



ISÔMEROS DA BAICALINA COMO POTENCIAL ANTÍDOTO PARA INTOXICAÇÃO POR RICINA

Samuel de Souza Farias¹, Tales Natan Freitas da Silva², Rafael Trindade Maia³

¹ Graduado em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos pelo Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG

² Graduando do curso de farmácia da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG

³ Professor Doutor do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia de Ciências biológicas do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG

RESUMO

A ricina é uma proteína altamente tóxica provinda da planta *Ricinus communis*, mais conhecida como mamona. Essa toxina possui a capacidade de inativar os ribossomos, resultando na inibição da síntese proteica e como consequência a morte celular por apoptose. Essa característica torna a ricina uma arma biológica em potencial, visto que a maioria dos casos de intoxicação deve-se à ingestão por via oral acidental por crianças pequenas e animais, bem como a tentativa de suicídio, no caso de adultos, tornando a intoxicação por ricina um problema de saúde para a população em geral. O foco deste trabalho é avaliar a molécula de baicalina e seus isômeros como possíveis compostos no combate da ação da ricina e no tratamento pós-exposição, utilizando o método de biologia computacional, *docking* molecular. A análise demonstrou que os isômeros de baicalina apresentaram alta capacidade de inibir a molécula de ricina bem como uma facilidade de realizar uma ligação espontânea com a mesma, corroborando com a eficácia sugerida na literatura. Contudo, a molécula de baicalina possui algumas características que devem ser melhoradas por meio de modificações em sua estrutura para que sua biodisponibilidade seja adequada. Ademais, este estudo surge como um guia a outros que utilizem *docking* como uma ferramenta na prospecção de compostos com possível atividade inibitória contra diferentes tipos de alvos moleculares.

Palavras-chave: *Docking* molecular, toxina, intoxicação, baicalina, ricina.

ISOMMERS OF BAICALIN AS AN POTENTIAL ANTIDOTE TO INTOXICATION BY RICIN

ABSTRACT

Ricin is a protein highly toxic provenied from the plant *Ricinus communis*, most recognized as mamona. This toxin has the capacity to inactivate the ribosomes, resulting in inhibition of protein sintesis, and as a consequence, cell death by apoptosis. This characteristic makes ricin a potential biological weapon, since on the most of cases of intoxication by ricin are due to accidental oral ingestion by small children, and animals, as well as the suicide attempt in the case of adults, making the intoxication by ricin a health problem for the general population. The objective of this work is to evaluate the baicalin molecule and its isomers as propably compounds on the combat of ricin action and in post-exposure the treatment, utilizing the method of computational biology, molecular docking. The analisys demonstrated that isomers of baicalin apresented high capacity to inibiting the molecule of ricin as well a facility to make a spontaneous binding with it, corroboring



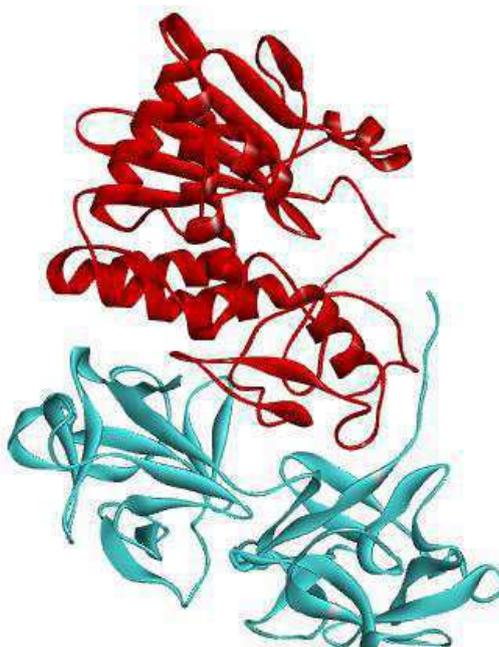
with the sugered efficacy on the literature. However, the baicalin molecule has some characteristics that must be improved through modifications in its structure so that its bioavailability is adequate. Furthermore, this study appears as a guide to others who use docking as a tool in the search for compounds with possible inhibitory activity against different types of molecular targets.

Keywords: Molecular docking, toxin, intoxication, baicalin, ricin.

INTRODUÇÃO

A ricina faz parte do grupo de proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) do tipo 2, a ricina é composta por duas cadeias, cadeia A e cadeia B unidas por uma ligação dissulfeto, sendo a cadeia A uma toxina com a capacidade de inibir a síntese de proteínas e a cadeia B uma subunidade com função de facilitar a entrada do complexo enzimático no interior da célula, de forma a unir-se a glicoproteínas e glicolípido contendo galactosídeos ⁽¹²⁾ ⁽¹⁸⁾ (Figura 1).

Figura 1 - Visão tridimensional da molécula de ricina e suas respectivas cadeias, A (vermelho) e B (Ciano), responsáveis respectivamente pela ação tóxica e por sua entrada na célula.



Fonte: Imagem gerada no software *Discovery Studio* (PDB-ID: 2AAI) ⁽²¹⁾.

A mamona (*Ricinus communis* L.) da família Euphorbiaceae é a planta responsável pela produção da ricina. Esta espécie vegetal se originou na África mas atualmente é distribuída em diversos locais pelo mundo para fins industriais e ornamentais, tendo como maiores produtores de mamona a Índia, China e Brasil. Embora a ricina constitua uma das principais proteínas encontradas nas sementes da mamona, representa apenas 1 a 5% de seu conteúdo ⁽¹⁹⁾.



A toxicidade da ricina varia de acordo com a via de exposição. A dose letal (DL50) oral média em camundongos é de 30 mg/kg, aproximadamente 1000 vezes maior do que a dose reportada para intoxicar por via parenteral ou inalatória. Essa menor toxicidade da ricina por via oral pode ser explicada devido a uma menor absorção por essa via ⁽⁸⁾.

Entre as substâncias químicas relacionadas na Convenção para a Proibição de Armas Químicas (CWC), a ricina se destaca devido a sua alta toxidez, grande disponibilidade e facilidade de extração ⁽¹⁹⁾, requerindo para sua obtenção e purificação apenas o conhecimento básico de técnicas laboratoriais ⁽²⁶⁾.

Esta toxina é classificada como um agente de prioridade da Categoria B pelo Centro para Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (CDC), sendo um dos agentes biológicos com uma das maiores toxicidades conhecidas. Essa toxina pode entrar em contato com o indivíduo por diferentes rotas de intoxicação, incluindo injeção, ingestão (alimentos e água contaminados) e inalação (exposição a aerossóis), sendo que todas elas representam uma grande ameaça do ponto de vista do bioterrorismo ⁽¹⁹⁾.

Diante destas informações deve-se salientar a periculosidade que representa tal toxina. Entretanto, a maioria dos casos de intoxicação por esta são casos de ingestão acidental quando se trata de crianças e animais domésticos, e em casos de ingestão intencional por adultos geralmente é feita por motivos de suicídio ou em alguns raros casos de tentativa de assassinato. Nestes casos, quando percebida a intoxicação é necessário tratamento imediato, para preservar a vida do paciente e evitar complicações ⁽¹⁾.

O ideal em termos de eficácia de tratamento para casos de intoxicação humana é que se tenha uma substância que consiga inativar a ricina e sirva de antídoto, porém no presente momento existem apenas terapias de suporte aos sintomas causados pela intoxicação por ricina e ainda nenhum antídoto específico para a mesma, demandando uma necessidade de estudos acerca do mecanismo de ação tóxica da ricina afim de propor moléculas que funcionem inibindo este mecanismo ⁽¹⁾.

A ricina entra na célula por meio da sua cadeia B que reconhece tipos complexos de receptores de carboidratos presentes na superfície das células eucarióticas. Esses receptores podem conter uma porção N-acetilgalactosamina terminal ou resíduos de galactose β -1,4 ligados entre si. Os resíduos de galactosil são abundantes na superfície da maioria dos tipos de células, eucarióticas, sendo elas portanto sensíveis à ricina. Esta toxina também pode se ligar a receptores de glicanos do tipo manose em células que os apresentam, principalmente os macrófagos ⁽²⁵⁾.

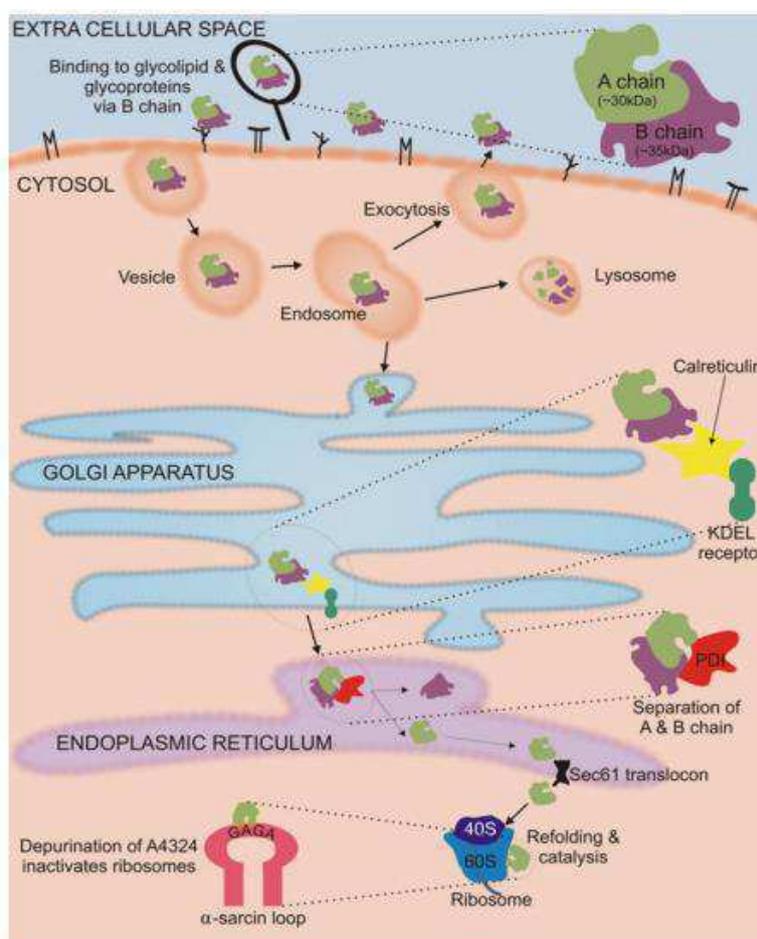
Após a ligação da ricina na célula, esta é transportada para dentro da célula por meio de endocitose, tendo sido demonstrado que a ricina é capaz de empregar diferentes mecanismos



endocíticos para atingir o interior celular. Uma vez no interior da célula, a ricina é internalizada pelos endossomos, uma parte das moléculas da ricina é reciclada e retorna para fora da membrana, outra parte é transportada por endossomos tardios para sofrer degradação pelos lisossomos, e uma pequena parte da ricina absorvida é transportada para o complexo de Golgi (25).

Do complexo de Golgi, a ricina é transportada para o retículo endoplasmático e por último é transportada para o citosol, sendo que todo esse processo ocorre de forma lenta, mas apenas um número pequeno de moléculas é suficiente para causar morte celular. Após o contato com os ribossomos a cadeia A da ricina promove a remoção de uma adenina específica (despurinação) da porção 28S do ácido ribonucleico ribossomal que está na subunidade 60S, impedindo a ligação do fator de alongamento 2 e por consequência impedindo a síntese proteica e consequentemente levando ao processo de apoptose das células (12) (22). A figura a seguir demonstra um esquema de como ocorre o processo de entrada e a ação tóxica da ricina na célula.

Figura 2 - Representação esquemática da entrada da ricina (RIP tipo II) em uma célula.





Fonte: DE SOUZA, 2017 ⁽⁸⁾.

QUADRO CLÍNICO DA INTOXICAÇÃO

A clínica e os efeitos fisiopatológicos da intoxicação por ricina dependem da dose, do tempo e da via de exposição. As principais rotas de exposição são a ingestão, a inalação e o contato com os olhos, mas pode também ser injetada. A via inalatória tem o maior potencial de ameaça às populações urbanas, além da disseminação por aerossóis que pode ser utilizada para contaminação de água e alimentos ⁽¹⁹⁾.

A ricina atua no organismo causando aglutinação de hemácias, seguida por uma hemólise intensa. Os principais sintomas do envenenamento causado por esta toxina ingerida por via oral são vômitos, diarreias e dores abdominais, havendo perda massiva de fluídos e eletrólitos gastrointestinais muitas vezes complicada por hematêmese ou melena, podendo causar choque volêmico e falência de múltiplos órgãos, principalmente o baço, o fígado e o rim ^{(16) (18) (19)}.

O único registro de exposição humana à ricina por inalação envolve trabalhadores expostos ao pó da mamona no processamento do óleo de mamona em plantas. Esses pacientes desenvolveram congestão nasal e na garganta, irritação na conjuntiva, urticária, aperto no peito e broncoespasmos ⁽³⁾. Estudos experimentais realizados em macacos mostrou que a inalação de ricina causa início lento de dificuldade respiratória, tosse, febre, há ocorrência de lesões pulmonares e edema, a morte ocorre como resultado de uma insuficiência respiratória devido a um intenso acúmulo de fluído alveolar ⁽¹⁸⁾.

DIAGNÓSTICO DA INTOXICAÇÃO POR RICINA

Em condições de emergência decorrentes de envenenamento por ricina, o diagnóstico precoce e a triagem para orientação terapêutica são necessários para diminuir os danos à saúde das vítimas. Conseqüentemente, é crucial detectar a exposição à toxina ricina nas vítimas assim que possível e antes do aparecimento dos primeiros sintomas ^{(10) (16)}.

O diagnóstico clínico do envenenamento por ricina é difícil por ela apresentar sintomas inespecíficos e parecidos com os de outras doenças ⁽⁹⁾. Em geral os profissionais médicos analisam parâmetros clínicos e informações epidemiológicas como histórico de ingestão de sementes de mamona ou ocorrência de múltiplos casos semelhantes ocorrendo em curto período de tempo ⁽²⁾.

No que diz respeito ao diagnóstico laboratorial, os imunoensaios, que geralmente dependem do reconhecimento da toxina por anticorpos são a abordagem mais comumente



utilizada atualmente para a detecção da ricina, tendo uma variedade grande de métodos como o *enzyme linked immuno sorbent assay* (ELISA), imunoprecipitação, ensaios de eletroluminescência, citometria de fluxo baseada em fluorescência, imuno reação de polimerase em cadeia (IPCR) considerado padrão ouro para detecção da ricina com um limite de detecção de 10 fg/mL ⁽¹⁰⁾.

TRATAMENTO DA INTOXICAÇÃO POR RICINA

Como foi dito, o tratamento para intoxicação contra a ricina é um tratamento de suporte, visando a retirada da toxina do organismo antes que ela cause dano fatal. O tratamento consiste no uso de carvão ativado ou lavagem gástrica para impedir a absorção da toxina pelo sistema gastrointestinal ⁽²⁰⁾. Por meio da lavagem gástrica é possível a remoção de uma quantidade significativa de ricina, porém para que haja maior efetividade neste método se faz importante que seja feito pelo menos 1 hora após a ingestão da toxina ⁽²⁶⁾. Também pode ser feita a indução ao vômito em casos que o paciente esteja consciente, utilização de sucralfato, dieta suave, intensa fluidoterapia intravenosa e terapia eletrolítica, a depender da ocorrência.

Em relação a uma exposição prolongada em que a ricina já tenha sido absorvida e distribuída pelo corpo, o ideal seria a existência de um antídoto, neste sentido há uma busca constante por inibidores desta enzima. Uma desvantagem que pode ser encontrada na maioria dos estudos é que os compostos analisados são compostos sintéticos com a capacidade de inibir a toxicidade da ricina, entretanto podem não ser seguros para o uso ⁽²⁰⁾.

Um composto natural que provou ter uma boa capacidade de inibir a ação da ricina assim como outros efeitos terapêuticos como atividade antitumoral, antimicrobiana e atividade antioxidante ⁽¹⁴⁾, foi a baicalina, uma flavona derivada principalmente das raízes da *Scutellaria baicalensis* ⁽¹³⁾, que interage com a cadeia A da molécula de ricina por redes de pontes de hidrogênio e interações de força eletrostática, proporcionando uma inibição da ação tóxica da ricina, fazendo com que a cadeia A passe por um processo de formação de oligômeros, sendo uma forma de inibição da ricina diferente dos demais inibidores relatados ⁽¹¹⁾.

Estudos recentes in vivo feitos em camundongos revelaram que a baicalina em uma dose de 100mg/kg foi capaz de evitar a morte de 50% deles em que havia sido injetada por via peritoneal uma dose de 500 ng de ricina, duas vezes maior do que o valor da DL50 pela via peritoneal que seria para os camundongos que seria de 250 ng ⁽¹¹⁾. Esses resultados confirmaram que a baicalina poderia fornecer uma proteção terapêutica eficaz contra letalidade causada pela ricina e merece ser mais estudada.



METODOLOGIA

A técnica de *docking* molecular foi escolhida para este trabalho. O *docking* molecular é um método *in silico*, baseado na estrutura 3D de determinada molécula, trata-se da representação computacional de um reconhecimento molecular, que ocorre entre o ligante e a molécula de interesse; tal representação simula as várias maneiras de encaixe possíveis entre a proteína e o ligante, permitindo explorar o espaço conformacional, representar as interações entre ligante e proteína e a estimativa da possibilidade de afinidade de ligação ⁽¹⁷⁾.

Os métodos de *docking* molecular se dividem em duas classes distintas: o proteína-ligante e proteína-proteína. O sistema de *docking* molecular é composto de duas etapas, sendo a primeira um algoritmo de busca conformacional que possibilita o envolvimento de todos os graus de liberdade do ligante; já a segunda etapa tem como função pontuar e ranquear as possíveis posições espaciais para um determinado composto. Neste estudo, foi utilizado o *docking* do tipo proteína-ligante ⁽²⁷⁾.

MINIMIZAÇÃO DE ENERGIA

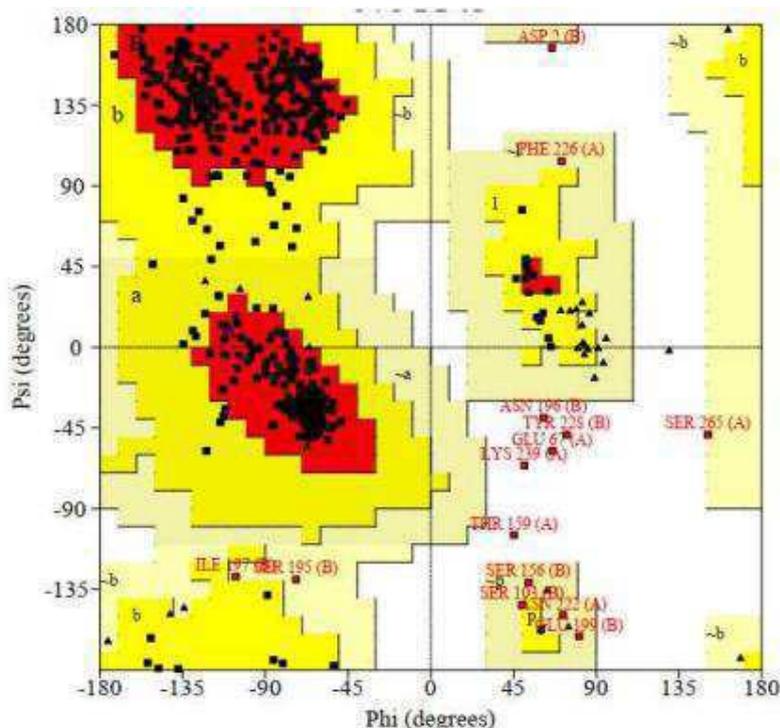
Para otimização da geometria molecular e das condições termodinâmicas foi necessário que a estrutura da molécula de ricina passasse por uma minimização de energia. Visto que a quantidade de resíduos em regiões favoráveis foi considerada insuficiente para a obtenção dos resultados desejados.

A minimização de energia é uma técnica que usa de algoritmos e outros métodos computacionais para melhorar a qualidade do modelo. Os algoritmos e métodos computacionais buscam conformações que possuem uma menor perturbação entrópica entre as possíveis, desta forma aumentando o número de resíduos em regiões favoráveis ⁽²⁴⁾. Para a realização da minimização de energia do modelo proposto foi utilizado o servidor Yasara ⁽¹⁵⁾. Após a minimização o modelo final passou pelo processo de validação.

A minimização de energia foi avaliada por meio do gráfico de Ramachandran gerado no *software* procheck. Os gráficos de Ramachandran descrevem a distribuição bidimensional do esqueleto da proteína por meio de ângulos de torção ϕ (φ) e ψ (ψ) nos aminoácidos, permitindo avaliar a qualidade da estrutura terciária de macromoléculas em que um modelo predito de excelente qualidade possui mais de 90% dos resíduos de aminoácidos localizados nas regiões mais favoráveis (A, B e L) do gráfico ⁽²³⁾.



Figura 2 - Gráfico de Ramachandran referente à molécula 2AAI: 86,5% dos resíduos nas regiões mais favoráveis (Vermelho), 10,4% dos resíduos em regiões adicionais mais permitidas (Amarelo), 1,7% dos resíduos em regiões permitidas (Bege) e 1,3% em regiões não permitidas (Branco).



Fonte: Gerado pelo *software* procheck.

DOCKING MOLECULAR

O receptor (macromolécula) utilizado para as simulações de *docking* foi o modelo tridimensional refinado da ricina (2AAI) (Figura 1), o qual foi nomeado de RIC_END. O arquivo foi convertido de .pdb para .pdbqt e foram adicionados e assinalados parâmetros de carga *Kollman*, assim como hidrogênios à estrutura.

Para a realização do experimento de *docking* foram selecionados diferentes isômeros de baicalina, molécula que apresentou capacidade inibidora descrita na literatura. Além disso, foi realizada uma análise do ligante por meio do *software* swiss ADME para verificar se a molécula era viável tendo como referência a sua biodisponibilidade por via oral e sua toxicidade. Foi utilizado o programa *Osiris property explorer* para auxiliar na predição da toxicidade e o *software molinspiration* para fazer a predição de bioatividade da molécula.

As coordenadas atômicas destes ligantes foram adquiridas por meio de arquivos .mol2 disponíveis na base de dados *Zinc database*. Os ligantes foram assinalados com parâmetros de carga *Gasteiger*, de forma que os seus arquivos foram convertidos para .pdbqt, para possibilitar

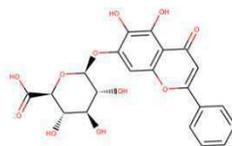
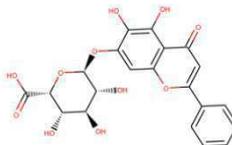


seu uso no programa Autodock1.5.6.

Os experimentos de simulação de *docking* foram realizados com o uso do programa Autodock1.5.6, o qual possuía uma grade cúbica de volume 126 x 126 x 126 Å, de modo que a molécula de ricina esteja no centro da grade cúbica e todas as possíveis ligações que podem ocorrer são feitas pela simulação de *docking*. Para este experimento foi escolhido o algoritmo genérico Lamarckiano (LGA) e os parâmetros escolhidos para a simulação foram de 10.000 réplicas, as quais possuíam análises de energia a cada 1.500.000 e 27000 gerações.

O *docking* gerou 10 conformações ranqueadas por energias distintas para cada molécula utilizada. As conformações obtidas foram organizadas, coletadas e analisadas através do uso dos recursos disponibilizados pela opção Autodock *tools*. Foram selecionadas dentre as conformações as que demonstraram energia livre de ligação e energia intermolecular final negativas, além de possuírem um alto potencial de inibição demonstrado pela constante de inibição estimada (CIE), sendo que quanto menor o valor para a CIE, menos moléculas do ligante são necessárias para inibir o composto em questão. A tabela 1 a seguir traz as estruturas 2D dos isômeros da baicalina utilizados para o estudo em questão.

Tabela 1 - Compostos para simulação de *docking*.

Nome	Estrutura 2D	Formula	Acesso	Base de dados
Baicalina (1)		C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	3943903	ZINC
Baicalina (2)		C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	4349040	ZINC



Baicalina (3)	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	59736941	ZINC
Baicalina (4)	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	12153569	ZINC

Fonte: Banco de dados ZINC.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No que diz respeito à biodisponibilidade por via oral do ligante, cinco critérios foram avaliados, sendo que para uma molécula apresentar boa disponibilidade oral, ela deve atender a pelo menos três dos seguintes critérios: Área de superfície polar total (ASPT) < 140 Å²; consenso de LopP ≤ 5; peso molecular < 500 daltons; número de aceptores de ligações de hidrogênio ≤ 10 e um número de doadores de ligações de hidrogênio ≤ 5. ⁽⁷⁾. A tabela a seguir traz os dados referentes a cada um destes parâmetros para a molécula de baicalina que conseguiu cumprir dois dos parâmetros em questão.

Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos referentes à biodisponibilidade da baicalina.

Parâmetros	Valores para a baicalina	Valores de referência
ASPT	187.12 Å ²	<140 Å ²
Consenso de LogP	0,25	≤ 5
Peso molecular	446.36 Da	<500 Da
Nº de aceptores de ligação de hidrogênio	11	≤ 10
Nº de doadores de ligação de hidrogênio	6	≤ 5

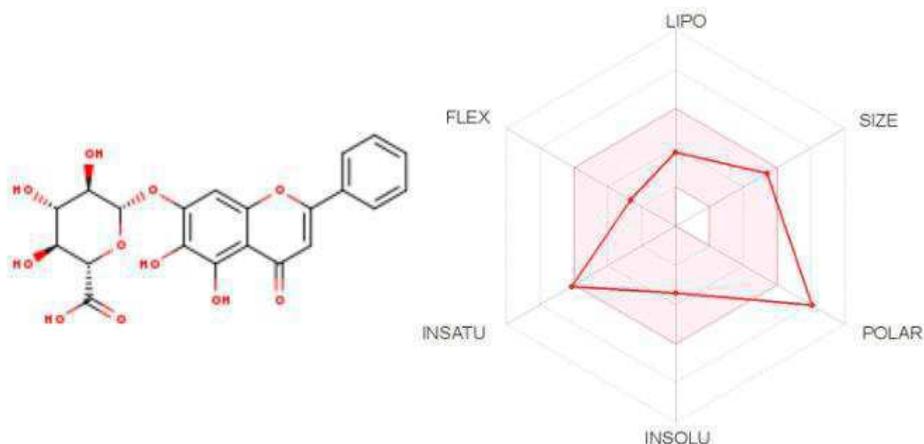
Fonte: Dados obtidos no *software* Swiss ADME.

Para avaliar a biodisponibilidade oral da molécula de ricina ainda foram utilizados outros critérios representados na figura a seguir pelo radar de biodisponibilidade que fornece um



gráfico que traça o perfil de *drug likeness* para a substância analisada com cada um dos vértices representando um parâmetro que define um bom medicamento biodisponível ⁽⁵⁾.

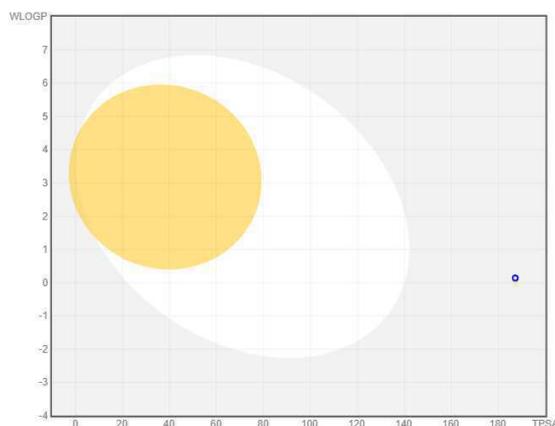
Figura 3 - Radar de biodisponibilidade, onde dentro da área colorida se encontra o espaço físico-químico adequado para a biodisponibilidade oral. Onde estão indicados lipoficidade, tamanho, polaridade, insolubilidade, insaturação e flexibilidade.



Fonte: Gerado pelo software Swiss ADME.

O modelo *boiled egg*, utilizado para avaliar a probabilidade de absorção pelo trato gastrointestinal representada pela região branca e a probabilidade de uma molécula transpassar a barreira hematoencefálica representada pela região amarela (gema) demonstrou que a baicalina é pouco absorvida pelo trato gastro intestinal. Em contra partida, o fato de que a baicalina não consiga ultrapassar a barreira hematoencefálica faz com que a molécula seja mais segura para administração, sem o risco de causar efeitos neurológicos indesejados ⁽⁶⁾.

Figura 4 - Representação do gráfico *BOILED-Egg*. A molécula está indicada por um ponto azul, mostrando que a mesma é suscetível a sofrer ação da glicoproteína p.





Fonte: Gerado pelo *software* Swiss ADME.

A análise de biodisponibilidade da baicalina revelou que a mesma possui algumas dificuldades em relação à sua absorção, o que pode ser contornado através de estudos de química medicinal, buscando elucidar os grupos farmacóforos, responsáveis pela ação da molécula e propor modificações em sua estrutura visando a melhoria de suas características.

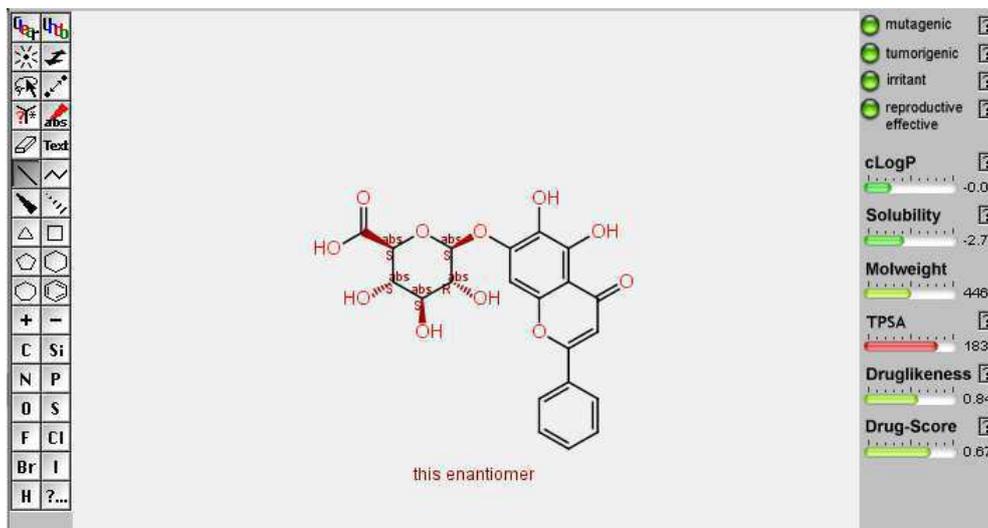
Com relação a possíveis interferências na metabolização de outras substâncias, a molécula de baicalina apresentou bons resultados, não tendo nenhum tipo de interação para todas as enzimas testadas (CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4) pertencentes ao complexo de enzimas do citocromo p450, de modo a não causar acúmulo de outras substâncias no organismo e por consequência evitando a toxicidade ⁽⁷⁾.

Também foram verificados dois indicadores importantes no âmbito da química medicinal que auxiliam na análise de fragmentos da molécula que possam ser nocivos à saúde, o alerta de *Pan-assay interference compounds* (PAIN) que indica fragmentos comuns em moléculas que costumam se comportar como compostos promíscuos, se ligando de forma inespecífica a diversos alvos biológicos e o alerta estrutural de Brenk que retorna fragmentos supostamente tóxicos, quimicamente reativos, metabolicamente instáveis ou que tenham propriedades responsáveis por uma farmacocinética pobre ⁽⁵⁾.

A baicalina apresentou um alerta para o grupo catecol presente em sua estrutura, porém este grupo pode ser facilmente modificado, devido a simplicidade da estrutura da baicalina, podendo substituir a hidroxila do grupo catecol ou promover outros tipos de modificações na molécula.

A análise da toxicidade feita no software Osiris explorer revelou que a baicalina não apresenta riscos de mutagenicidade, características tumorgênicas, irritantes ou efeitos adversos.

Figura 5 - Avaliação de toxicidade vista no programa OSIRIS *Property Explorer*.



Fonte: Dados obtidos no software Osiris property explorer.

A predição de atividade biológica realizada no *molinspiration* mostrou que a baicalina tem potencial para atuar como um inibidor enzimático devido ao seu score positivo para este tipo de atividade biológica.

Tabela 3 - Pontuação de bioatividade do *Molinspiration* para a baicalina.

Atividade biológica	Score
Ligante de Receptores acoplados à proteína G	0,07
Modulador de canal iônico	-0,10
Inibidor de quinase	-0,00
Ligante de receptor nuclear	0,30
Inibidor de protease	-0,05
Inibidor enzimático	0,42

Fonte: Dados obtidos no Software *Molinspiration*.

Com o refinamento da molécula de ricina, a realização do *docking* molecular apresentou resultados satisfatórios, mostrando a eficiência da baicalina como um possível inibidor citado na literatura. Os resultados de *docking* molecular para o ligante baicalina (1) podem ser vistos na tabela 4.

Tabela 4 - Resultados do *docking* entre a baicalina (1) e a ricina, mostrando dentre as 10 conformações obtidas as 3 com melhores resultados para os parâmetros analisados (Energia livre de ligação, constante de inibição estimada e energia intermolecular final).

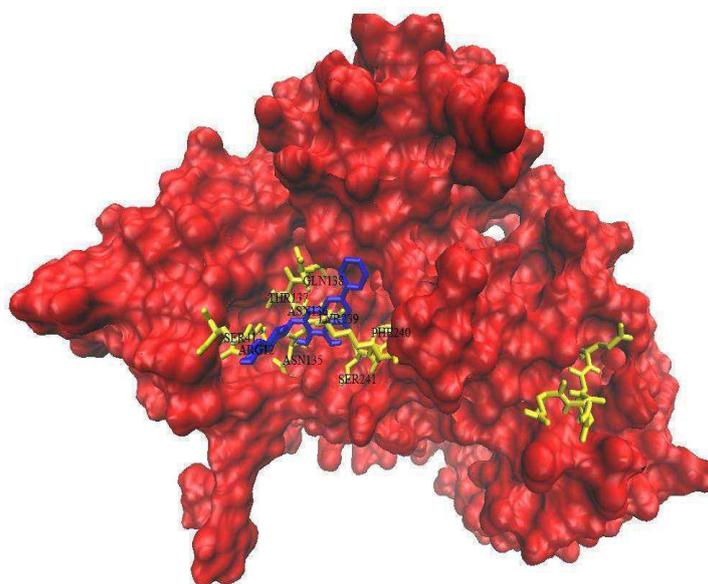


Nome	Energia livre de ligação(kJ/mol)	Constante de inibição estimada(μM)	Energia intermolecular final (kcal/mol)
Baicalina (1) (conformação 1)	-5,3	129,24	-7,99
Baicalina (1) (conformação 2)	-4,73	342,55	-7,41
Baicalina (1) (conformação 3)	-4,65	388,64	-7,34

Fonte: Dados da pesquisa.

Pode-se notar a facilidade que o composto possui em formar ligações com a molécula receptora, visto que a energia de ligação foi “negativa”, ou seja, o ligante tem alta afinidade com a molécula alvo. Além disso, os valores estimados para as constantes de inibição se apresentaram baixos, na ordem de micromolares, denotando que seria necessário uma pequena quantidade da molécula para inibir a ricina. A energia intermolecular final também se mostrou negativa, o que indica que a ligação entre a ricina e o composto baicalina (1) é estável, sendo difícil de ser rompida, não se desliguem por variações que podem acontecer no decorrer do tempo. A figura 2 mostra a ligação entre a molécula alvo e o ligante, apresentando o complexo Ricina-Baicalina.

Figura 6 - Baicalina (1) ligada à ricina. Vermelho: ricina. Amarelo: resíduos do sítio ativo. Azul: ligante.



Fonte: Dados da pesquisa.



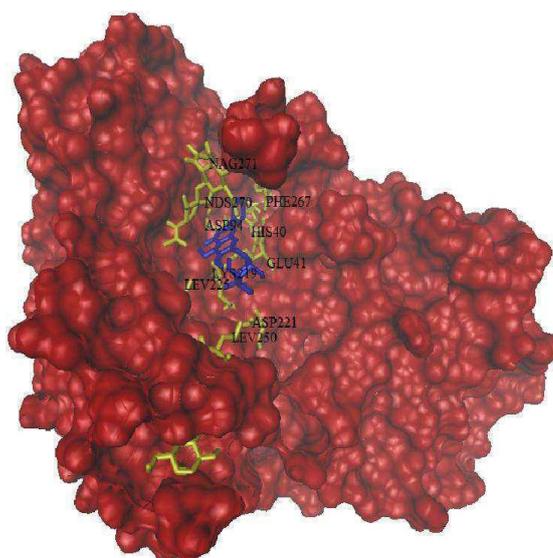
A tabela 3 a seguir traz os 3 melhores resultados de docking obtidos entre o isômero baicalina (2) e a ricina. Assim como o isômero mostrado anteriormente a baicalina (2) também apresentou bons valores para os parâmetros analisados.

Tabela 5 - Resultados do *docking* entre a baicalina (2) e a ricina, mostrando dentre as 10 conformações obtidas as 3 com melhores resultados para os parâmetros analisados (Energia livre de ligação, constante de inibição estimada e energia intermolecular final).

Nome	Energia livre de ligação(kJ/mol)	Constante de inibição estimada(μM)	Energia intermolecular final (kcal/mol)
Baicalina (2) (conformação 1)	-3,26	4,08	-5,94
Baicalina (2) (conformação 2)	-4,86	273,18	-7,55
Baicalina (2) (conformação 3)	-4,43	564,41	-7,12

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 7 - Baicalina (2) ligada à ricina. Vermelho: ricina. Amarelo: sítios de ligação entre ricina e o ligante. Azul: ligante.



Fonte: Dados da pesquisa.

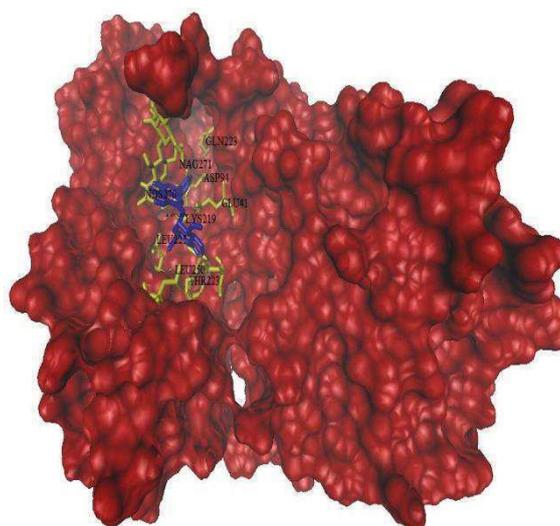


Tabela 6 - Resultados do *docking* entre a baicalina (3) e a ricina, mostrando dentre as 10 conformações obtidas as 3 com melhores resultados para os parâmetros analisados (Energia livre de ligação, constante de inibição estimada e energia intermolecular final).

Nome	Energia livre de ligação(kJ/mol)	Constante de inibição estimada(μ M)	Energia intermolecular final (kcal/mol)
Baicalina (3) (conformação 1)	-4,34	654,49	-7,03
Baicalina (3) (conformação 2)	-5,47	97,94	-8,7
Baicalina (3) (conformação 3)	-4,19	846,0	-6,88

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 8 - Baicalina (3) ligada à ricina. Vermelho: ricina. Amarelo: sítios de ligação entre ricina e o ligante. Azul: ligante.



Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 7 - Resultados do *docking* entre a baicalina (4) e a ricina, mostrando dentre as 10 conformações obtidas as 3 com melhores resultados para os parâmetros analisados (Energia livre de ligação, constante de inibição estimada e energia intermolecular final).

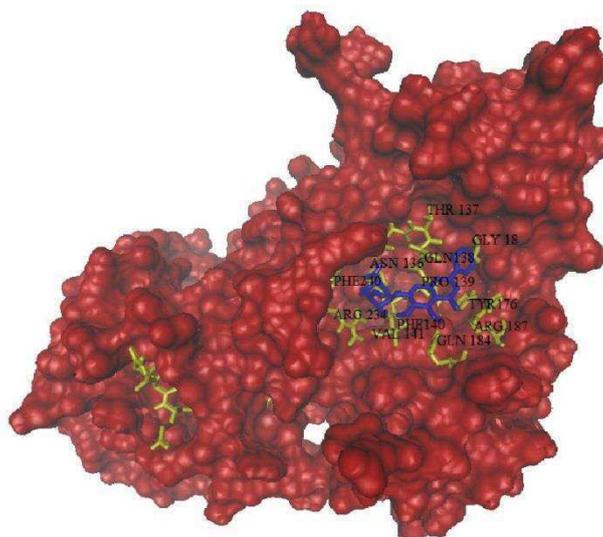
Nome	Energia livre de ligação(kJ/mol)	Constante de inibição estimada(μ M)	Energia intermolecular final (kcal/mol)
Baicalina (4) (conformação 1)	-4,95	237,37	-7,63
Baicalina (4) (conformação 2)	-4,7	360,75	-7,38



Baicalina (4) (conformação 3)	-4,93	244,47	-7,61
----------------------------------	-------	--------	-------

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 9 - Baicalina (4) ligada à ricina. Vermelho: ricina. Amarelo: sítios de ligação entre ricina e o ligante. Azul: ligante.



Fonte: Dados da pesquisa.

Em geral todos os isômeros de baicalina tiveram bons resultados para o docking, com destaque para a baicalina (2) que teve a menor constante de inibição estimada. Na literatura a baicalina apresentou a capacidade de inibir a ricina por um mecanismo complexo em que se posiciona em interfaces altamente carregadas positivamente, de forma a ligar duas cadeias A da ricina relacionando-as por um eixo helicoidal cristalográfico, diminuindo assim o número de sítios ativos presentes na toxina drasticamente, transformando-os em oligômeros menos ativos ⁽¹¹⁾. Estes bons resultados associados à baixa toxicidade da baicalina a tornam uma molécula viável como composto protótipo para mais estudos e modificações em sua estrutura a fim de aprimorar suas interações e eficácia ⁽²⁸⁾.

Entretanto, a eficiência demonstrada no *docking* molecular pode ser alterada no experimental, visto que a baicalina possui uma baixa solubilidade em água e uma baixa biodisponibilidade via oral, características que devem ser melhoradas na molécula ⁽⁴⁾. Desta forma a via de administração pode alterar a eficiência da baicalina na inibição da ricina, de modo que em experimentos práticos podem ocorrer resultados que podem diferir dos esperados.

Os dados obtidos neste estudo podem ser úteis para estudos futuros *in silico*, tais como estudos de dinâmica molecular, simulações quânticas, *design* racional de fármacos, além de



corroborar com os dados de experimentos *in vivo* e *in vitro* existentes na literatura que afirmam que o uso de baicalina reduz a percentagem de lise celular e também aumenta a viabilidade das células afetadas pós-exposição à ricina ⁽¹¹⁾. Além disso, a metodologia aqui utilizada pode ser um *pipeline* para busca de outras substâncias que inibam a ricina ou até mesmo para estudos de outras toxinas

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo encontrou-se evidências *in silico* do potencial dos isômeros da baicalina como inibidores da molécula de ricina. Foram obtidos resultados esperados, em consonância com os apresentados na literatura, nos quais os ligantes demonstraram sua eficiência em inibir a ricina com resultados significativos no que diz respeito à energia livre de ligação na faixa de - 3,26 a - 5,47 kcal/mol e à energia intermolecular final na faixa de -5,94 a -8,7, além de valores baixos para a CIE indicando que tanto a baicalina é capaz de formar uma ligação estável para exercer seu efeito como é necessário uma pequena quantidade para atingir tal efeito, podendo ser utilizada para a composição de antídotos desde que sejam resolvidos os problemas relacionados à sua biodisponibilidade.

REFERÊNCIAS

- 1-Abbes, Melissa et al. Ricin poisoning: a review on contamination source, diagnosis, treatment, prevention and reporting of ricin poisoning. *Toxicon*. 2021; 195(1): 86-92.
- 2-Aggarwal, R., Aggarwal, H., Chugh, P. K. Medical management of ricin poisoning. *Journal of Medical & Allied Sciences*. 2017; 7(2): 82.
- 3-Benamor, Mouna et al. Ricin poisoning after oral ingestion of castor beans: A case report and literature review. *African journal of emergency medicine*. 2020; 10(4): 274-276.
- 4-Chen H, et al. Exploring Therapeutic Potentials of Baicalin and Its Aglycone Baicalin for Hematological Malignancies. *Cancer letters*. 2014; 354(1):5-11.
- 5-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*. 2017; 7(1): 1-13.
- 6-Daina, A., Zoete, V. A boiled-egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. *ChemMedChem*. 2016; 11(11): 1117.
- 7-De Lima, R. S. Et al. Farmacocinética e farmacodinâmica *in silico* do ácido cinâmico. *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento*. 2021; 7(6), p: 53-64.



- 8-De Souza L. C. M. Avaliação da inativação da ricina por óxido de cálcio [Tese de Doutorado]. Campos dos Goytacazes: Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2017. 94 p.
- 9-Diac, M. et al. Intoxication with ricin-biochemical weapon. *Rev Chim (Bucharest)*. 2017; 68(6): 1427-1430.
- 10-Diakite, M. L. Y. et al. Point-of-care diagnostics for ricin exposure. *Lab on a Chip*. 2015; 15(10): 2308-2317.
- 11-Dong J. et al. Baicalin Inhibits the Lethality of Ricin in Mice by Inducing Protein Oligomerization. *The Journal of Biological Chemistry*. 2015; 290(20):12899-12907.
- 12-Grela, P. et al. How ricin damages the ribosome. *Toxins*. 2019; 11(5): 241.
- 13-Guo A. J. Y. et al. Baicalin, a Flavone, Induces the Differentiation of Cultured Osteoblasts. An action via the wnt/ β -catenin signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2012; 287(9): 6958.
- 14-Huang, T., Liu, Y., Zhang, C. Pharmacokinetics and bioavailability enhancement of baicalin: a review. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*. 2019; 44(2): 159-168.
- 15-Krieger, E. et al. Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2009; 77(9): 114-122.
- 16-Nunez, O. F. L., Pizon, A. F., Tamama, K. Ricin poisoning after oral ingestion of castor beans: a case report and review of the literature and laboratory testing. *The Journal of emergency medicine*. 2017; 53(5): e67-e71.
- 17-Pinzi, Luca; Rastelli, Giulio. Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery. *International journal of molecular sciences*. 2019 20(18): 4331.
- 18-Polito, L. et al. Ricin: An ancient story for a timeless plant toxin. *Toxins*. 2019; 11(6): 324.
- 19-Raffagnato, C. G. et al. Terrorismo químico: proposta de modelagem de risco envolvendo ricina em eventos de grande visibilidade no Brasil. *Saúde em Debate*. 2020; 43 (3): 152-164.
- 20-Rasooly R., He, X., Friedman M. Milk Inhibits the Biological Activity of Ricin. *Journal of Biological Chemistry*. 2012 Mar; 287(33): 27924-27929.
- 21-Rutenber, E. et al. Crystallographic refinement of ricin to 2.5 Å. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 1991; 10(3): 240-250.
- 22-Simm, R., Kvalvaag, A. S., van Deurs, B., Lindbäck, T., & Sandvig, K. Benzyl alcohol induces a reversible fragmentation of the Golgi apparatus and inhibits membrane trafficking between endosomes and the trans-Golgi network. *Experimental cell research*. 2017; 357(1): 67-78.
- 23-Sobolev, O. V. et al. A global Ramachandran score identifies protein structures with unlikely stereochemistry. *Structure*. 2020; 28(11): 1249-1258.



24-Soletti, L. V. Um modelo de workflow científico para o refinamento da estrutura 3D aproximada de proteínas [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre: Faculdade de informática, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2015. 142 p.

25-Sowa-Rogozińska, N. et al. Intracellular transport and cytotoxicity of the protein toxin ricin. *Toxins*. 2019; 11(6): 350.

26-Spivak L., Hendrickson R. G. Ricin. *Critical care clinics*. 2005;21(4):815-24.

27-Vakser, I. A. Challenges in protein docking. *Current Opinion in Structural Biology*. 2020; 64(1): 160-165.

28-Xiang, Y. et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicity of Baicalin liposome on cerebral ischemia reperfusion injury rats via intranasal administration. *Brain research*. 2020; v. 1726(1): 146503.