 mm de diâmetro e capacidade de 400 mL e preenchida com 80 g de sílica *flash* (200-400 mesh). A eluição foi do tipo isocrática com hexano-acetato de etila (70:30, v/v), previamente predefinida por CCD. A cromatografia foi realizada com volume morto de 180 mL, vazão 38 mL/min e velocidade linear de aproximadamente 2 polegadas/minuto. Amostras foram coletadas em volume de 40 mL, totalizando 36 frações. As frações 3 e 4 forneceram os poliprenois.

## 2.5. ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE/DAD-UV)

As análises por HPLC foram realizadas no modelo Agilent *Infinity* II 1260 acoplado a um detector de arranjo de diodo (DAD). As amostras e as fases móveis foram filtradas usando um filtro Millipore de 0,45 µm. A fase móvel foi composta por solvente (A) água ultrapura (sistema Milli-Q) e solvente (B) MeOH. O gradiente foi o seguinte: 0 min, 30% B; 5 min, 50% B; 15 min, 100% B; 22 min, 50% B; 24 min, 30% B; 25 min, 30% B. A cromatografia foi feita a uma vazão de 1,0 mL·min<sup>-1</sup> e 20 µL de cada amostra foram injetados. Os dados espectrais foram registrados de 190 a 700 nm durante toda a corrida.

### 2.5.1 ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os espectros de RMN 1D e 2D foram registrados em um espetrômetro Bruker AVANCE operado a 500 e 125 MHz para <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, respectivamente, em benzeno deuterado, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>. Foram realizados os experimentos uni-(<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C RMN) e bidimensionais (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY, HSQC e HMBC). Desvios químicos são dados em ppm ( $\delta$ ) utilizando como padrão de referência interna TMS ou resquícios dos solventes não deuterados.

### 2.5.2 ESPECTROMETRIA DE MASSA

Para análises de HPLC-ESI-MS de alta resolução, foi utilizado o HPLC Shimadzu (Prominance, Kyoto, Japão) equipado com uma bomba de solvente binária LC-20AT, um injetor automático SIL-20A, um sistema de desgasificação DGU-20A, um detector de conjunto de diodos SPD-M20A. O instrumento foi acoplado a um espetrômetro de massas de alta resolução micrOTOF II (Bruker) que utilizou a técnica de ionização por eletrospray. Os parâmetros de análise do espetrômetro micrOTOF II foram capilar de 4,0 kV, ESI em modo de íon positivo, deslocamento da placa final de 500 V, nebulizador de 35,0 psi, vazão de gás seco (N<sub>2</sub>) de 8,0 L/h e temperatura de 300 °C. Os espectros (*m/z* 50–1000) foram registrados

a cada 2,0 s. O formato de sódio foi utilizado como calibrador interno durante a corrida cromatográfica.

## 2.6. ENSAIOS DE INIBIÇÃO DAS COLINESTERASES

### 2.6.1. Inibição da AChE e da BuChE *in vitro*

A atividade inibitória da AChE foi avaliada pelo ensaio de microplacas de Ellman (1961), com modificações, conforme descrito previamente por Almeida *et al.* (2023) usando AChE de *E. electricus*. Em uma microplaca de 96 poços, tampão fosfato de sódio 0,1 M contendo albumina de soro bovino (140 µL), poliprenois (20 µL) e uma solução enzimática de AChE (0,15 U/mL, 20 µL) foram homogeneizados (leitor de microplacas) e incubados em temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, foram adicionados 10 µL de DTNB 10 mM em cada poço, seguido pela adição de iodeto de acetiltiocolina (2,5 mM, 10 µL). Controles positivo (eserina 500 µM) e negativos (etanol a 1% e tampão fosfato 0,1 M) também foram incluídos. Os poliprenois foram avaliados na concentração de 1mg/ml. A absorbância foi medida a 405 nm em leitor de microplacas Multiskan (Thermo Scientific ®) nos tempos 0 e 10 min. Para o ensaio inibitório de BuChE, o mesmo procedimento foi seguido, exceto que a enzima e a concentração do substrato utilizados foram BuChE do soro equino (0,15 U/mL) e acetiltiocolina (14 mM), respectivamente, com leituras em 0 e 20 minutos. A porcentagem da atividade enzimática foi calculada usando a seguinte fórmula: % Inibição = {1 - [(Tf - amostra T0)/(Tf - T0 CN/TF)]} × 100 (onde T0 é a leitura de absorbância após o início da reação; Tf, leitura de absorbância 10/20 min após T0 (para AchE/ BuChE, respectivamente); CN, controle negativo; e TF, tampão fosfato).

### 2.6.2. Análise da interação molecular com a AChE *in silico*

O acoplamento molecular foi realizado para prever as interações intermoleculares entre poliprenois obtidos de *A. muricata* e acetilcolinesterase, usando o programa DOCK 6.9. A estrutura cristalina 3D da AChE foi retirada do Protein Data Bank (PDB): PDB ID: 6O4W (Gerlits *et al.*, 2019) para AChE. A estrutura das proteínas e seus ligantes foram processados antes dos estudos de docking molecular usando o software Chimera 1.9. A delimitação do sítio ativo foi realizada de acordo com a posição do ligante cocristalizado com a respectiva proteína. As grades foram calculadas com o software acessório GRID com base nos seguintes parâmetros: distância de atração de energia = 6,0 Å, distância de repulsão da força de van der Waals = 12,0 Å e colisão de sobreposição = 0,75 Å (Shoichet *et al.*, 1992). Os ligantes foram

minimizados usando um algoritmo simplex implementado no DOCK 6.9. O sucesso do encaixe foi medido pelo cálculo do desvio quadrático médio da raiz (RMSD) da posição de encaixe em relação à sua conformação na estrutura cristalina. RMSD menor que 2 Å é considerado um bom resultado (Yang *et al.*, 2013). As poses foram escolhidas com base nas funções de pontuação e interações proteína-ligante. Essas interações foram analisadas usando o Protein-Ligand Interaction Profiler (PLIP) (Salentin *et al.*, 2015).

## 2.7. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FARMACOCINÉTICOS

A previsão das propriedades ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) é uma fase inicial da descoberta de medicamentos. As estruturas dos poliprenóis foram projetadas no Marvin Sketch e seus formatos canônicos SMILES submetidos ao banco de dados PkCSM ([//biosig.lab.uq.edu.au/pkcsdm/](http://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsdm/)) e parâmetros incluindo solubilidade em água, penetração da barreira hematoencefálica (BBB), absorção, distribuição, metabolismo via CYP450, permeabilidade do SNC e toxicidade foram levantados (Pires *et al.*, 2015).

## 2.8. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS E NEUROPROTEÇÃO EM CULTURA DE CÉLULAS DA LINHAGEM PC12

### 2.8.1. Cultura e diferenciação de células da linhagem PC 12

Para este estudo, células PC12 foram cultivadas em placas Petri de cultura aderentes contendo meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*/ Gibco, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 4 mM L-glutamina, e antibioticos (100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina, Gibco®). As placas foram mantidas em estufas, a 37°C. Quando as células atingiram a confluência, foram retiradas da placa de cultura usando a solução TrypLE Express (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, cat. no. 12604-021). Em seguida, foi adicionado meio com SFB para inativar o TrypLE Express e as células foram centrifugadas a 1000 RPM, por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas para um meio fresco.

Para os ensaios de citotoxicidade, usando as células PC12, não diferenciadas foi semeada a quantidade de 7000 células/ poço, em placas de 96 poços (KASVI® 96 well Tissue Culture Plate). Após o plaqueamento, as células foram incubadas por 24 horas para adesão a superfície, antes do tratamento com os poliprenóis. Para os ensaios de neurotoxicidade e neuroproteção, células PC12 diferenciadas foram semeadas a quantidade de 3000 células/poço, em placas de 96 poços (KASVI® 96 well Tissue Culture Plate). Após o plaqueamento, as células foram incubadas por 24 horas para adesão a superfície. Em seguida, para diferenciação,

as células foram tratadas com 100 ng/mL de fator de crescimento neuronal (NGF) (SigmaAldrich, St. Louis, MO, EUA) por 5 dias. O NGF foi dissolvido no meio de cultura, com o meio sendo renovado a cada 48 h e mantendo a mesma concentração de NGF.

### 2.8.2. Tratamentos

As células PC12 foram tratadas com os poliprenois obtidos da *A. muricata*, dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, St. Louis, MO, EUA) a uma concentração de estoque de 100 mM e armazenado a uma temperatura de 4° C. Foram utilizadas as seguintes concentrações: 0.3; 1; 3; 10; 30; 100 e 200 $\mu$ M. Para indução de dano neuronal, foi realizado o tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (Sigma Aldrich, Burlington, VT, EUA) na concentração de 5  $\mu$ g/mL, diluído no momento do tratamento no meio de cultura fresco sem Soro Fetal Bovino. As análises dos efeitos nas células foram realizadas 24 horas após o tratamento.

### 2.8.3. Análise de Citotoxicidade Celular

#### 2.8.3.1. Ensaio de viabilidade com MTT

O ensaio de viabilidade MTT (Hansen *et al.*, 1989) foi usado para avaliar a citotoxicidade nas células PC12. Para tal, as células tratadas por 24 h com os poliprenois de *A. muricata* (1  $\mu$ M) ou na condição de controle (DMSO) foram incubadas com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT; Sigma), em concentração de 1 mg/mL por 2 h. Em seguida, foi adicionada a solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 20% (p/v) e dimetilformamida (DMF) a 50% (v/v), a pH 4,7 para promover lise. A viabilidade foi quantificada pela conversão do MTT amarelo em formazan de coloração roxa, promovido por desidrogenases mitocondriais de células vivas. Para isso, a densidade óptica de cada amostra foi medida a 540 nm usando um leitor de microplacas (Varioskan TM Thermo Plate-Reader®, Thermo Fisher Scientific Inc., Vanta, Finland). Três experimentos independentes foram feitos para cada análise.

#### 2.8.3.2 Ensaio de viabilidade com Sulforodamina B (SRB)

O ensaio SRB (Vichai; Kirtikara, 2006) foi utilizado para avaliar a viabilidade em células PC12 diferenciadas. Células após diferenciação com NGF cultivadas em placas de 96 poços (Kasvi) foram submetidas ao tratamento por 24 h com poliprenois (nas concentrações 0.3; 1; 3 e 10  $\mu$ M). e/ou LPS ou na condição controle (DMSO). Após o tempo de tratamento,

100 µL de solução de ácido tricloroacético (TCA) a 10% foram adicionados a cada poço e incubados por 1 hora a 4°C. O TCA foi descartado e cada placa foi lavada cinco vezes com PBS (1x), deixando secar completamente. Em seguida, 100 µL de solução de SRB a 0,4% em ácido acético foram adicionados a cada poço, incubando por 10 minutos em temperatura ambiente. O corante foi então removido e os poços lavados cinco vezes com 50 µL de ácido acético a 1%. Finalmente, 100 µL de solução base TRIS 10 mM, pH 10,5, foram adicionados a cada poço; e as placas foram lidas em Leitor de microplacas (Varioskan TM Thermo Plate-Reader®, Thermo Fisher Scientific Inc., Vanta, Finland) a 570 nm.

#### 2.8.4. Alterações morfológicas e avaliação da celularidade

Todas as culturas foram examinadas através de microscopia por contraste de fases com filtro verde (Microscópio Labomed® TCM400), onde foram realizadas avaliações de celularidade (densidade celular na cultura) e morfologia celular.

### 2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por ANOVA seguido do teste de Dunnett. A análise estatística foi realizada com o programa estatístico GraphPad Prism (versão 5.0).

## 3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE POLIPRENOIS DO EXTRATO HEXANO DE *Annona muricata*

Para esse estudo foi selecionada a obtenção do extrato hidroetanólico a partir das folhas de *Annona muricata*, e posteriormente, a realização de uma partição líquido-líquido clássica, e deu origem ao extrato hexano (12 g), de interesse para esse estudo de obtenção de poliprenois. Tradicionalmente, poliprenois são extraídos com a utilização de solventes orgânicos, como o n-hexano ou éter de petróleo e separados através de cromatografia em coluna (sílica gel) (Wang *et al.*, 2008), destacando que quando o n-hexano é usado para extraer poliprenois há menos impurezas quando comparado com a extração com éter de petróleo (Zhang *et al.*, 2019).

A busca pela presença dos poliprenois na fração hexânica da *A. muricata* foi realizada utilizando Cromatografia em Camada Delgada, utilizando sistemas de eluentes já descritos na literatura. Essa análise permitiu a visualização de compostos lipossolúveis contidos na fração hexano, possivelmente a presença de poliprenois e possibilitou a escolha do melhor sistema

eluente para a separação dos compostos, que foi Hexano/ Acetato de etila (70:30) (v/v). A partir desses dados de CCD, foi utilizada a plataforma descrita por Fair & Kormos (2008), para melhor visualizar a execução da cromatografia em coluna *flash* (FCC). O método consiste no preenchimento de uma planilha com os fatores de retenção obtidos por CCD para a projeção de um cromatograma teórico, possibilitando inferir na otimização do processo de separação. Os poliprenois foram isolados conforme previsto na planilha de Fair (2008), sendo que o poliprenol 2 (60 mg), foi obtido da fração 3, e o poliprenol 1 (30 mg), foi isolado partir da fração 4. A purificação também foi verificada através da cromatografia líquida de alta eficiência, sendo que o poliprenol 1 apresentou tempo de retenção em 15.8 minutos, enquanto que o poliprenol 2 mostrou tempo de retenção de 13.7 minutos. O Material Suplementar apresenta com mais detalhe a execução desses procedimentos de isolamento.

A identificação estrutural dos compostos **1** e **2** foi realizada através da análise dos espectros de ESI-EM de alta resolução e de RMN uni e bidimensional. O composto 1 apresentou espectro de RMN de hidrogênio, registrado em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> (Misiak *et. al.*, 2009), com três regiões intensas de sinais: região entre  $\delta_H$  1.5-1.7 correspondente à hidrogênio metílico (-CH<sub>3</sub>), região entre  $\delta_H$  1.9-2.3 ppm correspondente a hidrogênio metíleno (-CH<sub>2</sub>) e região entre  $\delta_H$  5.1-5.3 correspondente a hidrogênio de dupla ligação (-HC=CH-). O sinal em  $\delta_H$  4.0 foi atribuído aos hidrogênios do carbono que sustenta o grupamento hidroxila (-CH<sub>2</sub>-OH).

O espectro RMN de <sup>13</sup>C confirmou a presença de 11 sinais de metilas entre  $\delta_C$  15.7-25.5, caracterizando 10 unidades de isopreno, e também mostrou um sinal em  $\delta_C$  58.7 o qual confirmou a presença do grupo -CH<sub>2</sub>-OH. Notou-se também a presença de dez sinais referentes a carbonos olefínicos quaternários, sendo nove entre  $\delta_C$  134.7-138.1, e um sinal em 130.1 ppm (C-39) correspondente ao carbono olefínico terminal que está ligado a duas metilas. Sinais entre  $\delta_C$  124.3-125.6 foram atribuídos a carbonos (-CH) e os sinais na faixa entre  $\delta_C$  26.3-39.9 correspondem a carbonos metilênicos (-CH<sub>2</sub>). Todos os dados de RMN estão summarizados na tabela 1.

A análise por espectrometria de massa de alta resolução desse composto mostrou íon pseudomolecular [M+H]<sup>+</sup> em *m/z* 701.4921 (calc. *m/z* 700.6522) podendo-se deduzir a seguinte fórmula molecular C<sub>50</sub>H<sub>84</sub>O. Em comparação com dados da literatura, verificou-se que o composto que mais se aproxima do composto 1 é o prenol-10, descrito por Misiak *et al.* (2009), que possui massa molecular em *m/z* 698.6365. Dessa forma, nesse estudo sobre *Annona muricata*, o composto 1 é um derivado do poliprenol-10 contendo uma saturação (fig. 2), provavelmente na posição C22-23 (*ver determinação estrutural do composto 2*).

A partir dos dados de RMN e massas juntamente com os dados da literatura (Misiak *et al.*, 2009), o composto 1 foi identificado como poliprenol-10 (figura 2A).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto 2 apresentou sinais na região de hidrogênios metílicos entre  $\delta_{\text{H}}$  1.60-1.75, na região de hidrogênios metilênicos corresponde a um conjunto de sinais entre  $\delta_{\text{H}}$  1.99-2.12, e entre  $\delta_{\text{H}}$  5.13-5.14 correspondente a sinais de hidrogênios olefínicos (-CH=C-). Esses sinais foram compatíveis com o composto 1, identificado como poliprenol-10. Entretanto, o sinal correspondente ao -CH<sub>2</sub>OH em  $\delta_{\text{H}}$  4.00 mostrou-se ausente, sendo notado o surgimento de um sinal em  $\delta_{\text{H}}$  4.7. Esse deslocamento pode ser atribuído a um efeito de desproteção do mesmo -CH<sub>2</sub> do composto 2, quando comparado ao composto 1. Na região de hidrogênio olefínico entre  $\delta_{\text{H}}$  0.8-1.3 foi notada uma região congestionada de sinais, sugerindo a presença de ácido graxo na molécula.

No espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  foi observada a ausência do deslocamento químico de C-1 do poliprenol-10 ( $\delta_{\text{C}}$  58.7) e o surgimento do sinal em  $\delta_{\text{C}}$  60.5. Esse efeito de desproteção foi atribuído a presença de grupamento éster na molécula 2. Os demais sinais de carbono quaternários e metilas ligadas a carbono oleofínico foram semelhantes aos encontrados no poliprenol-10 (1), com sinal adicional de carbonila (C=O)  $\delta_{\text{C}}$  172.6 (C-1'), e sinais adicionais de ácidos graxos entre  $\delta_{\text{C}}$  22.7-34.2 e um sinal de metila terminal ligada a -CH<sub>2</sub> em  $\delta_{\text{C}}$  13.9. Esses dados foram confirmados no experimento de RMN bidimensional HSQC e HMBC. O deslocamento do carbono C-2 em  $\delta_{\text{C}}$  120.2 acoplou a uma longa distância  $^3\text{J}_{\text{C-H}}$  com os dois hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  4.72 ppm, mostrando a presença de grupamento éster no composto 2. A carbonila também aparece acoplando-se com  $\delta_{\text{H}}$  1.6, referentes aos carbonos (C-2') da cadeia alifática. Todos os sinais de RMN foram descritos na Tabela 1, e os espectros de RMN referente as análises das duas estruturas estão disponíveis no Material Suplementar.

Na análise por Espectrometria de massas de alta resolução do composto 2, mostrou o mesmo sinal em  $m/z$  701.4916, atribuído ao fragmento do dihidropoliprenol-10, com sinais adicionais em  $m/z$  365.1063 e  $m/z$  316.2854 entretanto não foi possível detectar o íon molecular desta molécula. O ácido graxo contendo 25 átomos de carbono (C<sub>25</sub>H<sub>50</sub>O<sub>2</sub>) foi identificado em esterificação com o dihidropoliprenol-10 devido a presença do fragmento  $m/z$  365.1063 (100%). A posição da saturação foi confirmada devido ao rearranjo 1,4 formando o fragmento de  $m/z$  316.2854 (40%, C<sub>23</sub>H<sub>40</sub>), atribuído a quatro unidades isoprénicas, mostrando que a saturação está presente entre os carbonos 22 e 23, uma proposta de fragmentação desse composto está no Material Suplementar - figura 7B. Assim sendo, o composto 2 foi atribuído ao 22,23-dihidroprenol-10 esterificado com o ácido pentacosanoico.

Poliprenois são normalmente armazenados em organismos como livres álcoois ou como ésteres em conjunto com carboxílicos ácidos, com uma fração relativamente pequena também existente de forma fosforilada (Surmacz; Swiezewska, 2011). Poliprenois contendo ligações saturadas adicionais, são considerados atípicos e já foram encontrados em folhas de diversas espécies de plantas, como da *Mallotus japonicus*. A eliminação de hidrogênio pode ocorrer durante o alongamento das unidades (Z)-prenil na biossíntese de poliprenois em plantas (Gryz *et al.*, 2019; Suga *et al.*, 1989). Ambos 22,23-dihidroprenois foram isolados pela primeira vez na espécie *Annona muricata*, e não há relatos anteriores na literatura da descrição estrutural dessas moléculas em outras fontes naturais.

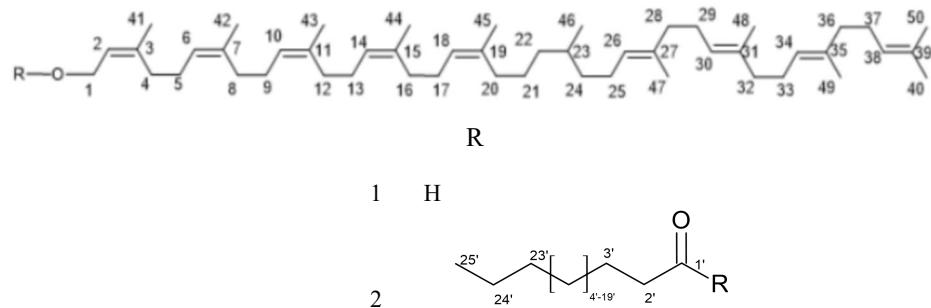


Figura 2- Estrutura química dos dihidropoliprenois 1 e 2 isolados de *Annona muricata*

Tabela 1 - RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) para poliprenois 1 e 2 em  $\text{C}_6\text{D}_6$  como solvente, incluindo dados HSQC ( $^1\text{JCH}$ ) e HMBC ( $^2\text{JCH}$  e  $^3\text{JCH}$ ). Deslocamentos químicos ( $\delta$ , ppm). [1] Misiak et al., Magn. Ressonância. Química, v. 47, p. 825-829, 2009.

	Poliprenol 1		[1]		Poliprenol 2		
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$^2\text{J}_{\text{CH}}$
<b>C</b>				--			
3	138.15	--	138.04	-	139.58	-	-
7	135.43	-	135.43	-	135.0	-	2H-5
11	134.91	-	135.00	-	135.0	-	2H-9
15	134.95	-	135.00	-	135.0	-	3H-44; 2H-13
19	134.95	-	135.00	--	135.4	-	-
23	135.05	--	135.05	-	--	--	-
27	135.02	-	134.97		135.0	-	3H-47; 2H-25; 2H-29
31	134.72		134.72	-	135.1		3H-49; 2H-33
35	134.64	-	134.64	-	134.7	-	-
39	130.12	-	130.77	--	130.8	-	3H-40; 3H-50
1'	-	-	-	-	172.69	-	2H-2'
<b>CH</b>							2H-1
2	125.55	5.45	125.63	5.368	120.25	5.47	2H-1
6	124.89	5.13	124.91	5.124	124.7	5.22	-
10	125.18	5.25	125.17	5.218	125.2	5.29	2H-9
14	125.18	5.25	125.21	5.244	125.2	5.29	3H-44
18	125.26	5.25	125.23	5.244	125.3	5.29	3H-45
22	125.18	5.25	125.17	5.244	--	--	--
23	124.36	5.28	125.17	5.244	38.9	1.74	
26	124.44	5.28	124.33	5.280	124.3	5.23	2H-28
30	124.49	5.45	124.41	5.260	124.4	5.23	3H-48
34	124.81	5.16	124.40	5.258	124.5	5.28	
38	124.60	5.21	124.58	5.204	124.6	5.28	3H-50
<b>CH<sub>2</sub></b>							
1	58.72	4.01 (d, $J=7.85$ )	58.71	3.975	60.58	4.72 (d, $J=7.25$ )	
4	31.99	1.99	32.15	1.990	32.1	2.17	3H-41
5	26.45	2.07	26.44	2.065	26.4	2.20	
8	32.18	2.07	32.20	2.074	32.2	2.17	3H-42
9	26.51	2.16	26.51	2.155	26.5	2.20	
12	32.27	2.17	32.26	2.175	33.3	2.20	
13	26.57	2.19	26.58	2.184	26.6	2.19	
16	32.29	2.12	32.29	2.134	33.3	2.20	
17	26.57	2.17	26.58	2.184	26.6	2.19	
20	32.29	2.12	32.29	2.134	33.3	2.00	
21	26.57	2.19	26.58	2.184	26.6	2.12	
22	-	-	-	-	37.5	1.35	
24	32.03	2.12	32.02	2.136	32.0	1.57	1H-26
N25	26.73	2.12	26.74	2.138	26.7	2.12	
28	39.87	2.07	39.90	2.076	39.9	2.22	
29	26.57	2.18	26.78	2.176	26.8	2.19	
32	39.79	2.07	39.86	2.069	39.8	2.19	
33	26.30	2.16	26.78	2.168	26.8	2.19	
36	39.88	2.08	39.88	2.073	39.7	2.09	
37	26.30	2.01	26.88	2.143	39.9	2.10	H-38; 2H-36
2'	-	-	-	-	34.19	2.32	
3'	-	-	-	-	25.1	1.64	
23'	-	-	-	-	29.6	1.26	3H-25'
24'	-	-	-	-	22.72	1.29	3H-25'
<b>CH<sub>3</sub></b>							
40	25.45	1.64	25.53	1.647	25.3	1.62	
41	23.19	1.61	23.17	1.605	23.2	1.76	
42	23.18	1.68	23.23	1.681	23.2	1.76	
43	23.21	1.71	23.35	1.711	23.3	1.76	
44	23.21	1.71	23.85	1.716	23.3	1.73	2H-16
45	23.21	1.71	23.35	1.716	23.3	1.73	2H-17
46	25.46	1.71	25.30	1.704	25.3	1.62	2H-24
47	15.77	1.63	15.76	1.598	15.8	1.61	
48	15.77	1.63	15.79	1.582	15.8	1.61	1H-30
49	15.77	1.63	15.79	1.57	15.8	1.61	2H-36
50	17.36	1.60	17.40	1.533	17.4	1.57	3H-40
25'	-	-	-	-	13.95	0.90	

### 3.2. ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

As moléculas isoladas foram testadas em concentrações de 1,4 mM (poliprenol 1) e 0,9 mM (poliprenol 2) presentes na Figura 3. O poliprenol 2 mostrou a melhor atividade de inibição, sendo seletiva para a AChE, com 82% de atividade inibitória, diferindo estatisticamente do controle negativo (etanol) e não diferindo estatisticamente do controle positivo (eserina). Alguns estudos propuseram critérios para avaliar a atividade anticolinesterásica em extratos de plantas. Vinutha *et al.* (2007) classificam a inibição da atividade da colinesterase como potente quando a inibição é superior a 50%, moderada quando a inibição é de 30 a 50% e baixa quando a inibição é inferior a 30%. Assim, os poliprenois 1 e 2 apresentaram atividade seletiva moderada (39%) e potente (82%) para acetilcolinesterase, respectivamente.

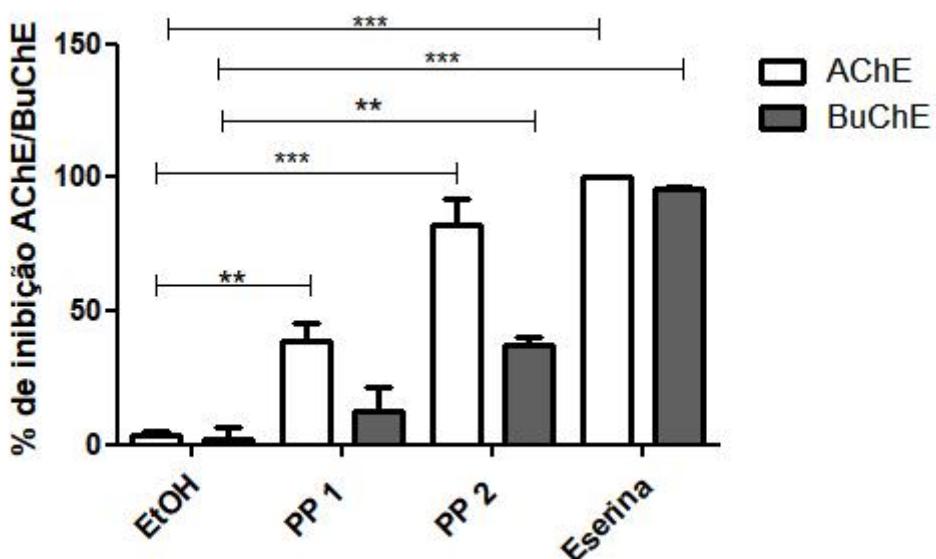


Figura 3- Porcentagens de inibição da colinesterase por compostos isolados de *A. muricata*. Todos os resultados são apresentados com média e desvio padrão. \* Diferença significativa para valor de  $p > 0,05$ , em comparação com o controle negativo, etanol.

Os poliprenois são conhecidos como agentes multifuncionais para a terapia de patologias hepáticas e deficiências cognitivas (Swiezewska; Danikiewicz, 2005). Fedotova e Volkova (2018) demonstraram que o extrato contendo poliprenois de *Picea abies*, na dose de 1,0 mg/kg, supriu a atividade da AChE em ratos com amnésia induzida por escopolamina. Outra pesquisa (Sviderskii *et al.*, 2006) mostrou que altas doses de Ropren®, uma preparação de poliprenol de plantas coníferas, administrada por 30 dias, causou uma diminuição na atividade da colinesterase no tecido hepático de ratos.

Outros estudos com espécies de Annonaceae também relataram potencial atividade anticolinesterásica *in vitro*. Extratos de *A. squamosa* (Leite *et al.*, 2021), *A. muricata* (Rawat *et al.*, 2019), *A. crassiflora* (Barbosa *et al.*, 2022), *A. hypoglaucia* (Santos *et al.*, 2015) e *Alphonsea tonkinensis* (Nguyen *et al.*, 2021) apresentaram efeitos inibitórios significativos *in vitro* sobre colinesterases. No entanto, a maioria dos estudos associa a atividade dessas plantas à ação de alcaloides.

Os inibidores da colinesterase são os principais fármacos disponíveis para o tratamento específico da Doença de Alzheimer (DA). A degeneração dos neurônios colinérgicos do prosencéfalo basal está associada ao comprometimento da neurotransmissão colinérgica, induzida pela hiperatividade da AChE (Souza *et al.*, 2013). Esses inibidores atenuam o déficit colinérgico relacionado às disfunções neurológicas em pacientes com DA. O poliprenol 2, embora moderado para BuCHE (36%), apresentou atividade contra ambas as enzimas. Para melhor elucidar a ação dos poliprenois, o acoplamento molecular foi realizado para avaliar as interações intermoleculares de **1** e **2** com a enzima acetilcolinesterase, uma vez que os dois poliprenois apresentaram melhores atividades frente a essa enzima.

Os parâmetros empregados no acoplamento molecular foram considerados eficientes, uma vez que o valor de RMSD estava abaixo de 2,0 Å (AChE: 1,3 Å). Esta análise fornece informações suficientes para demonstrar que os parâmetros usados no acoplamento molecular foram suficientes para aproximar a pose cristalográfica e indicar um ajuste de alta resolução (Collin *et al.*, 2018). O sítio de ligação da AChE humana consiste em vários domínios: um sítio catalítico formado pela triade catalítica (Ser203, Glu334 e His447); um domínio aniônico contendo apenas resíduos aromáticos (Trp86, Tyr130, Tyr337 e Phe338); o bolso acil com dois resíduos, Phe295 e Phe297; oxiânion consistindo de Gly121, Gly122 e Ala204; e, finalmente, o sítio aniônico periférico (PAS) situado na entrada do desfiladeiro de ligação. É composto por cinco resíduos: Tyr72, Asp74, Tyr124, Trp286 e Tyr341 (Atanasova *et al.*, 2015).

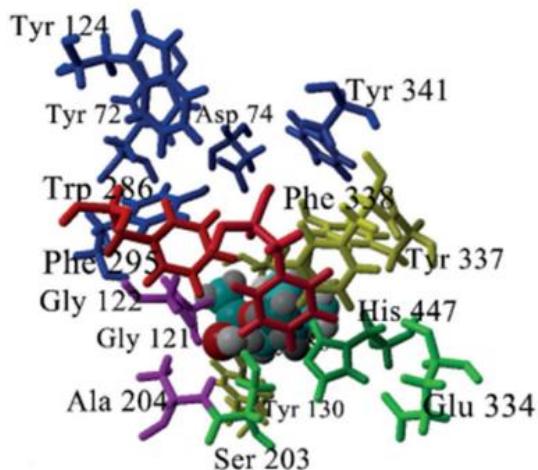


Figura 4- Estrutura da Acetilcolinesterase com domínios de ligação: em azul, sítio periférico aniónico; em vermelho,bolso acil; em amarelo, domínio ânionico ; em verde, aminoácidos da tríade catalítica ; e em roxo, espaço oxiânon.

Fonte: Atanasova *et al.*, 2015

Os resultados do acoplamento mostram que os compostos exibiram valores de Gridscore negativos com AChE correspondendo a -88,00 kcal/mol (1) e -116,86 kcal/mol (2). Os valores de acoplamento se correlacionam com a energia livre de ligação, portanto, pontuações mais negativas sugerem uma ligação mais forte ( García-Ortegón *et al.*, 2022) . O acoplamento do poliprenol 1 mostra cinco interações com AChE (Figura 5A). Todas foram interações hidrofóbicas e ocorrem com aminoácidos não relacionados aos domínios AChE (Asn65, Glu273, Tyr279, Ala325 e Ile353). Por outro lado, o poliprenol 2 estabeleceu duas ligações de hidrogênio com Gly122 e Ala204 do domínio oxiânon (Figura 5B). O espaço oxiânon hospeda uma molécula estrutural de água. A molécula de água faz a ponte entre a enzima e o substrato por meio de uma rede de ligações de hidrogênio e estabiliza o estado de transição tetraédrico do substrato (Atanasova *et al.*, 2015).

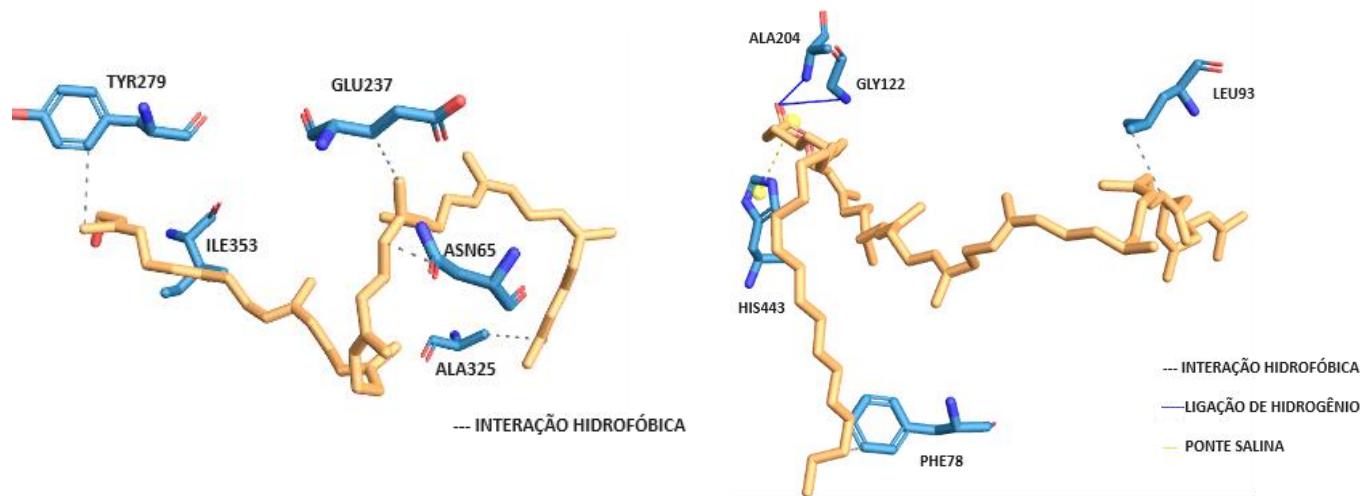


Figura 5- A) Interações do Poliprenol 1 com a enzima acetilcolinesterase (6O4W). B) Interações do Poliprenol 2 com a enzima acetilcolinesterase (6O4W).

Fonte: PLIP, 2024

A técnica de acoplamento molecular geralmente usa uma função de pontuação baseada em energia para obter a orientação e conformação de ligante mais favoráveis necessárias para a ligação no sítio ativo (Jang *et al.*, 2018). O acoplamento de poliprenol 2 com AChE sugeriu que este composto é capaz de interagir com a enzima, convergindo com os resultados obtidos em ensaios anticolinesterásicos *in vitro*.

### 3.3. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS E TOXICOLÓGICA (ADMET)

O perfil ADMET é geralmente usado para uma melhor apreciação da relação benefício/risco e índice terapêutico. A predição do perfil ADMET é baseada principalmente em modelos das propriedades físico-químicas de produtos químicos que influenciam grande parte de sua farmacocinética, mas também existem modelos de previsão dos pontos finais em ADME que são baseados em resultados de ensaios *in vitro* e *in vivo*. As propriedades ADMET computadas (absorção gastrointestinal (TGI); permeação da barreira hematoencefálica (BHE); inibição do sistema citocromo P450; substrato da glicoproteína de permeabilidade (P-GP) desses compostos são apresentadas no quadro 01. Para que um composto potencial seja considerado um medicamento candidato para uso eventual, ele deve possuir características farmacocinéticas e de segurança adequadas ou ótimas, além da atividade biológica desejada (Hu *et al.*, 2018).

Quadro 1 -Propriedades farmacocinéticas e tóxicologicas avaliadas no perfil ADMET dos poliprenois isolados da *Annona muricata*.

Parâmetros ADMET	Poliprenol 1	Poliprenol 2
Solubilidade em água	-3.992	-2.892
Permeabilidade em CaCO <sub>2</sub>	1.296	1.26
Absorção intestinal (humana)	88.803	76.75
Permeabilidade BBB	1.144	1.469
Permeabilidade ao SNC	-0.479	0.832
Substrato da P-glicoproteína	Não	Não
Inibidor da P-glicoproteína I	Não	Não
Inibidor da P-glicoproteína II	Sim	Sim
Inibidor do CYP1A2	Não	Não
Inibidor do CYP2C19	Não	Não
Inibidor do CYP2C9	Não	Não
Inibidor do CYP2D6	Não	Não
Inibidor do CYP3A4	Não	Não
Inibidor hERG I	Não	Não
Inibidor hERG II	Sim	Sim
Toxicidade Ames	Não	Não
Hepatotóxico	Não	Não

A lipofilicidade é uma medida de quão bem o medicamento se dissolve em lipídios ou solventes apolares (Arnott; Planey, 2012). Lipofilicidade é um dos importantes descritores físico-químicos e está relacionada tanto às propriedades farmacodinâmicas quanto farmacocinéticas. A ligação entre solubilidade e lipofilicidade é talvez a mais óbvia de todas. Em um nível teórico, a solubilidade de uma molécula em solução é determinada por seu coeficiente de atividade e isso é uma indicação de sua hidrofobidade. A solubilidade das moléculas do fármaco medida como o logaritmo da concentração molar (*logmol/L*). No presente estudo, os poliprenois apresentaram baixa solubilidade em água, por conta de sua estrutura lipofílica. A baixa solubilidade em água não desqualifica as substâncias consideradas como potenciais medicamentos; no entanto, indica alguns desafios associados ao desenvolvimento de uma forma do medicamento que garanta biodisponibilidade adequada (Czeleń *et al.*, 2023).

Um dos desafios mais importantes enfrentados por um fármaco oral é seu movimento através da barreira epitelial intestinal que determina a taxa e a extensão da absorção humana e, em última análise, afeta sua biodisponibilidade. Portanto, as análises de Caco-2 e absorção intestinal foram selecionados para avaliar as propriedades de absorção das duas moléculas. A linhagem celular Caco-2 é composta de células de adenocarcinoma colorretal epitelial humano, é amplamente usada como um modelo *in vitro* da mucosa intestinal humana para prever a absorção de medicamentos administrados por via oral (Pires *et al.*, 2015). A absorção

no trato gastrointestinal humano também foi medida, uma molécula com uma absorção menor que 30% é considerada com baixa absorção. As duas moléculas apresentaram bons perfis de absorção nos dois parâmetros, tendo uma porcentagem de absorção de 88.80% (poliprenol 1) e 76.75% (poliprenol 2).

A Barreira Hematoencefálica (BHE) é muito importante para limitar a penetração de drogas no sistema nervoso central (SNC) (Abbott, 2002). A penetração na BHE e a permeabilidade no Sistema Nervoso Central são questões problemáticas no processo de desenvolvimento de medicamentos, e mais de 98% das moléculas pequenas são excluídas do cérebro pela BHE (Pardridge, 2009). A capacidade de um medicamento de atravessar o cérebro e se perfundir nos tecidos cerebrais é um parâmetro importante a ser considerado para ajudar a reduzir efeitos colaterais e toxicidades ou para melhorar a eficácia de medicamentos com ação direta no cérebro (Pires *et al.*, 2015). Os valores obtidos para as duas moléculas, nos dois parâmetros, mostram que ambas apresentam potencial de atravessar a BHE e fazer a perfusão pelo tecido cerebral.

A P-glicoproteína é um transportador de cassete de ligação de ATP (ABC). Ela funciona como uma barreira biológica ao extrudar toxinas e xenobióticos para fora das células (Pires *et al.*, 2015). As moléculas que podem interagir com a P-glicoproteína são classificadas aproximadamente em três classes: substratos, inibidores e moduladores. Os substratos podem ser transportadosativamente por P-gp, enquanto os inibidores podem comprometer a função de transporte de P-gp (Li *et al.*, 2014). Os poliprenois inibem a P-gpII, e não apresentam inibição da P-gp I. A coadministração de inibidores com substratos da gp-P provoca um aumento da concentração de fármaco maior no cérebro do que no plasma, uma vez que tem sido demonstrado que o cérebro e a placenta são muito sensíveis aos inibidores de P-gp, sendo aconselhada prudência na utilização pelos potenciais riscos de neurotoxicidade e teratogênese (Choo *et al.*, 2000; Huisman *et al.*, 1999).

As enzimas do complexo citocromo P450, encontradas principalmente no fígado, são essenciais para o processo de biotransformação de diversos xenobióticos, incluindo fármacos. Essas enzimas participam de reações de oxidação que gera metabolitos mais polares e hidrossolúveis, facilitando a excreção. Inibidores dessa enzima, podem afetar o metabolismo de fármacos e são contraindicados, pois podem reduzir sua excreção e desencadear toxicidade induzida por medicamentos. Os dados *in silico* revelaram que os dois poliprenois não apresentaram potencial para inibir qualquer uma das cinco isoformas do P450. Isto indica que estes compostos seriam bem metabolizados no fígado e facilmente eliminados do organismo.

A inibição dos canais de potássio codificados pelo hERG (gene humano éter-a-go-go) são as principais causas para o desenvolvimento da síndrome do QT longo adquirido - levando à arritmia ventricular fatal. Os poliprenois apresentam potencial de inibir a hERG II, e não apresentam inibição da hERG I. hERG é um gene que codifica um canal de proteína de potássio que contribui à atividade da frequência cardíaca (Illian *et al.*, 2022).

As propriedades de toxicidade foram analisadas com uma série de parâmetros importantes, incluindo teste de Ames e hepatotoxicidade. O teste de Ames visa predizer o potencial de mutagenicidade de uma substância química, nos estágios iniciais da descoberta de fármacos (Guan *et al.*, 2018). A hepatotoxicidade também foi avaliada, uma vez que lesão hepática induzida por medicamentos é uma grande preocupação de segurança para o desenvolvimento de medicamentos (Pires *et al.*, 2015). Os poliprenois não apresentaram toxicidade nos parâmetros avaliados.

### 3.4. EFEITO CITOTÓXICO EM CÉLULAS PC12

#### 3.4.1. Avaliação do efeito citotóxico em células PC12

O poliprenol 1 foi testado em concentrações variando de 1 a 200 $\mu$ M em células PC12. Conforme mostrado na figura 6A, não houve redução significativa na viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas no ensaio MTT. Nas análises da morfologia celular, utilizando fotos de microscopia (figura 6B), não foram observadas alterações celulares ou sinais de morte celular em nenhuma das concentrações testadas. Esses resultados sugerem uma baixa toxicidade do poliprenol 1 neste modelo celular.

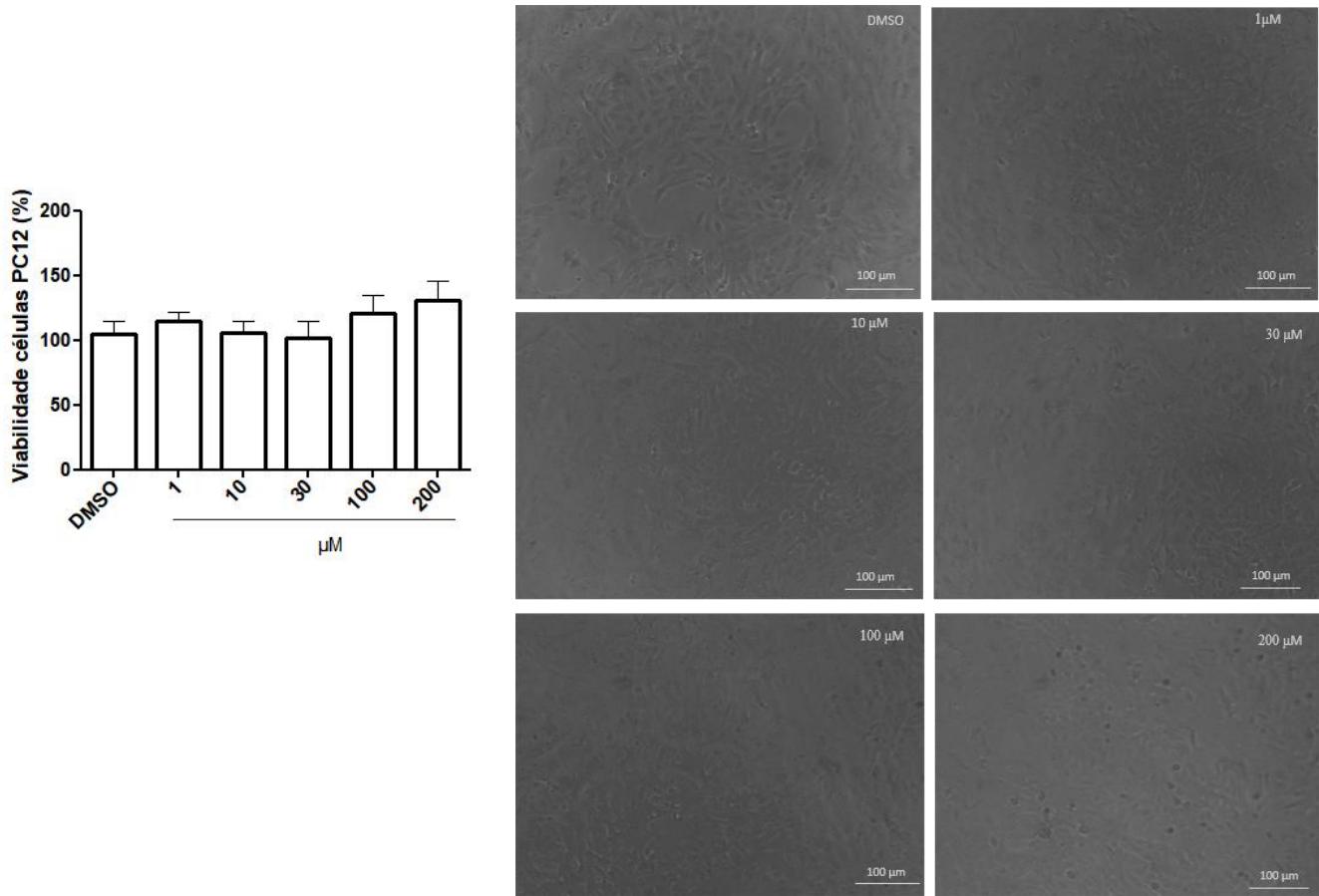


Figura 6- Efeito citotóxico do poliprenol 1 (A) de *A. muricata* (PP1). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT 24 h após o tratamento com PP1 (1 a 200  $\mu$ M); os resultados são expressos em porcentagem do controle (DMSO 0,1%), considerado 100% (\*  $p < 0,05$ , ANOVA seguida do teste de Dunnett). Imagens representativas da morfologia das células PC12 em condições controle ou após exposição ao PP1 (1 a 200  $\mu$ M) (B) por microscopia de contraste de fase; obj  $\times 20$ ; barra de escala = 100  $\mu$ m.

O tratamento de células PC-12 não diferenciadas com poliprenol 2 induziu redução significativa ( $p < 0,005$ ) na viabilidade celular apenas nas duas maiores concentrações avaliadas no teste MTT (10 e 30  $\mu$ M) (Figura 7A). O valor de  $IC_{50}$  para este parâmetro correspondeu a 10,83  $\mu$ M (intervalo de confiança = 9,91 a 11,84  $\mu$ M).

Os resultados obtidos com o poliprenol 2 na avaliação da viabilidade celular por MTT corroboram os achados na análise da morfologia celular da linhagem celular PC12 por meio de microfotografia (Figura 7B). No meio de crescimento, as células PC12 apresentam formato redondo ou poligonal e tendem a crescer em pequenos aglomerados (Greene; Tischler, 1976). Conforme a Figura 6, após 24 horas de exposição ao poliprenol 2, a partir da concentração de 10  $\mu$ M, as células tornaram-se arredondadas e apresentaram características típicas de apoptose, como encolhimento do corpo celular, condensação nuclear e perda da integridade da membrana celular. Alterações citomorfológicas são evidências de toxicidade de uma substância, pois o dano celular nem sempre resulta em morte celular. Alterações estruturais ou na composição da membrana plasmática podem estar associadas à perda de funções

importantes. A morte celular, seja por apoptose ou necrose, também apresenta alterações na forma, tamanho e estruturas celulares ou alterações intracitoplasmáticas, como inclusões granulares ou vacúolos (Teng *et al.*, 2006).

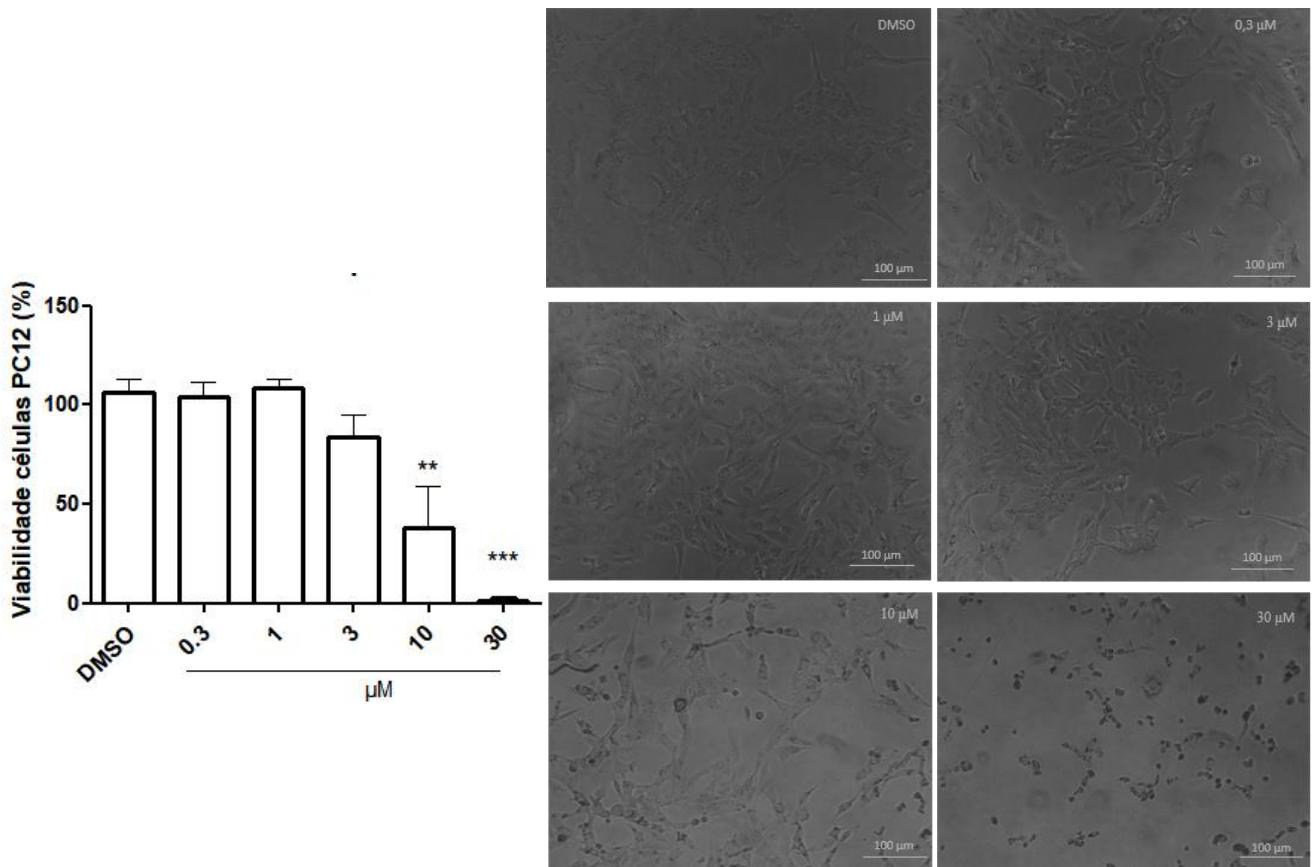


Figura 7- Efeito citotóxico do poliprenol 2 (A) de *A. muricata* (PP2). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT 24 h após o tratamento com PP2 (0,3 a 30 $\mu\text{M}$ ); os resultados são expressos em porcentagem do controle (DMSO 0,1%), considerado 100% (\*  $p < 0,05$ , ANOVA seguida do teste de Dunnett), IC<sub>50</sub> = 10,83  $\mu\text{M}$ . Imagens representativas da morfologia das células PC12 em condições controle ou após exposição ao PP1 (1 a 200  $\mu\text{M}$ ) (B) por microscopia de contraste de fase; obj  $\times 20$ ; barra de escala =100 $\mu\text{m}$ .

Os poliprenois, em geral, são compostos que apresentam baixa toxicidade e têm sido amplamente utilizados como aditivos em alimentos saudáveis, cosméticos e medicamentos (Fedotova *et al.*, 2018). Os poliprenois de *Pinus massoniana* (PNP) foram considerados seguros e com ação antiviral. Experimentos clínicos mostraram efeito terapêutico contra agentes virais de enterite canina, hepatite infecciosa canina, hepatite murina, gastroenterite infecciosa felina, enterite infecciosa felina e peritonite, raiva e cinomose. Para outro grupo de poliprenois, de folhas de *Gingko biloba* (GBP), baixa toxicidade também foi identificada, sendo considerado uma potencial matéria-prima para alimentos e medicamentos (Danilov *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2015).

A linhagem celular de feocromocitoma PC12 foi estabelecida a partir de um tumor adrenal de rato. O tratamento dessas células com fator de crescimento nervoso (NGF)

interrompe sua proliferação e promove a extensão de neurites e são utilizadas para estudo de modelo de citotoxicidade *in vitro*, identificação de moléculas neuroprotetoras e modelos de doenças neurodegenerativas (Chua; Lim, 2021). Essas células são cultivadas mais facilmente e, além disso, não apenas se assemelham aos neurônios em termos de estrutura celular e excitabilidade elétrica, mas também são capazes de formar redes quase neuronais (Zhao *et al.*, 2019).

A indução de dano pela exposição ao LPS em culturas diferenciadas de PC-12 foi confirmada com o ensaio de Sulforrodamina B, uma vez que foi observada redução significativa ( $p < 0,05$ ) na porcentagem de células viáveis nas culturas expostas ao LPS (36%) em comparação ao grupo controle (0,1% DMSO). O tratamento das culturas diferenciadas de PC12 com poliprenol 1 (0.3 a 10  $\mu$ M) resultou em efeito neuroprotetor *in vitro*, sendo observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na viabilidade celular em relação às culturas expostas apenas ao LPS. Para o poliprenol 1, a viabilidade das células PC12 expostas foi de 86; 59; 57 e 71 % para 0.3; 1; 3 e 10  $\mu$ M, respectivamente (Figura 8A). Não há efeito neuroprotetor dependente da concentração para PP1.

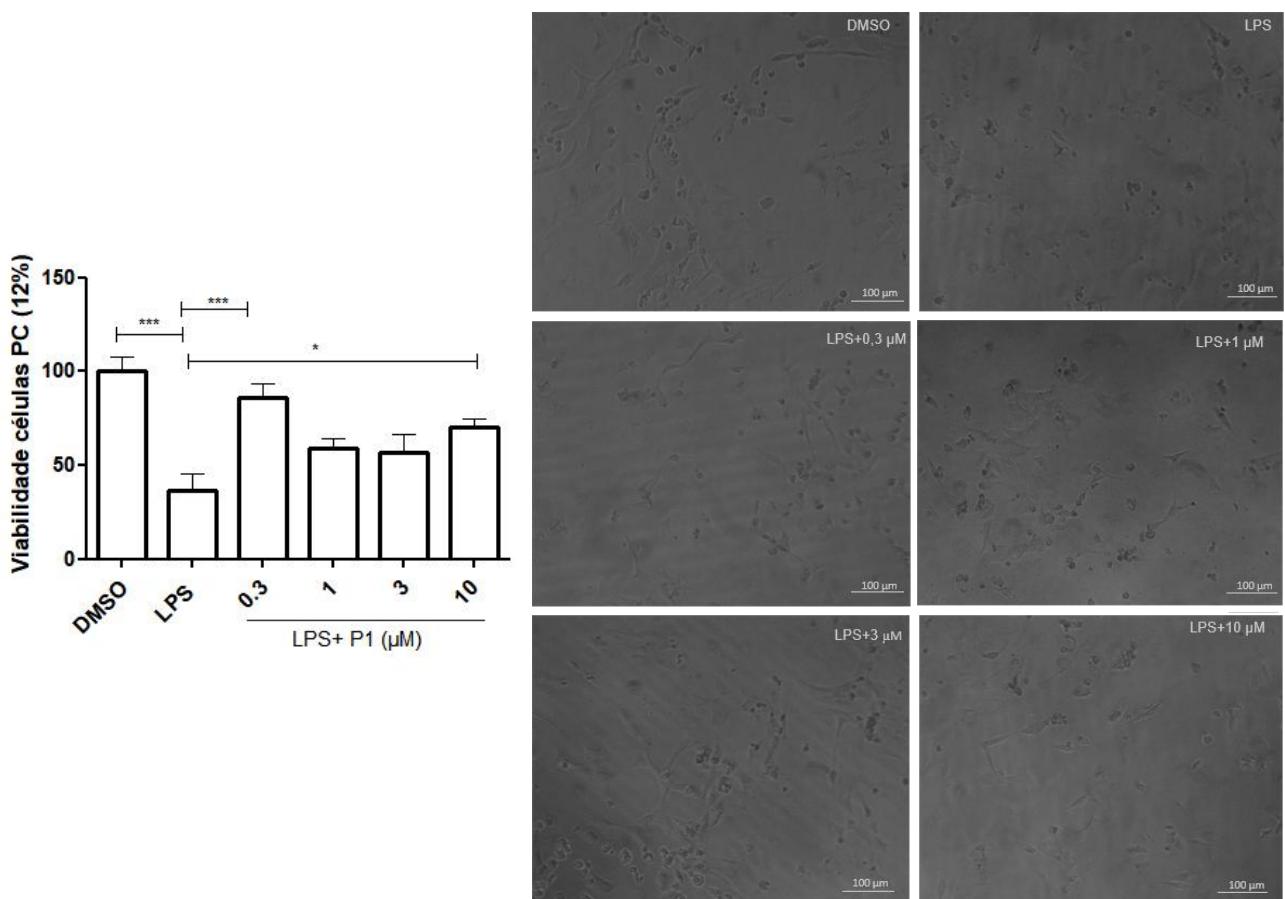


Figura 8- Análise do efeito neuroprotetor induzido pelo poliprenol 1 de *A. muricata* em culturas de células PC12 contra danos inflamatórios. (A) A viabilidade celular foi determinada após coloração com SRB em culturas 24 h após tratamento com LPS (5  $\mu$ g/mL) + poliprenol 1 (0.3 a 10  $\mu$ M). Os resultados são expressos como uma porcentagem do controle (DMSO 0,1%), considerado 100% (\*  $p < 0,05$ , ANOVA seguido pelo teste de Dunnett). Os valores foram expressos como médias  $\pm$  DP. (B)

Fotomicrografias de contraste de fase representativas das culturas nas condições controle, tratadas com LPS e tratadas com LPS com PP1 (0.3 a 10 µg/mL); Obj.  $\times 20$ ; escala = 100 µm.

A exposição de culturas diferenciadas de PC12 ao poliprenol 2 (0.3 a 10 µM) também resultou em um efeito neuroprotetor *in vitro*. Para o poliprenol 2, a viabilidade das células PC12 expostas foi de 86, 68, 73 e 37 % para 0.3; 1; 3 e 10 µM, respectivamente. Considerando a toxicidade do poliprenol 2, para células PC12, na concentração de 10 µM, já era esperada uma redução significativa na viabilidade. O melhor resultado de ação neuroprotetora foi observado no tratamento com a concentração de 0.3 µM para ambos os poliprenois, em que a proporção de células viáveis foi semelhante à das culturas em condições controle, indicando alta proteção contra danos induzidos pela exposição ao LPS.

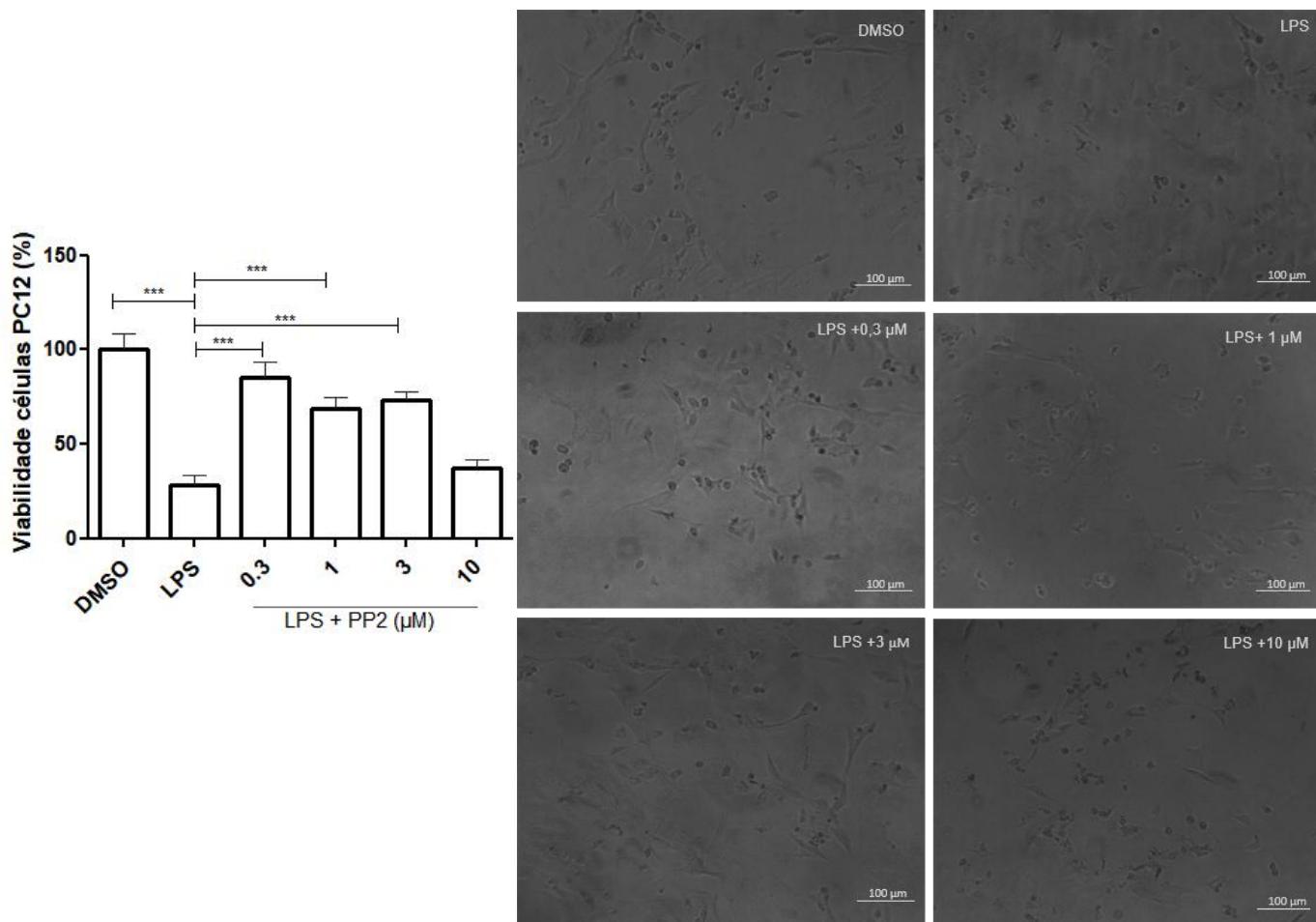


Figura 9- Análise do efeito neuroprotetor induzida pelo poliprenol 2 de *A. muricata* em culturas de células PC12 contra danos inflamatórios. (A) A viabilidade celular foi determinada após coloração com SRB em culturas 24 h após tratamento com LPS (5 µg/mL) + poliprenol 2 (0.3 a 10 µM). Os resultados são expressos como uma porcentagem do controle (DMSO 0,1%), considerado 100% (\* p < 0,05, ANOVA seguido pelo teste de Dunnert). Os valores foram expressos como médias ± DP. (B) Fotomicrografias de contraste de fase representativas das culturas nas condições controle, tratadas com LPS e tratadas com LPS com PP2 (0.3 a 10 µg/mL); Obj.  $\times 20$ ; escala = 100 µm.

Após tratamentos com LPS e poliprenois, a morfologia celular das células PC-12 diferenciadas foi avaliada por microscopia. Nas culturas celulares sob condições controle

(0,1% DMSO), as células PC12 diferenciadas apresentaram morfologia típica da linhagem, exibindo processos e neuritos, assim como nas linhagens submetidas à concentração de LPS + 0.3 µM de ambos os poliprenóis. Nas culturas expostas apenas ao LPS, houve redução da celularidade e as células aderentes remanescentes apresentaram contração do corpo celular. As microfotografias são apresentadas nas figuras 8B e 9B.

Os poliprenois já são conhecidos por suas atividades biológicas, especialmente sua atividade hepatoprotetora. Segundo estudos (Yang *et al.*, 2011), os poliprenois de *Ginkgo biloba* (GBP) são benéficos na inibição da fibrose hepática e esse potencial é atribuído à sua capacidade de eliminar peróxidos e eliminar radicais livres, os encontrados na espécie *Pinus massoniana* mostraram um efeito protetor contra danos em células PC12 induzidos por Aβ1-42 (aumento da viabilidade celular e redução da atividade da desidrogenase láctica). Essa atividade foi associada à potencial ação inibitória desses compostos na formação do radical oxigênio induzido pela proteína Aβ (Zheng *et al.*, 2011). Os poliprenois apresentam proteção intensa contra danos em células PC12 induzidos por Aβ1-42, que podem ser causados pela inibição do radical oxigênio induzido pela proteína Aβ em um modelo de camundongo (Wang *et al.*, 2014) e esses dados indicam que possuem propriedades marcadamente neuroprotetoras (Zhuang *et al.*, 2018), que convergem com os resultados do presente estudo.

## CONCLUSÃO

Este estudo permitiu o isolamento e a elucidação estrutural de dois poliprenois na espécie *Annona muricata*, representando o primeiro relato dessas estruturas químicas nesta espécie vegetal e sendo o poliprenol 2 inédito na literatura. Os dois poliprenois apresentaram ação anticolinesterásica *in vitro* selecionada para acetilcolinesterase, sendo o composto 2 mais ativo. As análises *in silico* indicaram interações intermoleculares (interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio) dos poliprenóis com diferentes regiões das enzimas AChE e BuChE, sendo que as interações do composto 2 ocorreram no domínio oxiânon, região relacionada à atividade enzimática. Os poliprenois **1** e **2** apresentam efeito neuroprotetor *in vitro* contra danos induzidos pela exposição ao LPS em culturas de células PC-12 diferenciadas. O poliprenol 1 não foi tóxico *in vitro* em células PC-12 não diferenciadas.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, N. J. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. **J Anat.**, v. 200(6), p. 629-38, 2002. doi: 10.1046/j.1469-7580.2002.00064.x.
- ALMEIDA, R. B. M.; BARBOSA, D. B.; DO BOMFIM, M. R.; AMPARO, J. A. O.; ANDRADE, B. S.; COSTA, S. L.; CAMPOS, J. M.; CRUZ, J. N.; SANTOS, C. B. R.; LEITE, F. H. A.; BOTURA, M. B. Identification of a Novel Dual Inhibitor of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase: In Vitro and In Silico Studies. **Pharmaceuticals**, v. 16, p. 95, 2023. <https://doi.org/10.3390/ph16010095>
- ATANASOVA, M. et al. Molecular Docking Study on Galantamine Derivatives as Cholinesterase Inhibitors. **Mol. Inf.**, v. 34, p. 394 – 403, 2015.
- BARBOSA, M. F., JUSTINO, A. B., MARTINS, M. M., BELAZ, K. R. A., FERREIRA, F. B.; OLIVEIRA, R. J., DANUELLO, A., ESPINDOLA, F. S., MARCOS PIVATTO, M., 2022. Cholinesterase inhibitors assessment of aporphine alkaloids from Annona crassiflora and molecular docking studies, **Bioorganic Chemistry**, v. 120, 2022.
- BARCHAN, A.; BAKKALI, M.; ARAKRAK, A.; PAGÁN, R.; LAGLAOUI, A. The effects of solvent polarity on the phenolic contents and antioxidant activity of three *Mentha* species extracts. **Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.** V. 3, p. 399–412, 2014.
- BASYUNI, M.; SAGAMI, H.; BABA, S. et al. Diversity of polyisoprenoids in ten Okinawan mangroves. **Dendrobiology**, v. 75, p.167–175, 2016. doi:10.12657/denbio.075.016
- BIZZARRI, R., CERBAI, B., SIGNORI, F. et al. New perspectives for (S)-dolichol and (S)-*nordolichol* synthesis and biological functions. **Biogerontology**, v. 4, p. 353–363, 2003.
- BRAZZOLOTTA, X. et al. Human butyrylcholinesterase produced in insect cells: huprine based affinity purification and crystal structure. **FEBS Journal**, 2012.
- CARLSON, T.; SKORUPINSKA-TUDEK, K. ;HERTEL, J.; CHOJNACKI, T.; OLSSON, J. M.; SWIEZEWSKA, E. Single polyprenol and dolichol isolation by semipreparative high-performance liquid chromatography technique. **Journal of Lipid Research**, v. 41 (7), p. 1177-1180, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)32025-3](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)32025-3).
- CHINNARASU, C.; KOLANDAIVEL, P. Potential for Fourier Transform Infrared Spectroscopy toward Predicting Phytochemicals with Potent Antioxidant Activity in Leaves of *Annona squamosa* Linn. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 85, 2023. doi: 10.36468/pharmaceutical-sciences.1091
- CHOO, E. F.; IMAMURA, H.; KIM, R.B.; LEAKE, B.; WANDEL, H.; WILKINSON, G.R.; WOOD, A.J.J. Pharmacological inhibition of P-glycoprotein transport enhances the distribution of HIV-1 protease inhibitors into brain and testes, **Drug Metab. Dispos.**, v. 28, p. 655-660, 2000.
- CONSTANTINESCU T., LUNGU C.N., LUNG I. Lipophilicity as a Central Component of Drug-Like Properties of Chalcones and Flavonoid Derivatives. **Molecules**, v.24, p. 1505, 2019; doi: 10.3390/molecules24081505.
- CZELEŃ, P.; JELIŃSKI, T.; SKOTNICKA, A.; SZEFLER, B.; SZUPRYCZYŃSKI, K. ADMET and Solubility Analysis of New 5-Nitroisatin-Based Inhibitors of CDK2 Enzymes. **Biomedicines**, v. 11, p. 3019, 2023. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11113019>
- D'ALEXANDRI, F.L.; TONHOSOLO, R.; KIMURA, E. A.; KATZIN, A. M. Mass spectrometry analysis of polyisoprenoids alcohols and carotenoids via ESI(Li(+))-MS/MS. **Methods Mol Biol.**, v. 580, p. 109-28, 2009. doi: 10.1007/978-1-60761-325-1\_6.

DANILOV, L. L.; MALTSEV, S. D.; DEYEVA, A. V.; NAROVLYANSKY, A. N.; SANIN, A. V.; OZHERELKOV, S. V.; PRONIN, A. V. Phosprenyl: a novel drug with antiviral and immunomodulatory activity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz.)*, v. 44(5-6), p. 395-400, 1996.

ELLMAN G.L., et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.*;7(2):88-95, 1961.

FAIR, J. D.; KORMOS, C. M. Flash column chromatograms estimated from thin-layer chromatography data. *Journal of Chromatography A*, v. 1211, n. 1-2, p. 49–54, 2008. doi:10.1016/j.chroma.2008.09.085

FEDOTOVA, J.; VOLKOVA, O. Polypropenols extract supplementation modulates scopolamine-induced non-spatial and spatial memory impairments in rats. *Орбита*, v. 2, n. 3, p. 5-14, 2018.

FEDOTOVA, J.; SOULTANOV, V.; NIKITINA, T.; ROSCHIN, V.; ORDAYN, N. Ropren® is a polypropenol preparation from coniferous plants that ameliorates cognitive deficiency in a rat model of beta-amyloid peptide-(25–35)-induced amnesia. *Phytomedicine*, v. 19, n. 5, p. 451–456, 2012. doi:10.1016/j.phymed.2011.09.073

FEDOTOVA, J.; SOULTANOV, V.; NIKITINA, T.; ROSCHIN, V.; ORDAYN, N. Ropren® is a polypropenol preparation from coniferous plants that ameliorates cognitive deficiency in a rat model of beta-amyloid peptide-(25–35)-induced amnesia. *Phytomedicine*, v. 19, p. 451–456, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.09.073>

FEDOTOVA, J. O.; SOULTANOV, V. S.; NIKITINA, T. V.; ROSCHIN, V.; ORDYAN, N.; HRITCU, L. Cognitive-enhancing activities of the polypropenol preparation Ropren® in gonadectomized beta-amyloid (25–35) rat model of Alzheimer's disease. *Physiology & Behavior*, v. 157, p. 55-62, 2016.

GARCÍA-ORTEGÓN, M. S.; GREGOR, N. C.; TRIPP, AUSTIN J.; HERNÁNDEZ-LOBATO, J. M.; BENDER, A.; BACALLADO, S. DOCKSTRING: Easy Molecular Docking Yields Better Benchmarks for Ligand Design. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 62(15), 2022. doi: 10.1021/acs.jcim.1c01334

GERLITS O, et al. A new crystal form of human acetylcholinesterase for exploratory roomtemperature crystallography studies. *Chem.Biol.Interact*, v.309 p: 1-9, 2019.

GREENE, L. A.; TISCHLER, A. S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 73, n. 7, p. 2424-8, 1976. doi: 10.1073/pnas.73.7.2424.

GRYZ, E.; PERLIŃSKA-LENART, U.; GAWARECKA, K.; JOZWIAK, A.; PIŁSYK, S.; LIPKO, A.; JEMIOLA-RZEMIŃSKA, M.; BERNAT, P.; MUSZEWSKA, A.; STECZKIEWICZ, K.; GINALSKI, K.; DŁUGOŃSKI, J.; STRZALKA, K.; SWIEZEWSKA, E.; KRUSZEWSKA, J. S. Poly-Saturated Dolichols from Filamentous Fungi Modulate Activity of Dolichol-Dependent Glycosyltransferase and Physical Properties of Membranes. *Int J Mol Sci.*, v. 20(12), p. 3043, 2019. doi: 10.3390/ijms20123043.

GUAN, L.; YANG, H.; CAI, Y.; SUN, L.; DI, P.; LI, W.; LIU, G.; TANG, Y. ADMET-score - a comprehensive scoring function for evaluation of chemical drug-likeness. *Medchemcomm.*, v. 10(1), p. 148-157, 2018. doi: 10.1039/c8md00472b.

HANSEN, M.B.; NIELSEN, S.E.; BERG, K. Re-examination, and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of Immunological Methods*, v.119, n.2, p.203-210, 1989.

HARTLEY, M. D. ; IMPERIALI, B. At the membrane frontier: A prospectus on the remarkable evolutionary conservation of polypropenols and polypropenyl-phosphates. *Tetrahedron Lett* , v. 29, 2012.

HUANG, G. Identification of a neuroprotective and selective butyrylcholinesterase inhibitor derived from the natural alkaloid evodiamine. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.81, p. 15-21, 2014.

HUANG, L.; WANG, S.; MA, F.; ZHANG, Y.; PENG, Y.; XING, C.; FENG, Y.; WANG, X.; PENG, Y. From stroke to neurodegenerative diseases: The multi-target neuroprotective effects of 3-n-butylphthalide and its derivatives. **Pharmacol. Res.**, v. 135, p. 201–211, 2018.

ILLIAN, D. N.; WIDYANA, A. P.; HASANA, A. R.; MAYSARAH, H.; AL MUSTANIROH, S. S.; BASYUNI, M. In silico approach: Prediction of ADMET, molecular docking, and QSPR of secondary metabolites in Mangroves. **J Appl Pharm Sci**, v. 12(11), p. 021–029, 2022 .

JANG, C. et al. Identification of novel acetylcholinesterase inhibitors designed by pharmacophore based virtual screening, molecular docking and bioassay. **Nature Scientific Reports**, v. 8, p. 1-21, 2018.

LEITE, D.O.D.; CAMILO, C.J.; NONATO, C.D.F.A.; CARVALHO, N.K.G.D.; SALAZAR, G.J.T.; DE MORAIS, S.M.; COSTA, J.G.M.D. Chemical Profile and Evaluation of the Antioxidant and Anti-Acetylcholinesterase Activities of *Annona squamosa* L. (Annonaceae) Extracts. **Foods**, v. 10, 2021.

LI, D.; CHEN, L.; LI, Y.; TIAN, S.; SUN, H.; HOU, T. ADMET Evaluation in Drug Discovery. Development of in Silico Prediction Models for P-Glycoprotein Substrates. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11(3), p. 716–726, 2014.

LIPKO, A.; PĄCZKOWSKI, C.; PEREZ-FONS, L.; FRASER, P. D.; KANIA, M.; HOFFMAN-SOMMER, M.; DANIKIEWICZ, W.; ROHMER, M.; POZNANSKI, J.; SWIEZEWSKA, E. Divergent contribution of the MVA and MEP pathways to the formation of polypropenols and dolichols in *Arabidopsis*. **Biochem J**, v. 480 (8), p. 495–520, 2023. doi: <https://doi.org/10.1042/BCJ20220578>

MISIAK, M.; WIKTOR KÓZMIŃSKI, W.; KWASIBORSKA, M.; JACEK WÓJCIK, J.; CIEPICHALB, E.; SWIEZEWSKA, E. Complete 1H and 13C signal assignment of prenol-10 with 3D NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 47, p. 825–829, 2009.

OPITZ, S.; NES, W. D.; GERSHENZON, J. Both methylerythritol phosphate and mevalonate pathways contribute to biosynthesis of each of the major isoprenoid classes in young cotton seedlings, **Phytochemistry**, v. 98, p. 110-119, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.11.010>.

PARDRIDGE, W. M. The blood-brain barrier: Bottleneck in brain drug development. **NeuroRX**, v. 2, n. 1, p. 3–14, jan. 2005. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.1.3>.

PEARLSTEIN,, R.; VAZ, R.; RAMPE D. Understanding the structure-activity relationship of the human ether-a-go-go-related gene cardiac K<sup>+</sup> channel. A model for bad behavior. **J Med Chem.**, v. 46(11), p. 2017–2022, 2003. doi: 10.1021/jm0205651.

PIRES, D. E. V.; TOM L. BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58 (9), p. 4066-4072, 2015. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00104

RAWA, M. S. A.; ZURINA, H.; VIKNESWARAN, M.; TOSHIHIKO, N.; WAHAB, A. H. Anti-cholinesterase potential of diverse botanical families from Malaysia: Evaluation of crude extracts and fractions from liquid-liquid extraction and acid-base fractionation. **Journal of Ethnopharmacology** v. 245, p. 1-17, 2019.

RIP, J. W.; RUPAR, C. A., RAVI, K.; CARROLL, K. K. Distribution, metabolism and function of dolichol and polypropenols. **Prog Lipid Res**, v. 24, p. 269–309, 1985.

ROWLAND, R. L.; LATIMER, P. H.; GILES, J. A. Flue-cured Tobacco. I. Isolation of Solanesol, an Unsaturated Alcohol. **Journal of the American Chemical Society**, v. 78(18), p. 4680–4683, 1956. doi:10.1021/ja01599a041

SALENTIN, S.; SCHREIBER, S.; HAUPT, V. J.; ADASME, M. F.; SCHROEDER M. I. PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Res.*, v. 43, 443-447, 2015. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv315>.

SANTOS, R. C., MELO FILHO, A. A., CHAGAS, E. A., TAKAHASHI, J. A., FERRAZ, V. P., COSTA, A. K. P., MELO, A. C. G. R., MONTERO, I. F., RIBEIRO, P. R. E. S. Fatty acid profile and bioactivity from *Annona hypoglauca* seeds oil. *African Journal of Biotechnology*, v. 14, p. 2377-2382.

SASAK, W.; MARIKOWSKI, T.; CHOJNACKI, T.; DANIEWSKI, W. M. Polyprenols in *Juniperus communis* needles. *FEBS Lett.*, v. 64, p. 55-58, 1976.

SHOICHER, B. K. KUNTZ, I.D. BODIAN, D.L. Molecular docking using shape descriptors. *J. Comput. Chem.*, v. 13 p. 380–397, 1992.

SINENSKY, M. Functional aspects of polyisoprenoid protein substituents: roles in protein-protein interaction and trafficking. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids*, v. 1529, p. 203-209, 2000.

SKORUPINSKA, K.; BIENKOWSKI, T.; OLSZOWSKA, O.; FURMANOWA, M.; CHOJNACKI, T.; DANIKIEWICZ, W. et al. Divergent pattern of polyisoprenoid alcohols in the tissues of *Coluria geoides*: a new electrospray ionization MS approach. *Lipids*, v. 38, p. 981-990, 2003

SKORUPINSKA, K.; SWIEZEWSKA, E. Polyisoprenoid alcohols-recent results of structural studies. *Chem. Rec.*, v. 8, p. 33-45, 2008.

STONE, K. J.; WELLBURN, A. R.; HEMMING, F. W.; PENNOCK, J. F. The characterization of ficaprenol-10, -11 and 12 from the leaves of *Ficus elastica* (decorative rubber plant). *Biochem J.*, v. 102(1), p.325-30, 1967 . doi: 10.1042/bj1020325

SUGA, T.; OHTA, S.; NAKAI, A.; MUNESADA, K. Glycinoprenols: Novel polyprenols possessing a phytol residue from the leaves of soybean. *J. Org. Chem.*, v. 54, p. 3390–3393, 1989.

SURMACZ, L. AND SWIEZEWSKA, E. 2011. Polyisoprenoids—secondary metabolites or physiologically important superlipids? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 407, p. 627-632, 2011.

SVIDERSKII, V. L.; KHOVANSKIKH, A. E.; ROZENGART, E.V.; MORALEV, S. N.; YAGODINA, O.V.; GORELKIN, V. S.; BASOVA, I. N.; KORMILITSYN, B. N.; NIKITINA, T. V.; ROSHCHIN, V. I.; SULTANOV, V. S. A comparative study of the effect of the polyprenol preparation ropren from coniferous plants on the key enzymes of the cholinergic and monoaminergic types of nervous transmission. *Dokl Biochem Biophys.*, v. 408, p. 148-51, 2006. doi: 10.1134/s1607672906030112.

SWIEZEWSKA, E.; DANIKIEWICZ, W. Polyisoprenoids: Structure, biosynthesis and function. *Progress in Lipid Research*, v. 44 (4), p. 235-258, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2005.05.002>.

ŚWIEŻEWSKA E., SASAK W., MAŃKOWSKI T., JANKOWSKI W., VOGTMAN T., KRAJEWSKA I., HERTEL J., SKOCZYLAS E., CHOJNACKI T. The search for plant polyprenols. *Acta Biochim.*, v. 41, p 221–260, 1994.

TAO, R.; WANG,C.; YE, J.; ZHOU, H.; CHEN, H. Polyprenols of *Ginkgo biloba* enhance Antibacterial Activity of Five Classes of Antibiotics. *BioMed Research International*, v. 2016, p. 1–8, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4191938>

TATEYAMA, S. T.; WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D.; SAGAMI, H.; OGURA, K. Dolichols of rubber plant, ginkgo and pine. *Phytochemistry*, v. 51(1), p. 11-15, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00581-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00581-0).

VALTERSSON, C.; VAN DUYN, G.; VERKLEIJ, A. J.; *et al.* The influence of dolichol, dolichol esters, and dolichyl phosphate on phospholipid polymorphism and fluidity in model membranes. **J Biol Chem**, v. 260, p. 2742–2751, 1985.

VANAGA, I.; GUBERNATOR , J.; NAKURTE, I.; KLETNIEKS, U.; MUCENIECE, R.; JANSONE, B. Identification of *Abies sibirica* L. Polyproprenols and Characterisation of Polyproprenol-Containing Liposomes. **Molecules**, v. 14 , p. 1801, 2020. doi: 10.3390/molecules25081801

VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nat Protoc.**, v. 1, p. 1112-6, 2006. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>

VINUTHA, B. *et al.* Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, 2007.

WANG, C.; HE, L.; YAN, M.; ZHENG, G-Y.; LIU, X-Y. Effects of polyproprenols from pine needles of *Pinus massoniana* on ameliorating cognitive impairment in ad-galactose-induced mouse model. **AGE**, v. 36, n.4, 2014.

WANG, C.-Z.; YUAN, J.-J.; LI, W.-J.; ZHANG, H.-Y.; YE, J.-Z. *In Vivo and In Vitro* Toxicity Evaluation of Polyproprenols Extracted from *Ginkgo biloba* L. Leaves. **Molecules**, v. 20, p. 22257-22271, 2015. <https://doi.org/10.3390/molecules201219839>

WELLBURN, A.R.; HEMMING, F.W. The occurrence and seasonal distribution of higher isoprenoid alcohols in the plant kingdom. **Phytochemistry**, v. 5, p. 969-975, 1966.

YANG, J.; ROY, A.; ZHANG, Y. Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. **Bioinformatics**. v. 29, p. 2588–2595, 2013.

YANG, L.; WANG, C-Z.; YE,J-Z.;LI,H-T. Hepatoprotective effects of polyproprenols from *Ginkgo biloba* L. leaves on CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in rats, **Fitoterapia**, v. 82 (6), 2011. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.04.009>.

XIE, D.; DENG, T.; ZHAI, Z.; SUN, T.; XU, Y. The cellular model for Alzheimer's disease research: PC12 cells. **Front Mol Neurosci.**, v.15, 2023. doi: 10.3389/fnmol.2022.1016559.

ZHANG, Q.; HUANG,L.; ZHANG, C.; *et al.* Synthesis and biological activity of polyproprenols, **Fitoterapia**, v.106, p. 184-193, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.09.008>.

ZHANG, C-W.; LI, M-F.; TAO, R.; PENG, M-J.; WANG, Z-H.; QI, Z-W.; XUE, X-Y.; WANG, C-Z. Physicochemical property and antibacterial activity of formulation containing polyproprenol extracted from *Ginkgo biloba* leaves. **Ind Crop Prod**, v. 147, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112213>

ZHANG, Q.; HUANG, L.; ZHANG, C.; XIE, P.; ZHANG, Y.; DING, S.; XU, F. Synthesis and biological activity of polyproprenols. **Fitoterapia**, v. 106, p. 184-193, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.09.008>

ZHANG, C-W.; YULU, M.; TAO, R.; YE J-Z.; WANG, C-Z. Separation, purification and hydrophilic derivative synthesis of *Ginkgo biloba* leaves polyproprenol. **Chemistry and Industry of Forest Products**, v. 39 (1), p.41-45, 2019.

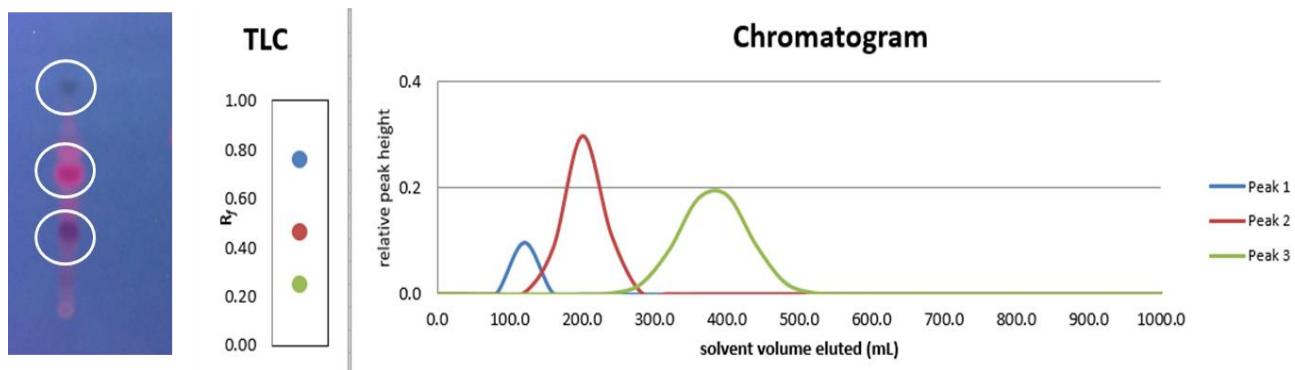
ZHUANG X-X, ZANG X, ZHENG G-Y, ET AL. Polyproprenols mitigate cognitive dysfunction and neuropathology in the APP/PS1 mouse. **Phytotherapy Research.**, v. 32, p. 1098-1107, 2018. <https://doi.org/10.1002/ptr.6050ZHUANG ET AL.1107>

## APÊNDICES/MATERIAL SUPLEMENTAR

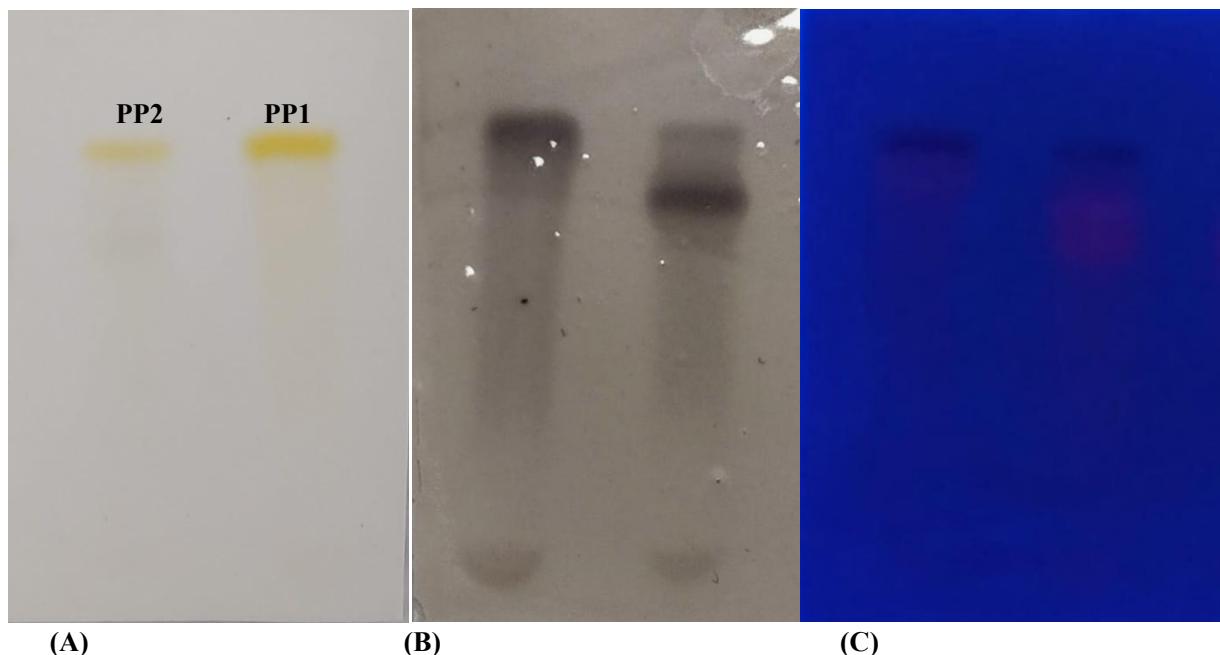
**Figura 1S - Planilha de planejamento para cromatografia em coluna flash (Fair & Kormos, 2008)** - A planilha dinâmica usa parâmetros obtidos por meio da análise de cromatografia de camada delgada (CCD) para prever o sistema de análise de cromatografia de coluna flash (FCC). As distâncias entre as três bandas cromatográficas obtidas por CCD (Pontos 1, 2 e 3) e suas respectivas origens na placa, a distância percorrida pelo sistema solvente, a quantidade em gramas de sílica a ser utilizada, as proporções entre as massas das bandas, a quantidade em gramas de extrato e o volume de frações a serem coletadas da Coluna Flash durante a eluição, são parâmetros teóricos que foram utilizados na planilha para prever a resolução e o sistema de separação de bandas do extrato hexano de *Annona muricata* por FCC . A partir desses valores, a planilha calcula os Fatores de Retenção das bandas, a eficácia na separação entre as bandas, o início, meio e fim da coleta dos compostos, por volume e por número de frasco.

	Dist Spot 1 - Origin	Dist Spot 2 - Origin	Dist Spot 3 - Origin	Dist of Solvent Front
<b>Distance (nm)</b>	28	17	9	37
<b>Mass loading (Xa)</b>	0.1	0.3	0.2	
<b>Rf</b>	0.76	0.46	0.24	
<b>Good/Bad separation</b>	—	Moderated separation	Moderated separation	
<b>Resolution</b>		1.01	1.23	
<b>Start of Peak (mL)</b>	97.22	148.65	289.40	
<b>Middle of Peak (mL)</b>	122.72	202.13	381.80	
<b>End of Peak (mL)</b>	148.22	255.61	474.20	
<b>Band size</b>	51.00	106.96	184.80	
Estimated Fractions/ Peaks				
<b>Start Fraction</b>	2.43	3.72	7.24	
<b>Middle Fraction</b>	3.07	5.05	9.55	
<b>End Fraction</b>	3.71	9.55	11.85	
<b>Number of Fractions between analytes</b>	—	0.01	0.84	
Optional				
Grams of Silica Gel			80	
Fraction Size			40	

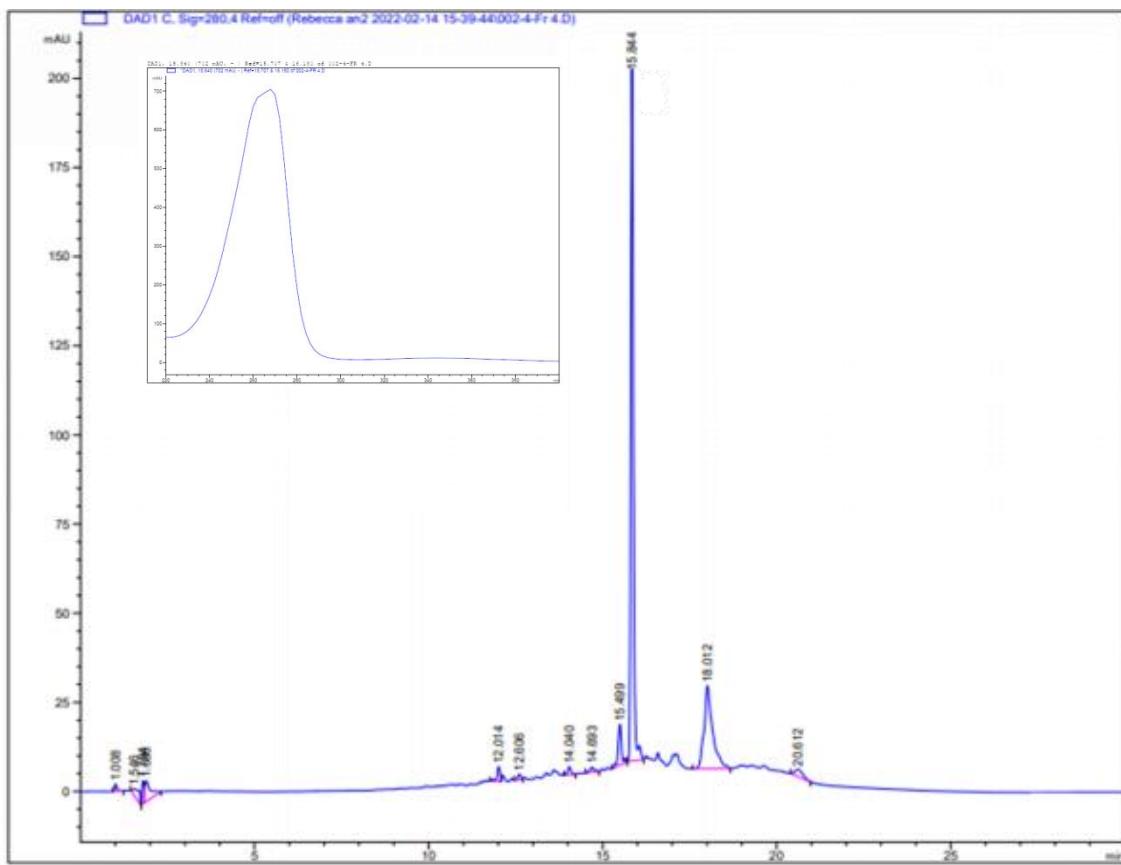
**Figura 2S - Cromatograma teórico (Fair & Kormos, 2008)** - O preenchimento da planilha dinâmica com os parâmetros obtidos através da análise da CCD do extrato hexano gerou um cromatograma com projeções teóricas para um sistema de fracionamento ótimo, por Cromatografia em Coluna Flash. Os picos, construídos em função do volume de solvente eluído, tiveram uma boa separação entre si, o que favorece a obtenção dos compostos isoladamente.



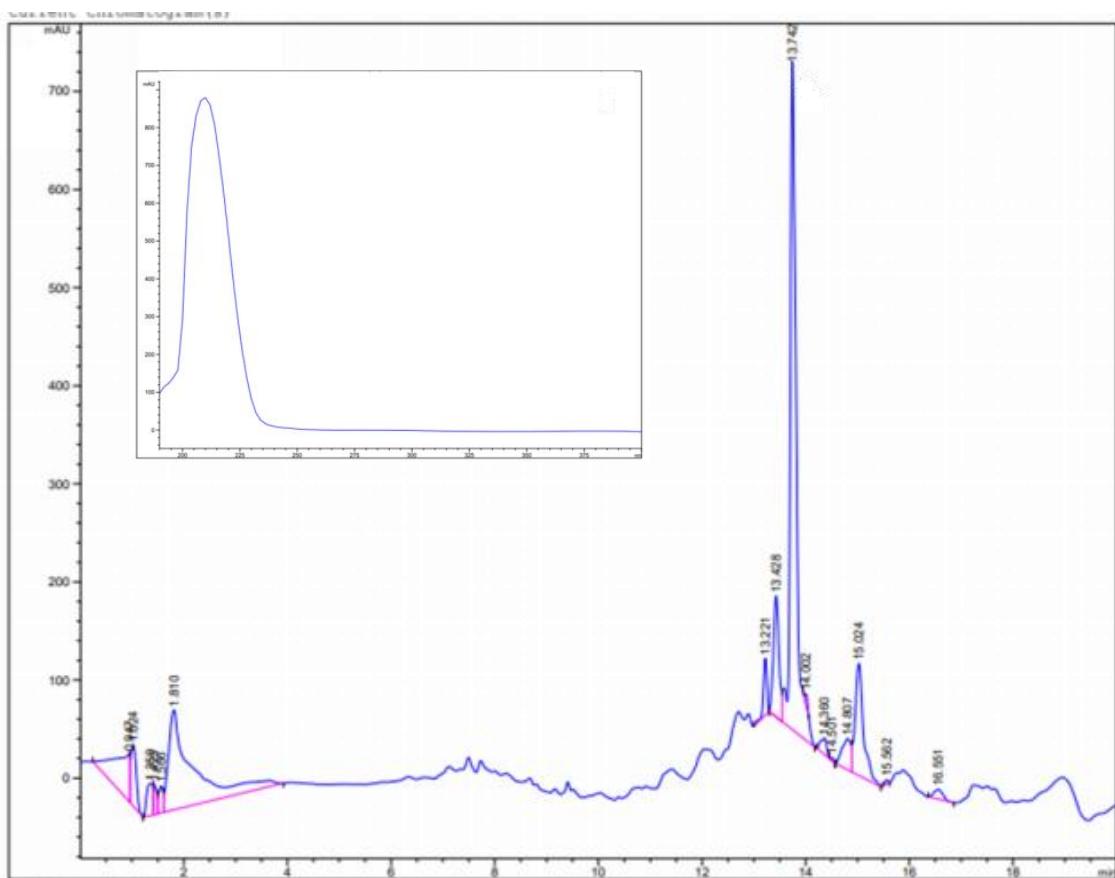
**Figura 3S - Análise por cromatografia em camada delgada (CCD) dos poliprenois obtido nas frações 3 e 4 do extrato hexano de *Annona muricata*.** Placa de CCD de extrato hexano de *Annona muricata*; eluído com sistema hexano-acetato de etila na proporção de 70:30 (v/v) (A), revelado com solução ácido sulfúrico e metanol (B) e visualizado sob luz UV (365 nm) (C).



**Figura 4S - Análise por Cromatografia Líquida de alta Eficiência (CLAE) acoplado com espectro UV e arranjo de diodos (UV-DAD) do poliprenol 1.** O poliprenol apresentou tempo de retenção 15.844 minutos e Uv máx em 275 nm.



**Figura 5S - Análise por Cromatografia Líquida de alta Eficiência (CLAE) acoplado com espectro UV e arranjo de diodos (UV-DAD) do poliprenol 2.** O poliprenol apresentou tempo de retenção 13.742 minutos e Uv máx em 210 nm.



**Figura 6S - Análise do poliprenol 1 por Espectrometria de massas.** Modo positivo, íon molecular  $[M+H^+]^+$ ,  $m/z$  701.49 (calc.  $m/z$  700.6522). Fórmula molecular C<sub>50</sub>H<sub>84</sub>O

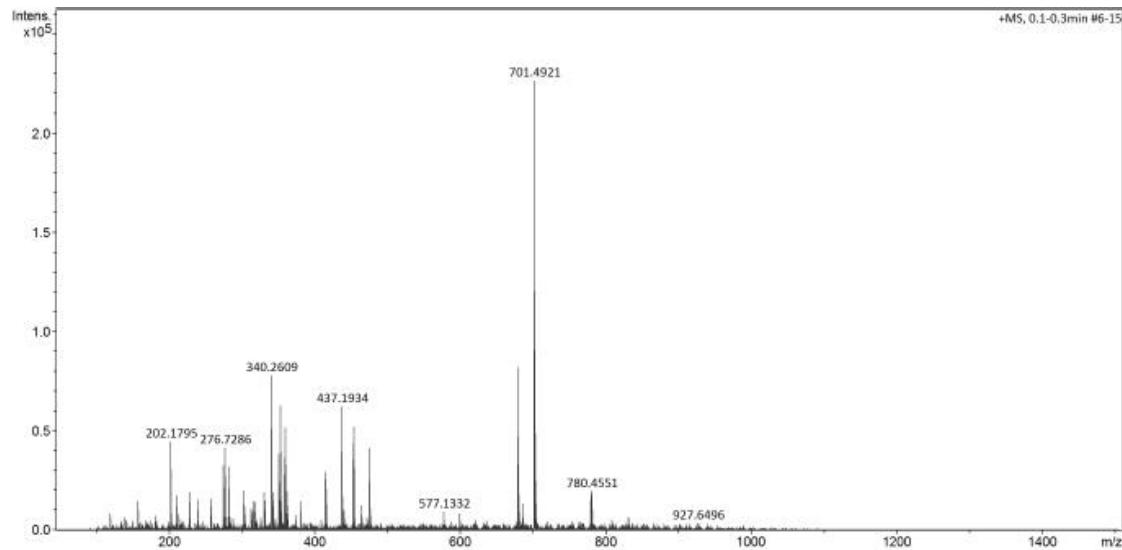
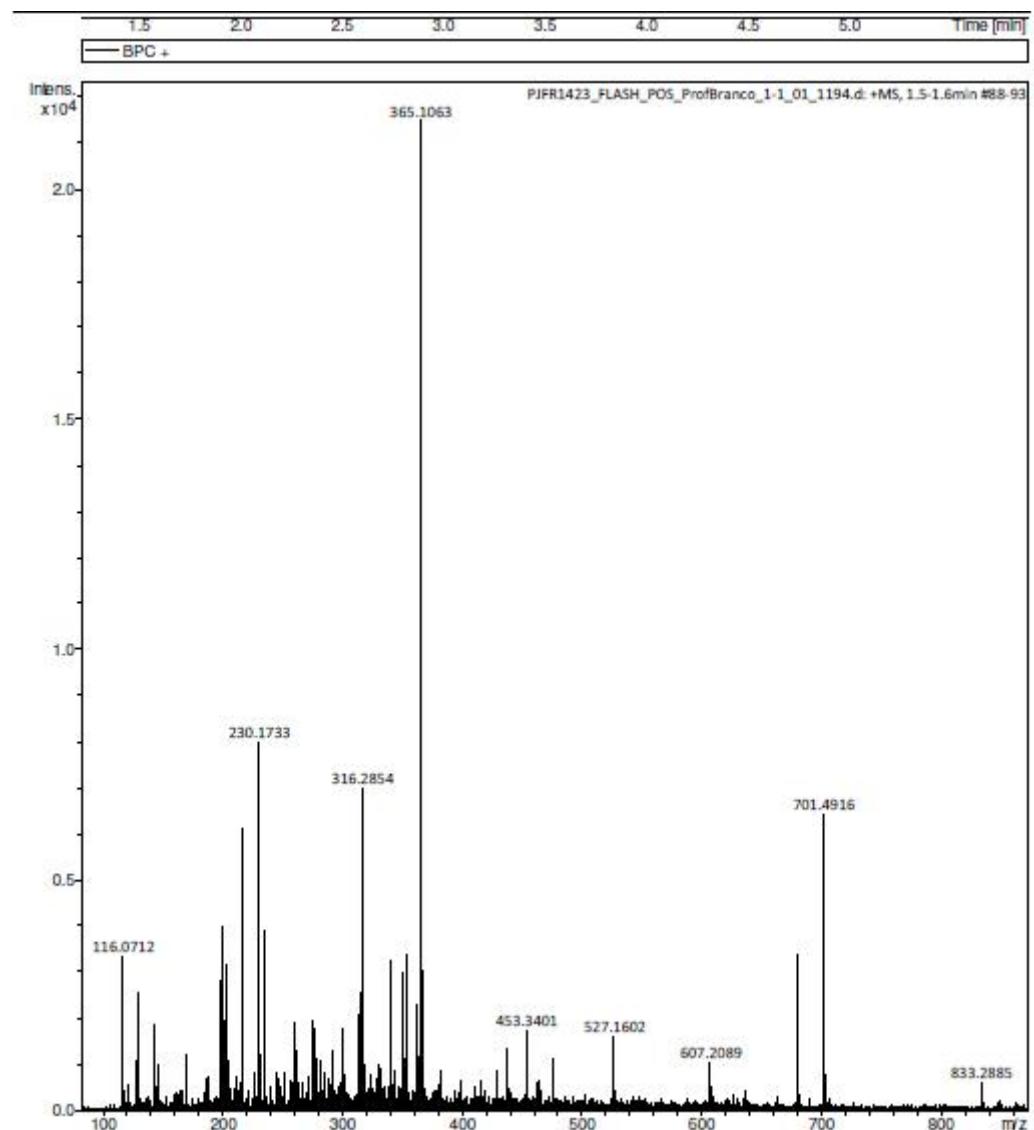


Figura 7SA - Análise do poliprenol 2 por Espectrometria de massas. (A) Modo positivo



**Figura 7S B- Poliprenol 2 por Espectrometria de massas de alta resolução:** a) Fragmentação que descreve a clivagem de ester de forma heterolítica, formando o fragmento  $m/z$  365.2063 (1), que possibilitou a dedução da cadeia de 25 átomos de carbono oriunda do ácido graxo esterificado com o 22,23-dihidroprenol-10; b) A protonação do poliprenol 2 levou ao rearranjo 1,4 da molécula liberando o 22,23-dihidroprenol-10 (fragmento  $m/z$  701.491 (2). O fragmento protonado sofre uma reação de desidratação, com a perda de uma molécula de água e origina o fragmento (3),  $m/z$  683.6489. c) O poliprenol 2 protonado deu origem ao fragmento  $m/z$  316.2854 (4), levando a confirmação da presença da saturação entre os carbonos C-22 e C-23 da estrutura do prenol-10.

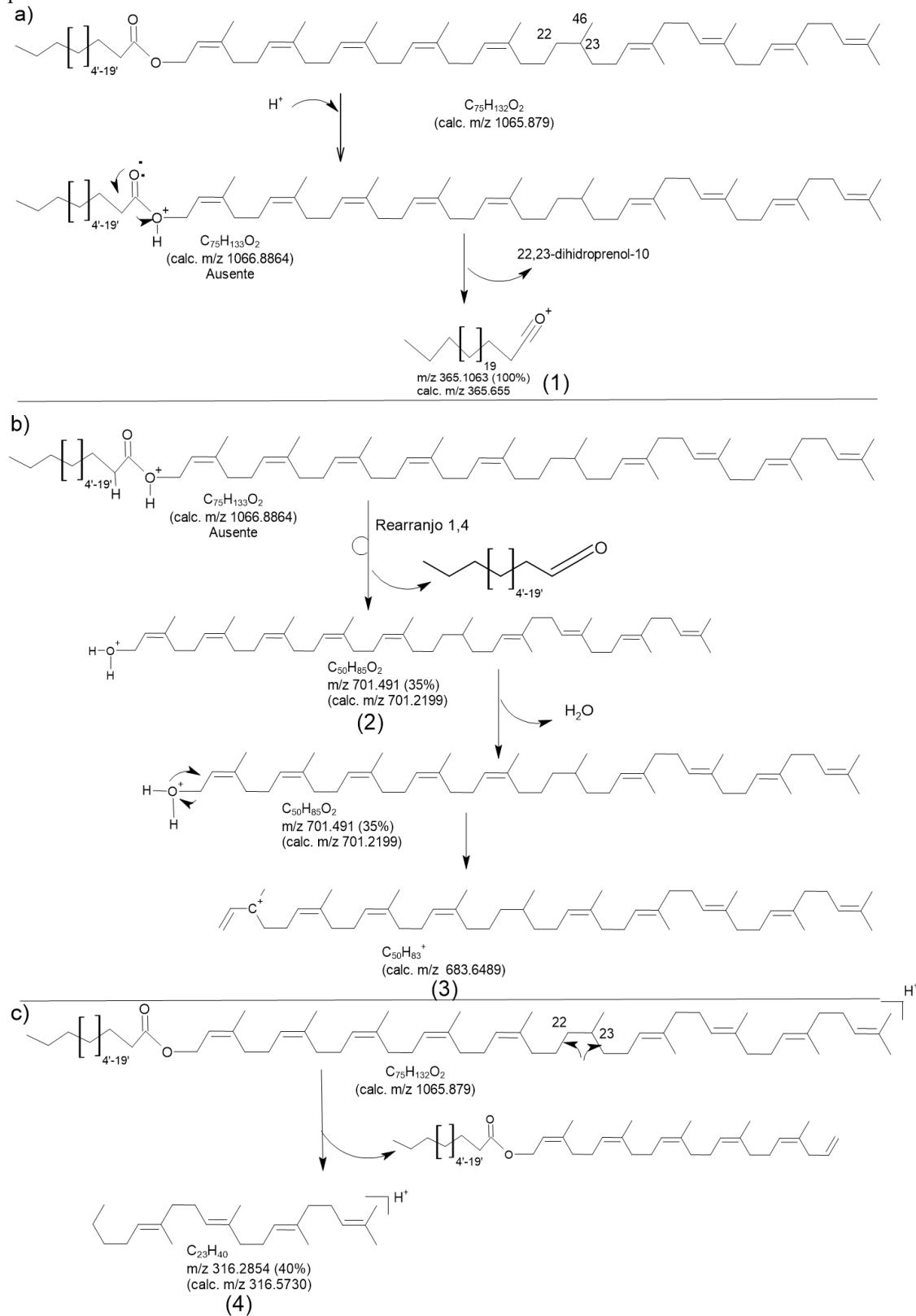
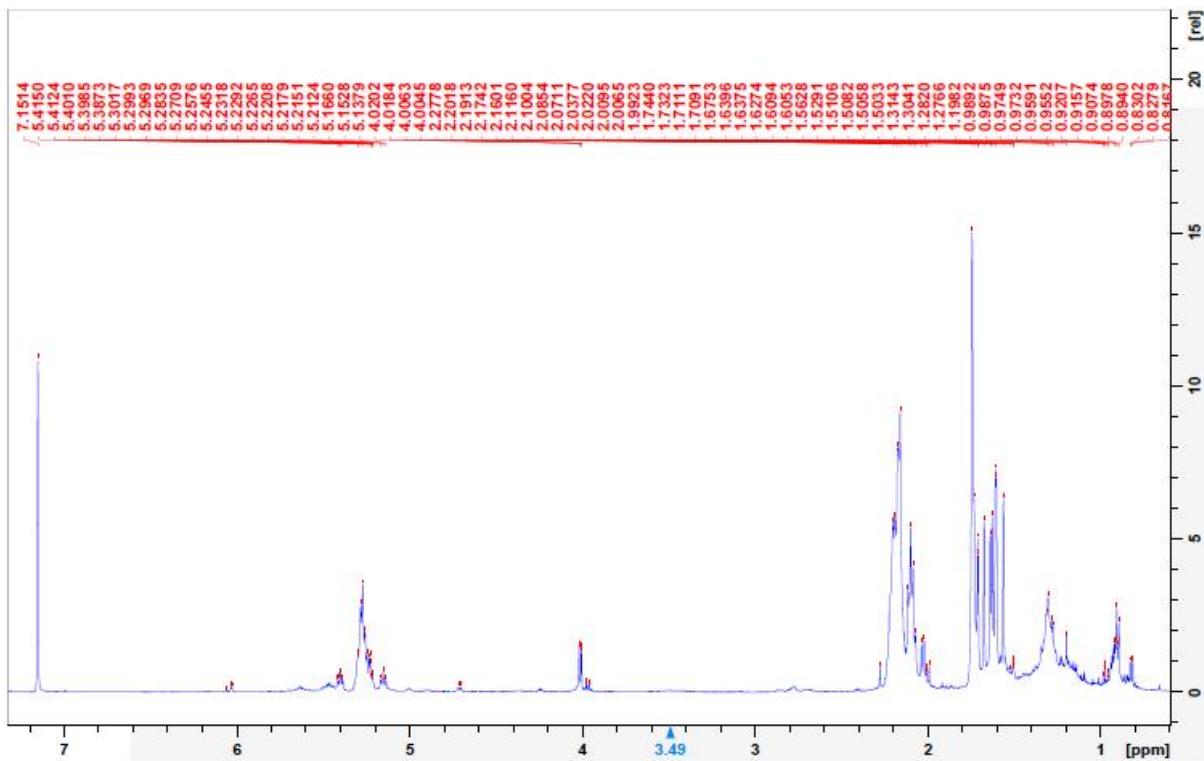
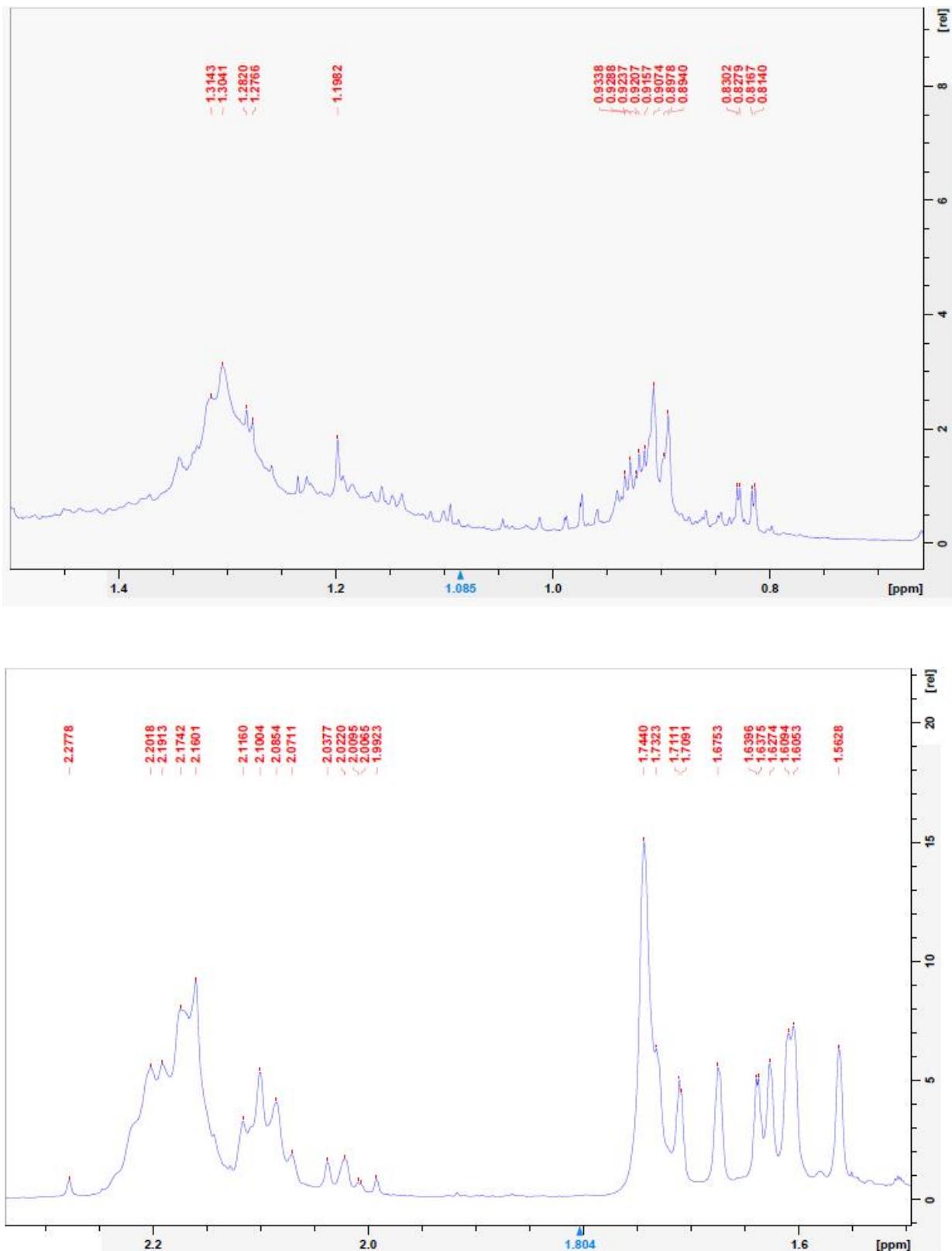


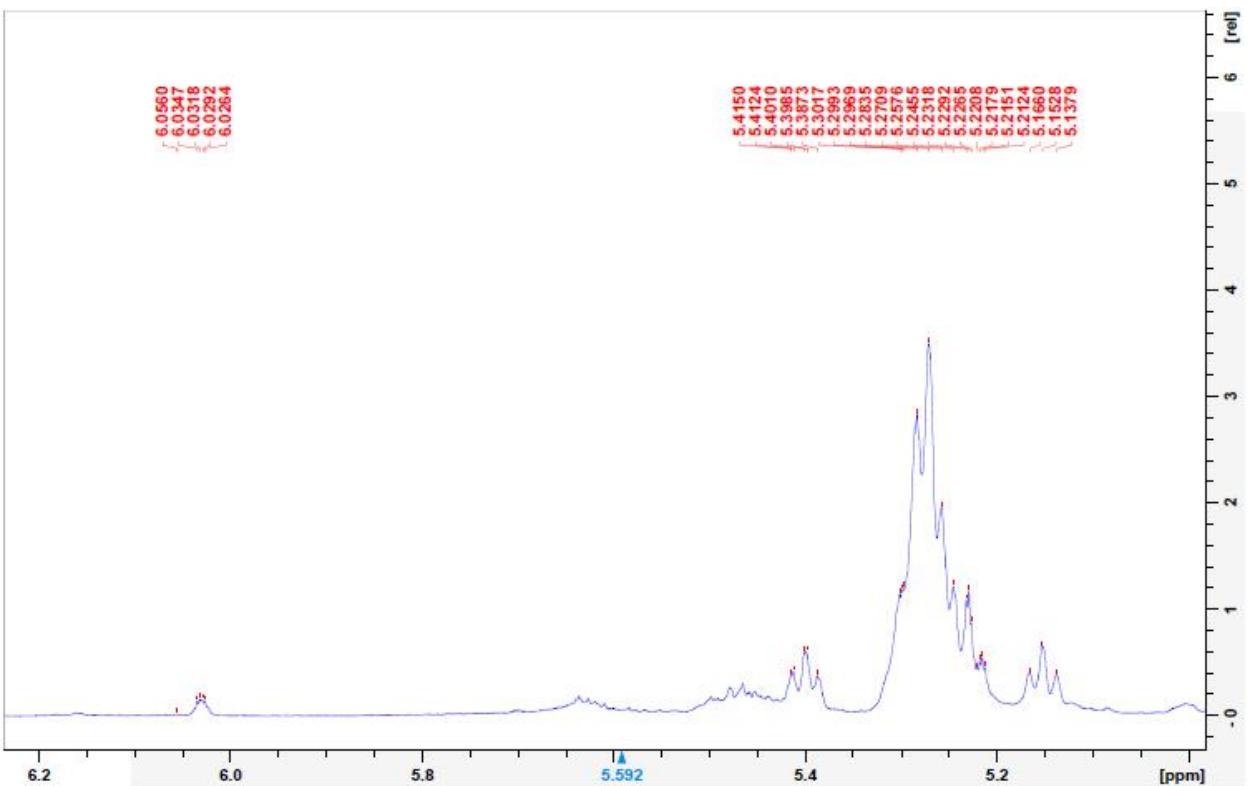
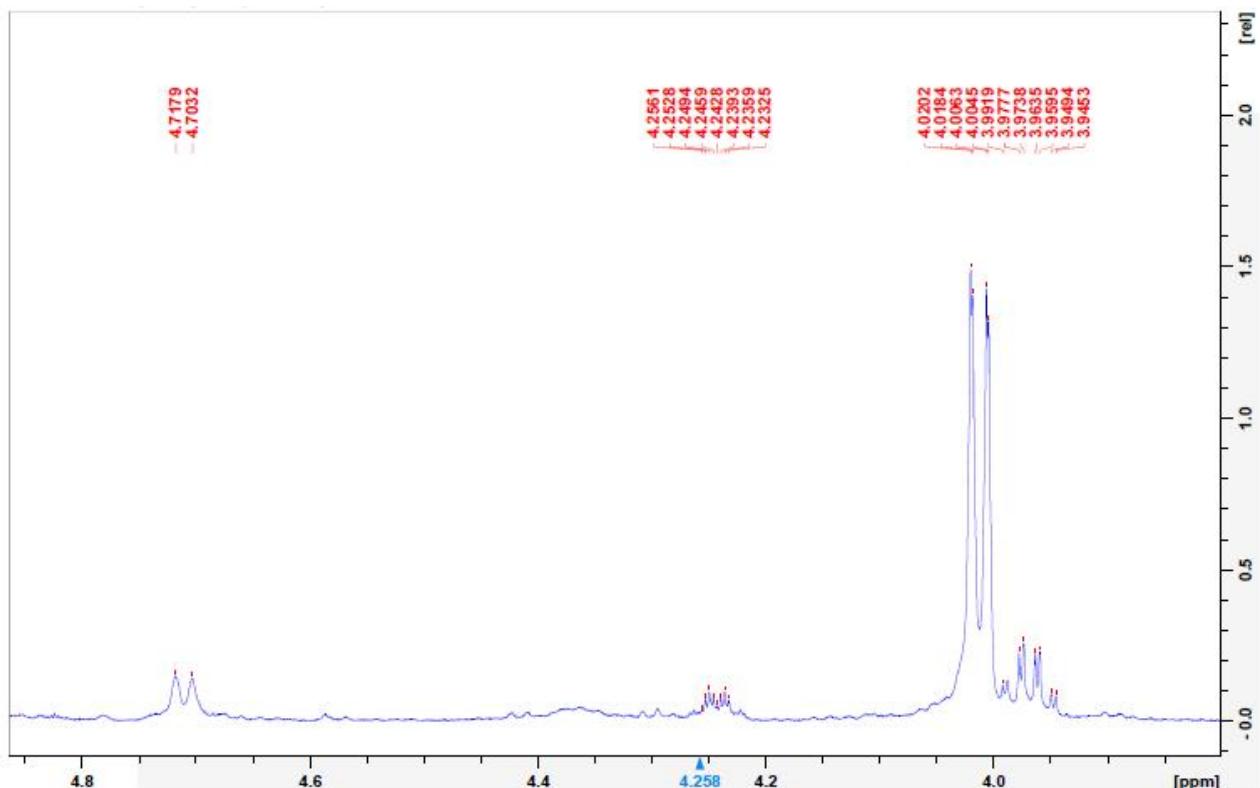
Figura 8S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear.  $^1\text{H}$  (500 MHz), em  $\text{C}_6\text{D}_6$ .



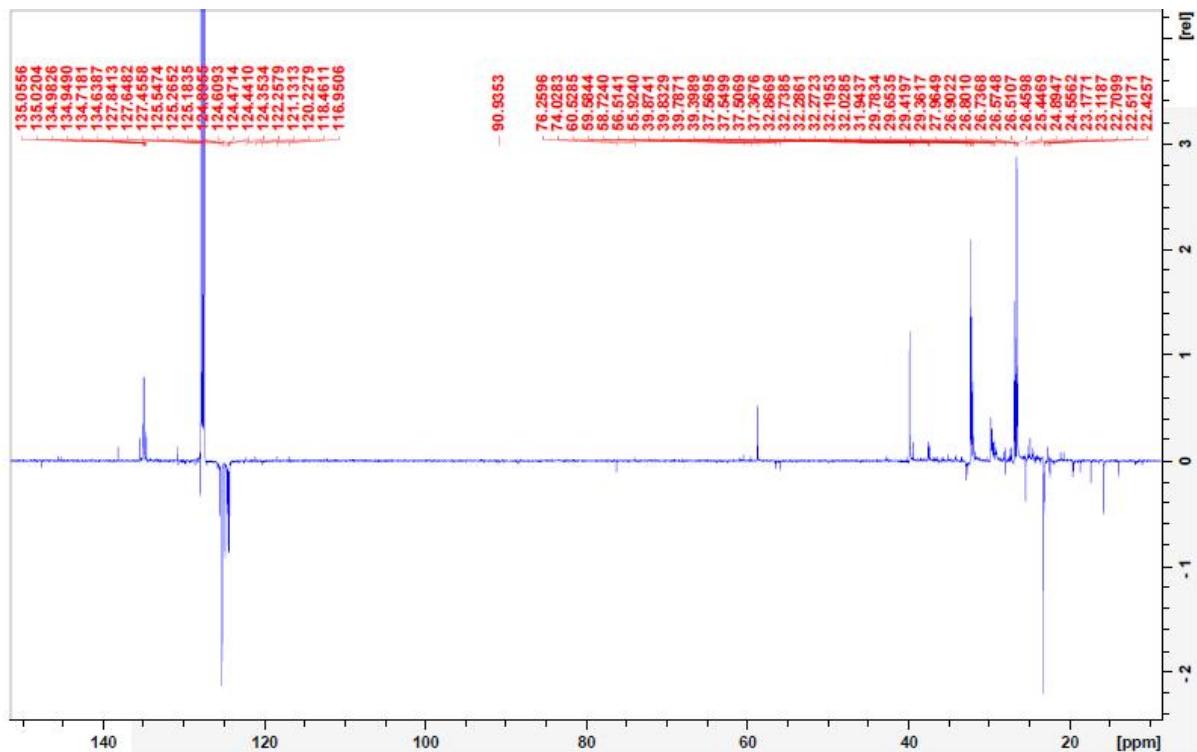
**Figura 9S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear.** Expansões do espectro  $^1\text{H}$  (500 MHz), em  $\text{C}_6\text{D}_6$ .- Parte 1



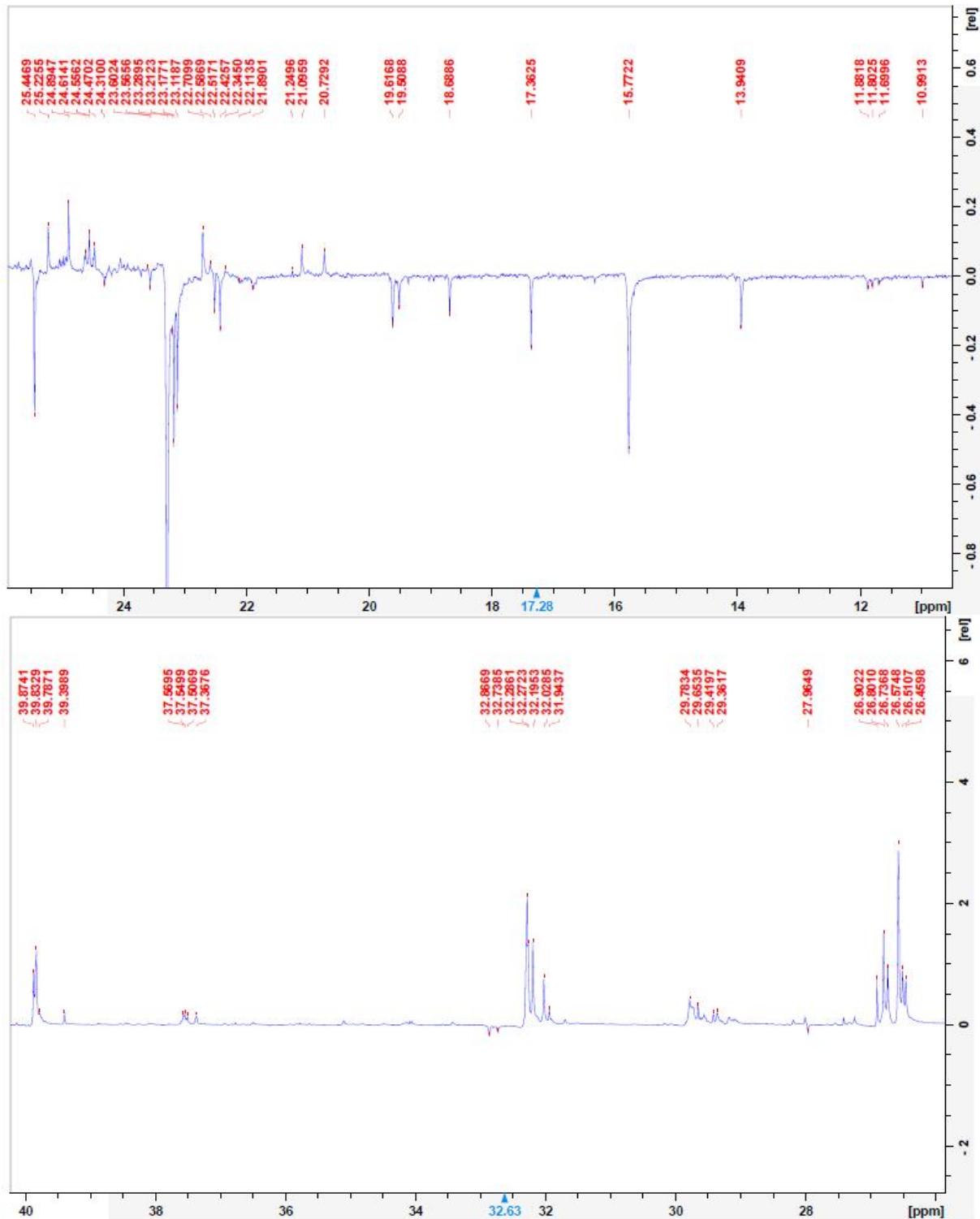
**Figura 10S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear.** Expansões do espectro  $^1\text{H}$  (500 MHz), em  $\text{C}_6\text{D}_6$ .- Parte 2



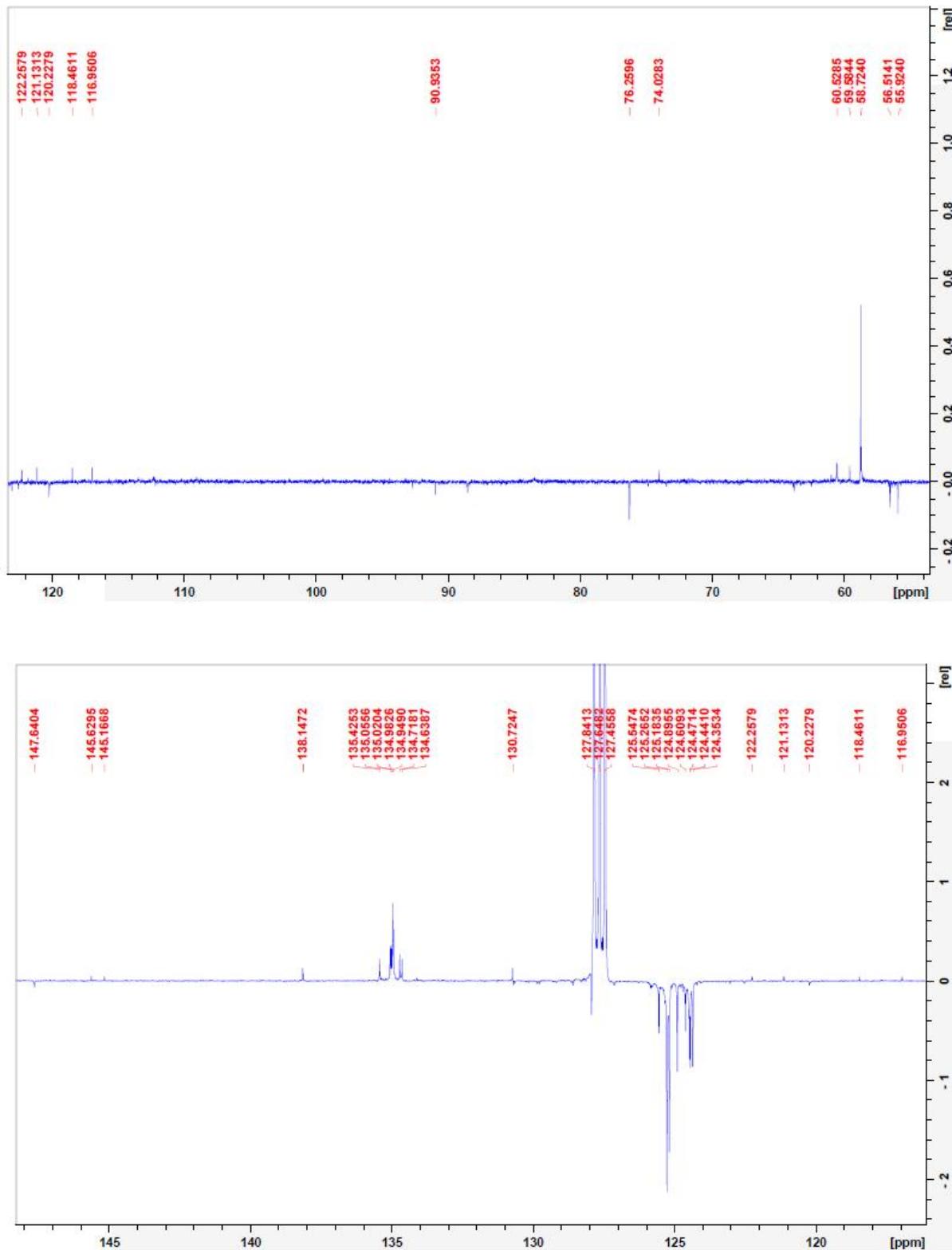
**Figura 11S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear. DEPT  $^{13}\text{C}$  (125 MHz), em  $\text{C}_6\text{D}_6$ .**



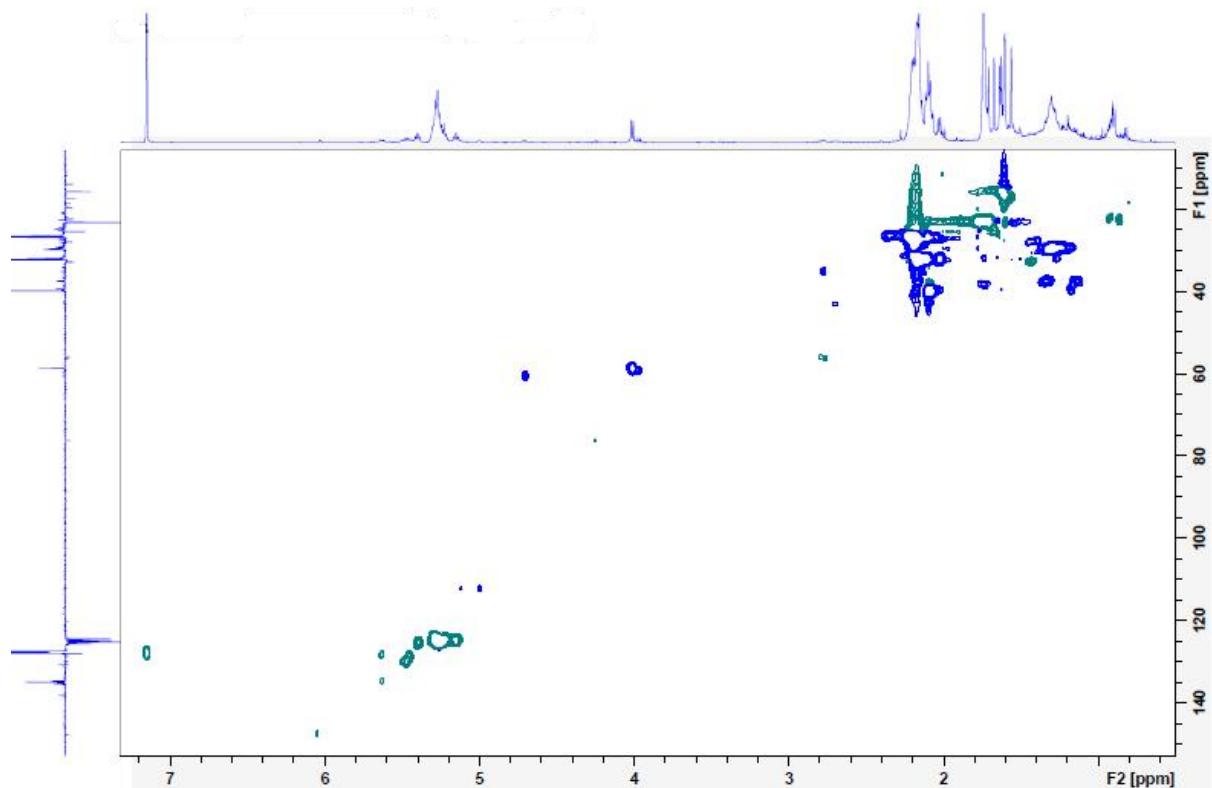
**Figura 12S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear.** Expansões do espectro de DEPT  $^{13}\text{C}$  (125 MHz), em  $\text{C}_6\text{D}_6$ . Parte 1



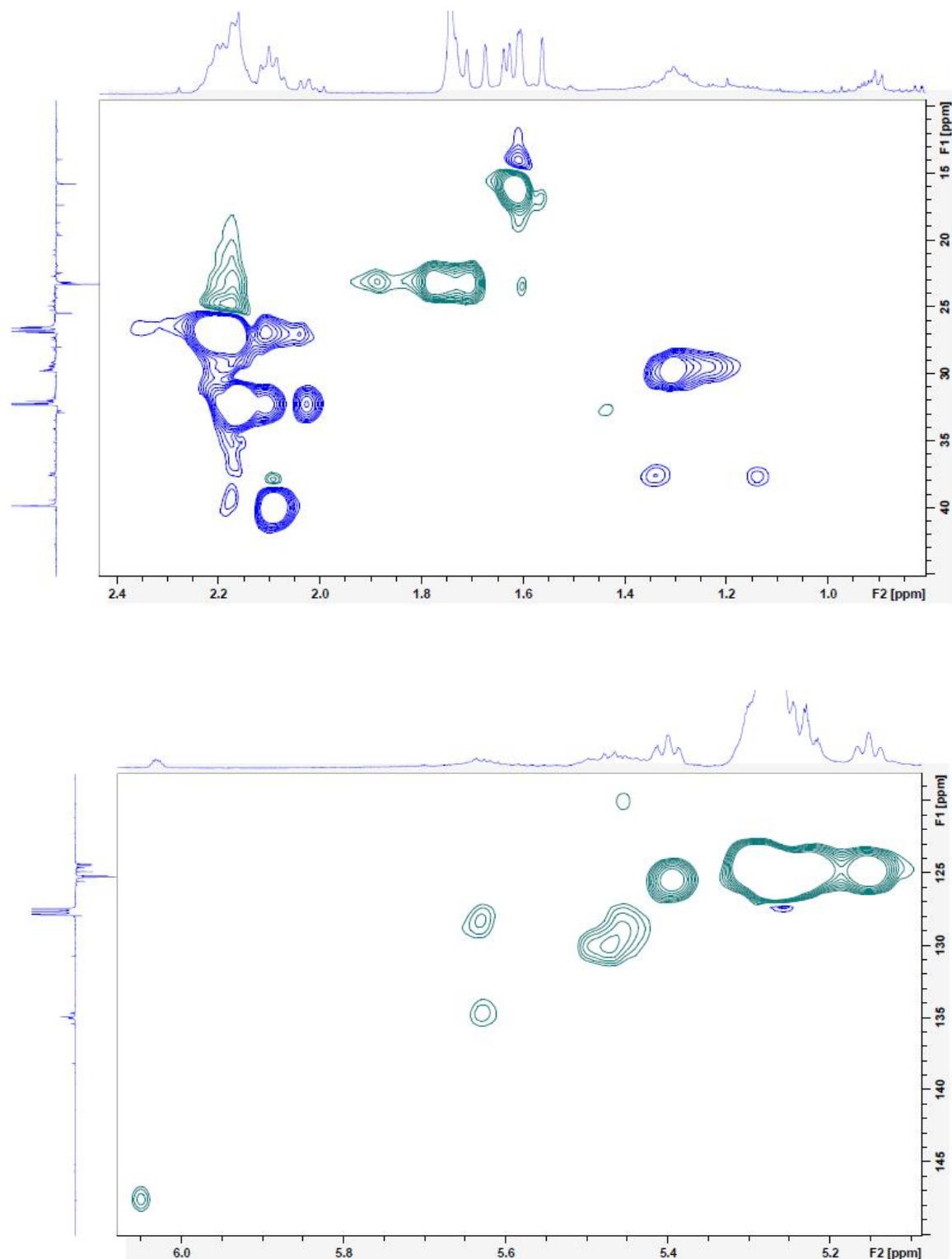
**Figura 13S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear.** Expansões do espectro de DEPT  $^{13}\text{C}$  (125 MHz), em  $\text{C}_6\text{D}_6$ . Parte 2



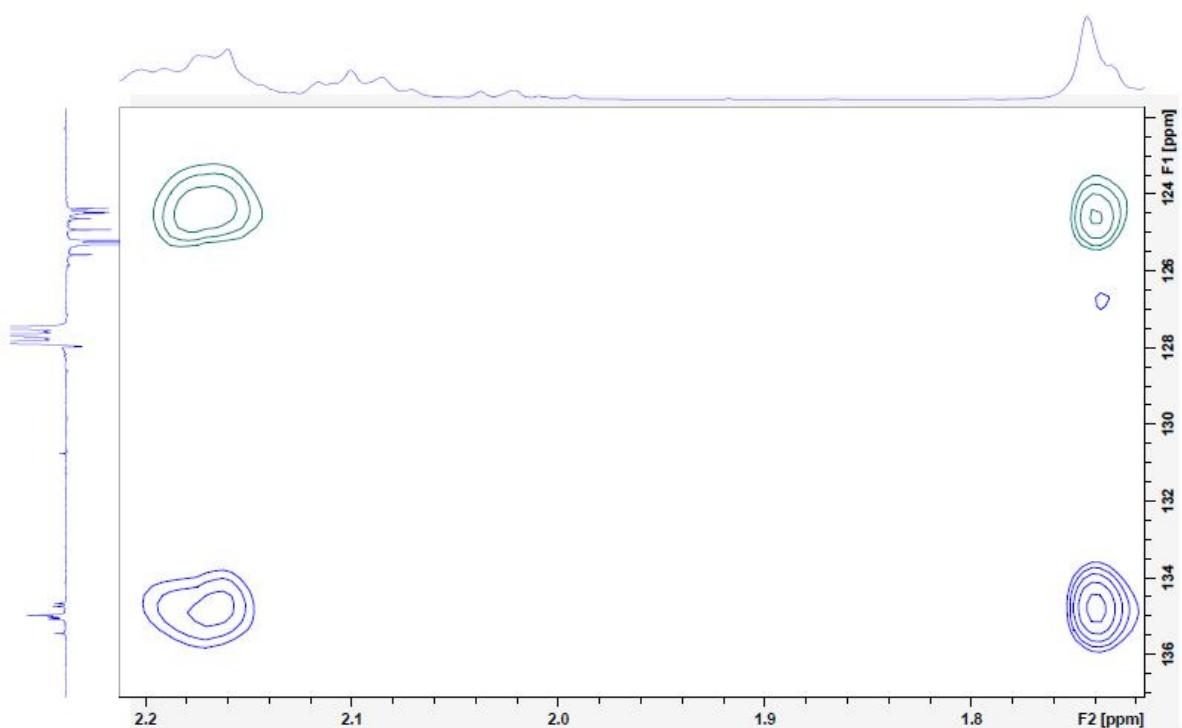
**Figura 14S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear.** Análise 2D- espectro HSQC (125 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.



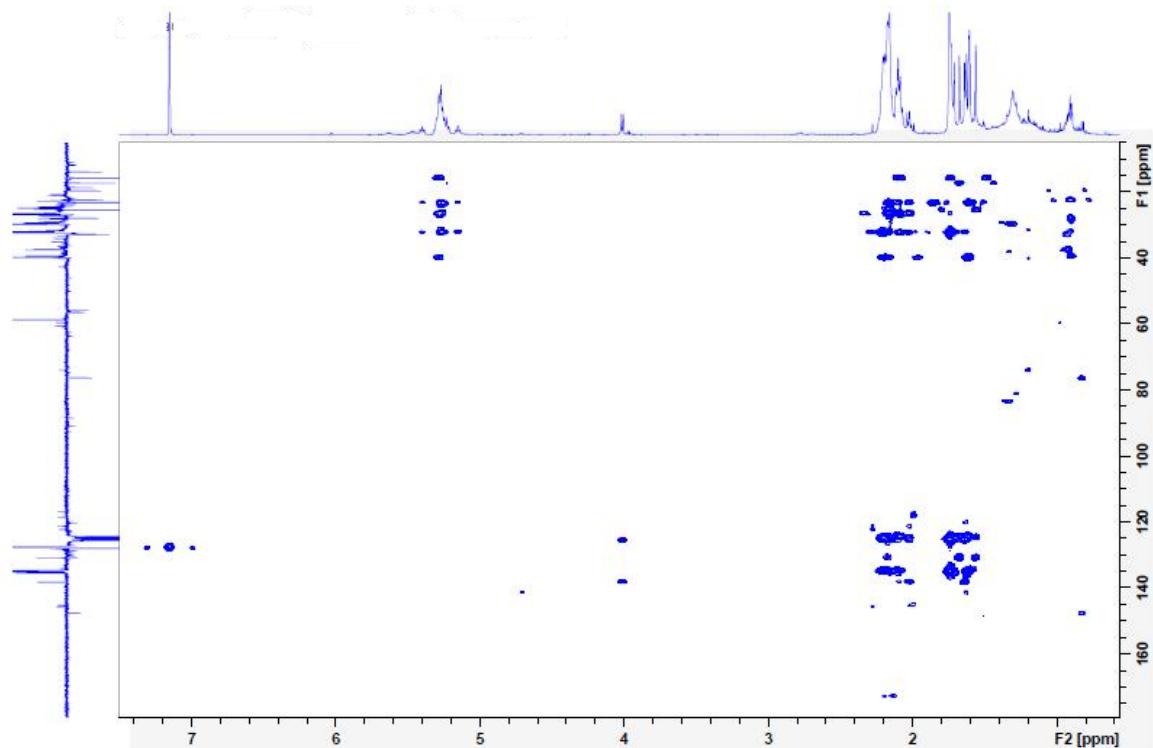
**Figura 15S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear.** Expansões do espectro HSQC (125 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>- Parte 1



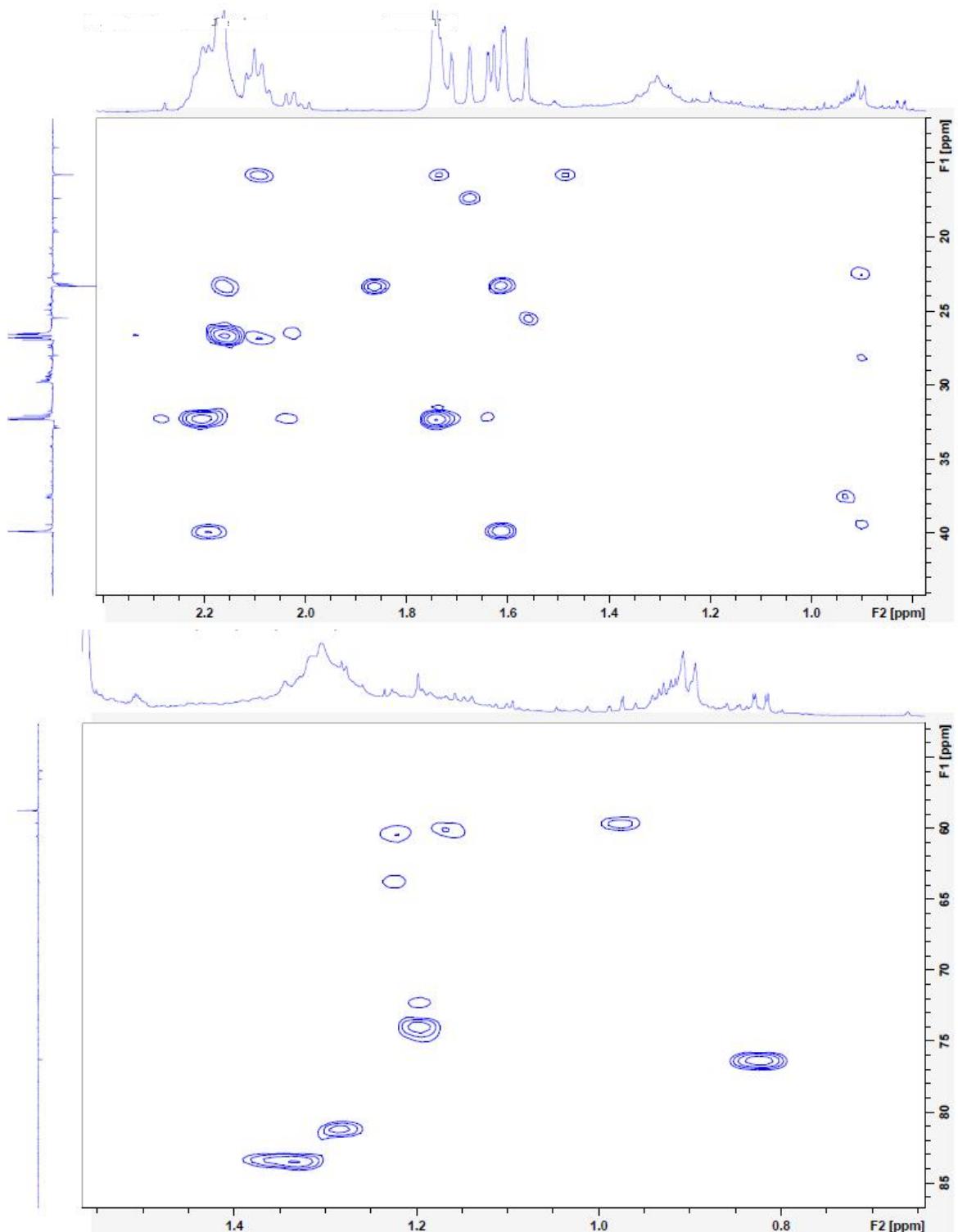
**Figura 16S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear.** Expansões do espectro HSQC (125 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.- Parte 2



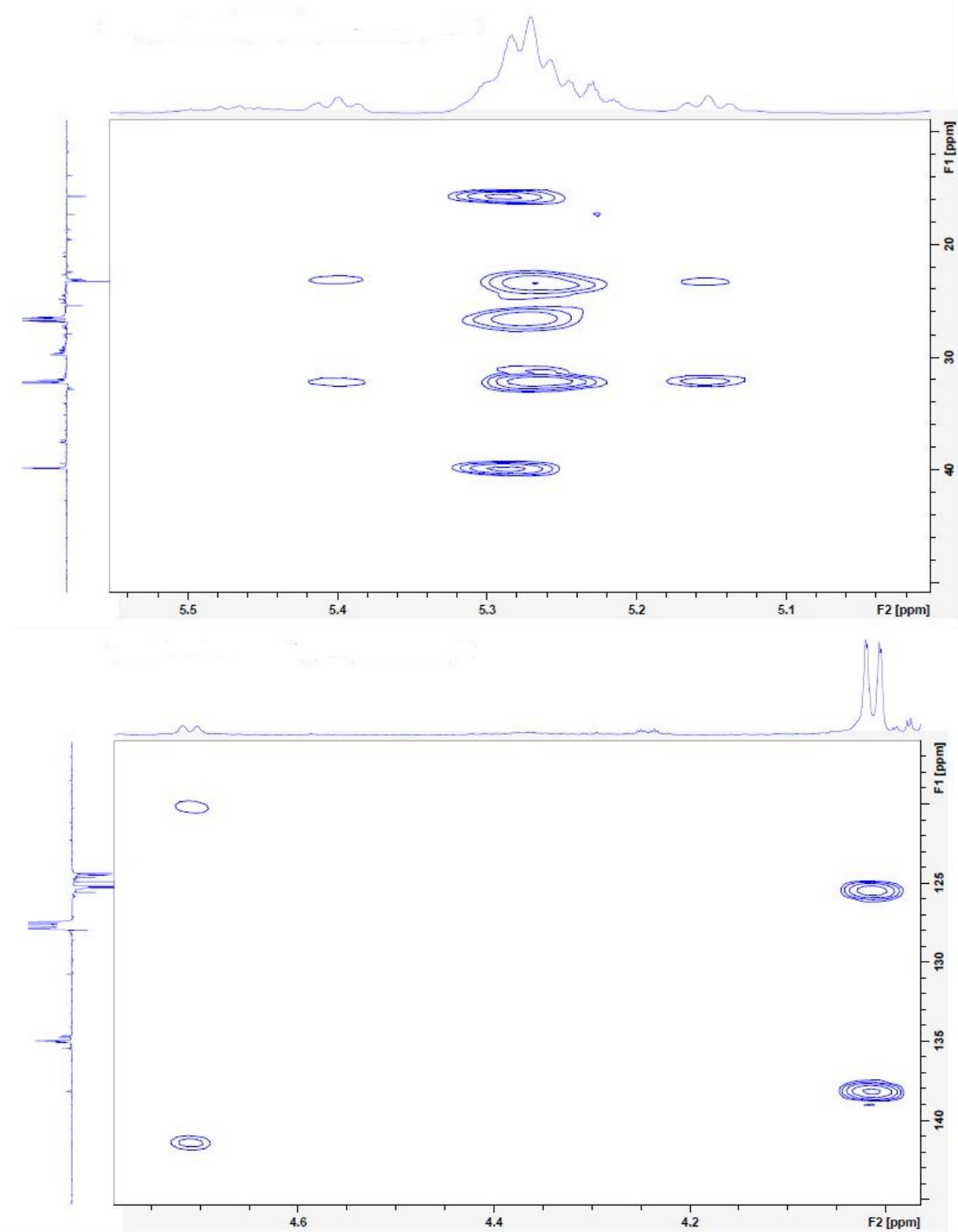
**Figura 17S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear.** Análise 2D- espectro HMBC (125 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.



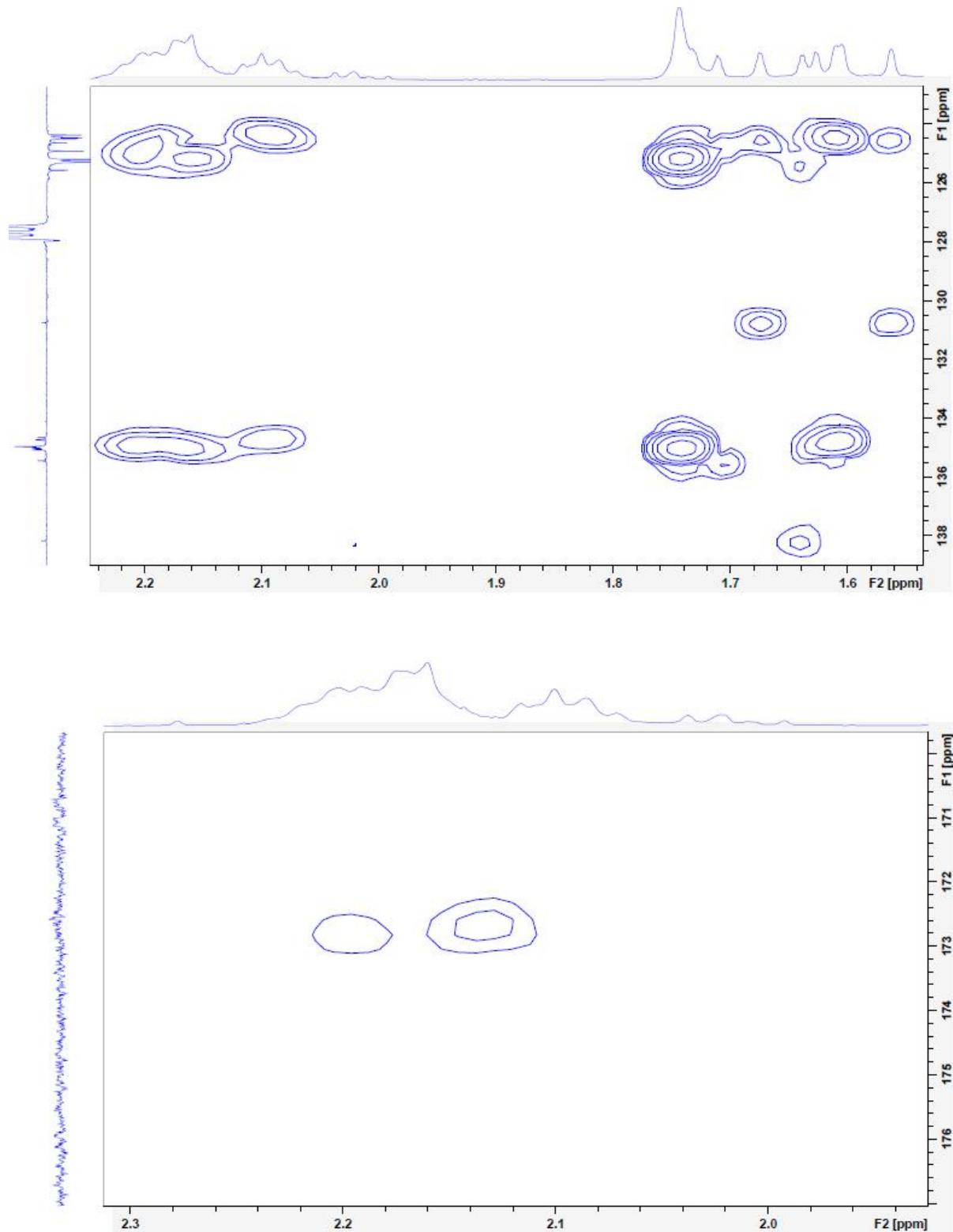
**Figura 18S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear. Expansões do HMBC(125 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.- Parte 1**



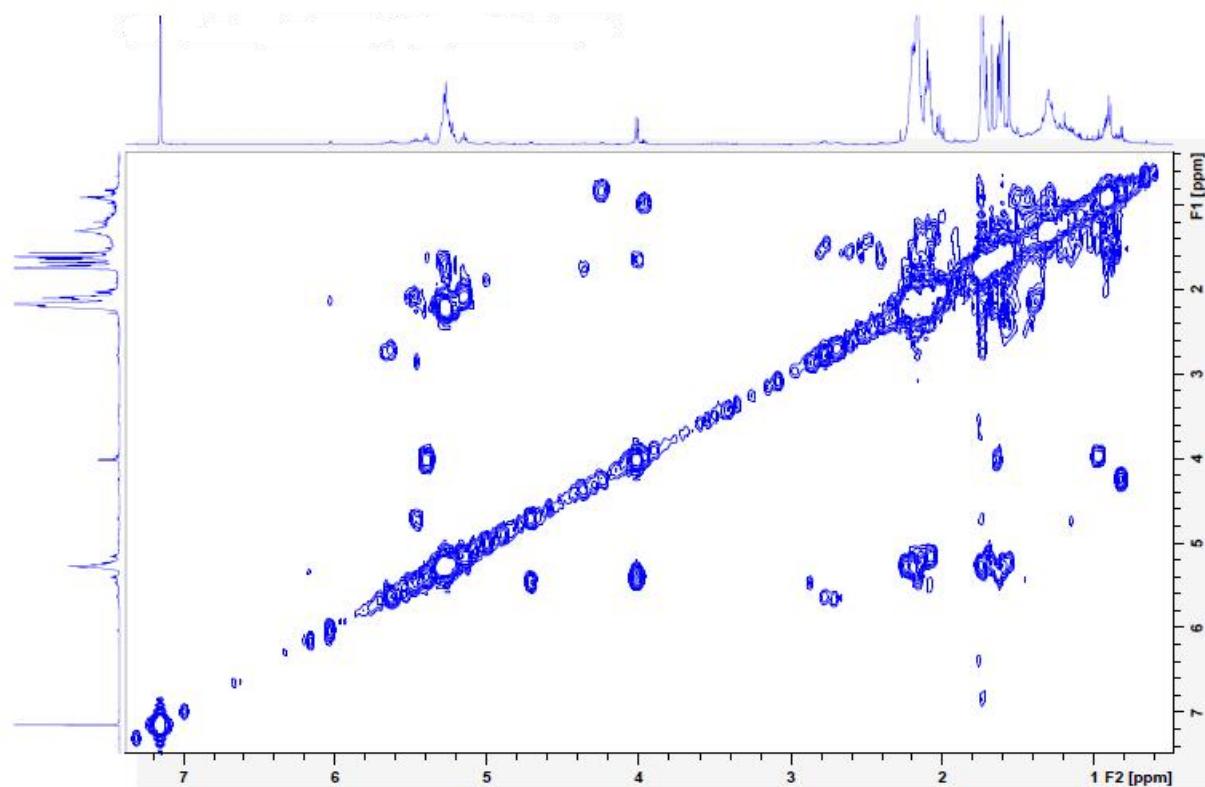
**Figura 19S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear.** Expansões do HMBC(125 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.- Parte 2



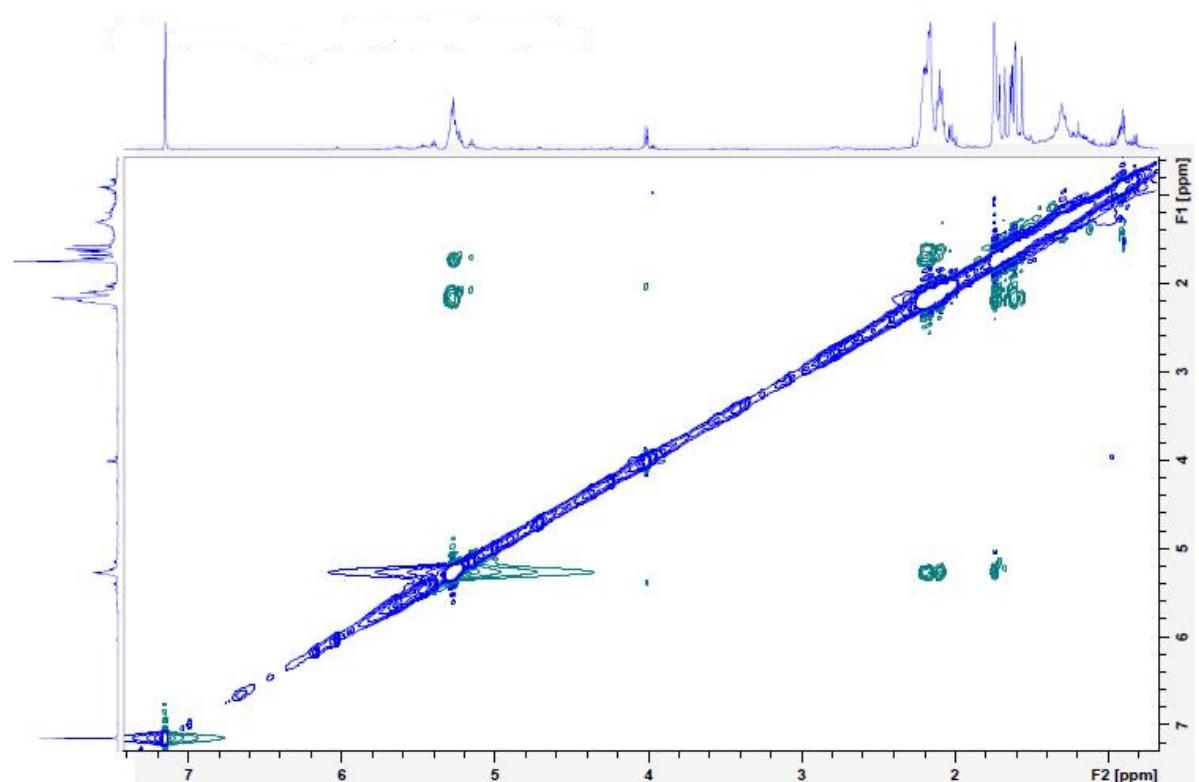
**Figura 20S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear.** Expansões do HMBC(125 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.- Parte 3



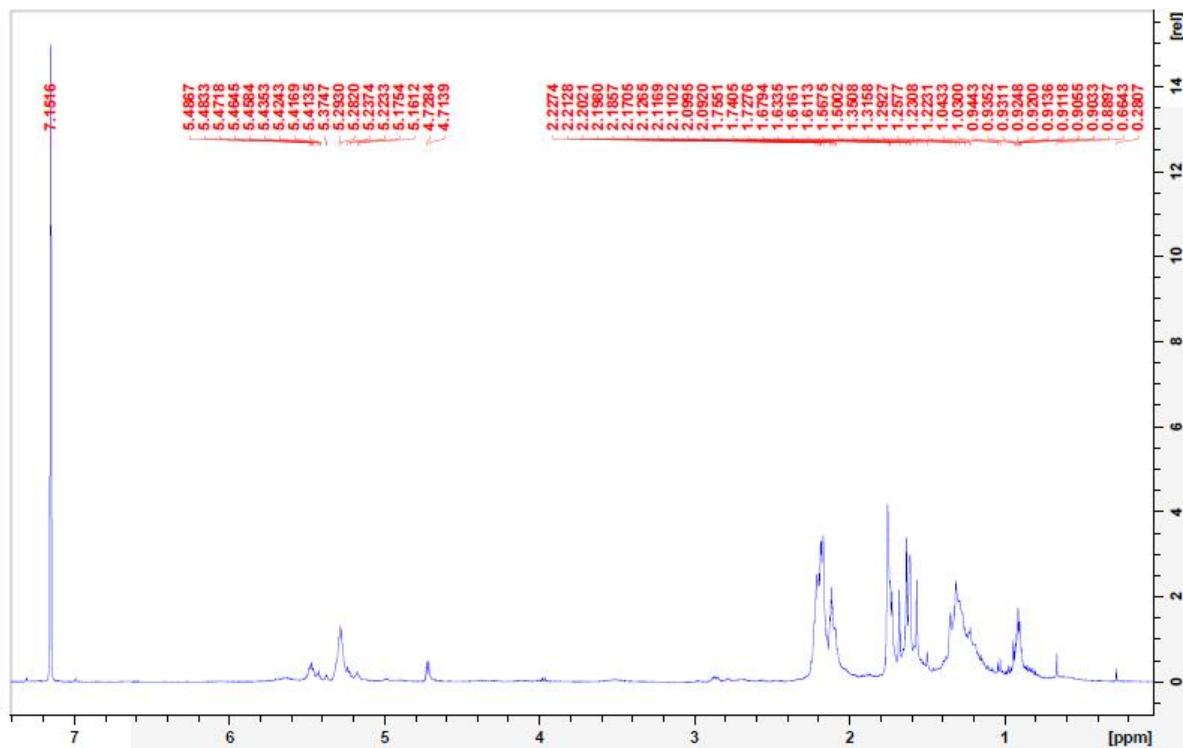
**Figura 21S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear.** Análise  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (500 MHz; 500MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.



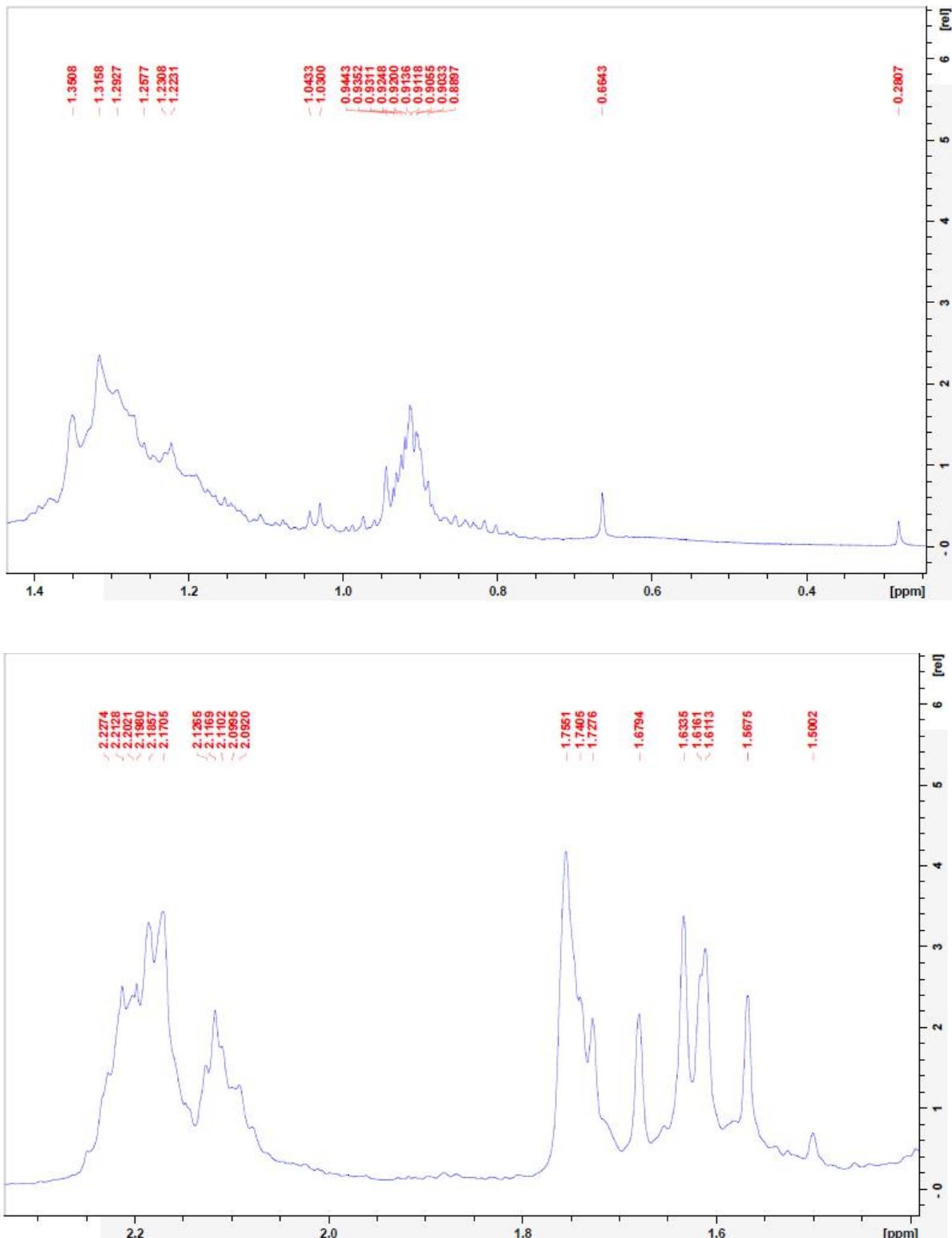
**Figura 22S - Análise do poliprenol 1 por Ressonância Magnética Nuclear.** Análise NOESY (500 MHz; 500 MH), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>



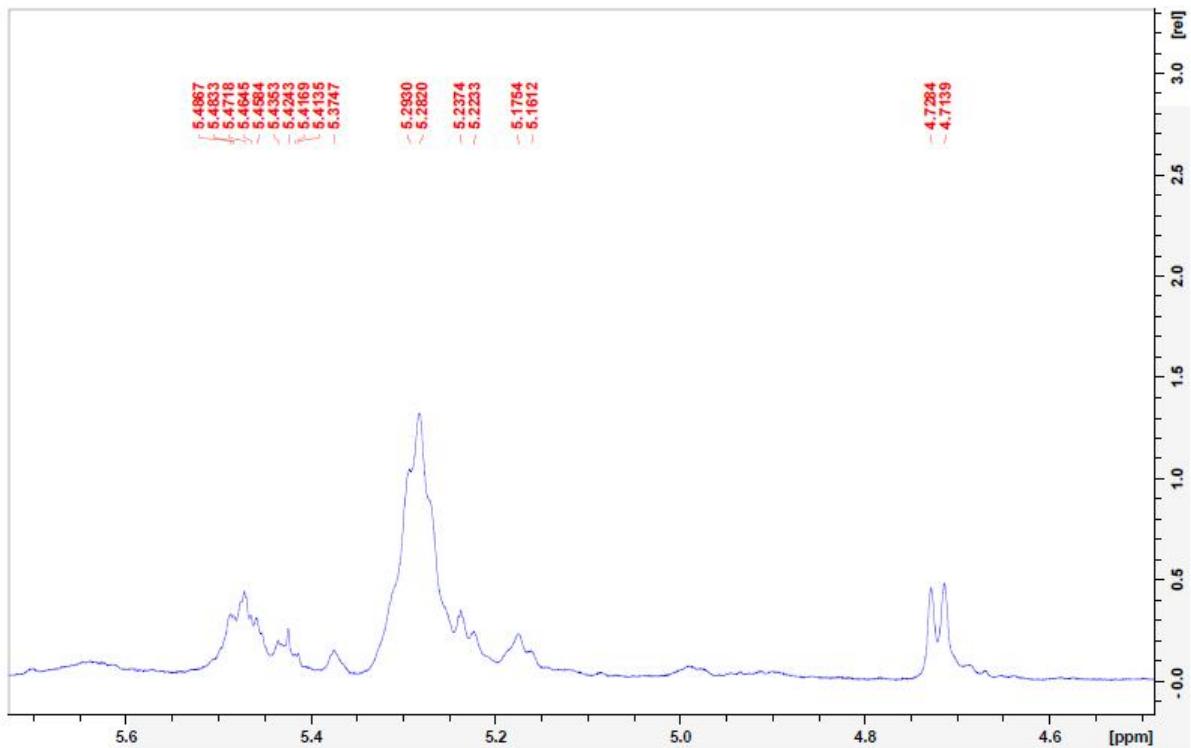
**Figura 23S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear.  $^1\text{H}$  (500 MHz), em  $\text{C}_6\text{D}_6$ .**



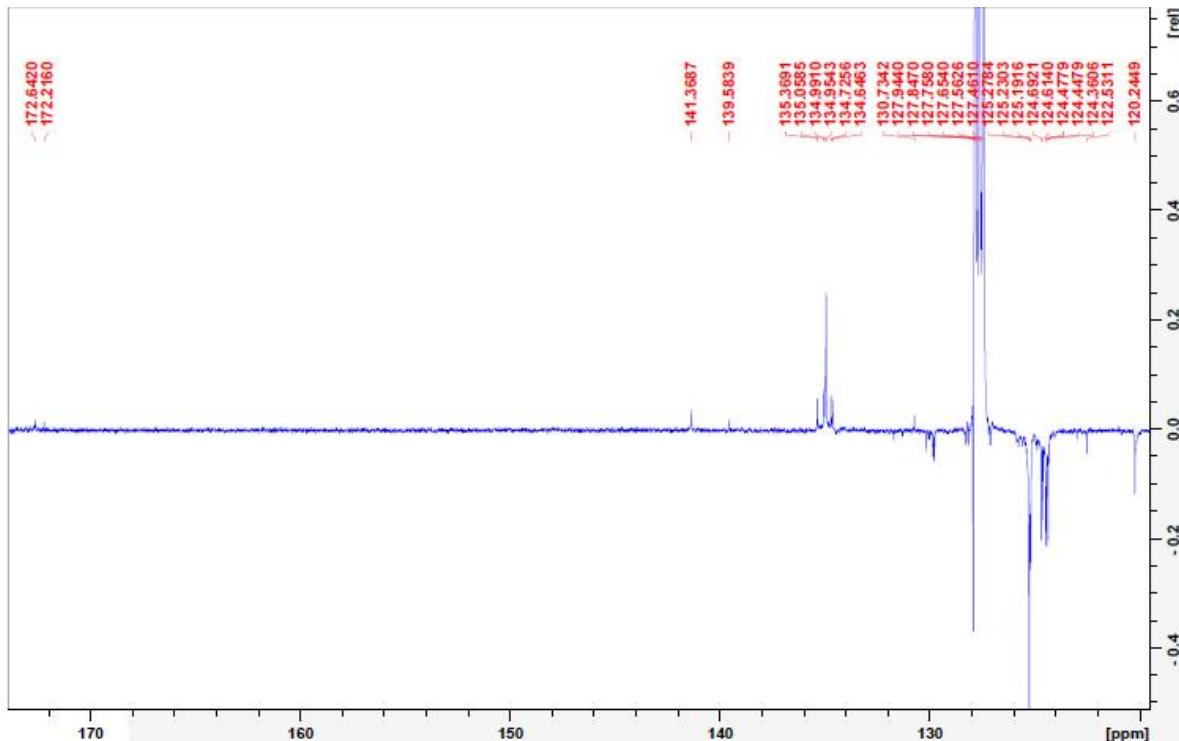
**Figura 24S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear.** Expansões do espectro  $^1\text{H}$  (500 MHz), em  $\text{C}_6\text{D}_6$ .- Parte 1



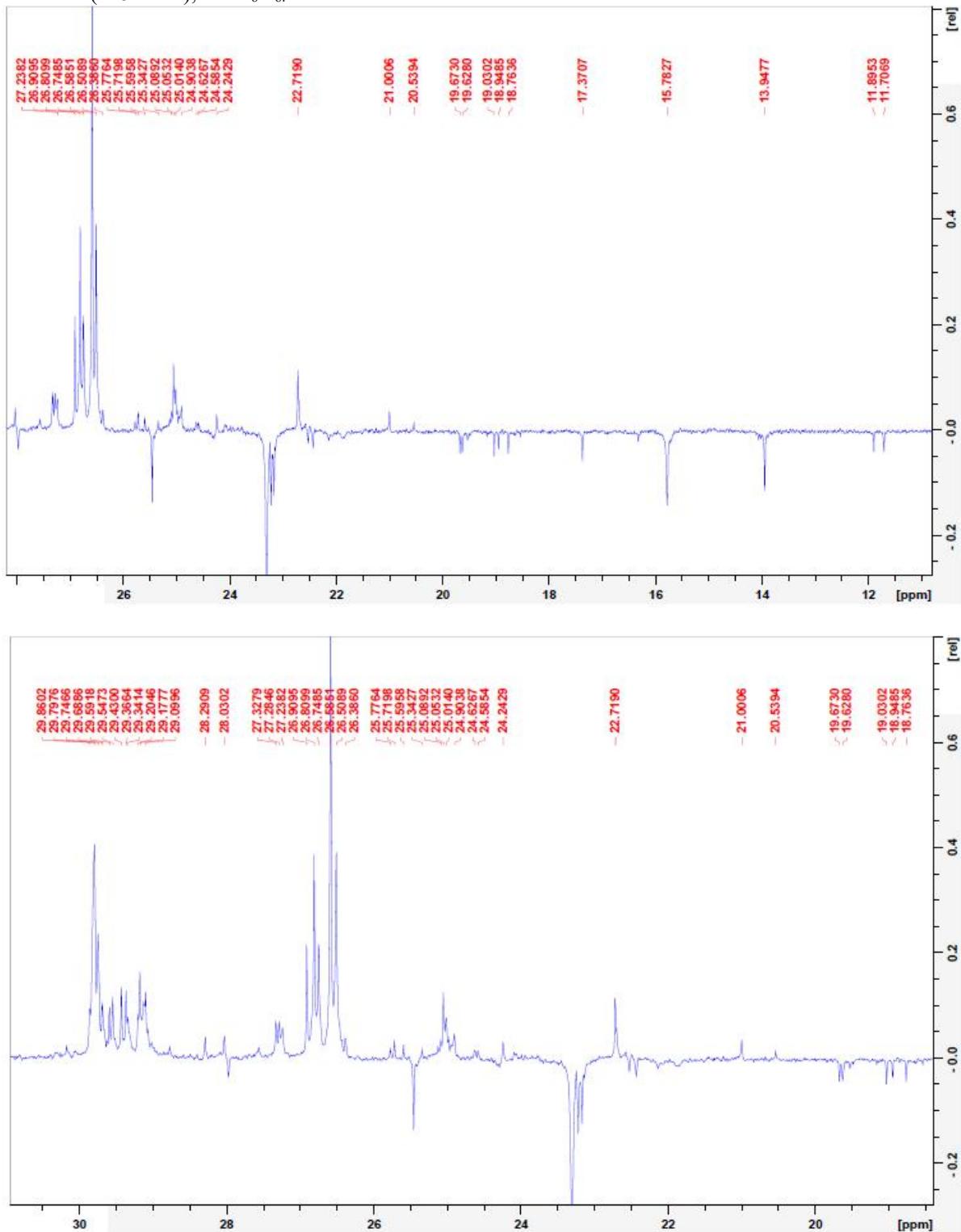
**Figura 25S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear.** Expansões do espectro  $^1\text{H}$  (500 MHz), em  $\text{C}_6\text{D}_6$ .- Parte 2



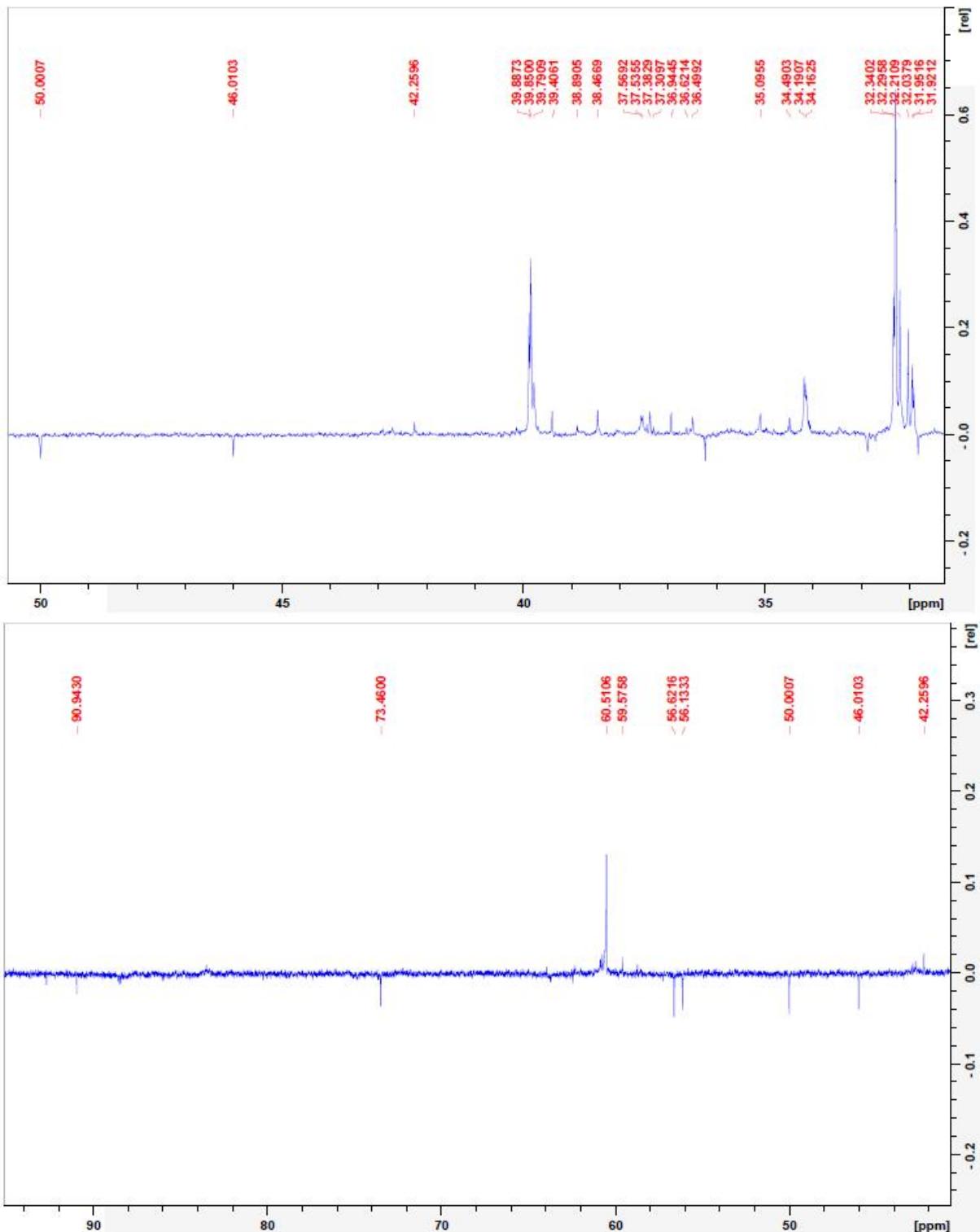
**Figura 26S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear. Expansões do DEPT  $^{13}\text{C}$  (125 MHz), em  $\text{C}_6\text{D}_{6,-}$ .**



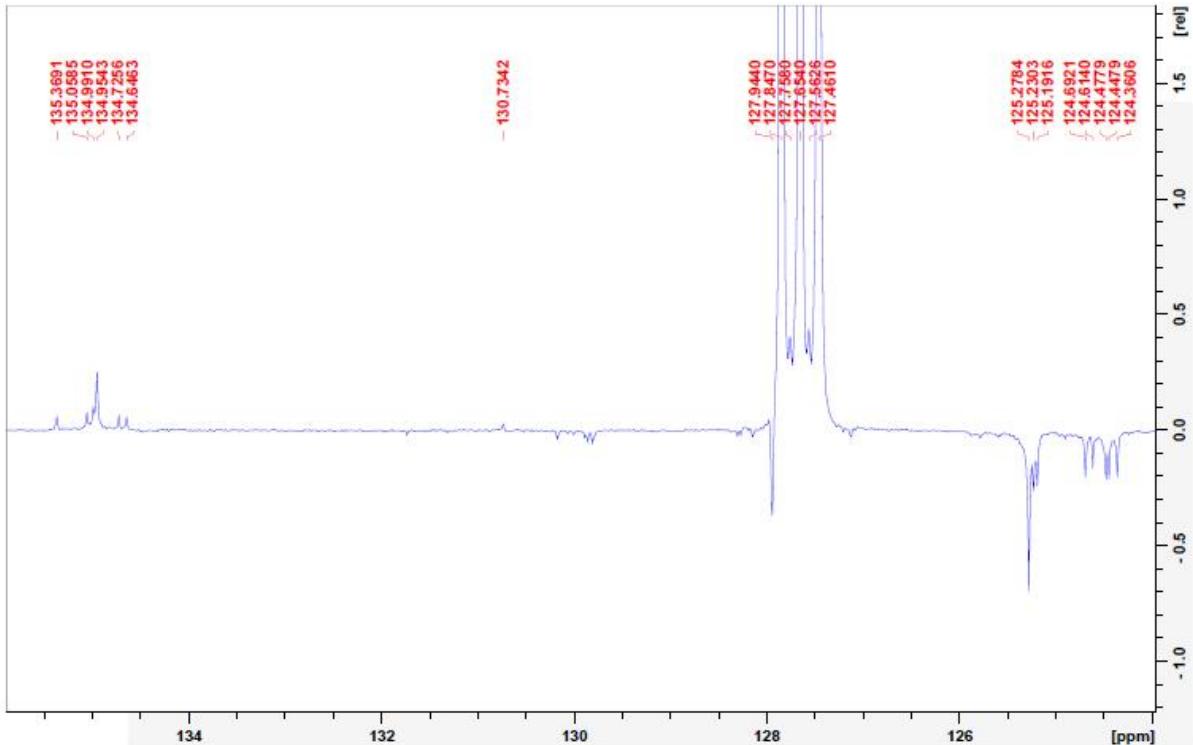
**Figura 27S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear.** Expansões do espectro de DEPT  $^{13}\text{C}$  (125 MHz), em  $\text{C}_6\text{D}_6$ .- Parte 1



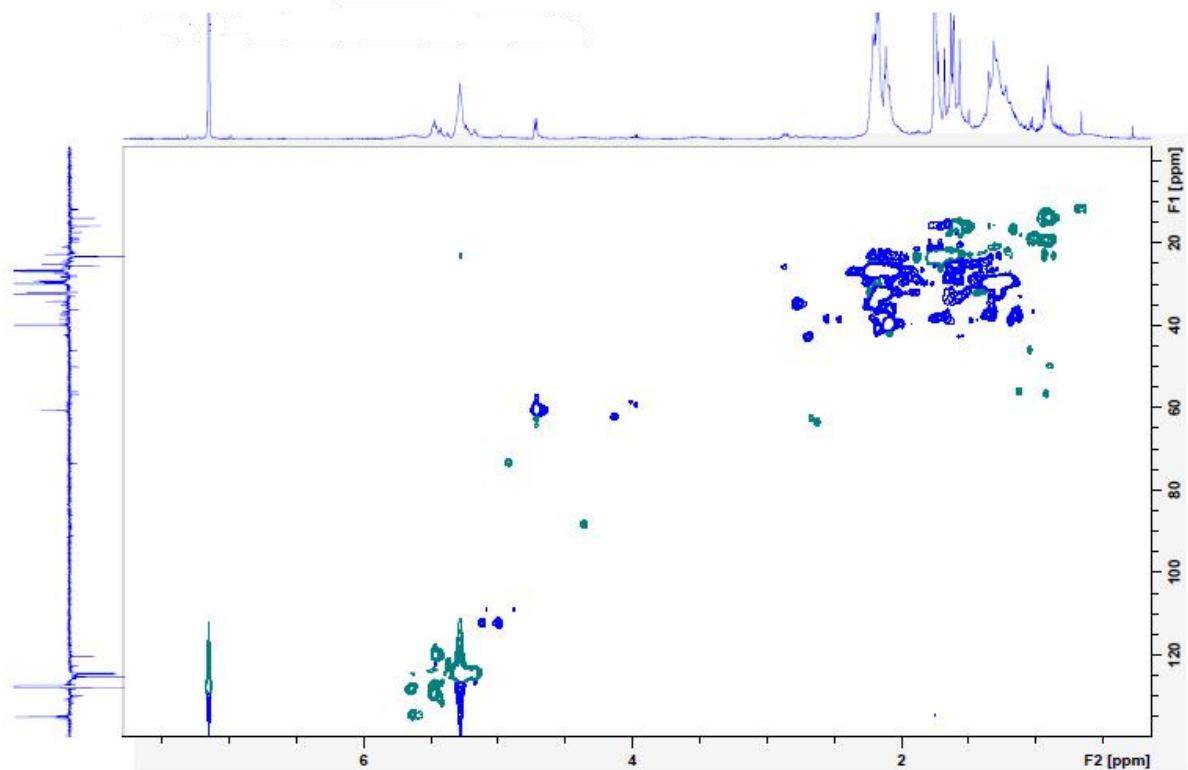
**Figura 28S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear.** Expansões do espectro de DEPT  $^{13}\text{C}$  (125 MHz), em  $\text{C}_6\text{D}_6$ . Parte 2



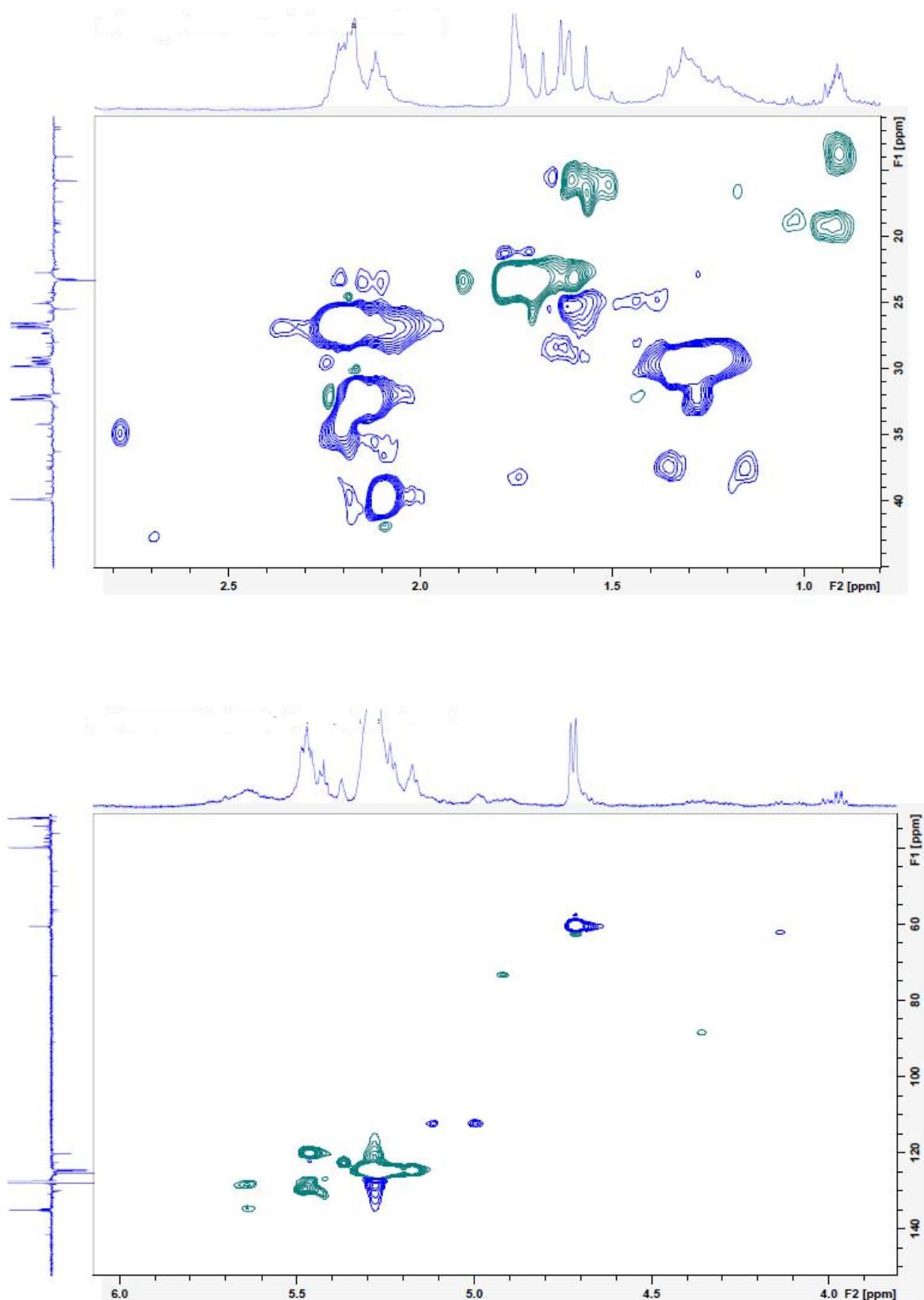
**Figura 29S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear.** Expansões do espectro de DEPT  $^{13}\text{C}$  (125 MHz), em  $\text{C}_6\text{D}_6$ . Parte 3



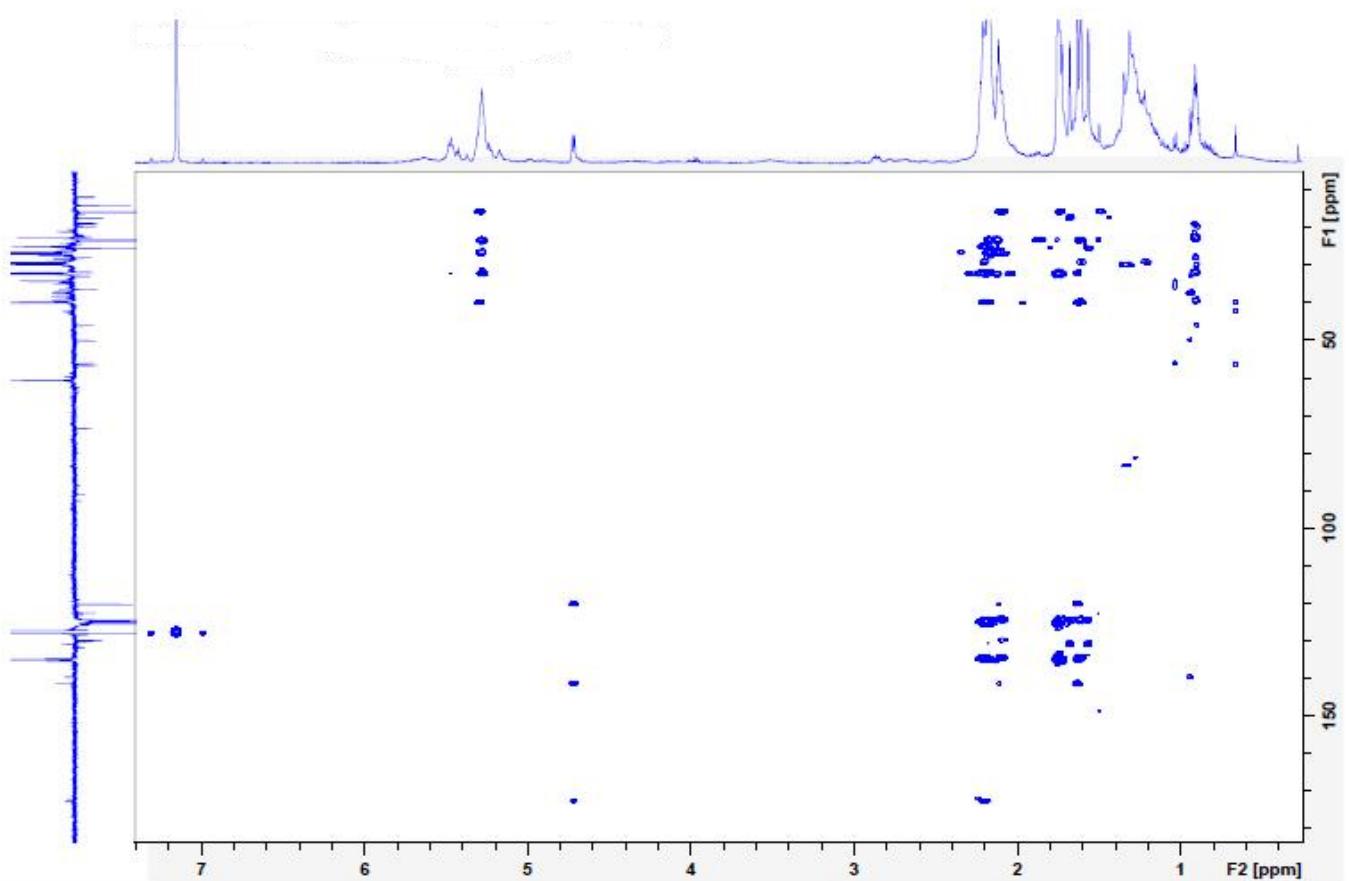
**Figura 30S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear.** Análise 2D- espectro HSQC (125 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.



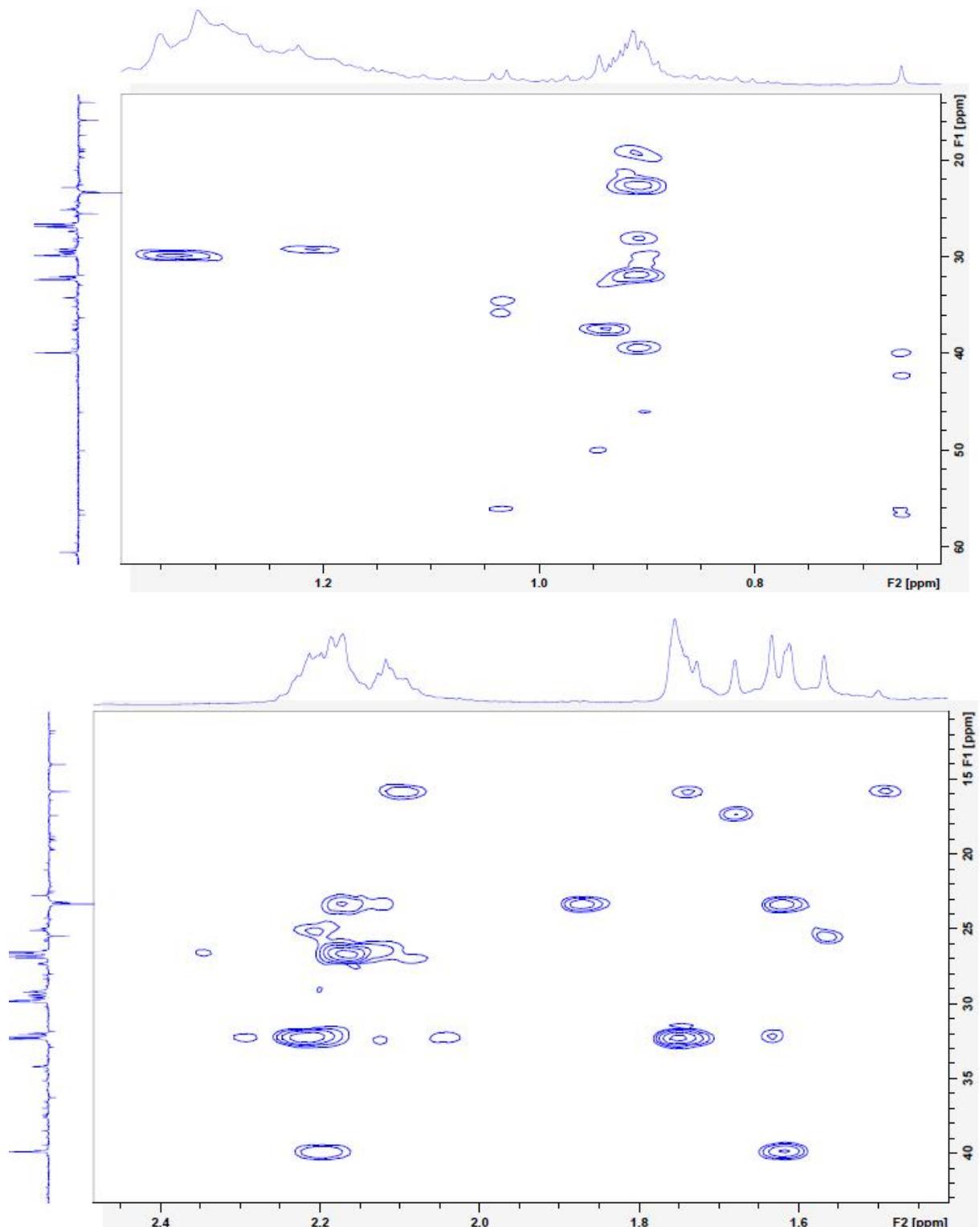
**Figura 31S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear.** Expansões do espectro HSQC (125 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>- Parte 1



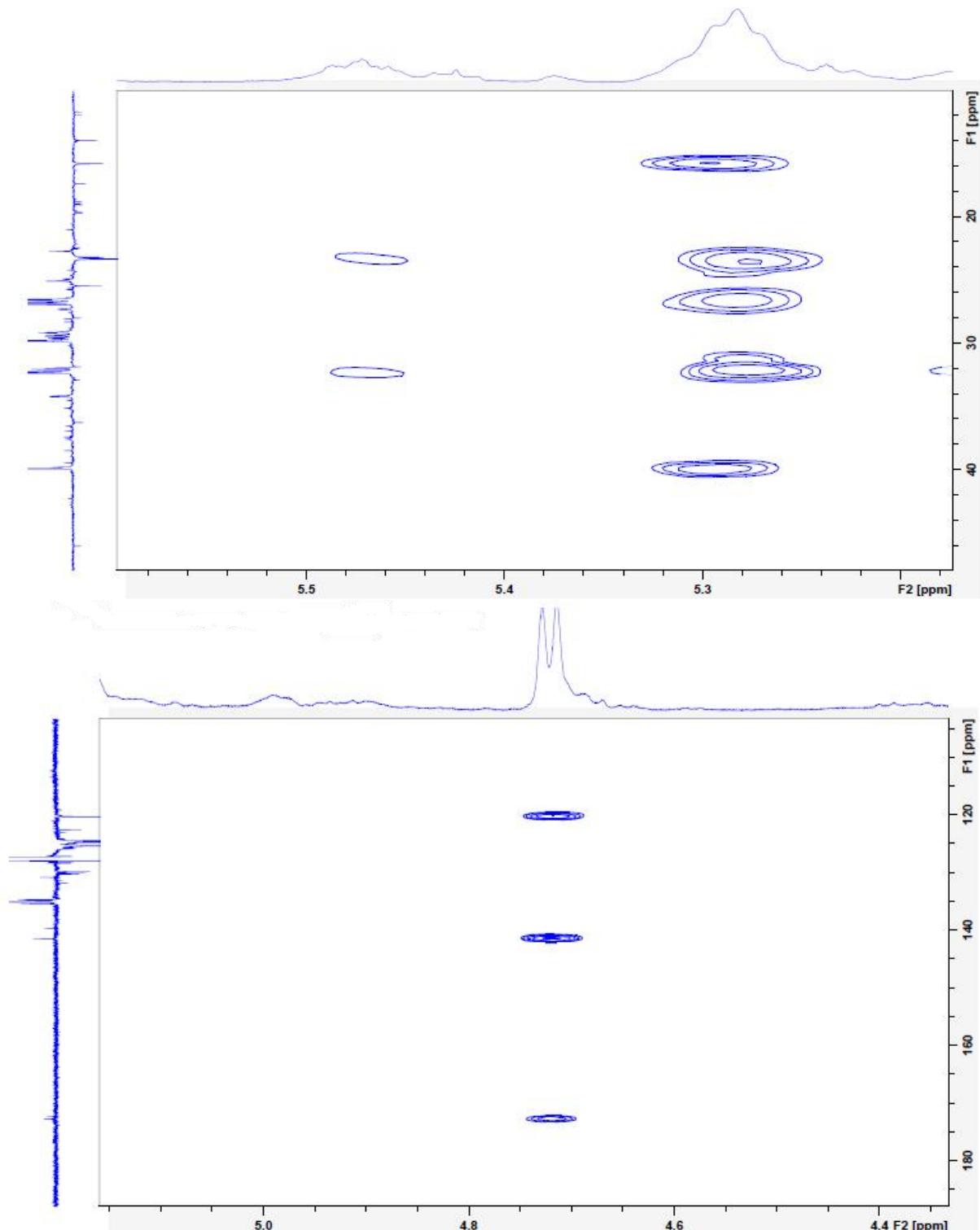
**Figura 32S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear.** Análise 2D- espectro HMBC (125 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.



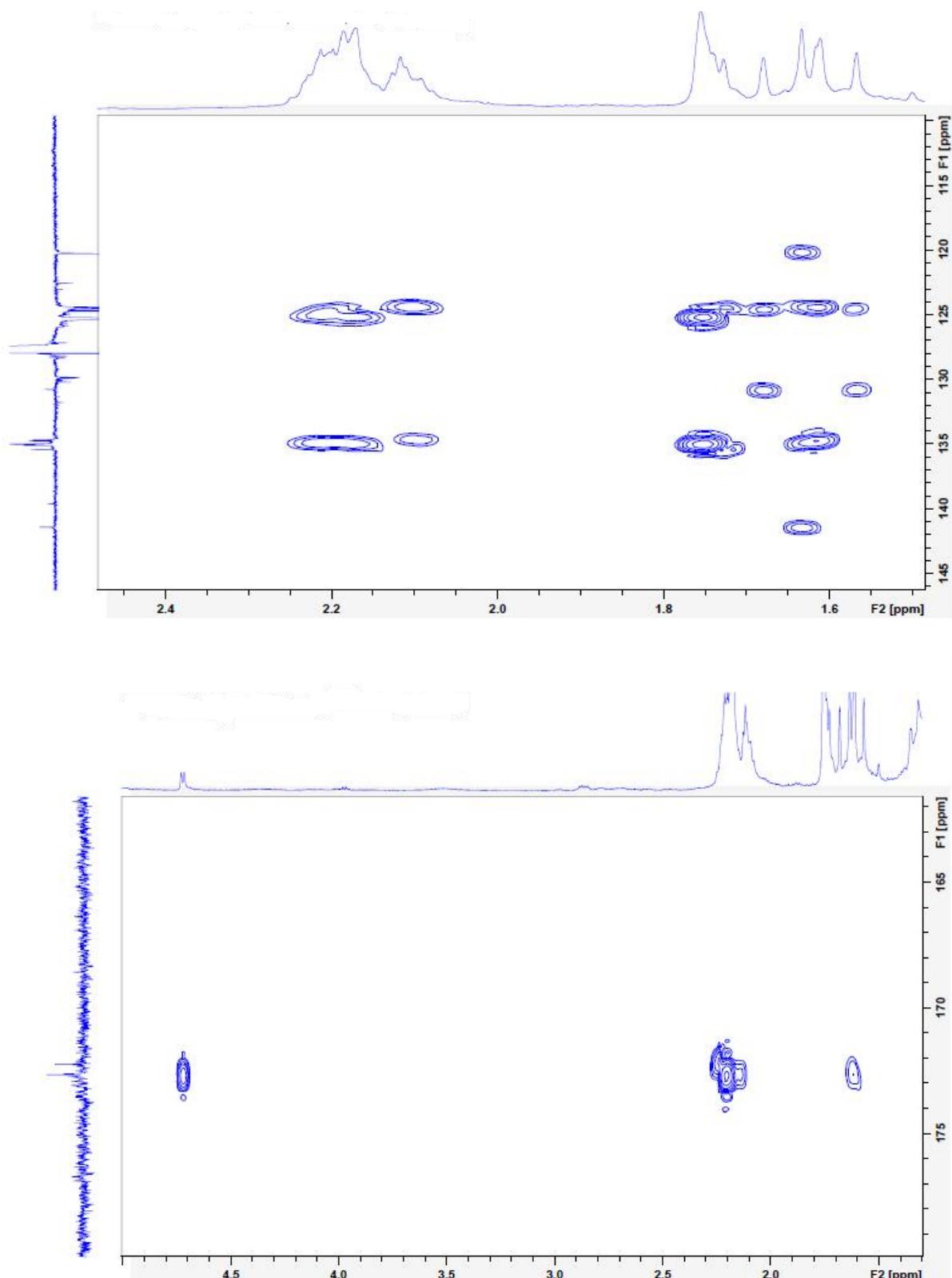
**Figura 33S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear.** Expansões do HMBC(125 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.- Parte 1



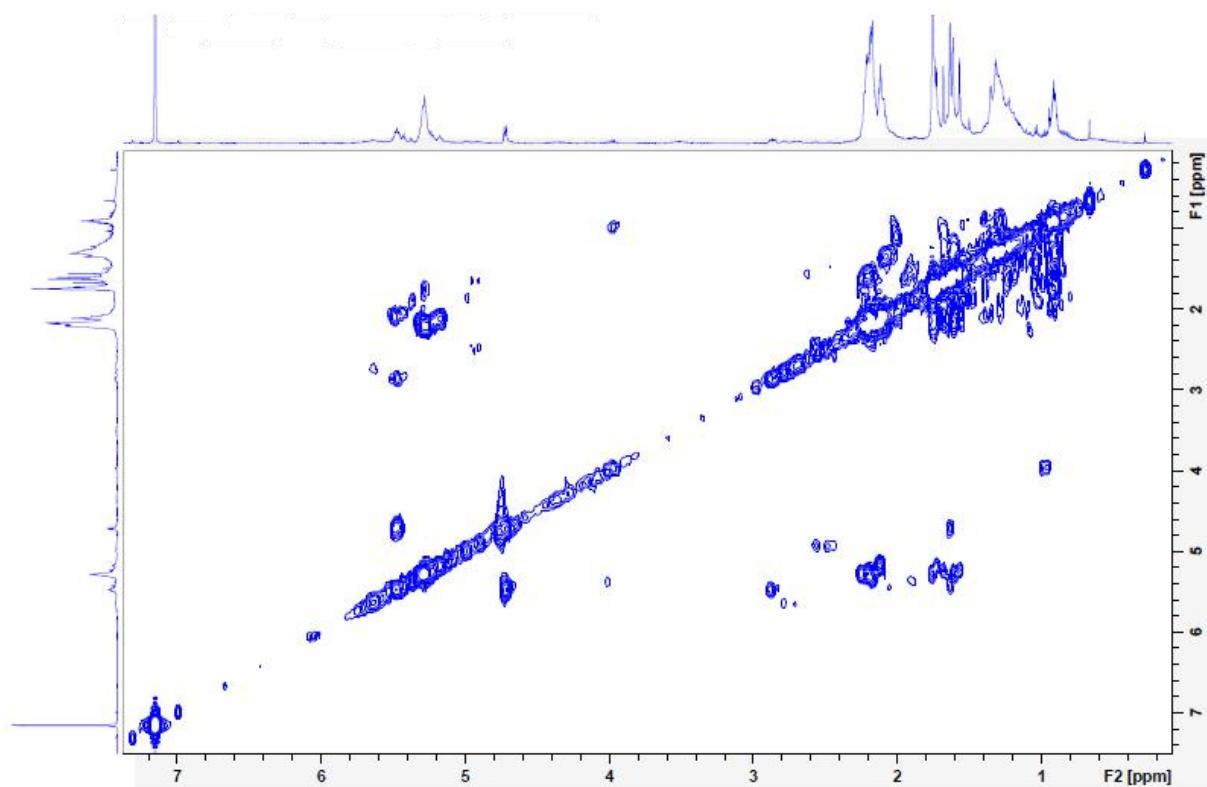
**Figura 34S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear.** Expansões do HMBC(125 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.- Parte 2



**Figura 35S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear.** Expansões do HMBC(125 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.- Parte 3



**Figura 36S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear.** Análise COSY (500 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.



**Figura 37S - Análise do poliprenol 2 por Ressonância Magnética Nuclear.** Análise NOESY (500 MHz; 500 MHz), em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>.

