**Investigação *in silico* de candidatos da espécie *Annona coriacea* com efeito no sistema nervoso central**

Túlio Nunes Pinto\* e Leonardo Luiz Borges \*, †, ‡.

*\*Escola de Ciências Médicas e da Vida*

*Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Brasil*

*† Campus Central, Unidade Universitária de Anápolis*

*Universidade Estadual de Goiás, Brasil*

*‡* [*leonardo.cbb@pucgoias.edu.br*](mailto:leonardo.cbb@pucgoias.edu.br)

**Resumo:** *Annona coriacea,* conhecida por nomes como “araticum”, “araticum liso” e “marolo”, é uma planta popularmente utilizada por suas propriedades antiprotozoária, antirreumática, anti-helmíntica e anti-inflamatórias, entre outras. Estudos com camundongos mostraram atividade ansiolítica e antidepressiva. Nesse estudo, procuramos identificar e elucidar os potenciais mecanismos envolvidos nas atividades supracitadas. O método de escolha empregado para predizer atividade biológica, farmacodinâmica e toxicidade foi o uso de ferramentas *in silico*. Além disso, foi performado *docking* e *redocking*. Dentre 28 compostos elegíveis, 2 foram os mais promissores, a trigonelina e o ácido gálico. Este estudo abre perspectivas para estudos *in vitro* e *in vivo* com essas estruturas isoladas.

**Palavras-chaves:** Trigonelina; ácido gálico; *docking* molecular; produtos naturais.

**Abstract:** *Annona coriacea*, known by names such as "araticum", "araticum smooth" and "marolo", is a plant popularly used for its antiprotozoal, antirheumatic, anthelmintic, and anti-inflammatory properties, among others. Studies with mice showed anxiolytic and antidepressant activity. This study sought to identify and elucidate the potential mechanisms involved in the activities above. The method of choice employed to predict biological activity, pharmacodynamics, and toxicity was *in silico* tools. In addition, docking and redocking were performed. Among 28 eligible compounds, 2 were the most promising, trigonelline and gallic acid. This study opens perspectives for *in vitro* and *in vivo* studies with these isolated structures.

**Keywords:** Trigonellin; gallic acid; molecular docking; natural products.

**INTRODUÇÃO**

A espécie *Annona coriacea,* popularmente conhecida como “araticum”, “araticum-liso” e “marolo”, é uma árvore pequena, da família Annonaceae, comumente encontrado nas regiões norte, nordeste, centro-oeste e sudeste do Brasil. No entanto, pode ser encontrado em outros países como Paraguai, Bolívia e nos trópicos do continente africano. Popularmente, essa espécie é utilizada na produção de soluções caseiras com a finalidade antiprotozoária, antirreumática, anti-helmíntica e anti-inflamatórias, assim como neuralgias, cefaleias. Além disso, alguns estudos indicam que algumas espécies do gênero possuem propriedades ansiolítica e antidepressiva (MONTEIRO et al., 2020)(NOGUEIRA DA SILVA AVELINO OLIVEIRA ROCHA et al., 2021).

Estudos realizados nos últimos 20 anos foram capazes de isolar substâncias que possivelmente são responsáveis pelos efeitos supracitados, entre eles são dignos de nota as acetogeninas, alguns alcaloides, diterpenos e componentes fenólicos e flavonoides. Dentre as duas últimas categorias citadas, temos os compostos: ácido gálico, cafeico, p-cumárico, catequina, epicatequina, rutina, quercitrina, quercetina e luteolina, que são de interesse por seus prováveis efeitos antidepressivos e ansiolíticos (NOGUEIRA DA SILVA AVELINO OLIVEIRA ROCHA et al., 2021).

Os transtornos psiquiátricos (TP) são doenças caracterizadas por alterações emocionais, cognitivas, motivacionais e de socialização. Possuem grande caráter hereditário, sendo fatores genéticos responsáveis por 20 a 90% da vulnerabilidade para essas doenças. Em decorrência de sua prevalência, início precoce e persistência, eles contribuem significativamente para esses distúrbios em todo o mundo (SARACENO, 2005).

Segundo o estudo de Carga Global de Doença realizado em 2010, os TP foram responsáveis por 7,4% do total de anos de vida ajustados por incapacidade (DALY- Disability-adjusted Life Year) e 22,9% do total de anos vividos em incapacidade (YLD – Years Lived with Disability), tornando-se a quinta principal causa de DALY e a primeira causa de YLD no mundo (BONADIMAN et al., 2017). Segundo pesquisas feitas recentemente pela Organização Mundial de Saúde (WHO) indicam que aproximadamente 700 milhões de pessoas no mundo sofrem algum transtorno mental e problemas relacionados com abuso de drogas e álcool e isso vem causando grande sofrimento para o indivíduo na sua vida social, individual e familiar (LEONARDO et al., 2017).

Diante disso, torna-se de interesse médico a criação de novos fármacos para que se possa ampliar o leque de opções terapêuticas que podem ser empregadas no tratamento desses distúrbios. Para a pesquisa de novas substâncias com possível atividade farmacológica, é consagrado o uso de ferramentas *in silico.* O desenho de protótipos de fármacos *in silico* envolve desde o estudo da relação estrutura-atividade (SAR), até estudos que consideram a farmacocinética (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) dos compostos (ADME). A vantagem dos estudos *in silico* é a velocidade de execução, o baixo custo e a capacidade de reduzir o uso de animais de laboratório (GERALDES, 2019) (DU et al., 2020) (PINZI; RASTELLI, 2019).

Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi a investigação de novos candidatos com atividades em TP obtidos da *Annona coriacea* empregando ferramentas *in silico*.

**METODOLOGIA**

Foi realizada uma pesquisa nas bases de dados PubMed (https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/), ScienceDirect (https://www.sciencedirect.com/) e Scielo (https://www.scielo.br/?lng=pt), com a finalidade de encontrar substâncias com possível efeito sobro o sistema nervoso central, já caracterizadas, provenientes da espécie *Annona coriacea.* Para isso, foram pesquisados artigos publicados entre os anos 2000 e 2021, usando os descritores “*Annona coriacea”* e “compostos químicos”.

Após a identificação dos compostos já elucidados nesta espécie, seus dados estruturais foram levantados por meio da base PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/). Logo após a organização das estruturas, empregou-se o servidor PASS Prediction (http://www.way2drug.com/passonline/) para predizer as prováveis atividades biológicas das estruturas catalogadas (FILIMONOV et al., 2014), com o objetivo de encontrar aquelas com maiores probabilidades de possuírem atividades sobre o sistema nervoso central. Por meio do servidor PASS prediction, consideramos os valores de Pa e Pi como > 0,7 e < 0,05 respectivamente. Estes valores representam a probabilidade de determinada substância ser ativa (Pa) ou inativa (Pi) para uma sugerida propriedade biológico, que foram utilizados como critério para a inclusão de estruturas de interesse. Através dos servidores SwissADME (http://swissadme.ch/) (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017) e ProtoxII (https://tox-new.charite.de/protox\_II/) (BANERJEE et al., 2018), foi possível realizar tanto a análise de predição de farmacocinética quanto toxicológica, respectivamente. Além disso, para se verificar os alvos mais prováveis dos compostos ligantes obtidos, foi utilizado o site Swiss Target Prediction (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2019).

A próxima etapa foi a realização da docagem molecular. A docagem molecular é um método de design de drogas baseado em estrutura que simula a interação molecular e prevê o modo de ligação e a afinidade entre receptores e ligantes obtidos nas fases anteriores do estudo (FAN; FU; ZHANG, 2019). Para a criação dos modelos docking, o programa utilizado foi GOLD Suite 5.7.0. Os mapas de interação 2D e as figuras de mapeamento farmacofórico foram gerados pelo software Discovery Studio 3.5 Visualizer. Por fim, as imagens 3D foram construídas com o software PyMOL Molecular Graphics System, versão 2.0.

Por último, para validar os modelos produzidos com as moléculas encontradas nesse estudo, o *redocking* foi realizado usando uma estrutura na qual a proteína alvo e seu ligante foram co-cristalizados. Para todos os parâmetros utilizados durante o processo, os valores padrão foram empregados, e as estruturas foram submetidas a 10 execuções de algoritmos genéticos usando a função CHEMPLP.

**RESUTADOS E DISCUSSÃO**

Após realização de busca por artigos nas plataformas Pubmed, ScienceDirect e Scielo, foram encontrados um total de 28 substâncias presentes na espécie *Annona coriacea*, que ocorre no Cerrado*.* Após as análises de predição farmacocinética (absorção pelo trato gastrointestinal (TGI), classificação “*druglike”* de acordo com Lipinski, interação com citocromos, e permeabilidade da barreira hematoencefálica), 11 compostos foram selecionados (Tabela 1).

**Tabela 1**. Compostos presentes na espécie *Annona coriacea* selecionados após avaliação farmacocinética.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Composto | Absorção pelo trato gastrointestinal | Classificação "*druglike"* | Interação com citocromos | Permeabilidade da barreira hematoencefálica |
| Ácido cafeíco | Alta | Sim; 0 violações | Nenhum | Não |
| Ácido crolecínico | Alta | Sim; 0 violações | CYP2C9 | Sim |
| Ácido elágico | Alta | Sim; 0 violações | CYP1A2 | Não |
| Ácido gálico | Alta | Sim; 0 violações | CYP3A4 | Não |
| Annonalide | Alta | Sim; 0 violações | Nenhum | Não |
| Catequina | Alta | Sim; 0 violações | Nenhum | Não |
| Epicatequina | Alta | Sim; 0 violações | Nenhum | Não |
| Kaempferol | Alta | Sim; 0 violações | CYP1A2, CYP2D6 e CYP3A4 | Não |
| Quercetina | Alta | Sim; 0 violações | CYP1A2, CYP2D6 e CYP3A4 | Não |
| Trigonelina | Alta | Sim; 0 violações | Nenhum | Não |

Fonte: PINTO, T. N. (2022)

Além disso, como último filtro de seleção, foram apurados os seus níveis de toxicidade, prováveis efeitos tóxicos e, finalmente, alvos de interesse para o estudo. Levando em consideração os efeitos tóxicos possíveis e a prova DL50, reduziu-se o número de compostos para 7 (Tabela 2).

**Tabela 2:** Compostos presentes na espécie *Annona coriacea* selecionados após avaliação de potencial tóxico.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Composto | DL50 | Prováveis efeitos tóxicos |
| Ácido cafeíco | 2980mg/kg - classe 5 de toxicidade | Hepatotoxicidade, carcinogenicidade, imunotoxicidade e inibição do receptor de andrógeno (AR) |
| Ácido elágico | 2991mg/kg - classe 4 de toxicidade | Carcinogenicidade |
| Ácido gálico | 2000mg/kg - classe 4 de toxicidade | Hepatotoxicidade e carcinogenicidade |
| Catequina | 10000mg/kg - classe 6 de toxicidade | Carcinogenicidade, mutagenicidade e inibição do Potencial de Membrana Mitocondrial (MMP) |
| Epicatequina | 10000mg/kg - classe 6 de toxicidade | Carcinogenicidade, mutagenicidade e inibição do Potencial de Membrana Mitocondrial (MMP) |
| Kaempferol | 3919mg/kg - classe 5 de toxicidade | Hepatotoxicidade, Mutagenicidade, inibidor de Receptor de hidrocarboneto aril (AhR), Aromatase, Receptor Alfa de Estrogênio (ER), Domínio de Ligação de Ligante de Receptor de Estrogênio (ER-LBD) e Potencial de Membrana Mitocondrial (MMP) |
| Trigonelina | 3720mg/kg - classe 5 de toxicidade | Hepatoxicidade e carcinogenicidade |

Fonte: PINTO, T. N. (2022)

Como critério de exclusão, averiguou-se os possíveis alvos de cada substância através da plataforma SwissTargetPrediction, excluindo aquelas que não apresentavam alvos que possuíssem relação com possível efeito sobre o SNC. Assim, os 2 compostos selecionados foram: trigonelina e ácido gálico.

**Tabela 3**: Substâncias encontradas na espécie *Annona coriacea* selecionadas para o estudo após análise de seus potenciais alvos e doenças psiquiátricas relacionadas.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Composto | Alvos de interesse | Doenças provavelmente relacionadas |
| Ácido gálico | Catecol O-metiltransferase / COMT | Esquizofrenia, Transtorno de Pânico, psicose, personalidade esquizotípica e esquizofrenia paranoica |
|  | AC1 | Amnésia global transitória |
|  |  |  |
| Trigonelina | SIRT2 | Transtornos de humor |
| CHRM1 | Esquizofrenia e Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade |

Fonte: PINTO, T. N. (2022)

A trigonelina, ou ácido N-metil nicotínico, é um alcaloide derivado de nucleotídeos de piridina amplamente distribuído no reino vegetal. Segundo estudos realizados *in vitro*, a trigonelina possui várias atividades biológicas, incluindo função antibacteriana contra *S. mutans* (bactéria relacionada ao desenvolvimento de cárie em humanos), regeneração de dendritos e axônios de neurônios corticais, levando a melhora da memória espacial em ratos, e inibição da invasão de células cancerígenas no fígado (ASHIHARA, 2015).

A disfunção cognitiva é tida por muitos como o principal sintoma da psicopatologia dos transtornos de humor, e atinge múltiplas áreas como atenção, velocidade de processamento, memória e atividades executivas (BREUKELAAR et al., 2020). Estudos mostram que produção a contínua de mediadores pró-inflamatórios está relacionada com a gênese de dano neuronal e, consequentemente, alteração estrutural e funcional de áreas vitais para o processamento afetivo e cognitivo, incluindo o córtex pré-frontal e o hipocampo (ZHANG; ZHANG; YOU, 2018).

Segundo análises feitas através da plataforma SwissTargetPrediction, um dos alvos que podem sofrer influência da Trigonelina é a Anidrase Carbônica 1 (CA1) (Figura 1A). As anidrases carbônicas (CAs) são uma grande família de metaloenzimas de zinco que catalisam a hidratação reversível do dióxido de carbono.

O redocking do ligante co-cristalizado com a CA1 foi realizado com sucesso, resultando em valores RMSD inferiores a 0.5 para as 10 poses geradas (Figura 1B).

**A**

Interface gráfica do usuário, Aplicativo

Descrição gerada automaticamente

**B**

Uma imagem contendo Interface gráfica do usuário

Descrição gerada automaticamente

**Figura 1**.**A -** Representação gráfica 2D da molécula da pose 1 da trigonelina encontrada na espécie *Annona coriacea* interagindo com o alvo anidrase carbônica I (9PDB ID: 2NMX). **B -** Imagem com representação em 3D da trigonelina com a anidrase carbônica I e a distância intermolecular da ligação de hidrogênio com o resíduo de ASN69.

O ácido gálico (Figura 2A) é um composto fenólico também conhecido como ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (FITZPATRICK; WOLDEMARIAM, 2017). Até o momento, essa substância tem demonstrado uma grande quantidade de efeitos, dentre os quais podemos citar: efeito anti-inflamatório, antinociceptivo, antineoplásico, antioxidante e antibacteriano.

**A:**

Interface gráfica do usuário, Aplicativo

Descrição gerada automaticamente

**B:**

Tela de computador com jogo

Descrição gerada automaticamente

**Figura 2A -** Representação gráfica 2D da molécula do ácido gálico encontrada na espécie *Annona coriacea*, interagindo com o alvo COMT (catecol O-metil transferase) (PDB ID: 4XUE). **B -** Imagem com representação 3D do ácido gálico com a COMT.

Pesquisas indicam que o ácido gálico possui um mecanismo dual de ação, no qual não apenas a serotonina tem seus níveis elevados nas fendas sinápticas, mas também as catecolaminas. Esses resultados foram obtidos através da realização do teste de suspensão da cauda e do teste de nado forçado modificado com camundongos machos adultos (CAN et al., 2017).

Segundo análises feitas através da plataforma SwissTargetPrediction, um dos alvos que podem sofrer influência do ácido gálico é a COMT, responsável pela codificação a enzima catecol-O-metiltransferase que catalisa a degradação de catecolaminas , incluindo a dopamina, neurotransmissor relevante na função cognitiva (Figura 2B) (FRICKE-GALINDO et al., 2022). O efeito é de caráter inibitório, agindo diretamente na ação da COMT, como foi mostrado por KADOWAKI et al. Seu estudo chegou através de experimentação com preparações citosólicas de fígado de rato e hepatócitos cultivados (KADOWAKI et al., 2005).

**A**

Interface gráfica do usuário

Descrição gerada automaticamente com confiança média

**B**

Interface gráfica do usuário

Descrição gerada automaticamente com confiança média

**Figura 3A -** Mapa de interações entre ácido gálico e o receptor COMT com as distâncias intermoleculares. **B -** Mapa de interações de hidrogênio, revelando a sítios de interação dentro da cavidade ativa da enzima COMT.

O *redocking* do ligante co-cristalizado com a COMT foi realizado com sucesso, resultando em valores RMSD inferiores a 0.5 para as 10 poses geradas. As distâncias intermoleculares entre o ácido gálico e o receptor COMT ficaram entre 2A e 4A, o que corresponde a uma docagem precisa (Figura 3A). Ademais, 5 ligações de hidrogênio parecem contribuir para a interação entre ácido gálico com o site de interação do ligante (Figura 3B).

Os achados encontrados através da empregabilidade das ferramentas *in silico* no estudo da relação entre a trigonelina e a CA1 suportam os resultados de outras pesquisas. Dentre eles, KHALILI et al que nos traz, através de estudos com *in vivo*, que a trigonelina possui a capacidade de atenuar os sintomas de disfunção cognitiva através da supressão do estresse oxidativo e neuro inflamatório causado por lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina produzida por bactérias gram-negativas (KHALILI et al., 2018).

O mesmo ocorreu em relação ao ácido gálico e a COMT. KADOWAKI et al, através de experimentação com preparações citosólicas de fígado de rato e hepatócitos cultivados, mostrou que o ácido gálico inibe fortemente o papel de catalização da COMT (KADOWAKI et al., 2005).

**CONCLUSÃO**

Levando em consideração a alta prevalência, início precoce e persistência dos TP, eles contribuem significativamente para o sofrimento de milhões de indivíduos, direta ou indiretamente, em todo o mundo. Diante desses dados, o interesse nos efeitos preventivos e curativos de plantas medicinais vem aumentando. A abordagem *in silico* utilizada nesse estudo demonstrou que a trigonelina e o ácido gálico são compostos promissores com atividade protetora sobre a perspectiva neuropsiquiátrica do homem. Os resultados aqui expostos podem ajudar a elucidar os efeitos de extratos da *Annona coriacea*, assim como encorajar pesquisas com outras plantas portadoras de substâncias similares. Finalmente, esse estudo disponibiliza informações que possibilitam futuras pesquisas *in vitro* e *in vivo* com essas estruturas isoladas.

**REFERÊNCIAS**

ASHIHARA, H. **Plant Biochemistry: Trigonelline Biosynthesis in Coffea arabica and Coffea canephora**. [s.l.] Elsevier Inc., 2015.

BANERJEE, P. et al. ProTox-II: A webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W257–W263, 2018.

BONADIMAN, C. S. C. et al. A carga dos transtornos mentais e decorrentes do uso de substâncias psicoativas no Brasil: Estudo de Carga Global de Doença, 1990 e 2015. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 20, p. 191–204, 2017.

BREUKELAAR, I. A. et al. Investigating the neural basis of cognitive control dysfunction in mood disorders. **Bipolar Disorders**, v. 22, n. 3, p. 286–295, 2020.

CAN, Ö. D. et al. Antidepressant-like effect of gallic acid in mice: Dual involvement of serotonergic and catecholaminergic systems. **Life Sciences**, v. 190, p. 110–117, 2017.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. March, p. 1–13, 2017.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W357–W3664, 2019.

DU, J. et al. New techniques and strategies in drug discovery. **Chinese Chemical Letters**, v. 31, n. 7, p. 1695–1708, 2020.

FAN, J.; FU, A.; ZHANG, L. Progress in molecular docking. **Quantitative Biology**, v. 7, n. 2, p. 83–89, 2019.

FILIMONOV, D. A. et al. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the pass online web resource. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 50, n. 3, p. 444–457, 2014.

FITZPATRICK, L. R.; WOLDEMARIAM, T. **Small-Molecule Drugs for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease**. [s.l.] Elsevier, 2017. v. 5–8

FRICKE-GALINDO, I. et al. Impact of COMT, PRODH and DISC1 Genetic Variants on Cognitive Performance of Patients with Schizophrenia. **Archives of Medical Research**, n. xxxx, p. 1–11, 2022.

GERALDES, V. S. M. Universidade De São Universidade De São. **Teses USP**, p. 262, 2019.

KADOWAKI, M. et al. Inhibitory effects of catechin gallates on o-methyltranslation of protocatechuic acid in rat liver cytosolic preparations and cultured hepatocytes. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 8, p. 1509–1513, 2005.

KHALILI, M. et al. Trigonelline mitigates lipopolysaccharide-induced learning and memory impairment in the rat due to its anti-oxidative and anti-inflammatory effect. **International Immunopharmacology**, v. 61, n. September 2017, p. 355–362, 2018.

LEONARDO, B. C.; CUNHA, D. F.; SAKAE, T. M.; REMOR, K. V. T. Prevalência de transtornos mentais e utilização de psicofármacos em pacientes atendidos em um ambulatório médico de especialidades. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, *[S. l.]*, v. 46, n. 2, p. 39–52, 2017.

MONTEIRO, Á. B. et al. Anxiolytic and antidepressant-like effects of Annona coriacea (Mart.) and caffeic acid in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 136, p. 111049, 2020.

NOGUEIRA DA SILVA AVELINO OLIVEIRA ROCHA, G. et al. Phytochemicals and biological properties of Annona coriacea Mart. (Annonaceae): A systematic review from 1971 to 2020. **Chemico-Biological Interactions**, v. 336, n. January, p. 109390, 2021.

PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, 2019.

SARACENO, B. Investing in mental health. **Information Psychiatrique**, v. 81, n. 4, p. 289–293, 2005.

ZHANG, L.; ZHANG, J.; YOU, Z. Switching of the microglial activation phenotype is a possible treatment for depression disorder. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, n. October, p. 1–13, 2018.