

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

ESCOLA DE CIÊNCIAS MÉDICAS E DA VIDA

GIOVANNA CARNEIRO NAZAR

LUIZA FERRO MARQUES MORAES



**ATIVIDADE ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIA DA MOLÉCULA ARTEPILLIN C EMPREGANDO FERRAMENTAS *IN SILICO***



GOIÂNIA

2023



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

ESCOLA DE CIÊNCIAS MÉDICAS E DA VIDA

GIOVANNA CARNEIRO NAZAR

LUIZA FERRO MARQUES MORAES

**ATIVIDADE ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIA DA MOLÉCULA ARTEPILLIN C EMPREGANDO FERRAMENTAS *IN SILICO***

Trabalho apresentado como requisito para a aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso na Graduação em Medicina da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Luiz Borges

GOIÂNIA

2023

| **BANCA EXAMINADORA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE MEDICINA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS** |
| --- |



**ATIVIDADE ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIA DA MOLÉCULA ARTEPILLIN C EMPREGANDO FERRAMENTAS *IN SILICO***



Alunos: Giovanna Carneiro Nazar e Luiza Ferro Marques Moraes

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Luiz Borges

Banca Examinadora

| Prof. Dr. Leonardo Luiz Borges - Presidente |
| --- |

| Dra. Fernanda de Oliveira Feitosa de Castro - Membro |
| --- |

| Ms. Amanda de Jesus Rocha - Membro |
| --- |

Data: 19/05/2023

# DEDICATÓRIA

Dedicamos este trabalho de conclusão de curso, primeiramente, a Deus, segundamente, aos nossos familiares, por estarem sempre conosco e ao nosso orientador Prof. Dr. Leonardo Luiz Borges, por todo o aprendizado e leveza durante o processo.

**AGRADECIMENTOS**

Agradecemos, primeiramente, a Deus. Agradecemos também aos nossos familiares e professores, por sempre nos apoiarem e nos incentivarem na realização deste trabalho.

# EPÍGRAFE

“A medicina é como uma lenta construção, disse Rob. Nós somos afortunados ao longo da vida por conseguirmos colocar um único tijolo. Se pudermos explicar a doença, alguém que ainda não nasceu poderá inventar a cura.”

Noah Gordon

**RESUMO**

Estudos *in silico* são ferramentas computacionais utilizadas para a identificação de moléculas e compostos candidatos a fármacos. Produtos naturais são, desde os primórdios da humanidade, o primeiro recurso terapêutico utilizado, devido a serem amplas fontes de moléculas e compostos diversos criados pela natureza e com infinidades de atividades biológicas em potencial, que talvez nunca seriam conseguidas através da criatividade humana. A Própolis é um ótimo exemplo de produto natural que se beneficia, não só da altíssima biodiversidade brasileira para produção de diversas espécies e subespécies, como também da capacidade única das abelhas de produzirem um composto com tantos usos possíveis e tão rico em moléculas com infinidades de atividades biológicas em potencial. A Artepillin C, molécula presente na própolis verde brasileira, já foi relatada na literatura com efeitos antioxidantes e antiinflamatórios. Nosso estudo detalhou propriedades promissoras da Artepillin, tanto em relação às interações farmacológicas da molécula e seus possíveis potenciais de ação, quanto à possíveis efeitos terapêuticos, como os potenciais efeitos antiagregante plaquetário e cardioprotetor que serão descritos nesse estudo. Propriedades farmacológicas promissoras sugerem que a Artepillin é, possivelmente, uma molécula candidata ao desenvolvimento de fármacos. Quanto aos efeitos potenciais da Artepillin C relacionados com a capacidade de inibir a agregação plaquetária e de realizar cardioproteção se dão, provavelmente, através da ação como antagonista do receptor de Tromboxano A2. Esse receptor desempenha um papel essencial na amplificação e manutenção da resposta plaquetária, além de estar envolvido na formação de trombos e, portanto, antagonizar tal receptor seria interessante para fins de terapêutica de doenças tromboembólicas e cardiovasculares.

**Palavras-chave**: Própolis; Produtos naturais; Modelos computacionais, Cardioproteção.

# ABSTRACT

In silico studies are computational tools used for the identification of molecules and compounds that could serve as drug candidates. Natural products have been the earliest therapeutic resource utilized by humanity due to their abundance of diverse molecules and compounds created by nature, with infinite potential for biological activities that might never be achieved through human creativity alone. Propolis is an excellent example of a natural product that benefits not only from Brazil's high biodiversity, which allows for the production of various species and subspecies, but also from the unique ability of bees to produce a compound with numerous potential uses and rich in molecules with diverse biological activities. Artepillin C, a molecule present in Brazilian green propolis, has been reported in the literature for its antioxidant and anti-inflammatory effects. Our study has provided detailed insights into the promising properties of Artepillin, both in terms of its pharmacological interactions and potential modes of action, as well as its possible therapeutic effects, such as the potential antiplatelet and cardioprotective effects described in this study. The promising pharmacological properties suggest that Artepillin is possibly a molecule worthy of consideration for drug development. Regarding the potential effects of Artepillin C related to its ability to inhibit platelet aggregation and provide cardioprotection, these effects likely occur through its action as an antagonist of the Thromboxane A2 receptor. This receptor plays an essential role in platelet response amplification and maintenance, as well as in thrombus formation. Therefore, antagonizing this receptor would be of interest for the therapeutic management of thromboembolic and cardiovascular diseases.

**Keywords**: Propolis; Natural products; Computational models; Cardioprotection.

# Sumário

[**1. INTRODUÇÃO**](#_heading=h.1rvwp1q) **12**

**2**[**. OBJETIVOS 20**](#_heading=h.3hv69ve)

**2**[**.1 Objetivo geral 20**](#_heading=h.1x0gk37)

**2**[**.2 Objetivos específicos 20**](#_heading=h.4h042r0)

**3**[**. MATERIAIS E MÉTODOS 21**](#_heading=h.2w5ecyt)

**4**[**. RESULTADOS 24**](#_heading=h.3vac5uf)

**5**[**. DISCUSSÃO**](#_heading=h.2nusc19)

5.1 Própolis: propriedades conhecidas

5.2 Doenças tromboembólicas e doenças cardíacas

5.3 Artepillin C

5.4 Propriedades farmacológicas, farmacocinéticas e farmacofóricas

5.5 Uso da molécula isolada invés do produto natural completo [**31**](#_heading=h.2nusc19)

**6**[**. CONCLUSÃO 33**](#_heading=h.3mzq4wv)

**7**[**. CONSIDERAÇÕES FINAIS 34**](#_heading=h.2250f4o)

**8**[**. REFERÊNCIAS 35**](#_heading=h.haapch)

# 1. INTRODUÇÃO

O uso de fontes naturais como recurso terapêutico é conhecimento histórico amplo dentro das diversas culturas e civilizações humanas. Desde os primórdios, difundem-se ensinamentos sobre diversas espécies, seus efeitos e formas de uso. O avanço da ciência e da medicina permitiu não só o desenvolvimento de fármacos originados de moléculas provindas da natureza, como também a síntese de moléculas semelhantes àquelas encontradas na natureza, fatos que contribuíram para o desenvolvimento de novos tratamentos e, consequentemente, para a diminuição da mortalidade por diversas enfermidades (RODRIGUES et al., 2020). A utilização de moléculas provindas da natureza para o desenvolvimento de fármacos propicia alguns benefícios como não depender das limitações da criatividade humana e nem mesmo dos altos custos financeiros empregados na produção de moléculas sintéticas (MISHRA et al., 2011).

Atualmente, a ciência já conta com listagens e softwares capazes de descreverem e analisarem as moléculas da natureza, o que nos permite desenvolver estudos para o levantamento de possíveis candidatos a fármacos. Nesse sentido, os estudos *in silico* são a primeira etapa para o desenvolvimento de novos fármacos (ZENI et al., 2017). Dessa forma, são realizadas análises, simulações e previsões de propriedades farmacológicas em geral, de possíveis ligações e interação com alvos, hipóteses estruturais de seus possíveis mecanismos de ação e visualização tridimensional da molécula e/ou composto e mesmo da interação molécula-alvo. Com tais análises, é possível oferecer um pilar para o desenvolvimento de estudos pré-clínicos (*in vitro* e *in vivo*), clínicos (em seres humanos) e populacionais e, consequentemente, o desenvolvimento de novos e promissores fármacos. Ademais, cita-se ainda que as ferramentas *in silico* são extremamente promissoras não só por permitir a obtenção de novos candidatos a fármacos, mas por permitir feito científicos através de um modo de operacionalização viável também para as questões financeiras (baixo custo), éticas, bioéticas e de respeito à natureza.

Dentre as diversas fontes naturais que são utilizadas como recurso terapêutico, lista-se a própolis, um rico e complexo produto resinoso produzido por abelhas através da junção de fito~~-~~extratos, enzimas apícolas, pólen e cera (ANJUM, S. I. et al., 2019) e que se apresenta em diversas espécies e em diversos biomas do mundo. A depender do bioma ao qual está inserida, a própolis se apresenta com espécies e subespécies diferentes, tanto por influência climática, quanto por influência da flora local. No Brasil, a própolis verde é a mais prevalente, no entanto, existem diversas outras espécies como as própolis amarela, vermelha, marrom e negra, que também apresentam subespécies de acordo com o local de produção. Dentre outros fatores, a infinidade de espécies e subespécies e, consequentemente, de possíveis moléculas promissoras, têm dado à própolis grandes interesse e visibilidade para o estudo de suas possíveis propriedades terapêuticas. A literatura conta com o mapeamento das diversas moléculas presentes nas diversas espécies e subespécies da própolis e com estudos comprobatórios de diversas propriedades terapêuticas da própolis, tais como atividades de proteção cardiovascular, anticancerígenas diversas, antiinflamatórias, antioxidantes, antimicrobianas, antiobesidade e imunomodulatórias (ANJUM et al., 2019).

Em nosso estudo, diversas moléculas da própolis verde, e de outras espécies, demonstraram potenciais propriedades semelhantes às citadas anteriormente, tendo as propriedades hemostáticas de algumas moléculas, em especial a Artepillin C (molécula selecionada pelo nosso estudo), chamado atenção das pesquisadoras e do pesquisador, não só pela propriedade hemostática em potencial em si, como também pelas características farmacológicas, farmacocinéticas e farmacofóricas promissoras apresentadas pela molécula.

A hemostasia engloba processos relacionados à “atividade plaquetária, cascata de coagulação, fluxo sanguíneo e cisalhamento, células endoteliais e fibrinólise”. A atividade plaquetária é ativada, primeiramente, a partir da lesão endotelial, sendo estímulos para essa ativação o difosfato de adenosina (ADP), a adrenalina, a trombina e o colágeno. Além disso, a ativação envolve processos de adesão, agregação, secreção e atividade pró-coagulante. A adesão envolve a deposição de plaquetas na matriz subendotelial, a agregação corresponde à coesão plaquetária, a secreção é a liberação de proteínas dos grânulos plaquetários e a atividade pró-coagulante se relaciona à intensificação da geração de trombina. (L.K. LEUNG L , MD.2012.).

Trombose venosa profunda, tromboembolismo pulmonar, doenças isquêmicas em geral, coagulação intravascular disseminada são alguns exemplos de doenças relacionadas a distúrbios da hemostasia, com enfoque para a via trombogênica. Fisiopatologicamente, as doenças tromboembólicas seguem a Tríade de Virchow, idealizada pelo patologista alemão Virchow, e que sumariza o processo tromboembólico em: estase venosa, hipercoagulabilidade e lesão endotelial, sendo que um ou mais de um desses elementos podem estar presentes (RIVA; DONADINI; AGENO, 2015). As doenças tromboembólicas são de causa multifatorial, mas, etiologicamente, são divididas em: provocadas por fatores de risco maiores, não provocadas e idiopáticas; podendo também serem relacionadas a fatores genéticos ou adquiridos (RIVA; DONADINI; AGENO, 2015).

Doenças cardiovasculares como doença arterial coronariana, infarto agudo do miocárdio, fibrilação atrial e outras arritmias são complexas, multifatoriais e responsáveis por importante porcentagem de óbitos anuais. Fisiopatologicamente, tais condições são decorrentes, resumidamente, “de fatores hemodinâmicos, eletrofisiológicos, estruturais, autonômicos (moduladores)” (CINTRA et al, 2021). Dentre esses processos, podemos destacar fenômenos isquêmicos ou mesmo da falência da bomba cardíaca, processos que afetam a oxigenação e a nutrição adequadas do tecido cardiovascular e, consequentemente, podem gerar algumas das doenças citadas (JAMESSON et al - HARRISON, 2021). Segundo o DataSUS, em 2022, as Doenças do Aparelho Circulatório (capítulo IX da CID-10) apresentaram uma taxa de mortalidade geral de 9,02%, número alarmante que solicita atenção para a necessidade de melhorias nas abordagens dessas condições.

O tratamento e a prevenção de condições tromboembólicas e cardiovasculares diversas é feito com o uso de fármacos, compostos e moléculas anticoagulantes, antiplaquetárias e/ou antiagregantes plaquetárias amplamente conhecidas, como heparinas, ácido acetilsalicílico, varfarina, anticoagulantes orais, dentre outras (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA et al., 2013). No entanto, tais medicamentos apresentam variados efeitos adversos, relatados em bulários, como distúrbios em diversos sistemas, principalmente no gastrointestinal, no respiratório, no cutâneo e no vascular, esse último com enfoque para o risco de sangramentos e hemorragias interna, externa, de menor ou maior graus e em diversos tecidos e órgãos.

O uso de moléculas advindas de produtos naturais pode, dessa forma, se apresentar como uma alternativa promissora, tanto em eficácia, quanto em redução de danos, como os efeitos adversos. Portanto, nosso trabalho irá detalhar o possível uso da Artepillin C, molécula da própolis verde brasileira, como potencial antiagregante plaquetário e cardioprotetor em diversidade de patologias que necessitam dessas atividades terapêuticas, além de expor todas as perspectivas e propriedades promissoras dessa molécula, como forma de embasar nosso argumento científico e nossa pesquisa.

**2. OBJETIVOS**

**2.1 Objetivo Geral**

Realizar uma busca *in silico* das potenciais moléculas e dos potenciais compostos bioativos encontrados na própolis verde brasileira, com enfoque para moléculas ou compostos que apresentem potenciais atividades de antiagreção plaquetária e de cardioproteção.

**2.2 Objetivos Específicos**

1. Mapear as principais moléculas e os principais compostos bioativos presentes na própolis verde brasileira;
2. Avaliar os aspectos farmacológicos *in silico* das moléculas e dos compostos encontrados e selecionados;
3. Realizar a predição da atividade biológica *in silico* dessas substâncias;
4. Realizar a similaridade farmacofórica das substâncias selecionadas com substâncias já conhecidas;
5. Buscar alvos moleculares para essas substâncias e verificar os seus potenciais de interação entre ligante-receptor (*docking*) e a veracidade do modelo (*redocking*).

# 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente, foram identificados os metabólitos ativos presentes na própolis através de uma revisão bibliográfica utilizando artigos das bases de dados PUBMED (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), SCIENCE DIRECT (<https://www.sciencedirect.com/>) e GOOGLE ACADÊMICO (<https://scholar.google.com.br/?hl=pt>) e encontrados a partir dos descritores “propolis AND *in silico*”, “propolis AND cerrado”, “brazilian propolis *in silico*”, refinando os artigos dos últimos 20 anos. De acordo com o encontrado, foram selecionadas as moléculas que participam da composição da própolis brasileira de diversas espécies e subespécies.

Para o levantamento dos CANONICAL SMILES das estruturas, utilizou-se o site PUBCHEM (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). A partir da codificação das estruturas, utilizou-se o servidor PASS ONLINE (<http://www.way2drug.com/passonline/>), vinculado ao Way2Drug, para obter-se a predição de possíveis bioatividades de cada molécula. Neste servidor são calculadas duas probabilidades: Pa ou probabilidade de ocorrência da atividade *predita* e Pi ou probabilidade da atividade predita ser falsa. Assim, empregou-se o seguinte critério de seleção de atividades: Pa>0,7 e Pi<0,05. Posteriormente, a estrutura foi analisada no servidor SwissADME (<http://www.swissadme.ch/index.php>), vinculado ao Swiss Institute of Bioinformatics, para o mapeamento do comportamento molecular e identificação das propriedades farmacológica e farmacocinética das moléculas e, então, identificar quais moléculas se comportam como fármaco (e excluir as que não se comportam como tal), fenômeno denominado *Druglikeness*. Além de análises moleculares em relação ao comportamento *Druglikeness*, a partir do seguimento das Regras de Lipinski também foram analisadas propriedades de absorção gastrointestinal, permeabilidade na barreira hematoencefálica e número de citocromos P450 inibidos. Assim, as moléculas restantes, foram submetidas ao servidor SwissTARGET PREDICTION (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), vinculado ao Swiss Institute of Bioinformatics, para a obtenção da listagem de seus possíveis alvos protéicos. Com os alvos mais prováveis identificados, a estrutura cristalografada foi obtida por meio do PDB (Protein Data Bank -<https://www.rcsb.org/>) para as análises de interação ligante-receptor. (POROIKOV, V. et al, 2000) (SADYM, A. et al, 2003)

Os compostos com maior pontuação para a atividade antiagregante plaquetária foram selecionadas para simulações de docagem molecular. O visualizador Hermes GOLD Suite 5.7.0 foi usado para preparar os receptores para o acoplamento (COLE; NISSINK; TAYLOR, 2005) . A região de interesse usada para o docking foi definida como todos os resíduos de proteína dentro dos ligantes de referência que acompanhavam os complexos de proteína baixados. Valores padrão de todos os outros parâmetros foram utilizados e os complexos foram submetidos a corridas de algoritmos genéticos usando a função de adequação CHEMPLP (KORB; STÜTZLE; EXNER, 2009). Para a validação dos parâmetros do modelo foi realizado o redocking utilizando o complexo ligante-proteína cristalografada e essas condições foram utilizadas para a realização do docking com o ligante selecionado da própolis.

**4. RESULTADOS**

A principal espécie da própolis brasileira descrita na literatura foi a própolis verde, sendo essa também a origem da molécula selecionada pelo nosso estudo. Na análise de sua composição, foram encontrados flavonóides, ácidos fenólicos, terpenóides e compostos aromáticos, além de água, açúcar, aminoácidos e vitaminas (ANJUM, S. I. et al.)

De acordo com o encontrado em nossas revisões da bibliografia, foram mapeadas moléculas que participam da composição da própolis brasileira de diversas espécies e subespécies (verde, amarela, vermelha, marrom e negra, de diversas regiões brasileiras) e, diante disso, chegou-se a o número de 53 moléculas. Tais moléculas foram submetidas à plataforma PUBCHEM para a obtenção do SMILES de cada uma e, nesse passo, houve o primeiro refinamento do número de moléculas, com a exclusão de cinco por inexistência do SMILES no banco de dados da plataforma. Os SMILES das outras 48 moléculas foram utilizados na plataforma PASSONLINE com o filtro PA>0,7 e PI<0,05, como citado na metodologia, para predição de todas as suas possíveis interações e bioatividades, etapa importante para refinamento molecular de acordo com a bioatividade em potencial objetivada pelo estudo, que seria relacionada à hemostasia e cardioproteção.

Na etapa subsequente, cada um dos compostos foi submetido ao programa SwissADME para a triagem farmacocinética, baseada em quatro princípios gerais: absorção, distribuição, metabolismo e excreção (que dão origem à sigla ADME). Assim, analisando critérios de respeito às Regras dos 5 de Lipinski, de absorção no trato gastrointestinal, de permeabilidade na barreira hematoencefálica e de quantidade de citocromos P450 inibidos, foi realizada a classificação *Druglikeness* para selecionar os compostos que apresentaram comportamento semelhante a outros fármacos já empregados por via oral. Com essa análise, foram, então, selecionados 16 compostos adequados (Tabela 1) dentro dos 48 restantes, sendo, então, excluídos 32 por não adequação em um ou mais critérios estabelecidos para a classificação dentro do comportamento *Druglikeness*.

Posteriormente, com o programa SwissTARGET PREDICTION, foram obtidos os possíveis alvos protéicos de cada metabólito ativo da própolis verde, informações que foram cruzadas com as atividades biológicas em potencial já encontradas com o PASS ONLINE, tal como atividade antiagregante plaquetária, atividade anticoagulante e atividade cardioprotetora, cruzadas com alvos protéicos como o receptor de Tromboxano A2 (TXA2) , alvo selecionado pelo nosso estudo e que será detalhado mais à frente.

Em seguida, o banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) foi utilizado para a análise dos alvos protéicos encontrados no SwissTARGET. Na pesquisa dos alvos e de suas respectivas estruturas cristalografadas no PDB, foi selecionado o alvo 6IIU, correspondente ao receptor do tromboxano A2 conjugado com a molécula cristalizada do fármaco ramatroban. Tal alvo está relacionado à molécula Artepillin C, proveniente da própolis verde e que possui possíveis efeitos antiagregante plaquetário e cardioprotetor. O ligante co-cristalizado (ramatroban) do alvo PDB ID: 6IIU foi submetido ao *redocking* para a validação dos parâmetros do modelo. Após a definição dos parâmetros do modelo a ser empregado para o *docking*, foram realizadas simulações com a molécula candidata Artepillin C sobre o sítio ativo do alvo 6IIU.

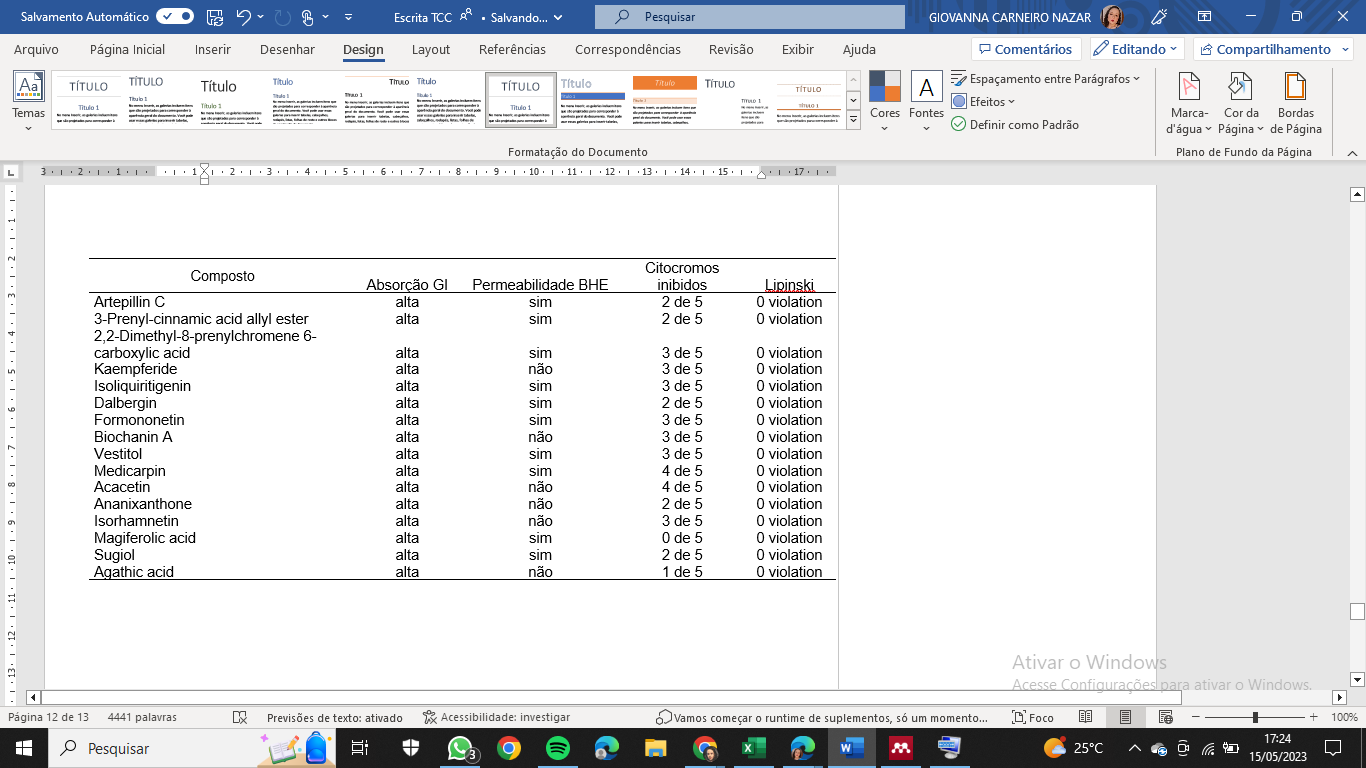
O *docking* sugeriu uma interação favorável da Artepillin C com o receptor de tromboxano A2. A Figura 1 mostra a presença de 3 interações intermoleculares de alta intensidade (uma ligação de hidrogênio e duas ligações de hidrogênio reforçadas com carga negativa) entre a Artepillin C e o alvo e também a distância adequada entre a molécula e o aminoácido de 2.05 A. A presença de três ligações é imprescindível para a existência de interação molécula-alvo e a distância entre a molécula e o aminoácido da cavidade ativa do receptor-alvo deve estar compreendida entre 1,7/1,8A à 4,0A, o que também ocorre com o nosso composto. A conformação tridimensional da interação da Artepillin C com o receptor de Tromboxano A2 está representada na Figura 2.

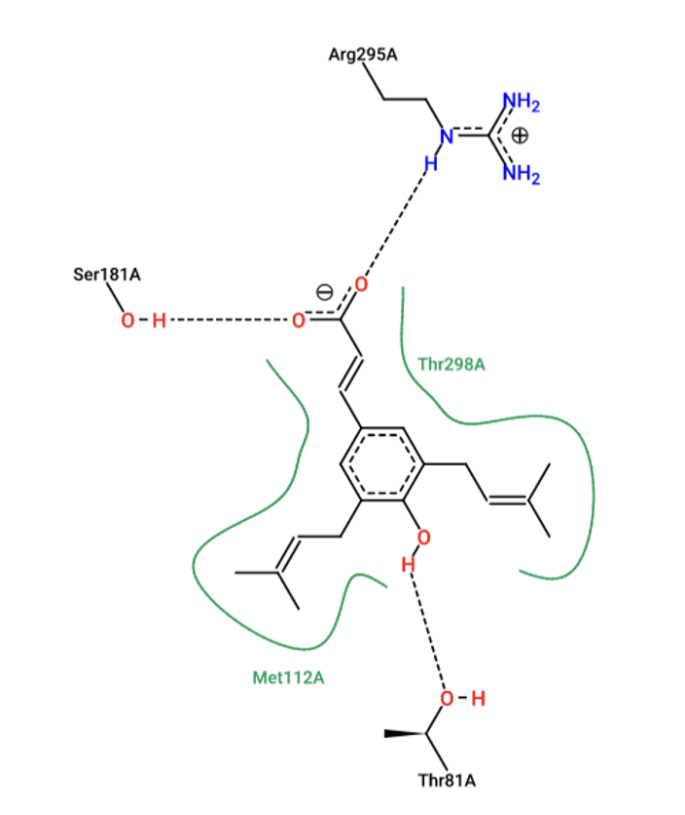
Cita-se, ainda, que as ligações estabelecidas entre a Artepillin C e o receptor de TxA2 são realizadas pelos aminoácidos: ARG295 (2,24 Aº de distância), SER181 (2,0 Aº) e THR81 (2,05 Aº). Tais aminoácidos são os mesmos que compõem as ligações estabelecidas entre Ramatroban e receptor de TxA2, o que indica similaridade de ligações estabelecidas pela Artepillin C e pelo Ramatroban e, portanto, maior probabilidade da Artepillin C ser viável na atuação antagonista sobre o alvo (receptor de TxA2).

Os resultados apresentados, propõem uma potencial atuação da Artepillin C como antagonista do receptor de TxA2, elucidando o mecanismo das supostas atividades antiagregante plaquetária e cardioprotetora. Além disso, nossos resultados sustentam a hipótese de que, a partir das propriedades farmacocinéticas e farmacofóricas promissoras apresentadas, a Artepillin C pode se caracterizar como uma viável candidata a fármaco.

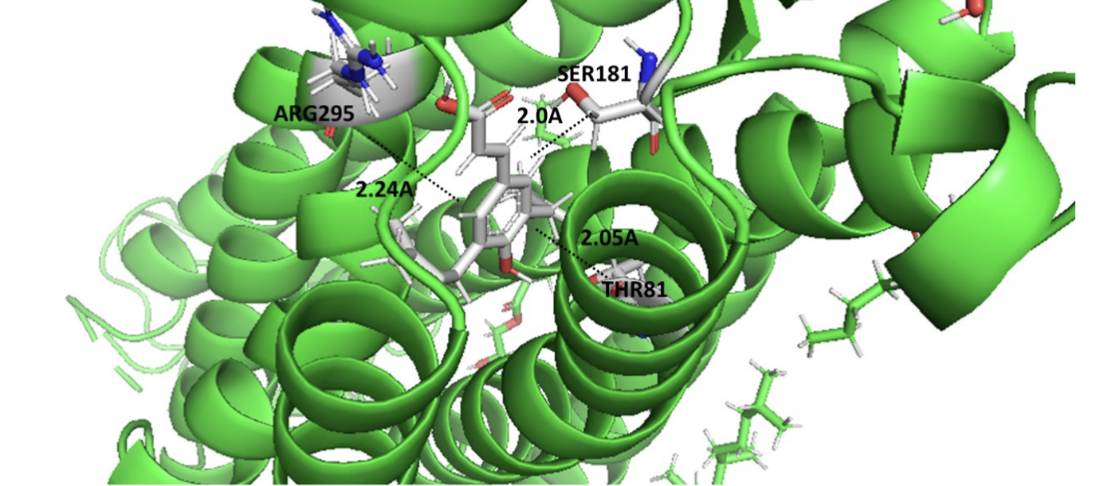
Nas duas páginas seguintes, se encontram a tabela de moléculas e compostos selecionados da própolis verde brasileira (Tabela 1), além das duas figuras que retratam às conformações bi (Figura 1) e tridimensionais (Figura 2) da interação Artepillin C - Receptor de TxA2.

**Tabela 1:** Compostos da Própolis Verde Brasileira selecionados após análise das propriedades fornecidas pelo servidor Swiss ADME.





**Figura 1:** Diagrama 2D de interação da artepillin C posição 1 no receptor de tromboxano A2. A representação demonstra suas ligações de hidrogênio, sendo duas reforçadas com carga negativa.



**Figura 2:** Pose 1 da ancoragem da artepillin C no sítio do receptor de tromboxano A2. Figura gerada com o software PyMol.

# 5. DISCUSSÃO

**5.1 Artepillin C**

Advinda da própolis verde brasileira, a Artepillin C é um dos compostos majoritários do produto e responsável por diversas de suas ações terapêuticas. Quimicamente, é um composto prenilado derivado do ácido p-cumárico e que apresenta “benefícios farmacológicos diversos, incluindo efeitos antioxidantes, antimicrobianos, anti-inflamatórios, antidiabéticos, neuroprotetores, gastroprotetores, imunomoduladores e anticancerígenos" (SHAHINOZZAMAN et al., 2020). Em nossos estudos, a Artepillin C também foi a molécula que apresentou maior quantidade de propriedades promissoras, tanto em potenciais atividades, quanto em propriedades farmacológicas. Porém, diferentemente da literatura, que se debruça sobre os efeitos “antioxidantes, antiinflamatórios, anti-diabetes e anticâncer” (SHAHINOZZAMAN et al., 2020) da molécula, nosso artigo se propôs a analisar as potenciais atividades hemostáticas da molécula no organismo humano.

Os potenciais efeitos anti-agregante plaquetário e cardioprotetor se dão pela provável atividade da Artepillin C de antagonizar o receptor de Tromboxano A2, um receptor do tipo prostanóide com “ação agonista plaquetária essencial na amplificação e na manutenção da resposta plaquetária e no recrutamento de novas plaquetas para o trombo em crescimento”(FAN et al., 2019), além de apresentar atividades vasoconstritoras (KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2010). Inibidores do receptor do TXA2, dessa forma, agem inibindo a agregação plaquetária e ativando vasodilatação, auxiliando na hemostasia e cardioproteção.

**5.2 Propriedades farmacológicas, farmacocinéticas e farmacofóricas**

Na primeira análise da Artepillin C, no servidor PASS ONLINE, foi encontrada a potencial atividade de “Vitamin-K-epoxide reductase (warfarin-insensitive) inhibitor” (VKOR), ou seja, a molécula pode, possivelmente, atuar, no corpo humano, como inibidora da enzima epóxido-redutase de Vitamina K insensível ao medicamento Varfarina. Demonstrar possível inibição dessa enzima, não só é uma ação anticoagulante que pode ser desempenhada pela Artepillin C, além da antiplaquetária relacionada ao Tromboxano A2, como também é uma atividade interessante pela atuação específica em enzimas VKOR insensíveis à Varfarina. VKOR insensíveis à Varfarina são fenótipos relacionados a polimorfimos genéticos, sendo que, pacientes que possuem tais mutações necessitam de ajustes de dose distintos da população geral, podendo esse ajuste ser para mais ou para menos (OLIVEIRA, 2012). Fármacos que atuam, especificamente, em receptores enzimáticos insensíveis à Varfarina são extremamente promissores, não só por possibilitarem alternativas de tratamento às pessoas que possuem tais polimorfimos, como também por estabelecerem maior padronização do tratamento, nesses casos, gerando aumento na eficácia terapêutica (OLIVEIRA, 2012).

No entanto, a principal função hemostática da Artepillin C foi demonstrada e analisada durante o *docking*, no qual ela se apresentou como um composto semelhante ao medicamento Ramatroban, ao também agir, possivelmente, como inibidor do receptor de Tromboxano A2. Em resumo, o receptor de TxA2 é um receptor prostanóide ligado à proteína Gq e que, ao receber a molécula de TxA2 em seu sítio de ligação, inicia uma cascata de ativação da agregação plaquetária ao gerar sinalizações celulares que ativam a proteína GP IIb/IIIa, que possui função de se ligar ao fibrinogênio e, assim, intermediar a agregação plaquetária (SILVEIRA, 2019)(GOLAN et al., 2009).

A potencial existência de dois mecanismos hemostáticos, na mesma molécula, é uma possibilidade que torna a Artepillin C muito promissora para o tratamento de condições tromboembólicas, tanto pela possibilidade de maior eficácia, como pela redução do número de medicamentos a serem administrados, evitando interações medicamentosas e maiores danos ao paciente.

Ademais, cita-se que a Artepillin C apresentou propriedades farmacofóricas muito promissoras para moléculas idealizadas como semelhantes a fármaco, sendo elas: alta absorção pelo trato gastrointestinal (TGI); permeabilidade na barreira hematoencefálica (BHE); inibição de baixo número de citocromos P450 (somente dois - CYP2C19 e CYP2C9 - dentre os cinco tipos analisados); nenhuma violação das regras de Lipinski; presença de três ligações de hidrogênio, sendo duas reforçadas com carga negativa; presença de uma distância entre molécula e alvo de 2,05 Aº, que se encontra dentro dos valores ideais para interação molécula-alvo adequada. A absorção pelo TGI e permeabilidade na BHE traduzem, respectivamente, possível e viável via de administração da molécula e extensão dos sítios de ação, além de solubilidade molecular. A inibição de baixo número de citocromos chama atenção para a possibilidade de baixa interação medicamentosa. A ausência de violações das Regras de Lipinski traduz que a molécula se comporta, provavelmente, como um fármaco ideal, no que concerne à biodisponibilidade, o que é uma propriedade essencial na busca por novos candidatos a fármaco. As ligações de hidrogênio tornam a molécula mais estável, propriedade almejada por compostos candidatos a fármaco por possibilitar maior eficácia e segurança. Já a distância entre molécula e alvo deve estar compreendida entre 1,7/1,8 Aº e 4,0 Aº para que haja interação adequada, pois, abaixo do limite inferior, às forças de repulsão superam as forças de atração e, acima do limite superior, as forças de atração se tornam insuficientes para gerar interação molécula-alvo (SUBRAMANIAN K et al., 2008).

**5.3 Uso da molécula isolada invés do produto natural completo**

A utilização de produtos naturais como fonte de moléculas terapêuticas sempre gera questionamentos, como: por quê usar a molécula isolada seria mais benéfico que o uso do produto completo?

Esse questionamento é baseado na possível existência de efeito sinérgico entre moléculas utilizando o extrato do produto inteiro. No entanto, o uso do extrato integral, além de não possuir uma composição padronizada, pois a composição de fenômenos naturais, também apresenta maior probabilidade de gerar efeitos colaterais e indesejáveis, devido à ausência de filtragem entre moléculas que: agem no foco objetivado, que não agem, que geram efeitos contrários ou mesmo moléculas inativas. Dessa forma, os primeiros benefícios do uso de moléculas isoladas são: direcionamento da atividade do medicamento, diminuição de efeitos colaterais e de interferências indesejáveis na atividade molecular e segurança. (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006)

Outros benefícios são: controle e precisão de dose, aumento da eficácia, padronização e estabilidade. O uso da molécula isolada exige: ou o isolamento da molécula do produto ou a síntese da molécula, sendo o último mais comum em produções em larga escala. Assim, com o uso de técnicas laboratoriais de isolamento ou síntese, se fazem necessárias fiscalizações e testagens experimentais mais rígidas e precisas para a adequação da molécula e de sua dosagem. A partir do controle da dosagem, obtém-se maior precisão da dose necessária, além de se estabelecer maior eficácia, não só pelo controle de dose, mas também por aperfeiçoamento molecular, durante a síntese. Com o aperfeiçoamento molecular para melhor interação e segurança no corpo humano, se obtém uma molécula mais estável, além de padronizada. Em resumo, trabalhar com a molécula isolada garante maior reprodutibilidade terapêutica. (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006)

# 6. CONCLUSÃO

A própolis é um rico produto apícola que apresenta ações terapêuticas diversas, em razão da sua composição molecular, que é distinta para cada espécie e subespécie. A Artepillin C é uma das moléculas que compõem a Própolis Verde Brasileira, espécie mais prevalente no Brasil, e a selecionada e analisada pelo estudo, devido suas potenciais atividades hemostáticas, principalmente, como anti-agregante plaquetária. Sua ação, semelhante ao medicamento Ramatroban, revela que sua potencial interação biológica é de caráter inibitório e voltada ao receptor de Tromboxano A2. Uma possível ação anticoagulante, com inibição de enzimas epóxido-redutases de Vitamina K insensíveis a Varfarina, necessita de mais estudos para ser entendida. O tratamento de doenças tromboembólicas e cardiovasculares é complexo, longo e necessita de monitoramento constante, dessa forma, o uso de moléculas mais naturais, estáveis, seguras e com menos efeitos colaterais, como, possivelmente, é o caso da Artepillin C. Portanto, essa molécula, provavelmente, é alternativa mais viável e eficaz às alopatias convencionais. Estudos *in vitro*,  *in vivo* e clínicos são necessários para testar e provar as possíveis ações antiagregante plaquetária e cardioprotetora em organismos vivos e humanos.

# 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo realizou uma análise *in silico* sobre as diversas moléculas presentes na própolis verde brasileira.

Foi encontrado e destrinchado sobre a molécula Artepillin C, uma forte candidata a fármaco com possível efeito antiagregante plaquetário e cardioprotetor.

No entanto, reconhecemos as limitações deste estudo por se tratar da primeira fase para o desenvolvimento de novos fármacos, isto é, o estudo *in silico*. Recomendamos o avanço da pesquisa para estudos *in vitro*, *in vivo* e clínicos para testar e provar a possível ação antiagregante plaquetária em organismos vivos e humanos.

# 9. REFERÊNCIAS

1. ANJUM, S. I. et al. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. Saudi journal of biological sciences, v. 26, n. 7, p. 1695–1703, nov. 2019.
2. BESERRA, F. P. et al. Artepillin C as an outstanding phenolic compound of Brazilian green propolis for disease treatment: A review on pharmacological aspects. Phytotherapy research : PTR, set. 2020.
3. BHARGAVA, P. et al. Experimental Evidence for Therapeutic Potentials of Propolis. Nutrients, v. 13, n. 8, jul. 2021.
4. CINTRA, F. D.; FIGUEIREDO, M. J. DE O. Fibrilação Atrial (Parte 1): Fisiopatologia, Fatores de Risco e Bases Terapêuticas. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 116, n. 1, p. 129–139, 2021.
5. COLE, J. C.; NISSINK, J. W. M.; TAYLOR, R. Protein-ligand docking and virtual screening with GOLD. Virtual Screening in Drug Discovery, p. 379–415, 2005.
6. 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, Issue W1, p W357–W364, July 2019
7. FAN, H. et al. Structural basis for ligand recognition of the human thromboxane A 2 receptor. Nature Chemical Biology, v. 15, n. 1, p. 27–33, 2019.
8. GOLAN,D.E et al. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia 3. ed.Guanabara Koogan, 2014.
9. JAMESSON, J. L.Manual de medicina Harrison 20. ed.AMGH. 2021.
10. KONTOGIORGIS, C.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Thromboxane synthase inhibitors and thromboxane A2 receptor antagonists: a quantitative structure activity relationships (QSARs) analysis. Current medicinal chemistry, v. 17, n. 28, p. 3162–3214, 2010.
11. KORB, O.; STÜTZLE, T.; EXNER, T. E. Empirical scoring functions for advanced Protein-Ligand docking with PLANTS. Journal of Chemical Information and Modeling, v. 49, n. 1, p. 84–96, 2009.
12. MISHRA, B.; TIWARI, S. Natural products: An evolving role in future drug discovery. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 46, n. 10, p. 4769-4807, 2011.
13. OLIVEIRA, C. S. O doente sob terapêutica anticoagulante oral e a intervenção farmacêutica. p. 150, 2012.
14. POROIKOV, V., LAGUNIN, A., STEPANCHIKOVA, A., FILIMONOV, D., PASS?: Prediction of activity spectra for, Bioinformatics, Appl. n 16 p 747–748, 2000.
15. RIVA, N.; DONADINI, M. P.; AGENO, W. Epidemiology and pathophysiology of venous thromboembolism: similarities with atherothrombosis and the role of inflammation. Thrombosis and haemostasis, v. 113, n. 6, p. 1176–1183, jun. 2015.
16. RODRIGUES, T. DE A. et al. A valorização das plantas medicinais como alternativa à saúde: um estudo etnobotânico. Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais, v. 11, n. 1, p. 411-428, jan./mar. 2020.
17. SADYM, A., LAGUNIN, A.FILIMONOV, D., POROIKOV, V., Prediction of biological activity spectra via the Internet. SAR QSAR Environmental Research, n 14 p 339–347, 2003.
18. SHAHINOZZAMAN, M. et al. Artepillin C: A comprehensive review of its chemistry, bioavailability, and pharmacological properties. Fitoterapia, v. 147, p. 104-775, nov. 2020.
19. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA et al. Diretrizes brasileiras de antiagregantes plaquetários e anticoagulantes em cardiologia. Arquivos brasileiros de cardiologia, v. 101, n.3 suppl 3, p. 1–95, 2013.
20. SUBRAMANIAN, K. et al Regulation of estrogen receptor alpha by the SET7 lysine methyltransferase. Mol Cell. v 9; n 30 suppl 3 p 336-47 May 2008.
21. VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. DA S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. Química Nova, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.
22. ZENI, A. L. B. et al. Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. Ciência & Saúde Coletiva, v. 22, n. 8, p. 2703-2712, ago. 2017.

## 