

PRÓPOLIS MARROM BRASILEIRA CONTRA DOENÇA DE ALZHEIMER EM MODELO IN SILICO

 <https://doi.org/10.56238/arev6n4-148>

Data de submissão: 10/11/2024

Data de publicação: 10/12/2024

Laura Bressan Callafatti

Graduação em Biomedicina, Universidade de Franca, Brasil
E-mail: laura.bressan@hotmail.com

Milena Souza Tavares

Graduação em Biomedicina, Universidade de Franca, Brasil
Universidade de Franca, Brasil
E-mail: tavares_mih@hotmail.com.br

Jhonatan Felipe dos Santos

Laboratório de Biociências e Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal,
Universidade de Franca, Brasil
E-mail: jhonatanfelipe957@gmail.com

Ricardo Andrade Furtado

Laboratório de Ciência Animal, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, e Programa
de Pós-Graduação em Promoção de Saúde, Universidade de Franca, Brasil.
E-mail: Ricardo.furtado@unifran.edu.br

Silvio de Almeida Junior

Laboratório de Biociências e Saúde, Universidade do Estado de Minas Gerais, Brasil.
Laboratório de Ciência Animal, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal,
Universidade de Franca, Brasil
E-mail: silvioalmeidajr@yahoo.com.br

RESUMO

INTRODUÇÃO: Ao longo dos últimos anos, com o crescimento da qualidade de vida e inversão da pirâmide etária, um aumento da população idosa, trouxe uma problemática de saúde pública, quanto a doenças ligadas ao envelhecimento, principalmente doenças neurodegenerativas (Domingos et al., 2018). Entre as patologias mais comuns a Doença de Alzheimer (DA) é uma das mais preocupantes e apresenta em sua etiopatologia a deposição de proteína β -amiloide, hiperfosforilação da proteína TAU intraneuronal, perda neuronal irreversível, neurodegenerativa e progressiva, e é clinicamente caracterizado pelo comprometimento das habilidades cognitivas, funcionais juntamente com alterações comportamentais (Scheltens et al., 2021).

Palavras-chave: Própolis Marrom. Doença de Alzheimer. Modelo in Silico. Propriedades Antioxidantes.

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos anos, com o crescimento da qualidade de vida e inversão da pirâmide etária, um aumento da população idosa, trouxe uma problemática de saúde pública, quanto a doenças ligadas ao envelhecimento, principalmente doenças neurodegenerativas (Domingos et al., 2018). Entre as patologias mais comuns a Doença de *Alzheimer* (DA) é uma das mais preocupantes e apresenta em sua etiopatologia a deposição de proteína β -amiloide, hiperfosforilação da proteína TAU intraneuronal, perda neuronal irreversível, neurodegenerativa e progressiva, e é clinicamente caracterizado pelo comprometimento das habilidades cognitivas, funcionais juntamente com alterações comportamentais (Scheltens et al., 2021).

O comprometimento de regiões do cérebro, em especial o hipocampo, leva a quadros de declínio cognitivo progressivo, alterações em sintomas neurocomportamentais, falha na memória recente e consolidação da memória (Bondi et al., 2017). Epidemiologicamente, a DA está associada a evolução da idade, entretanto, outros fatores importantes como alterações genéticas, níveis de escolaridade e exercícios da mente, modo de vida como etilismo e tabagismo, níveis de atividade física e alimentação, além de padrões de ecotoxicidade e ambientais, apresentam parcela representativa no surgimento e agravamento do quadro dessa patologia (Atri, 2019).

Na intenção de melhorar a qualidade de vida dos pacientes acometidos com DA, são utilizadas formulações terapêuticas nas fases leves e moderadas a partir de fármacos moduladores de colinesterases, por meio das enzimas catalisadas de acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE) com o objetivo de aumentar a acetilcolina na fenda sináptica (Samadi et al., 2012).

Esses inibidores estão disponíveis no mercado entretanto, sua escolha terapêutica deve ser feita com cuidado a partir da quadro do paciente e em especial, aceitabilidade do organismo aos efeitos adversos encontrados por essa droga, visto que alguns medicamentos como a tacrina apresenta alto índice de hepatotoxicidade em pacientes, sendo como alternativa o uso de galantamina, donepezil e rivastigmina, ambos, moduladores de acetilcolinesterase e com baixos índices de toxicidade e efeitos colaterais (Joe & Ringman, 2019).

Uma outra opção terapêutica medicamentosa, em uma apresentação diferente de monoterapia, é a utilização de fármacos na intenção de diminuir quadros característicos da doença, como déficit e alterações cognitivas, demência e atrofia cerebral, por meio de

modulação de vias distintas, como o caso do grupo de medicamentos, no qual são compostos por melatonina no qual possui atividade neuroprotetora, antioxidante e anti-inflamatória (Luo et al., 2015), a minociclina atuando também como neuroprotetora e ação sobre morte celular (Sahoo et al., 2018), a modafinil na modulação de vigília, visto que a privação de sono, leva a diminuição de neurogênese hipocampal, com aumento da geração de β -amiloide e disfunção de memória (Wilms et al., 2019) e por último a memantina que é um agonista não competitivo, bastante utilizado no tratamento moderado e grave em DA (Daulatzai, 2016).

Por meio de outra via não farmacológica tradicional, as plantas medicinais despertam interesses de forma geral na população ao redor do mundo, com produtos que apresentem atividade empírica sobre neuroproteção, prevenção e diminuição de quadros de doenças neurogeradoras como a DA (Gregory et al., 2021). Esses produtos, são utilizados devido sua vasta e diversificada composição química, com presença de flavonoides, taninos, terpenóides, alcaloides e fenóis, por meio de extratos brutos padronizados, extratos aquosos, hidroalcoólico, etanólico entre outros tantos na intenção de possuem elevado nível de atividade sobre inibição da enzima acetilcolinesterase que aumente a capacidade cognitiva, melhorando assim sinais de deficiência de aprendizagem (Manoharan et al., 2016).

Entre esses produtos é possível citar a *Ginkgo biloba* L, com efeitos positivos sobre acetilcolinesterase a outros fármacos conhecidos, além de apresentar atividades antioxidantas e anti-inflamatórias (Mohanta et al., 2014), ou ainda, a utilização da própolis (Shen et al., 2019) como potencial de modulação sobre AChE e BuChE, no qual se torna o foco deste trabalho.

A própolis é um produto natural resinoso e bem abundante no Brasil, é produzido a partir de uma mistura de saliva de abelhas e sua composição é dependente da região onde é produzido, matéria etnobotânica, período do ano e incidência de umidade do ambiente (Almeida-Junior et al., 2023), além da sua ampla utilização na medicina popular, é bastante estudada com atividades antioxidantas, anti-inflamatórias e analgésicas (dos Santos et al., 2022), despertando interesse em pesquisas futuras para DA.

2 OBJETIVO

Nessa intenção, o presente trabalho avaliou a atividade sobre colinesterases das principais moléculas presentes na Própolis Marrom Brasileira (PMB) em modelo computacional, visto que a predição de moléculas *in silico* para as mais diversas patologias é

uma realidade em grandes laboratórios, apresentando uma economia financeira e diminuição de ensaios em modelos animais (Wang et al., 2022).

3 METODOLOGIA

3.1 COLETA DE DADOS DA PRÓPOLIS MARROM DO BRASIL (PMB)

A coleta de dados fez parte de um estudo de caráter descritivo-exploratório no qual foram selecionados artigos primeiramente, procedendo a leitura e identificação se o mesmo apresentava perfil fitoquímico e identificação como PMB, sendo critério de inclusão deste trabalho previamente estabelecidos para o estudo (Almeida-Junior et al., 2022).

A partir da literatura científica, foi identificado o perfil químico da PMB. Para isso, foram utilizadas as bases de dados Google Scholar (<https://scholar.google.com.br/>), *PubMed* (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) e *ScienceDirect* (<https://www.sciencedirect.com/>). Foram utilizados os seguintes termos de pesquisa: própolis marrom e própolis marrom brasileira associados com perfil fitoquímico, perfil químico, compostos químicos, etnofarmacologia, padronização. Foram incluídos artigos de 2000 a 2022, no qual apresentassem a característica química da própolis, classificação como própolis marrom brasileira, região de coleta e se possível, identificar etnobotânica. Foram excluídos artigos que apresentassem apenas atividade biológica da própolis marrom brasileira, apresentasse outros tipos de própolis (verde, vermelha, amarela), ou ainda, própolis de outros países. A pesquisa de dados ocorreu de março a junho de 2022 e contou com dupla checagem de informações, evitando falhas.

3.2 BIOINFORMÁTICA

Para identificação de potencial sobre colinesterases em DA, foi realizado predição destas moléculas a partir de softwares comerciais. As análises foram realizadas por equipe competente, treinada para respectivo trabalho desenvolvido. Foram utilizadas as plataformas *SwissADME* (<http://www.swissadme.ch/>), *SwissDock* (<http://www.swissdock.ch/>), OSIRIS *Property Explorer®* (<http://www.organicchemistry.org/prog/peo>), *UCSF Chimera* 1.16.

3.3 PERFIL DE TOXICIDADE

Na intenção de elucidar possíveis efeitos adversos dos compostos presentes na própolis marrom brasileira, foi realizado predição de efeito toxicológico *in silico*, seguindo protocolo definido por Rodrigues & Costa (2021). Foi utilizado a plataforma OSIRIS *Property*

Explorer®, no qual permite presumir o potencial irritante, mutagênico, reprodutivo e cancerígeno dos compostos. A plataforma aqui elencada é devidamente validada e amplamente utilizadas em outros estudos científicos (Thangarasu et al., 2018).

3.4 PADRÃO CINÉTICO DAS MOLÉCULAS

Para determinação de característica de absorção, distribuição, metabolismo e excreção utilizou-se o software *SwissADME*. Cinco critérios foram avaliados, sendo que, para uma droga apresentar boa disponibilidade oral, ela deve apresentar pelo menos três dos seguintes critérios: 1) Área de superfície polar total (ASPT) <140 A₂; 2) Consenso de LopP ≤ 5; 3) Peso molecular <500 daltons; 4) Número de aceptores de ligações de hidrogênio ≤ 10; e 5) Número de doadores de ligações de hidrogênio ≤ 5 (Lipinski, 2004).

Mecanismos de absorção e interação com enzimas citocromo P450, também foram previstos utilizando o *SwissADME*, as quais incluem: Absorção pelo trato gastrointestinal (TGI) e pele, permeabilidade para a barreira hematoencefálica (BHE), interação com a glicoproteína P e com enzimas importantes do citocromo P450 (Daina et al., 2017).

3.5 ANCORAGEM MOLECULAR

SwissDock é baseado no software *EADock DSS* (Grosdidier et al., 2011) beneficiando-se dos recursos mais eficientes do algoritmo *EADock2* (Grosdidier et al., 2009), que é baseado em física porque segue a definição completa do campo de força *CHARMM* (MacKerell et al., 1998). A recuperação da estrutura 3D da proteína de interesse é realizada via PDB (<https://www.rcsb.org/>) e a estrutura do ligante a partir do ZINC (<http://zinc15.docking.org/>). O cálculo é realizado em servidores internos e os resultados são exibidos em 3D na página da web de resultados para facilitar a interpretação (Daina & Zoete, 2019).

Devido a condução do trabalho ser focada na identificação de moléculas frente a doença de Alzheimer, foi realizado a predição baseada em proteínas já conhecidas como inibição do glicogênio sintase quinase 3β (GSK3β - PDB ID: 3GB2), acetilcolinesterase (AChE - PDB ID: 1QTI) e butirilcolinesterase (BuChE - PDB ID: 1p0I). O *UCSF Chimera* versão 1.16 (um sistema de visualização para pesquisa e análise exploratória) foi usado para visualização da estrutura molecular (Pettersen et al., 2004).

4 RESULTADOS

A literatura apresenta quatro geotipos de PMB, entretanto é identificado uma divergência quanto ao padrão fitoquímico deste produto. Ribeiro et al., (2020) traz informações da própolis marrom coletada em Minas Gerais, com presença de 1,8-cineol, terpinen-4-ol, α -copaeno, β -cariofileno, γ -muurolene, nerolidol, espatulenol e apresentando como fonte etnobotânica mista através do Eucalipto (*Eucalyptus* sp) e Araucária (*Araucaria* sp). A própolis marrom coletada na Bahia, apresenta um perfil fitoquímico diferente, com presença de catequina, luteolina e ácido ferúlico (Devequi-Nunes et al., 2018), não sendo investigado a origem etnobotânica. Já Própolis Marrom de Rio Grande do Sul apresenta ácido p-cumárico, rutina, ácido clorogênico, ácido cafeico, kaempferol, miricetina, queracetina (Waller et al., 2017). No Paraná é possível encontrar um novo tipo de própolis marrom, com apresentação de perfil químico divergente com as demais, sendo ácido cupressico, ácido isocupressico, epi-13-torulosol, ácido transcomunico, ácido abiético (*Araucaria* sp) (Santos et al., 2021).

A partir do levantamento, foi realizado a identificação de molécula a partir da *PubChem* e identificado *CAS* de identificação e *Smile* para determinação de análises *in silico* (dados não mostrados). Quanto ao potencial toxicológico em metodologia de predição *in silico* a tabela traz informações acerca dos principais compostos presentes na própolis marrom brasileira. Dos 22 compostos apresentados neste estudo, 18,2% apresentaram potencial mutagênico e 9,1% apresentaram potencial carcinogênico ou tumorigênico a partir de predições *in silico*. Potencial irritante sobre mucosa ou pele é representado por 18,2% das moléculas estudadas, enquanto 9,1% apresentaram possibilidade sobre alterações teratogênicas ou reprodutivas. Nenhuma molécula do estudo apresentou atividade sobre as quatro categorias avaliadas.

As características quanto ao perfil de aspectos de solubilidade sejam em água (ESOL), ou em gordura (iLOGP) é identificado na tabela 1 e é de suma importância para determinação de via de utilização em estudos futuros. Entre as moléculas, 5 compostos apresentaram destaque quanto a sua lipofilicidade, sendo o epi-13-torulosol com maior afinidade lipofílica (iLOGP 3,85), seguido do ácido abiético (iLOGP 3,19), ácido 13-epi-cupressivo (iLOGP 3,18), ácido transmuconico (iLOGP 3,14) e isocupressico (iLOGP 3,06). Entre as moléculas, o ácido p-cumárico apresentou menor índice de interações em lipofilidade (iLOGP 0,95). Já referente a solubilidade, é possível identificar o epi-13-torulosol (ESOL 5,14) como maior solubilidade em água, seguido de ácido transmuconico (ESOL – 5,05), ácido abiético (ESOL – 4,59), isocupressico (ESOL – 4,39) e ácido 13-epi-cupressivo (ESOL – 4,17). Entre as demais

moléculas, o ácido clorogênico apresentou menor índice de solubilidade em água (ESOL – 1,62).

Como método de triagem, foi utilizado identificação de absorção em trato gastrointestinal e transposição de barreira hematoencefálica, com dados descritos na tabela 1. Com o primeiro aspecto, foram desconsiderados os compostos ácido clorogênico, miricetina, rutina, α -copiaeno, β -cariofileno e γ -muurolene. Quanto a transporte em barreira hematoencefálica, foram desconsiderados por não apresentar afinidade o ácido caféico, ácido p-cumárico, catequina, kaempferol, luteolina e quercetina.

Tabela 1. Farmacocinética das moléculas da matéria

Molécula	Absorção GI	B BB	Substrato P-gp	Interação enzima P450					Log K p (permeação da pele)
				CYP1 A2	CYP2 C19	CYP2 C9	CYP2 D6	CYP3 A4	
1,8-cineol	Alto	Sí m	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-5,30 cm/s
ácido 13-epi-cupressico	Alto	Sí m	Não	Não	Sim	Sim	Sim	Não	-3,76 cm/s
Ácido abiético	Alto	Sí m	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	-4,75 cm/s
Ácido cafeico	Alto	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-6,58 cm/s
Ácido clorogênico	Baixo	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-8,76 cm/s
Ácido ferúlico	Alto	Sí m	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-6,41 cm/s
Ácido p-cumárico	Alto	Sí m	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-6,26 cm/s
Ácido transcomunico	Alto	Sí m	Não	Não	Sim	Sim	Não	Sim	-4,09 cm/s
Catequina	Alto	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	-7,82 cm/s
Epi-13-torulosol	Alto	Sí m	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	-5,24 cm/s
Espatulenol	Alto	Sí m	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	-5,44 cm/s
Isocupressico	Alto	Sí m	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	-5,00 cm/s
Kaempferol	Alto	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	-6,70 cm/s
Luteolina	Alto	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	-6,25 cm/s
Miricetina	Baixo	Não	Não	Sim	Não	Não	Não	Sim	-7,04 cm/s
Nerolidol	Alto	Sí m	Não	Sim	Não	Sim	Não	Não	-4,23 cm/s
Quercetina	Alto	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	Sim	-7,05 cm/s
Rutina	Baixo	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	-10,26 cm/s

Terpinen-4-ol	Alto	Sí m	Não	Não	Não	Não	Não	Não	-4,93 cm/s
α -cpaeno	Baixo	Sí m	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Não	-4,37 cm/s
β -cariofileno	Baixo	Nã o	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	-4,44 cm/s
γ -muurolene	Baixo	Nã o	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	-4,49 cm/s

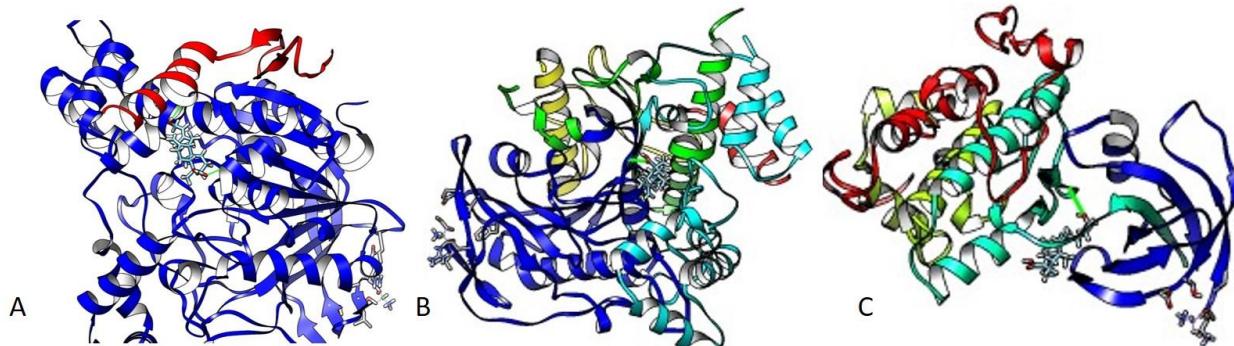
Além disso, é apresentado semelhança das moléculas com outras drogas já conhecidas. Na intenção de predizer uma possível molécula de atividade, foi levado em consideração semelhanças com medicamentos já aprovados por instituições internacionais como EMA (*European Medicines Agency*) e FDA (*Food and Drug Administration*). As moléculas de ácido ferúlico, epi-13-torulosol, espatulenol e nerolidol foram excluídas a partir de critérios de não identificação de Muegge. Já as moléculas 1,8-cineol e terpinem-4-ol foram excluídas devido critérios de não identificação por GANSO e Muegge (dados finais não mostrados).

A partir dos resultados encontrados, foi realizado a predição *in silico* para interações ligante-proteína, apenas o ácido cupressivo, ácido abiético, ácido transmuconico e ácido isocupressivo, ambas moléculas presentes na própolis marrom do Paraná. Frente a AChE, é encontrado uma variação de -8,71 a -7,29 ΔG kcal/mol, a BuChE uma variação de -9,11 a -6,35 ΔG kcal/mol, enquanto GSK3 β apresentou uma variação de -8,27 a -7,50 ΔG kcal/mol. A droga comercial donepezil foi utilizada como referência e padrão de atividade sobre enzimas citadas. Os dados individuais podem ser observados na tabela 2 e as ligações na figura 1.

Tabela 2. Predição das principais moléculas frente a moduladores da DA.			
	AChE	BuChE	GSK3 β
Referência	- 8,71	-9,11	-7,90
Ácido abiético	-7,29	-6,35	-8,27
Ácido cupressico	-7,44	-7,97	-7,50
Ácido isocupressico	-8,11	-8,23	-8,13
Ácido transmuconico	-7,50	-7,02	-7,95

Os valores são expressos em ΔG kcal/mol

Figura 1 – Ancoragem molecular do ácido isocupressivo em acetilcolinesterase (A), buriticolinesterase (B) e GSK3 β (C) por meio do SwissDock modulado no Chimera 1.16.



Sobre os sítios de ligações é possível observar que ocorre 42 possibilidades de ligações inespecíficas do ácido isocupressico sobre AChE por meio de interações com aminoácidos ASN⁴²⁹ (2.506 Å), ASN⁵²⁵ (1.941 Å), CYS²³¹ (2.507 Å), GLU³⁰⁶ (2.319 Å), GLU⁴⁵⁵ (2.139 Å), HSD³⁹⁸ (1.983 Å), PRO²³² (2.780 Å), SER²³⁵ (1.942 Å) e TRP⁵²⁴ (2.045 Å), enquanto o padrão comercial apresenta 48 possibilidades de ligações de uma forma mais específica, por meio de interações com aminoácidos GLU³⁰⁶ (2.255 Å), LEU³⁰⁵ (2.201 Å) e PHE²⁸⁸ (2.622 Å). É possível observar que apenas o aminoácido GLU³⁰⁶ apresenta semelhança de ligações entre as duas moléculas.

Quanto a interação com BuCHE, o ácido isocupressico pode ser ligar em 46 sítios diferentes de ligações, de uma forma mais específica, se ligando ao aminoácido GLN⁷¹ (2.209 Å). Quanto ao padrão de referência, são encontradas possibilidades de 53 interações, entretanto, não foi identificado a interação com aminoácido específico.

Quanto a inativação de GSK3 β , o ácido isocupressico apresentou 45 possíveis sítios de ligações, com interações entre os aminoácidos ARG³²⁸ (1.877 Å), ASN⁶⁴ (1.876 Å), ASP²⁰⁰ (1.946 Å), GLN⁸⁹ (2.773 Å), GLU⁹⁷ (1.957 Å), ILE⁶² (2.168 Å), LEU²⁰⁷ (1.940 Å), LEU⁸⁸ (2.184 Å), LYS⁹⁴ (2.576 Å), PHE⁶⁷ (2.033 Å), PRO¹³⁶ (2.163 Å), PRO³²⁵ (2.805 Å), SER¹⁷⁴ (1.999 Å), SER³⁶⁹ (2.638 Å), SER⁶⁶ (2.091 Å), TYR²³⁴ (2.159 Å), VAL¹³⁵ (1.906 Å) e VAL³⁴⁸ (1.952 Å), enquanto o padrão referência apresentou 43 possíveis ligações de uma forma mais específica, interagindo com aminoácidos ASN⁶⁴ (2.092 Å), ASP²⁰⁰ (2.107 Å), LEU³⁵⁹ (2.298 Å) e PHE³⁶⁰ (2.304 Å).

5 DISCUSSÃO

A constituição química da própolis apresenta variações ao longo das estações do ano, regiões que são coletas e tipos de fontes etnobotânica, o que faz com que sua atividade biológica seja modulada de acordo com essa composição. No estudo, a própolis que apresentou maior número moléculas ativas é a encontrada no Paraná, com perfil de terpenóides diferentes dos encontrados em

outras literaturas, sendo atribuído a *Araucaria* sp essa constituição (Santos et al., 2021). Olegário et al., (2019) identifica em seus estudos uma apresentação de 315 compostos presentes nos mais diversos tipos de própolis brasileira, sendo as mais comuns compostos fenólicos e terpenos, sendo este último os mais predominantes e que apresenta variação conforme fonte etnobotânica presente na região, corroborando assim, com os achados no levantamento realizado pelos autores na literatura. Dessa maneira, os terpenos foram a classe escolhida para avaliação de atividade, visto que é bem descrito na literatura sua utilização em estudos *in silico*, *in vitro*, *in vivo* e principalmente, estudos clínicos (Reveglia et al., 2018; Braz et al., 2020; Jiang et al., 2021).

Quanto segurança pré-clínica e clínica, faltam estudos referente ao potencial toxicológico da própolis marrom brasileira. Ribeiro et al., (2021) não identificou toxicidade sobre LLC-PK1 e VERO, duas linhagens normais de células renais, o mesmo identificado por Waller et al., (2017) que não observou potencial citotóxico sobre linhagem de MDBK, célula renal. Sobre potencial mutagênico, Fernandes et al., (2015) não identificaram perfil sobre ensaio com *Drosophila melanogaster*. É possível identificar na literatura, o potencial citotóxico da PMB sobre células tumorais (Lima et al., 2019) além do seu potencial antigenotóxico em modelo murino induzido por doxorrubicia (Fernandes et al., 2014).

O potencial de interações com meios lipofílicos e hidrofílicos devem ser levados em consideração referente a farmacocinética na determinação de novas moléculas com atividades biológicas, sendo estudos cinéticos amplamente solicitados em validações e perspectivas de desenvolvimento de novos fármacos (Rao et al., 2019). Outro fator importante é a transposição pelo trato gastrointestinal e se as moléculas presentes em circulação conseguem transpor a barreira hematoencefalica, visto que a atividade buscada tem ação direta sobre sistema nervoso central (Wang et al., 2012).

O potencial de modulação das colinesterases na DA é identificado a partir de modulações de três vias específicas, ou seja, acetilcolinesterase, buritilcolinesterase e modulação da vida de GSK3 β , por meio de ação antioxidante, como já foi identificado na própolis de Okinawa (Shahinuzzaman et al., 2018), ou ainda, por meio de atividade de neuroproteção como já foi relatado anteriormente por Balaha et al., (2021), que identificou éster fenetílico do ácido cafeico (CAPE) da própolis brasileira na modulação de doenças neurodegenerativas. Esse potencial antioxidante da PMB já é conhecido e descrito na literatura nos ensaios de DPPH, ABTS +, FRAP, ORAC (Andrade et al., 2017; de Oliveira Dembogurski et al., 2018; Lima et al., 2019).

Na predição, o ácido isocupressico apresentou melhores resultados frente as três variáveis avaliadas. Sobre esse composto, há pouco registrado na literatura, porém apresenta potencial de

inibição da esteroidogênese (Tsui et al., 2012), potencial anti-aderente de *S. aureus* sobre cateter (El-Guendouz et al., 2016), modulação de receptor transiente anquirina-1 (TRPA1) em células pulmonares por meio de estresse oxidativo e modulação de GSH (Shapiro et al., 2013) além do seu potencial apopótico sobre neuroblastoma (Qiao et al., 2019).

Em especial, o ácido isocupressico é capaz de modular a agregação do peptídeo β -amilóide por meio das vias via GSK3 β e NF- κ B (Yan et al., 2020). GSK3 possui altos níveis de expressão no cérebro e está associada a alguns em muitos distúrbios prevalentes, incluindo doenças psiquiátricas e neurológicas, doenças inflamatórias, câncer e outras, em especial, na doença de Alzheimer no qual, sua modulação demonstrou promover todos os principais processos patológicos, incluindo a produção de peptídeo β amilóide e fosforilação de TAU, que levam às duas características, placas amilóides e emaranhados neurofibrilares, respectivamente (Beurel et al., 2015).

Shahinuzzaman et al., (2018) identificou em seus estudos, flavonoides a partir da própolis para atividade sobre AChE em modelo computacional e transpôs para modelos in vitro identificando potencial semelhante, obtendo valores de ΔG kcal/mol próximos aos encontrados nesse trabalho (-7,1 a -9,3). Estudos conduzidos na Coreia do Sul demonstram atividade anti-Alzheimer da própolis por meio do potencial de modulação das vidas da enzima de clivagem precursora de β -amilóide humana, inibitória da acetilcolinesterase (AChE), além da sua atividade antioxidante (Wang et al., 2016).

Outra via de atuação proposta, é por meio da modulação de BuChE. Essa enzima possui atividade associada ao amilóide e neurítico em placas neurítica, além de poder desempenhar um papel de fosforilação da TAU, pertinentes na terapêutica da enzima para inibição e responsável pela maturação de estruturas supostamente neurotóxicas o que leva à neurodegeneração o que é muito comum na DA, caracterizando como alvo importante no desenvolvimento de fases mais graves da doença (Greig et al., 2002). Gülçin et al., (2016) identifica em seus estudos o potencial anti-Alzheimer pela modulação de BuChE além do potencial antioxidante glutationa S-transferase, lactoperoxidase e isoenzimas I, II, IX e XII da anidrase carbônica.

O uso concomitante da PMB com um fármaco conhecido pode apresentar benefícios ao paciente com DA. Ayikobua et al., (2018) em modelo experimental, associou o uso de donepezil com extrato etanólico de própolis no qual apresentou resultados superiores a monoterapia com donepezil, demonstrando atividade sinérgica, potencializando a atividade do fármaco já conhecido. O uso de produtos naturais, sejam compostos isolados ou extratos e demais preparações associados a medicamentos convencionais vem apresentando grande potencial biológico, principalmente quando relaciona-se a baixa atividade, ou resistência de medicamentos, demonstrando a necessidade e importância de desenvolvimento dessa mais pesquisas sobre o assunto (Yuan et al., 2017).

Em suma, métodos de predição por modelos computacionais são amplamente utilizados como screening de produtos naturais, fazendo com que seja realizado de forma segura, de baixo custo e efetivo, prevendo apenas moléculas de interesse, inclusive, com aplicações dentro da DA (El-Hawary et al., 2021). A investigação por docking molecular ou ancoragem apresenta confiabilidade, desde que empregado ferramentas corretas, como é observado por Javed et al., (2021), no qual identificou potencial toxicológico e atividade sobre AChE, BuChE e mediadores inflamatórios por ancoragem e apresentou confirmação *in vivo* e *ex vivo*. O mesmo é identificado por Innok et al., (2021), que observou a atividade anti-AChE *in silico* e confirmou por meio de estudos de bancada. Outros estudos são observados com transposição dos resultados obtidos na ancoragem virtual com aplicações dentro da modulação de vias na DA (Cruz-Vicente et al., 2021; Li et al., 2018; Liu et al., 2019; Sarkar et al., 2021).

6 CONCLUSÃO

Por meio de ferramentas computacionais, foram avaliados 22 moléculas originadas da Própolis Marrom Brasileira e após caracterização físico-química da moléculas, solubilidade em lipídio e água, determinação de cinética com atenção especial a transporte no trato gastrointestinal e transposição de barreira hematoencefálica, e observação ao perfil de toxicidade, apenas 4 moléculas apresentaram perfil de interesse para o estudo sendo elas ácido abiético, ácido cupressico, ácido isocupressico e o ácido transmuconico, em que apresentam bons resultados frente a interação com as três vias para doença de Alzheimer, sendo acetilcolinesterase, burutilcolinesterase e GSK3 β quando comparado ao donepezil. Dessa maneira, a Própolis Marrom Brasileira originada no Paraná apresenta melhor possibilidade de atividade frente a alterações encontradas na doença de Alzheimer em especial o ácido isocupressico.

REFERÊNCIAS

- Almeida-Junior, S. de, Nicobue, V. R., & Santos, J. C. dos. (2022). Uso da ozonioterapia e medicina Ayurveda como práticas complementares no tratamento de infecção por Sars-CoV-2. *REVISE - Revista Integrativa em Inovações Tecnológicas nas Ciências da Saúde*, 9(fluxocontinuo), Artigo fluxocontinuo. <https://doi.org/10.46635/revise.v9ifluxocontinuo.2625>
- Andrade, J. K. S., Denadai, M., de Oliveira, C. S., Nunes, M. L., & Narain, N. (2017). Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. *Food Research International*, 101, 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.066>
- Atri, A. (2019). The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management. *The Medical Clinics of North America*, 103(2), 263–293. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.10.009>
- Ayikobua, E. T., Semuyaba, I., Eze, D. E., Kalange, M., Nansunga, M., Okpanachi, A. O., & Safiriyu, A. A. (2018). Combined Donepezil and Ethanolic Extract of Propolis Improved Memory Better Than Donepezil and Propolis Monotherapy in Wild Type *Drosophila melanogaster*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, 2018, 3717328. <https://doi.org/10.1155/2018/3717328>
- Balaha, M., De Filippis, B., Cataldi, A., & di Giacomo, V. (2021). CAPE and Neuroprotection: A Review. *Biomolecules*, 11(2), 176. <https://doi.org/10.3390/biom11020176>
- Beurel, E., Grieco, S. F., & Jope, R. S. (2015). Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases. *Pharmacology & therapeutics*, 0, 114–131. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.016>
- Bondi, M. W., Edmonds, E. C., & Salmon, D. P. (2017). Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future. *Journal of the International Neuropsychological Society: JINS*, 23(9–10), 818–831. <https://doi.org/10.1017/S135561771700100X>
- Braz, J. de V. C., Carvalho Nascimento Júnior, J. A., & Serafini, M. R. (2020). Terpenes with Antitumor Activity: A Patent Review. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 15(4), 321–328. <https://doi.org/10.2174/1574892815666201002162315>
- Cruz-Vicente, P., Passarinha, L. A., Silvestre, S., & Gallardo, E. (2021). Recent Developments in New Therapeutic Agents against Alzheimer and Parkinson Diseases: In-Silico Approaches. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(8), 2193. <https://doi.org/10.3390/molecules26082193>
- Daina, A., Michelin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7(1), Artigo 1. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Daina, A., & Zoete, V. (2019). Application of the SwissDrugDesign Online Resources in Virtual Screening. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4612. <https://doi.org/10.3390/ijms20184612>

Daulatzai, M. A. (2016). Pharmacotherapy and Alzheimer's Disease: The M-Drugs (Melatonin, Minocycline, Modafinil, and Memantine) Approach. *Current Pharmaceutical Design*, 22(16), 2411–2430. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160203142111>

de Almeida-Junior, S., Ferraz, M. V. F., de Oliveira, A. R., Maniglia, F. P., Bastos, J. K., & Furtado, R. A. (2023). Advances in the phytochemical screening and biological potential of propolis. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 37(5), 886–899. <https://doi.org/10.1111/fcp.12898>

de Oliveira Dembogurski, D. S., Silva Trentin, D., Boaretto, A. G., Rigo, G. V., da Silva, R. C., Tasca, T., Macedo, A. J., Carollo, C. A., & Silva, D. B. (2018). Brown propolis-metabolomic innovative approach to determine compounds capable of killing *Staphylococcus aureus* biofilm and *Trichomonas vaginalis*. *Food Research International*, 111, 661–673. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.033>

Devequi-Nunes, D., Machado, B. A. S., Barreto, G. de A., Rebouças Silva, J., da Silva, D. F., da Rocha, J. L. C., Brandão, H. N., Borges, V. M., & Umsza-Guez, M. A. (2018). Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. *PLoS ONE*, 13(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207676>

Domingos, J., Keus, S. H. J., Dean, J., de Vries, N. M., Ferreira, J. J., & Bloem, B. R. (2018). The European Physiotherapy Guideline for Parkinson's Disease: Implications for Neurologists. *Journal of Parkinson's Disease*, 8(4), 499–502. <https://doi.org/10.3233/JPD-181383>

dos Santos, F. F., Morais-Urano, R. P., Cunha, W. R., de Almeida, S. G., Cavallari, P. S. dos S. R., Manuquian, H. A., Pereira, H. de A., Furtado, R., Santos, M. F. C., & Amdrade e Silva, M. L. (2022). A review on the anti-inflammatory activities of Brazilian green, brown and red propolis. *Journal of Food Biochemistry*, 6(n/a), e14350. <https://doi.org/10.1111/jfbc.14350>

El-Guendouz, S., Aazza, S., Lyoussi, B., Bankova, V., Lourenço, J. P., Costa, A. M. R., Mariano, J. F., Miguel, M. G., & Faleiro, M. L. (2016). Impact of Biohybrid Magnetite Nanoparticles and Moroccan Propolis on Adherence of Methicillin Resistant Strains of *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 21(9), 1208. <https://doi.org/10.3390/molecules21091208>

El-Hawary, S. S., Sayed, A. M., Issa, M. Y., Ebrahim, H. S., Alaaeldin, R., Elrehany, M. A., Abd El-Kadder, E. M., & Abdelmohsen, U. R. (2021). Anti-Alzheimer chemical constituents of *Morus macroura* Miq.: Chemical profiling, in silico and in vitro investigations. *Food & Function*, 12(17), 8078–8089. <https://doi.org/10.1039/d1fo01177d>

Fernandes, F. H., da R Guterres, Z., Violante, I. M. P., Lopes, T. F. S., Garcez, W. S., & Garcez, F. R. (2015). Evaluation of mutagenic and antimicrobial properties of brown propolis essential oil from the Brazilian Cerrado biome. *Toxicology Reports*, 2, 1482–1488. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.11.007>

Fernandes, F. H., da Rosa Guterres, Z., Garcez, W. S., Lopes, S. M., Corsino, J., & Garcez, F. R. (2014). Assessment of the (anti)genotoxicity of brown propolis extracts from Brazilian Cerrado biome in a *Drosophila melanogaster* model. *Food Research International*, 62, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.029>

Gregory, J., Vengalasetti, Y. V., Bredesen, D. E., & Rao, R. V. (2021). Neuroprotective Herbs for the Management of Alzheimer's Disease. *Biomolecules*, 11(4), 543. <https://doi.org/10.3390/biom11040543>

Greig, N. H., Lahiri, D. K., & Sambamurti, K. (2002). Butyrylcholinesterase: An important new target in Alzheimer's disease therapy. *International Psychogeriatrics*, 14 Suppl 1, 77–91. <https://doi.org/10.1017/s1041610203008676>

Grosdidier, A., Zoete, V., & Michelin, O. (2009). Blind docking of 260 protein-ligand complexes with EADock 2.0. *Journal of Computational Chemistry*, 30(13), 2021–2030. <https://doi.org/10.1002/jcc.21202>

Grosdidier, A., Zoete, V., & Michelin, O. (2011). Fast docking using the CHARMM force field with EADock DSS. *Journal of Computational Chemistry*, 32(10), 2149–2159. <https://doi.org/10.1002/jcc.21797>

Gülçin, İ., Scozzafava, A., Supuran, C. T., Akıncıoğlu, H., Koksal, Z., Turkan, F., & Alwasel, S. (2016). The effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on metabolic enzymes including acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, glutathione S-transferase, lactoperoxidase, and carbonic anhydrase isoenzymes I, II, IX, and XII. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(6), 1095–1101. <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1094470>

Innok, W., Hiranrat, A., Chana, N., Rungrotmongkol, T., & Kongsune, P. (2021). In silico and in vitro anti-AChE activity investigations of constituents from Mytragyna speciosa for Alzheimer's disease treatment. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 35(3), 325–336. <https://doi.org/10.1007/s10822-020-00372-4>

Javed, M. A., Ashraf, N., Saeed Jan, M., Mahnashi, M. H., Alqahtani, Y. S., Alyami, B. A., Alqarni, A. O., Asiri, Y. I., Ikram, M., Sadiq, A., & Rashid, U. (2021). Structural Modification, In Vitro, In Vivo, Ex Vivo, and In Silico Exploration of Pyrimidine and Pyrrolidine Cores for Targeting Enzymes Associated with Neuroinflammation and Cholinergic Deficit in Alzheimer's Disease. *ACS Chemical Neuroscience*, 12(21), 4123–4143. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.1c00507>

Jiang, C., Xue, J., Yuan, Y., Li, Y., Zhao, C., Jing, Q., Zhang, X., Yang, M., Han, T., Bai, J., Li, Z., Li, D., & Hua, H. (2021). Progress in structure, synthesis and biological activity of natural cephalotane diterpenoids. *Phytochemistry*, 192, 112939. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.112939>

Joe, E., & Ringman, J. M. (2019). Cognitive symptoms of Alzheimer's disease: Clinical management and prevention. *BMJ*, 367, l6217. <https://doi.org/10.1136/bmj.l6217>

Li, H., Wang, X., Yu, H., Zhu, J., Jin, H., Wang, A., & Yang, Z. (2018). Combining in vitro and in silico Approaches to Find New Candidate Drugs Targeting the Pathological Proteins Related to the Alzheimer's Disease. *Current Neuropharmacology*, 16(6), 758–768. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666171030142108>

Lima, V. H. M. de, Almeida, K. de C. R., Alves, C. C. F., Rodrigues, M. L., Crotti, A. E. M., Souza, J. M. de, Ribeiro, A. B., Squarisi, I. S., Tavares, D. C., Martins, C. H. G., & Miranda, M. L. D. (2019). Biological properties of volatile oil from Brazilian brown propolis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(6), 807–810. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2019.07.004>

Lipinski, C. A. (2004). Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today. Technologies*, 1(4), 337–341. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>

Liu, S., Cao, X.-L., Liu, G.-Q., Zhou, T., Yang, X.-L., & Ma, B.-X. (2019). The in silico and in vivo evaluation of puerarin against Alzheimer's disease. *Food & Function*, 10(2), 799–813. <https://doi.org/10.1039/c8fo01696h>

Luo, X.-T., Wang, C.-M., Liu, Y., & Huang, Z.-G. (2015). New multifunctional melatonin-derived benzylpyridinium bromides with potent cholinergic, antioxidant, and neuroprotective properties as innovative drugs for Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 103, 302–311. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.08.052>

MacKerell, A. D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L., Evanseck, J. D., Field, M. J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F. T., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D. T., Prodhom, B., ... Karplus, M. (1998). All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 102(18), 3586–3616. <https://doi.org/10.1021/jp973084f>

Manoharan, S., Essa, M. M., Vinoth, A., Kowsalya, R., Manimaran, A., & Selvasundaram, R. (2016). Alzheimer's Disease and Medicinal Plants: An Overview. *Advances in Neurobiology*, 12, 95–105. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28383-8_6

Mohanta, T. K., Tamboli, Y., & Zubaidha, P. K. (2014). Phytochemical and medicinal importance of *Ginkgo biloba* L. *Natural Product Research*, 28(10), 746–752. <https://doi.org/10.1080/14786419.2013.879303>

Olegário, L. S., Andrade, J. K. S., Andrade, G. R. S., Denadai, M., Cavalcanti, R. L., da Silva, M. A. A. P., & Narain, N. (2019). Chemical characterization of four Brazilian brown propolis: An insight in tracking of its geographical location of production and quality control. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 123, 481–502. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.004>

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>

Qiao, Y., Sunada, N. K., Hatada, A. E., Lange, I., Khutsishvili, M., Alizade, V., Atha, D., Ko'omoa-Lange, D.-L., & Borris, R. P. (2019). Potential anti-neuroblastoma agents from *Juniperus oblonga*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 516(3), 733–738. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.06.123>

Rao, T., Tan, Z., Peng, J., Guo, Y., Chen, Y., Zhou, H., & Ouyang, D. (2019). The pharmacogenetics of natural products: A pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective. *Pharmacological Research*, 146, 104283. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104283>

Reveglia, P., Cimmino, A., Masi, M., Nocera, P., Berova, N., Ellestad, G., & Evidente, A. (2018). Pimarane diterpenes: Natural source, stereochemical configuration, and biological activity. *Chirality*, 30(10), 1115–1134. <https://doi.org/10.1002/chir.23009>

Ribeiro, V. P., Arruda, C., Aldana-Mejia, J. A., Bastos, J. K., Tripathi, S. K., Khan, S. I., Khan, I. A., & Ali, Z. (2021). Phytochemical, Antiplasmodial, Cytotoxic and Antimicrobial Evaluation of a

Southeast Brazilian Brown Propolis Produced by *Apis mellifera* Bees. *Chemistry & Biodiversity*, 18(9), e2100288. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100288>

Ribeiro, V. P., Arruda, C., Mejía, J. A. A., Candido, A. C. B. B., Dos Santos, R. A., Magalhães, L. G., & Bastos, J. K. (2020). Brazilian southeast brown propolis: Gas chromatography method development for its volatile oil analysis, its antimicrobial and leishmanicidal activities evaluation. *Phytochemical Analysis: PCA*. <https://doi.org/10.1002/pca.2988>

Rodrigues, J. S. da M., & Costa, E. D. (2021). In silico ADME/T prediction of novel potential inhibitors against dengue virus Author. *Research, Society and Development*, 10(4), Artigo 4. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i4.14459>

Sahoo, A. K., Dandapat, J., Dash, U. C., & Kanhar, S. (2018). Features and outcomes of drugs for combination therapy as multi-targets strategy to combat Alzheimer's disease. *Journal of Ethnopharmacology*, 215, 42–73. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.12.015>

Samadi, A., Estrada, M., Pérez, C., Rodríguez-Franco, M. I., Iriepa, I., Moraleda, I., Chioua, M., & Marco-Contelles, J. (2012). Pyridonepezils, new dual AChE inhibitors as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease: Synthesis, biological assessment, and molecular modeling. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 57, 296–301. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.09.030>

Santos, M. F. C., Oliveira, L. C., Ribeiro, V. P., Soares, M. G., Morae, G. de O. I., Sartori, A. G. de O., Rosalen, P. L., Bastos, J. K., de Alencar, S. M., Veneziani, R. C. S., & Ambrósio, S. R. (2021). Isolation of diterpenes from Araucaria sp Brazilian brown propolis and development of a validated high-performance liquid chromatography method for its analysis. *Journal of Separation Science*, 44(16), 3089–3097. <https://doi.org/10.1002/jssc.202100374>

Sarkar, P., Jayaraj, P., Patwardhan, K., Yeole, S., Das, S., Somaiya, Y., Desikan, R., & Thirumurugan, K. (2021). In Silico Analysis to Link Insulin Resistance, Obesity and Ageing with Alzheimer's Disease. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, 71(12), 2608–2617. <https://doi.org/10.1007/s12031-021-01875-x>

Scheltens, P., De Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C. E., Cummings, J., & van der Flier, W. M. (2021). Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)*, 397(10284), 1577–1590. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32205-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32205-4)

Shahinuzzaman, M., Taira, N., Ishii, T., Halim, M. A., Hossain, M. A., & Tawata, S. (2018). Anti-Inflammatory, Anti-Diabetic, and Anti-Alzheimer's Effects of Prenylated Flavonoids from Okinawa Propolis: An Investigation by Experimental and Computational Studies. *Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 23(10), 2479. <https://doi.org/10.3390/molecules23102479>

Shapiro, D., Deering-Rice, C. E., Romero, E. G., Hughen, R. W., Light, A. R., Veranth, J. M., & Reilly, C. A. (2013). Activation of Transient Receptor Potential Ankyrin-1 (TRPA1) in Lung Cells by Wood Smoke Particulate Material. *Chemical research in toxicology*, 26(5), 750–758. <https://doi.org/10.1021/tx400024h>

Shen, X., Liu, Y., Luo, X., & Yang, Z. (2019). Advances in Biosynthesis, Pharmacology, and Pharmacokinetics of Pinocembrin, a Promising Natural Small-Molecule Drug. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(12), E2323. <https://doi.org/10.3390/molecules24122323>

Thangarasu, P., Thamarai Selvi, S., & Manikandan, A. (2018). Unveiling novel 2-cyclopropyl-3-ethynyl-4-(4-fluorophenyl)quinolines as GPCR ligands via PI3-kinase/PAR-1 antagonism and platelet aggregation valuations; development of a new class of anticancer drugs with thrombolytic effects. *Bioorganic Chemistry*, 81, 468–480. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.09.011>

Tsui, K.-H., Wang, J.-Y., Wu, L.-S., & Chiu, C.-H. (2012). Molecular Mechanism of Isocupressic Acid Suppresses MA-10 Cell Steroidogenesis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, e190107. <https://doi.org/10.1155/2012/190107>

Waller, S. B., Peter, C. M., Hoffmann, J. F., Picoli, T., Osório, L. da G., Chaves, F., Zani, J. L., de Faria, R. O., de Mello, J. R. B., & Meireles, M. C. A. (2017). Chemical and cytotoxic analyses of brown Brazilian propolis (*Apis mellifera*) and its in vitro activity against itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis*. *Microbial Pathogenesis*, 105, 117–121. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.02.022>

Wang, L., Chiang, H.-C., Wu, W., Liang, B., Xie, Z., Yao, X., Ma, W., Du, S., & Zhong, Y. (2012). Epidermal growth factor receptor is a preferred target for treating Amyloid- β -induced memory loss. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(41), 16743–16748. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208011109>

Wang, M., Song, W.-M., Ming, C., Wang, Q., Zhou, X., Xu, P., Krek, A., Yoon, Y., Ho, L., Orr, M. E., Yuan, G.-C., & Zhang, B. (2022). Guidelines for bioinformatics of single-cell sequencing data analysis in Alzheimer's disease: Review, recommendation, implementation and application. *Molecular Neurodegeneration*, 17(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s13024-022-00517-z>

Wang, X., Sankarapandian, K., Cheng, Y., Woo, S. O., Kwon, H. W., Perumalsamy, H., & Ahn, Y.-J. (2016). Relationship between total phenolic contents and biological properties of propolis from 20 different regions in South Korea. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16, 65. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1043-y>

Wilms, W., Woźniak-Karczewska, M., Corvini, P. F.-X., & Chrzanowski, Ł. (2019). Nootropic drugs: Methylphenidate, modafinil and piracetam - Population use trends, occurrence in the environment, ecotoxicity and removal methods - A review. *Chemosphere*, 233, 771–785. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.016>

Yan, L., He, X., Jin, Y., Wang, J., Liang, F., Pei, R., Li, P., Wang, Y., & Su, W. (2020). Modulation of the A β -Peptide-Aggregation Pathway by Active Compounds From *Platycladus orientalis* Seed Extract in Alzheimer's Disease Models. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12, 207. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00207>

Yuan, H., Ma, Q., Cui, H., Liu, G., Zhao, X., Li, W., & Piao, G. (2017). How Can Synergism of Traditional Medicines Benefit from Network Pharmacology? *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(7), E1135. <https://doi.org/10.3390/molecules22071135>