



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO**

LAILA DOS SANTOS PEREIRA

**AVALIAÇÃO IN SÍLICO DA INTERAÇÃO DE MOLÉCULAS COM POTENCIAL
NEUROPROTETOR NA NEUROTOXINA ISOLADA DO VENENO DE CASCAVEL
BRASILEIRA (*CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS*)**

AREIA

2022

LAILA DOS SANTOS PEREIRA

**AVALIAÇÃO IN SILICO DA INTERAÇÃO DE MOLÉCULAS COM POTENCIAL
NEUROPROTETOR NA NEUROTOXINA ISOLADA DO VENENO DE CASCAVEL
BRASILEIRA (*CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS*)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Química da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) como requisito parcial para obtenção do título de Bacharela em Química.

Orientador: Prof. Dr. Sidney Ramos de Santana.

AREIA

2022

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

P436a Pereira, Laila dos Santos.

Avaliação in sílico da interação de moléculas com potencial neuroprotetor na neurotoxina isolada do veneno de cascavel brasileira (*Crotalus durissus terrificus*) / Laila dos Santos Pereira. - Areia, 2023. 36 f. : il.

Orientação: Sidney Ramos de Santana.
TCC (Graduação) - UFPB/CCA.

1. Venenos. 2. Crotoxina. 3. Flavonóides. 4. Canabinóides. 5. Docking molecular. I. Santana, Sidney Ramos de. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA CDU 54(02)

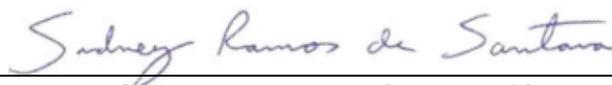
LAILA DOS SANTOS PEREIRA

AVALIAÇÃO IN SÍLICO DA INTERAÇÃO DE MOLÉCULAS COM POTENCIAL
NEUROPROTETOR NA NEUROTOXINA ISOLADA DO VENENO DE CASCAVEL
BRASILEIRA (CROTALUS DURISSUS)

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Bacharelado em
Química da Universidade Federal da
Paraíba (UFPB) como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharela em
Química.

Aprovado em: 22/12/2022.

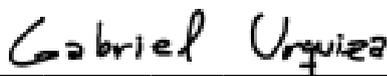
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Sidney Ramos de Santana (Orientador)
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Profa. Dra. Edilene Dantas Teles Moreira
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



Prof. Dr. Gabriel Aires Urquiza de Carvalho
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

À minha família: mãe, pai e irmã gêmea, pelo amor incondicional e força exponencial, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão à Olorum e os Orixás, as forças da natureza que sustentam axé na minha vida. À ancestralidade que me guia e protege em todas as encruzilhadas da vida e abre caminhos para minhas conquistas. Por Ela e Ele tenho amor imensurável, Laroyê!

Gratidão à minha família: minha mãe Nilza, por ser essa potência feminina que me inspira a ser a minha melhor versão; ao meu pai José Mendes, por ser meu porto seguro e maior fonte de carinho; e minha irmã gêmea Letícia. A espiritualidade foi perfeita em nos unir nesta vida, minhas melhores memórias têm você comigo. Amo vocês!

Gratidão ao meu amor Samuel Luna, por ser meu melhor amigo e confidente em meia década de cumplicidade. Sua permanência na minha vida na saúde e na doença me provou o quanto somos especiais um para o outro. Sou feliz por sermos uma família com a Ágata Mariah (a cachorra), eu te amo.

Gratidão ao meu Babalorixá Antunes Caldas, sua bênção e axé foram fundamentais para o meu equilíbrio e resiliência, tens um lugar especial em meu coração.

Agradeço aos professores que confiaram no meu potencial e paixão pelos venenos, professora Karla Luna e professor Abraão Ribeiro, serei eternamente grata pelas oportunidades que me concederam. Vocês foram importantíssimos nas minhas escolhas acadêmicas. Saudades!

Agradeço ao professor Rosivaldo e professora Ana Cristina pelas vivências inesquecíveis no projeto de extensão Identidade Afro-brasileira, foram aprendizados muito além de acadêmicos.

Agradeço à professora Maria Betania e a técnica do laboratório de química Tereziana da Costa, pelas oportunidades nos projetos científicos e companheirismo com os alunos em busca de produtividade de uma forma tão leve e saudável. Ambas são personalidades maravilhosas!

Agradeço aos meus amigos Felipe Ferreira por ter sido uma companhia tão alto astral com seu bom humor (risos) e também pelo apoio nos momentos difíceis; Mônica Shinneider, por todos os diálogos e conselhos. Me encanto com pessoas inteligentes, por isso sou sua fã; Edinho Fidelis pela imensa troca de carinho, é raríssimo encontrar alguém com um coração tão bom quanto o seu; Quellya Ketllen, minha amiguinha, pela união em alcançar nossas metas. Foi ótimo trabalhar contigo; Diego Eduardo, por tanto incentivo e apoio. Adoro pessoas que sonham alto!

Agradeço à banca examinadora, a Prof. Dra. Edilene Dantas Teles Moreira e Prof. Dr. Gabriel Aires Urquiza de Carvalho, fico feliz em ser avaliada e receber contribuições para o meu trabalho de profissionais tão competentes e engajados na produção científica.

“Exu matou um pássaro ontem com uma pedra que só jogou hoje.” Provérbio lorubá

RESUMO

Ofidismo é um problema de saúde pública classificado na categoria de Doenças Tropicais Negligenciadas de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) por não despertar interesse dos segmentos farmacêuticos em pesquisa e desenvolvimento de fármacos para tratamentos com maior eficácia em consonância à soroterapia pois a maioria das ocorrências são em regiões onde a população é socioeconomicamente vulnerável, sem gerar retorno lucrativo para a indústria. Os venenos ofídicos são constituídos principalmente por proteínas, peptídeos e toxinas que desencadeiam diversos efeitos locais e sistêmicos na vítima. Nos envenenamentos crotálicos, pela cascavel brasileira, a Crotoxina é uma das principais toxinas com ação neurotóxica, isto é, que provoca danos neurológicos, deixando sequelas ou levando a óbito. De acordo com a pesquisas em etnobotânica, tem se intensificado estudos para explorar metabólitos secundário de plantas medicinais como flavonoides e canabinóides com potencial neuroprotetor para doenças neurológicas como convulsão, epilepsia, mal de Alzheimer e mal de Parkinson. Logo, o presente trabalho teve como objetivo verificar se estas propriedades neuroprotetoras são capazes de inibir a ação da neurotoxina Crotoxina. Para aplicação da metodologia de Docking Molecular, as estruturas cristalográficas foram obtidas dos seguintes repositórios gratuitos: Protein Data Bank, Cannabis Database e Pubchem e o conversor Openbabel. O preparo das estruturas para dockagem foi realizado no software off-line Chimera e posteriormente submetidas à plataforma online DockThor tanto ao método Blinding quanto ao Grid box, foram realizados testes in silico para predição de energias livres na interação receptor-ligantes, do alvo Crotoxina com 28 ligantes, dentre eles um fármaco de referência (Surinan), ligantes co-cristalizados com toxinas de *bothrops moojeni* da literatura, flavonoides de *Ocotea notata* (Nees) e canabinóides da *Cannabis sativa*. Todas as etapas deste procedimento foram feitas em computador pessoal com acesso à internet. Os resultados obtidos mostraram valores de afinidade de interação promissores para o fármaco de referência Surinan e para canabinóide Alfapinene, com scores -9,349 kcal/mol e -8,962 kcal/mol, respectivamente, demonstram serem bons candidatos a fármacos inibidores da Crotoxina, destinados à terapia complementar ao soro anticrotálico.

Palavras chave: venenos; crotoxina; flavonoides; canabinóides; docking molecular.

ABSTRACT

Ophidism is a public health problem classified in the category of Neglected Tropical Diseases according to the World Health Organization (WHO) because it does not arouse the interest of the pharmaceutical segments in research and development of drugs for more effective treatments in line with serum therapy, since most of occurrences are in regions where the population is socioeconomically vulnerable, without generating a profitable return for the industry. Snake venoms consist mainly of proteins, peptides and toxins that trigger various local and systemic effects on the victim. In crotalic poisoning, by the Brazilian rattlesnake, Crotoxin is one of the main toxins with neurotoxic action, that is, it causes neurological damage, leaving sequelae or leading to death. According to research in ethnobotany, studies have been intensified to explore secondary metabolites of medicinal plants such as flavonoids and cannabinoids with neuroprotective potential for neurological diseases such as seizures, epilepsy, Alzheimer's and Parkinson's disease. Therefore, the present study aimed to verify whether these neuroprotective properties are capable of inhibiting the action of the neurotoxin Crotoxin. To apply the Molecular Docking methodology, the crystallographic structures were obtained from the following free repositories: Protein Data Bank, Cannabis Database and Pubchem and the Openbabel converter. The preparation of the structures for docking was carried out in the Chimera off-line software and subsequently submitted to the DockThor online platform for both the Blinding method and the Grid box, in silico tests were carried out to predict free energies in the receptor-ligand interaction, of the target Crotoxin with 28 ligands, including a reference drug (Surinan), ligands co-crystallised with bothrops moojeni toxins from the literature, flavonoids from *Ocotea notata* (Nees) and cannabinoids from *Cannabis sativa*. All steps of this procedure were performed on a personal computer with internet access. The results obtained showed promising interaction affinity values for the reference drug Surinan and for the cannabinoid Alfapinene, with scores -9.349 kcal/mol and -8.962 kcal/mol, respectively, demonstrating that they are good candidates for Crotoxin inhibitor drugs, intended for therapy complementary to the anticrotalic serum.

Keywords: poisons; crotoxin; flavonoids; cannabinoids; molecular docking.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Cascavel brasileira (<i>Crotalus durissus terrificus</i>)	16
Figura 2 - Modelo Estrutural da Crotoxina	17
Figura 3 - Planta <i>Ocotea notata</i>	20
Figura 4 - Planta <i>Cannabis sativa</i>	21
Figura 5 - Emprego do método de Atracamento Molecular na predição do modo de ligação entre proteína e ligante.....	22
Figura 6 - Coordenadas do Grid box na Crotoxina	25
Figura 7 - Acessibilidade do sítio catalítico de CB em modelos cristalográficos CTX e estruturais SAXS	26
Figura 8 - Estrutura cristalográfica do complexo Crotoxina-7BTP, contendo o ligante representado em rosa para carbono, azul para nitrogênio, vermelho para oxigênio e branco para hidrogênio.....	28
Figura 9 - Estrutura cristalográfica do complexo Crotoxina-1isoquercitrina, contendo o ligante representado em rosa para carbono, azul para nitrogênio, vermelho para oxigênio e branco para hidrogênio.....	29
Figura 10 - Estrutura cristalográfica do complexo Crotoxina-1THC, contendo o ligante representado em rosa para carbono, azul para nitrogênio, vermelho para oxigênio e branco para hidrogênio.....	30
Figura 11 - Estrutura cristalográfica do complexo Crotoxina-2CBD, contendo o ligante representado em rosa para carbono, azul para nitrogênio, vermelho para oxigênio e branco para hidrogênio.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Docking Molecular e valores de afinidade da Crotoxina com ligantes testados em toxinas do veneno de Bothrops, pelos métodos Blinding e Grid box	27
Tabela 2 - Docking Molecular e valores de afinidade da Crotoxina com flavonóides da planta <i>Ocotea notata</i> (Ness), pelos métodos Blinding e Grid box.....	28
Tabela 3 - Docking Molecular e valores de afinidade da Crotoxina com THC's da planta <i>Cannabis sativa</i> , pelos métodos Blinding e Grid box.....	29
Tabela 4 - Docking Molecular e valores de afinidade da Crotoxina com CBD's da planta <i>Cannabis sativa</i> , pelos métodos Blinding e Grid box.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBD	Canabidiol
CTX	Crotoxina
INCT-INOVAR	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fármacos e Medicamentos
LNCC	Laboratório Nacional de Computação Científica
NIH	National Institutes of Health
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDB	Protein Data Bank
SINAN	Sistema de Informações de Notificação de Agravos
SINAPAD	Sistema Nacional de Processamento de Alto Desempenho
SNC	Sistema Nervoso Central
THC	9-tetrahydrocannabinol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 ACIDENTES OFÍDICOS	15
2.2 NEUROTOXINAS	17
2.3 FITOTERAPIA.....	18
2.3.1 Ocotea notata	19
2.3.2 Cannabis sativa	20
2.4 ANCORAMENTO MOLECULAR.....	21
3 METODOLOGIA	23
3.1 OBTENÇÃO DO ALVO	23
3.2 OBTENÇÃO DE LIGANTES.....	23
3.3 PREPARO DAS ESTRUTURAS	24
3.4 ANCORAGEM MOLECULAR.....	24
3.4.1 Método Blinding	25
3.4.2 Método Grid box.....	25
4 RESULTADOS E DISCUSSAO	27
5 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

O ofidismo¹ no Brasil é uma problemática de saúde pública classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das Doenças Tropicais Negligenciadas devido ao desinteresse da comunidade farmacêutica em direcionar recursos para o desenvolvimento de fármacos para envenenamento ofídico. Esse fato está relacionado a incidência do problema em regiões com baixo desenvolvimento socioeconômico, acometendo principalmente moradores das zonas rurais e trabalhadores do campo, inviabilizando os interesses financeiros da indústria (FERNANDES; FONTES 2017).

Atualmente, a terapia para acidentes com serpentes são os soros antiofídicos desenvolvidos pelo sanitarista Vital Brazil, que hoje é ofertado como política pública, após a iniciativa de doar sua patente ao Estado brasileiro possibilitando a produção nacional através de investimentos do Governo Federal nos principais institutos de pesquisa e produção do soro destinados ao tratamento (VAZ; BRAZIL; PAIXAO, 2020). Apesar da soroterapia ser funcional, existem variáveis biológicas que comprometem a eficácia do soro como a localização geográfica, fatores sazonais, dieta alimentar, idade e sexo, tornando importante a busca por novas terapias complementares (FERREIRA JUNIOR, 2005).

As serpentes peçonhentas brasileiras de interesse médico são representadas pela família Viperidae; que incluem os gêneros *Bothrops* (jararaca), *Crotalus* (cascavel) e *Lachesis* (surucucu), e família Elapidae; que inclui o gênero *Micrurus* (SILVA, PARDAL, 2018). A *Crotalus*, popularmente conhecida pelo nome cascavel, é temida pela ação do seu veneno que causa efeitos locais e sistêmicos. Uma das toxinas responsáveis pelo complexo quadro clínico em pacientes acidentados é a Crotoxina com sua atividade neurotóxica, podendo levar a vítima a complicações neurológicas severas ou evoluir a óbito (MOLINA, 2020).

Muitas comunidades que frequentemente presenciam acidentes com animais peçonhentos fazem uso de plantas medicinais para atenuar os efeitos tóxicos. Com isto, é crescente o número de pesquisas em etnobotânica com foco em plantas antiofídicas para estudo dos seus metabólitos secundários e ações farmacológicas (SOUZA, 2006; RODRÍGUEZ, 2010).

¹ Ofidismo: quadro clínico decorrente da mordedura de serpentes (Ministério da saúde)

Estudos tem comprovado as propriedades antiinflamatórias e neuroprotetoras de flavonóides oriundos de plantas nativas como a *Ocotea notata* (Nees) (DOERL, 2015) e de canabinóides provenientes da *Cannabis sativa* no tratamento de doenças neurológicas como esclerose múltipla, mal de Alzheimer mal de Parkinson, entre outros, apresentando significativas melhoras no sistema nervoso (FLORES, 2016; FARIAS, 2020; CRISPIM *et al.*, 2022).

Com estes indícios terapêuticos relacionados a danos neurológicos, o presente trabalho se desenvolve com objetivo de avaliar o potencial neutralizador de moléculas neuroprotetoras de plantas medicinais frente a Crotoxina através de metodologias in silico, na busca de possíveis candidatos a fármacos para uma terapia complementar ao soro anticrotálico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ACIDENTES OFÍDICOS

Os acidentes ofídicos representam um importante problema global de saúde pública e, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), considerado como uma das Doenças Tropicais Negligenciadas; grupo de doenças que afetam principalmente populações de países tropicais em desenvolvimento. O que implica em dizer que são mais comuns em locais de difícil acesso e com baixo nível socioeconômico, conseqüentemente não despertam interesse da indústria farmacêutica em subsidiar o desenvolvimento de novos fármacos que atuem em consonância à soroterapia (PINHO *et al.*, 2001; WHO, 2019)

Os acidentes ofídicos são classificados também como emergência médica, e como tal, podem rapidamente levar a vítima a morte e, cujos efeitos do envenenamento podem ser locais ou sistêmicos, como relação estritamente relacionada com a espécie e toxinas presentes no veneno (WHO, 2019).

A ocorrência de vítimas de ofidismo é de cerca de 1 milhão de vítimas por ano no mundo, com aproximadamente 300 mil mortes (FERNANDES, 2022). A mortalidade dos acidentados varia em diferentes países, na Ásia, por exemplo, os acidentes provocam de 25 mil a 35 mil óbitos anuais (SANTOS, 2009). No Brasil, a partir de 1986, há a notificação obrigatória de acidentes ofídicos no Sistema de Informações de Notificação de Agravos (SINAN). De 2009 a 2019 tiveram 313.139 casos registrados, dos quais 151.565 ocorreram na Região Norte, principalmente, em área rural.

Existem cerca de 3.000 espécies de serpentes no mundo, das quais a maioria compreende as serpentes desprovidas de peçonha, ou seja, sem importância médica e aproximadamente 400 peçonhentas. As serpentes peçonhentas de interesse médico no Brasil incluem os gêneros *Bothrops* (jararaca, jararacuçu, urutu, caiçaca), *Crotalus* (cascavel) e *Lachesis* (surucucu, pico-de-jaca) da família Viperidae; e *Micrurus* (coral verdadeira) da família Elapidae (SILVA; PARDAL, 2018).

O gênero *Crotalus* agrupa as espécies de serpentes popularmente conhecidas pelo nome Cascavel e também pelos seus inconfundíveis chocalhos na extremidade da cauda e sua pele com formas losangulares de cor marrom, branca e amarelo, evidentes na figura 1. São endêmicas no Brasil, predominantes no Sudeste e Sul e habitam regiões secas, arenosas e pedregosas.

Figura 1 - Cascavel brasileira (*Crotalus durissus terrificus*)



Fonte: Lima (2010)

As ações do veneno crotálico são classificadas por três características principais: neurotóxica, miotóxica e coagulante, formando o conjunto responsável por sua alta letalidade se não houver uma intervenção inibitória para atenuar o efeito de suas toxinas neurotóxicas e nefrotóxicas (MOLINA, 2020).

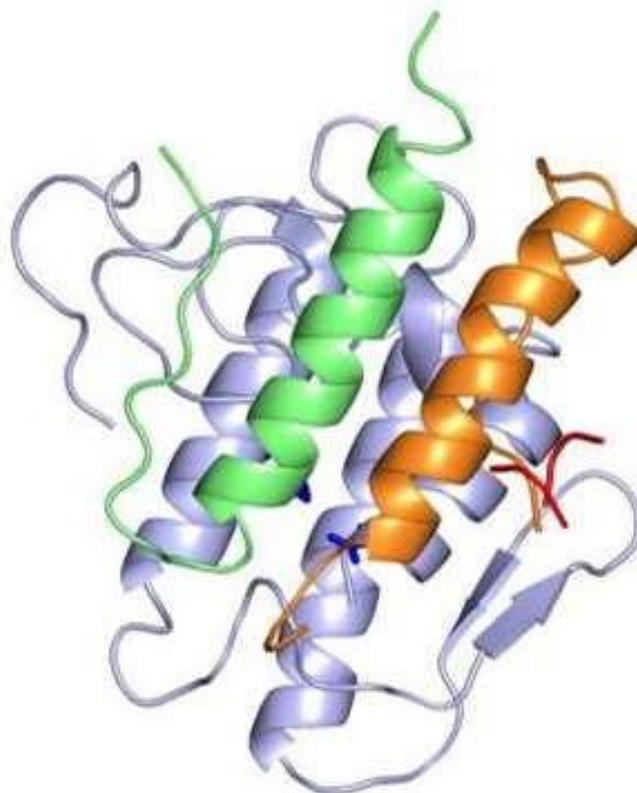
Dentre as manifestações clínicas características do envenenamento crotálico estão paralisia dos músculos esqueléticos, ptose palpebral, redução da motricidade ocular e insuficiência respiratória, quadro atribuído à Crotoxina que atua no sistema nervoso periférico, bloqueando a transmissão na junção neuromuscular e consequentemente inibindo a liberação da acetilcolina, neurotransmissor importante nessa função (LIMA, 2010).

O tratamento específico para acidentes crotálicos no Brasil é o soro anticrotálico produzido a partir de plasmas hiperimunizados de equinos. Nestes animais são inoculadas diferentes doses de venenos dessecados e posteriormente é feita a coleta do sangue rico em anticorpos para ser submetido a métodos de purificação. Apesar do grande porte e a facilidade para a produção de antivenenos em cavalos, eles sofrem reações locais e sistêmicas que comprometem tanto a qualidade como o tempo de vida desses animais (FERREIRA JUNIOR, 2005).

2.2 NEUROTOXINAS

Neurotoxinas são toxinas com considerável potencial agressivo e, capazes de lesar o sistema nervoso, podendo ainda agir sobre outras partes do organismo. Em envenenamentos crotálicos, a neurotoxicidade é atribuída principalmente a significativa presença da crotoxina (CTX) que representa cerca de 60% do peso seco do veneno bruto desta serpente (NATAL JUNIOR, 2019). Sua ação é capaz de bloquear as transmissões neuromusculares provocando paralisia progressiva na vítima. A crotoxina é uma molécula de PLA₂, proteína heterodimérica que apresenta β -neurotoxicidade pré-sináptica (SAMPAIO *et al.*, 2010). Sua estrutura (Figura 2) é de caráter não covalente, constituída pela parte das cadeias polipeptídicas ligadas por dissulfeto α , β e γ da subunidade ácida denominada CA (crotaipotina) não tóxica, em laranja, verde e vermelho, respectivamente. E uma subunidade básica denominada CB, destacada em azul, que é tóxica e dependente do fragmento CA para cumprir sua atividade de fosfolipase A₂, atuando nas junções neuromusculares inibindo a liberação de acetilcolina (MOLINA, 2020).

Figura 2 - Modelo Estrutural da Crotoxina



Fonte: Faure; Xu; Saul (2011)

2.3 FITOTERAPIA

Os estudos com plantas medicinais para a implantação da fitoterapia na prática da medicina é algo crescente no Brasil. Desde a década de 80 o Ministério da Saúde elaborou diversas resoluções, portarias e relatórios visando regulamentar o uso de plantas medicinais no território brasileiro (DAMASCENO, 2017). Entre as políticas desenvolvidas tem-se em destaque:

a Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos em 2001; o Seminário Nacional de Plantas Medicinais, Fitoterápicos e Assistência Farmacêutica em 2003; a Política de Medicina Natural em 2003; as Práticas Complementares no SUS em 2006; o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos em 2007; a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (Renuis); a Resolução nº10 de 9 de março de 2010, que estabelece o marco regulatório para produção, distribuição e uso de plantas medicinais, particularmente sob a forma de drogas vegetais e a Resolução nº 26, de 13 de maio de 2014, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro/notificação de produto tradicional fitoterápico (BADKE *et al.*, 2012; PETRY; ROMAN JÚNIOR, 2012).

As propriedades de plantas medicinais para tratamento de diversas doenças têm sido direcionadas a métodos terapêuticos complementares ou alternativos para venenos em acidentes com cobras, escorpiões, aranhas, abelhas e vespas atuando contra componentes como as fosfolipases A2, proteases, hemorraginas, hialuronidases, proteases, citotoxinas, miotoxinas e neurotoxinas (DOERL, 2015). Apesar das comprovações científicas, ainda requer estudos mais aprofundados devido à alta complexidade de venenos e grande variabilidade biológica decorrentes da idade, sexo, alimentação, distribuição geográfica e sazonal (FERREIRA JUNIOR, 2005). A literatura dispõe de trabalhos em etnobotânica que investiam as ações farmacológicas de diversas espécies de plantas contra peçonhas de serpentes, inclusive apresentam seus compostos isolados e caracterizados (RODRÍGUES, 2010).

Inseridas na lista de relevâncias das plantas medicinais, têm-se as plantas com potencial neuroprotetor, De acordo com Klauke *et al.*, (2014), atualmente há intensa a busca e identificação de moléculas com atividade neuroprotetora oriundas de produtos naturais, principalmente da flora brasileira por sua grande biodiversidade. Essas pesquisas visam novas descobertas terapêuticas para neuropatias que provocam traumas no sistema nervoso ocasionando degeneração e/ou morte dos neurônios, cujo poder de regeneração é mínimo, entre elas estão as doenças de Huntington,

Parkinson, o Alzheimer e Esquizofrenia que carecem de tratamentos específicos (MORAES, 2014; FERREIRA JUNIOR, 2005).

Segundo Meneses *et al.* (2014), os trabalhos científicos em fitoquímica destacados em sua pesquisa apresentam diversas espécies de famílias botânicas brasileiras com efeitos anti-inflamatórios e neuroprotetores associados a presença de metabólitos secundários como flavonóides e alcalóides comprovados contra doenças neurológicas. Um estudo relacionado com algumas destas espécies abordadas se mostraram eficientes também na reversão do quadro de neurotoxicidade por metil mercúrio em camundongos (FARINA *et al.*, 2005; LUCENA *et al.*, 2007; LUCENA *et al.*, 2010).

2.3.1 *Ocotea notata*

A família Lauraceae apresenta-se em territórios mundiais, mas tem predominância maior na América, Ásia tropical, Austrália e Madagascar com aproximadamente 3000 espécies reconhecidas em 68 gêneros, sendo os principais *Ocotea*, *Litsea*, *Cinnamomum*, *Persea*, *Beilschmiedia* (OLIVEIRA, 2014). No Brasil está distribuída do Sergipe ao Paraná ao longo da costa atlântica, prevalecendo nas restingas, e são famosas pela utilidade na medicina popular (DOERL, 2014).

Na pesquisa de Meneses (2021), são apresentadas diversas espécies de plantas ricas em flavonóides que mostraram altamente eficazes no tratamento, prevenção ou retardamento de doenças neurológicas. DOERL (2014) também enfatiza essa propriedade em flavonóides ao analisar o potencial antiofídico e neuroprotetor da *Ocotea notata* (figura 3) sobre o sistema nervoso central e periférico contra injúrias do veneno de *Crotalus durissus terrificus* certificando a planta como antineurotóxica.

Estudos fitoquímicos realizados por Garrett e colaboradores (2012) identificaram 10 flavonoides nas folhas de *O. notata*, sendo os principais a quercetina, o kaempferol, a isoquercitrina e a quercitrina (OLIVEIRA, 2014). Estes compostos são comuns em plantas com atividades antioxidantes e anti-inflamatória e podem estar presentes em toda sua estrutura como casca, raiz, folhas, inclusive frutos e flores (MENESES, 2021).

Figura 3 - Planta *Ocotea notata*



Fonte: P.L.R. de Moraes & M.C. Machado

2.3.2 *Canabis sativa*

Da família Cannabaceae, a espécie *Cannabis sativa* é de uma das plantas mais antigas que são cultivadas para diversos fins como uso religioso, recreativo e medicinal, principalmente em virtude de substâncias aromáticas e canabinóides presentes nela (VANIN, 2022). Segundo a literatura, a *Cannabis* produz mais de 113 tipos de canabinóides, sendo os mais conhecidos e estudados o 9-tetrahidrocanabinol (THC) e canabidiol (CBD) em razão dos seus efeitos mais acentuados (CRISPIM *et al.*, 2022).

Os fitocanabinóides e extratos de *Cannabis* vem ganhando interesse de vários grupos de pesquisa através de evidências científicas sobre seu uso terapêutico mundialmente. Os efeitos farmacológicos desses compostos ainda não são completamente definidos, porém a aplicação do óleo a base de cannabis no controle de convulsões, epilepsia, esclerose múltipla, ansiedade, depressão, enxaqueca, mal de Alzheimer, mal de Parkinson, entre outras que afetam o sistema nervoso tem alcançado bons resultados clínicos e seus efeitos bem tolerados atestados pelos pacientes, comprovando seu importante papel no SNC (FLORES, 2016; FARIAS, 2020; CRISPIM *et al.*, 2022).

Dentre as ações farmacológicas já definidas para o CBD, se destacam a presença propriedades anticonvulsivantes, ausência de efeitos psicomiméticos e o fato de não causar dependência. O THC pode atuar como analgésico e relaxante muscular. Embora contenha propriedades psicoativas e tendência para causar dependência, quando utilizado concomitantemente com o CBD estes efeitos se reduzem, pois ele tem o potencial de antagonizar o THC (VANIN, 2022).

Figura 4 - Planta *Cannabis sativa*



Fonte: Deyan Georgiev

2.4 ANCORAMENTO MOLECULAR

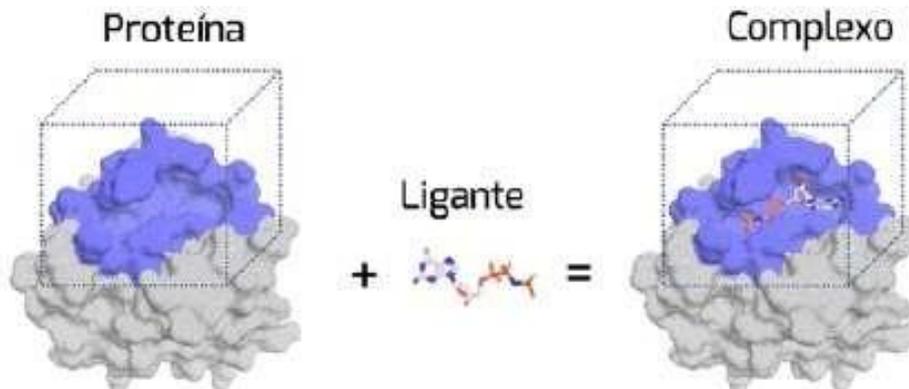
O Docking Molecular, cujo a tradução do inglês é Ancoramento Molecular, é uma técnica computacional amplamente utilizada para planejamento racional de fármacos que serve para previsão de interação entre moléculas ligantes e proteínas alvos relevantes à saúde e tecnologia. Os métodos possíveis com essa técnica se classificam em receptor-ligante e receptor-proteína, onde através de características físico-químicas é definido graus de afinidades e especificidades referente as interações intermoleculares existentes no complexo, como variações de entropia rotacional e translacional, bem como vibracional e conformacional resultante das restrições de comprimento de ligação, deformação angular e ângulos diedrais. durante o processo de reconhecimento molecular.

Este processo de reconhecimento molecular é conduzido por combinações de efeitos entálpicos e entrópicos estimados através da energia livre de ligação de Gibbs que está diretamente relacionada à constante de equilíbrio de ligação K_{eq} , podendo ser medida experimentalmente. A equação expressa a seguir reúne ΔH que é a variação de entalpia, T é a temperatura absoluta, ΔS é a variação de entropia e R é a constante universal dos gases.

$$\Delta G_{lig} = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_{eq} \quad (\text{Equação 1})$$

Programas de ancoramento molecular oferecem diferentes métodos de busca e avaliação de afinidade e são flexíveis em termos de utilização, podendo ser através de portais ou localmente, em versões gratuitas ou pagas, com ou sem necessidade de registro e integração com bancos de ligantes e proteínas (VERLI, 2014).

Figura 5 - Emprego do método de Atracamento Molecular na predição do modo de ligação entre proteína e ligante



Fonte: Verli (2014)

3 METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DO ALVO

O Protein Data Bank (PDB) é um banco de dados de proteínas e suas estruturas tridimensionais. Neste repositório é possível verificar informações detalhadas da estrutura química como coordenadas atômicas do espaço tridimensional, a sequência polimérica, constituintes metálicos, entre outros. Bem como a origem biológica, atividade biológica e referências da sua obtenção cristalográfica (BERMAN et al., 2000). A estrutura da Crotoxina (PDB ID 3R0L) cristalizada por Faure *et al.* (2011), alvo objeto de estudo deste trabalho, foi obtida neste repositório, em 02 de dezembro de 2022, em formato de arquivo PDB para realização do teste de Docking Molecular.

3.2 OBTENÇÃO DE LIGANTES

As estruturas dos metabolitos secundários dos produtos naturais que foram usadas como ligantes foram obtidas em diferentes repositórios públicos na web no período de 27 de novembro à 02 de dezembro de 2022. Os ligantes considerados como referências para comparação dos resultados são moléculas que foram co-cristalizadas com toxinas do veneno de *Bothrops* (Jararaca) e publicadas no repositório PDB, de onde foram obtidas.

O PubChem database é um componente da Molecular Libraries Roadmap Initiatives of the US National Institutes of Health (NIH) que reúne diversas substâncias químicas com descrição de suas propriedades e atividades biológicas disponíveis gratuitamente para a comunidade científica de áreas farmacêuticas, química computacional, química medicinal e afins (LOPES, 2018). Deste repositório foram obtidos os flavonóides da planta *Ocotea notata* (Nees).

O Cannabis Compound Database é um banco de dados eletrônico gratuito de moléculas encontradas Cannabis sativa, Cannabis indica e híbridos de Cannabis provenientes de pesquisas científicas, contendo suas estruturas e informações detalhadas sobre efeitos fisiológicos, medicinais e de seus alvos de proteína conhecidos. O banco de dados contém 6.172 entradas de constituintes químicos e 2.336 concentrações químicas para 115 cultivares de Cannabis (© Wishart Research Group). Através deste banco de dados foram obtidos os ligantes canabinóides da planta *cannabis sativa*.

3.3 PREPARO DAS ESTRUTURAS

Para configurar os arquivos de estruturas das moléculas ao formato necessário para o teste de Docking Molecular, estes foram submetidos à plataforma online OpenBabel que permite converter quase todos os formatos químicos de interesse. Desse modo, os flavonóides e canabinóides foram convertidos do formato SMILE para PDB.

Para preparar as estruturas de proteínas-alvo para o teste de Docking Molecular é preciso dissociá-las de componentes coadjuvantes como íons de metaloproteínas ou cofatores inseridos para auxiliar na cristalização em raio-X. Para este procedimento foi utilizado o software Chimera, versão 1.15, uma ferramenta gráfica para visualização e análises de moléculas individuais e interações com outras. O aplicativo foi desenvolvido pela Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics (RBVI) que recebe apoio do recebe apoio da Molecular Libraries Roadmap Initiatives of the US National Institutes of Health (NIH), da Chan-Zuckerberg Initiative e da University of California, San Francisco.

3.4 ANCORAGEM MOLECULAR

A realização do teste de Docking Molecular para obtenção de energias livres de ligação e verificação da afinidade receptor-ligante teve como suporte a plataforma online DockThor, um servidor de ancoragem molecular receptor-ligante desenvolvido pelo grupo de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos do Laboratório Nacional de Computação Científica LNCC integrante do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fármacos e Medicamentos INCT-INOVAR e está acoplado às facilidades de computação de alto-desempenho do SINAPAD (Sistema Nacional de Processamento de Alto Desempenho).

O portal está disponível gratuitamente para a comunidade científica internacional, sendo amplamente utilizado para predição dos modos de ligação e energia livre para grau de afinidade de complexos receptor-ligante em estudos reais de desenho racional de fármacos (INCT-INOVAR).

3.4.1 Método Blinding

O método Blinding na ancoragem molecular consiste experimentar a interação receptor-ligante sem especificar a coordenada onde se localiza o sítio ativo na molécula alvo. Dessa forma, o teste é feito em diferentes posições e se destaca aquela cujo a combinação obtiver melhor valor de afinidade.

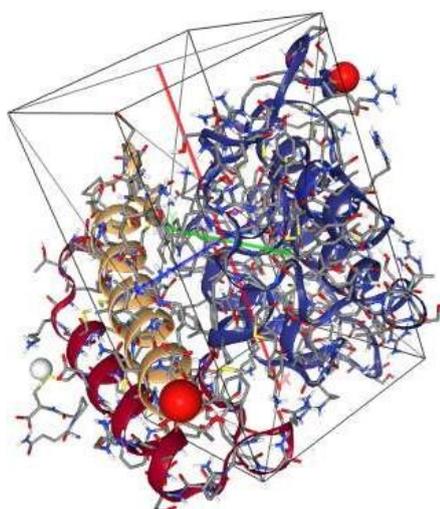
Os experimentos online de Blinding no DockThor foram realizados no dia 03 de dezembro de 2022, submetendo a estrutura do alvo Crotoxina com seus respectivos cofatores e 28 ligantes, dentre eles a referência, os flavonóides e canabinóides, habilitando o teste para 24 conformações. Os arquivos gerados de score e imagens foram recebidos em e-mail e armazenados em desktop para análises posteriores.

3.4.2 Método Grid box

O método Grid box, diferentemente do Blinding, requer as coordenadas do sítio ativo na molécula alvo. Segundo Meng *et al.*, (2011), é ideal que o sítio ativo seja definido antes dos processos de encaixe, favorecendo uma melhor acoplagem receptor-ligante. No entanto, pouco se sabe sobre os sítios de inibição e interação da crotoxina (NATAL JUNIOR, 2019), portanto, foi designada uma coordenada onde teoricamente estaria situado o sítio ativo entre as subunidades CA e CB.

O cálculo do grid habilitado para um teste com 24 conformações e as coordenadas referentes ao tamanho do grid foi ajustada nos eixos X, Y e Z (dimensões do grid em angstrom: x: -13; y: -11 e z: 3) na estrutura do alvo Crotoxina (figura 6) com seus respectivos cofatores para a interação dos 28 ligantes naquela região.

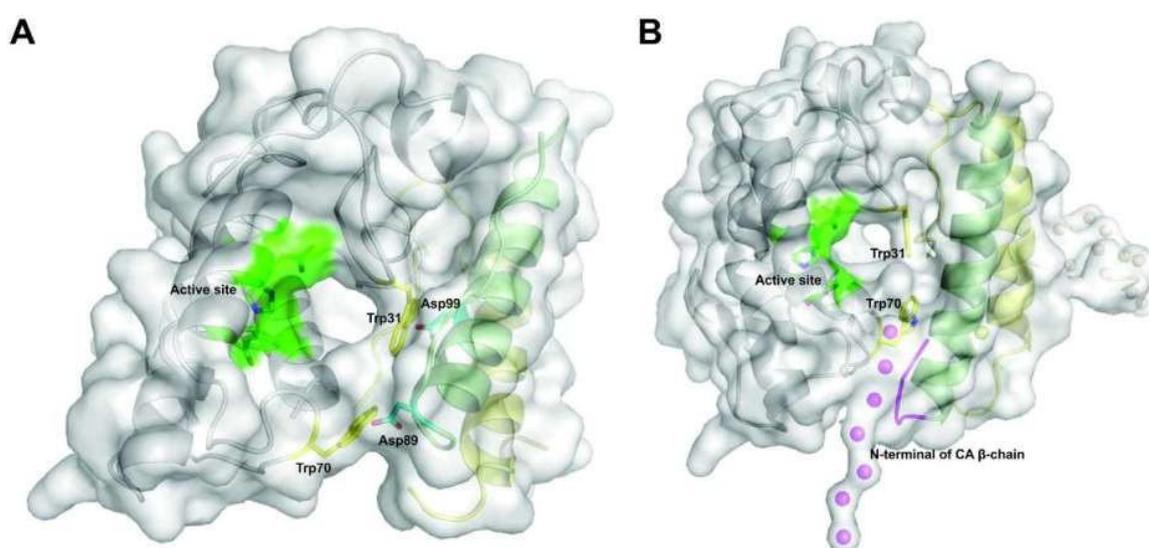
Figura 6 - Coordenadas do Grid box na Crotoxina



Fonte: DockThor

As coordenadas em que foi posicionado o grid box foram baseadas em dados experimentais que sugerem que a localização do sítio ativo da Crotoxina (figura 8) esteja situada entre as cadeias α , β , γ de CA apresentada em verde, amarelo e bege, respectivamente, e CB apresentada em branco. Especificamente na região de CB (His48, Asp49, Tyr53 e Asp99) representado em verde, juntamente com resíduos Asp89 e Asp99 de CA apresentados como bastões ciano.

Figura 7 - Acessibilidade do sítio catalítico de CB em modelos cristalográficos CTX e estruturais SAXS



Fonte: Fernandes *et al* (2017)

3.4.3 As Funções de Score

A função de Score do DockThor, parametrizadas para descrever os diferentes tipos de interações entre o ligante e a proteína alvo, foram desenvolvidas utilizando métodos de aprendizado de máquina (GUEDES, 2021).

4 RESULTADOS E DISCUSSAO

Os resultados da ancoragem molecular para afinidade de ligação receptor-ligantes foram visualizados na interface do portal dockthor e elencados nas Tabelas 1, 2, 3, e 4, em ordem de nomenclatura atribuída ao complexo alvo-ligante durante o processo de obtenção das moléculas. Para cada complexo constam os valores de afinidade pelos métodos Blinding e Grid box, respectivamente. Esses valores são apresentados em score negativo, pois se refere ao menor valor de energia livre em kcal/mol necessário para acoplagem alvo-ligante. Portanto, quanto menor for o valor, melhor será o resultado.

Tabela 1 - Docking Molecular e valores de afinidade da Crotoxina com ligantes testados em toxinas do veneno de *Bothrops*, pelos métodos Blinding e Grid box

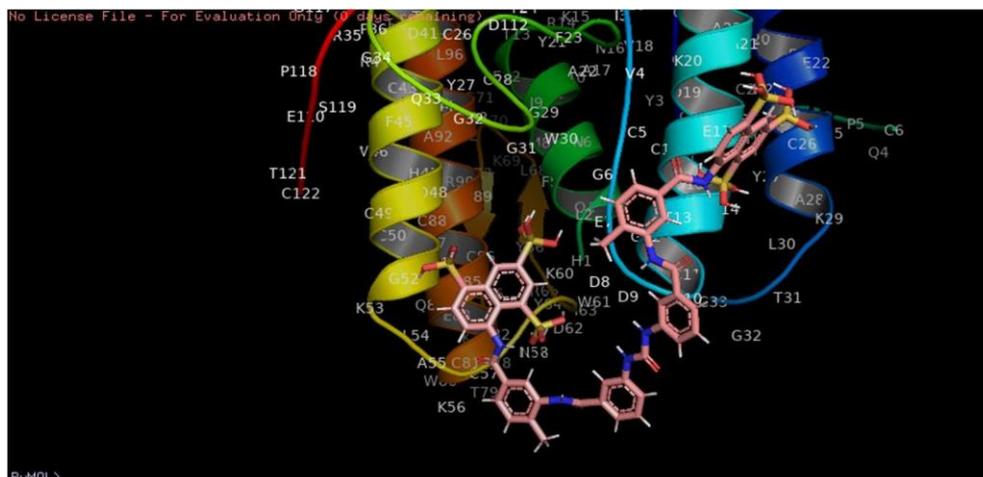
Docking Molecular	Afinidade Blinding kcal/mol	Afinidade Grid box kcal/mol
1 BTP	-9.225	-7.483
2 BTP	-7.667	-6.974
3 BTP	-8.508	-6.891
4 BTP	-7.947	-7.176
5 BTP	-7.699	-6.966
6 BTP	-8.849	-7.485
7 BTP	-9.349	-8.891
8 BTP	-8.122	-6.992

Fonte: Elaboração própria (2022)

Visto que não há um fármaco de referência no mercado farmacêutico para inibição do alvo em questão, foi utilizado como referência o ligante Suramina co-cristalizado com uma toxina do veneno de *Bothrops moojeni* disponibilizado na literatura em 2018 sob PBD ID 6CE2. Este ligante foi considerado como uma boa proposta de neutralizador para toxina de *Bothrops* com score -11.320 kcal/mol, portanto, escolhido para referência nos testes de docking neste trabalho. No complexo da Crotoxina com este ligante referência, identificado como 7 BTP, apresentou um score satisfatório de -9.347 kcal/mol, valor aproximado ao complexo originário.

A estrutura cristalográfica do resultado desse complexo em destaque pode ser visualizada tridimensionalmente na figura 8 a seguir:

Figura 8 - Estrutura cristalográfica do complexo Crotoxina-7BTP, contendo o ligante representado em rosa para carbono, azul para nitrogênio, vermelho para oxigênio e branco para hidrogênio.



Fonte: Pymol

Tabela 2 - Docking Molecular e valores de afinidade da Crotoxina com flavonoides da planta Ocotea notata (Ness), pelos métodos Blinding e Grid box

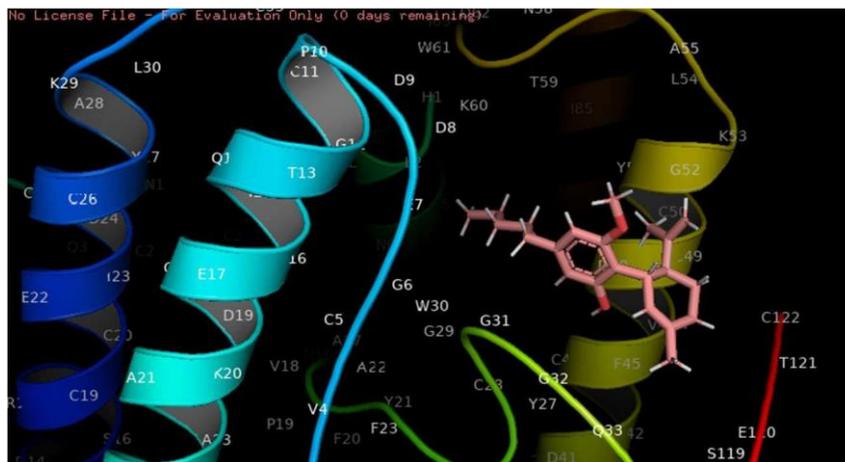
Docking Molecular	Afinidade Blinding kcal/mol	Afinidade Grid box kcal/mol
1 ISOQUERCITRINA	-7.846	-7.502
2 KAEMPFEROL	-7.308	-7.829
3 QUERCITRINA	-7.282	-7.427

Fonte: Elaboração própria (2022)

Os resultados para afinidade da Crotoxina com os flavonóides foram semelhantes nos dois métodos de ancoragem, sendo o melhor valor de energia livre referente ao complexo Crotoxina-Isoquercitrina pelo método Blinding com score - 7.846 kcal/mol.

A estrutura cristalográfica do resultado desse complexo em destaque pode ser visualizada tridimensionalmente na figura 11 a seguir:

Figura 11 - Estrutura cristalográfica do complexo Crotoxina-2CBD, contendo o ligante representado em rosa para carbono, azul para nitrogênio, vermelho para oxigênio e branco para hidrogênio.



Fonte: Pymol

De modo geral, os resultados de afinidade da Crotoxina foram melhores e semelhantes com THC e CBD, do que com flavonóides. Entre todos, o melhor valor de energia livre entre os ligantes canabinoides foi referente ao complexo Crotoxina-1THC pelo método Blinding com score -8.495 kcal/mol.

Os ensaios com flavonóides apresentaram resultados com os menores valores de score de afinidade. As estruturas podem ser modificadas para uma melhor ação como ligante ou serem substituídas por outros flavonóides também abundante na planta *Croton totona* (Nees) em novos testes.

Analisando os valores dos scores de afinidade da Crotoxina com os dois grupos de canabinóides, estes não apresentaram resultados próximos ao complexo de referência, PBD ID 6CE2 de score -11,320 kcal/mol, porém a diferença é pequena, o que sugere um potencial inibidor contra a Crotoxina. Ainda assim, é ideal que se faça modificações nestes ligantes para aperfeiçoar o acoplamento no sítio ativo do alvo e consequentemente diminuir a energia livre de ligação até que esteja semelhante à referência, assim como todo planejamento de fármaco.

5 CONCLUSÃO

A avaliação in silico das interações alvo-ligantes realizada no presente trabalho levaram a conclusões positivas em relação aos objetivos da pesquisa. A escolha da referência Suramina serviu como um bom parâmetro para análise dos resultados do docking molecular, mostrando que ligantes já co-cristalizados com alguma toxina ofídica podem servir para outros gêneros de serpente.

O método Blinding teve melhor desempenho com relação ao método Grid box, reforçando a necessidade de mais estudos para identificação do sítio ativo da Crotoxina, que conseqüentemente resultará no aperfeiçoamento das seguintes ancoragens moleculares.

A Suramina e os canabinóides são possíveis candidatos a fármacos para terapia complementar ao soro anticrotálico, tanto para medicina humana quanto para medicina veterinária, sendo fundamental a continuidade dessa pesquisa com as próximas etapas que constituem o desenvolvimento de medicação.

REFERÊNCIAS

- BERMAN, H.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I.; BOURNE, P. The protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 235-242, 2000.
- CRISPIM, M. E. S.; LIMA, J. A. L. C.; SANTOS, G. B.; FURTADO, F. R. C. M.; FURTADO, B. R. C. M. A Neuroproteção Causada pelos Fitocanabidioides, seus Efeitos e sua Aplicabilidade no Brasil. **Estudos Avançados sobre Saúde e Natureza**, v. 4, p. 150-164, 2022.
- DAMASCENO, C. S. B. **Estudo Fitoquímico, Antioxidante, Antibacteriano. Toxicidade e Identificação Botânica de Ocotea bicolor Vattimo-Gil (LAURACEAE)**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.
- DOERL, J. G. **Atividade Antiofídica Induzida pelo Extrato Hidroalcoólico de Ocotea notata**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, 2015.
- FLORES, L. E. **Efeito Neuroprotetor, Anti-inflamatório e Antioxidante do Canabidiol: Contribuições para o Estudo e o Tratamento de Doenças Neurodegenerativas**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Literatura em Ciências Biológicas) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Cerro Largo, 2016.
- FARIAS, A. **Cannabis medicinal no combate à doença de Parkinson**. São Paulo: Editora Europa, 2020.
- FAURE, G.; XU, H.; SAUL, F. A. **Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric β -neurotoxin**. *Journal of Molecular Biology*, v. 412, n. 2, p. 176-191, 2011.
- FERNANDES, A.H.; PAZIN, W.M.; DREYER, T.R.; BICEV, R. N.; CAVALCANTE, W. L. G.; FORTES-DIAS, C. L.; ITO, A. S.; OLIVEIRA, C. L. P.; FERNANDEZ, R. M.; FONTES, M. R. M. Biophysical studies suggest a new structural arrangement of crotoxin and provide insights into its toxic mechanism. *Scientific Reports*. Março, 2017.
- FERNANDES, C.; FONTES, M. R. M. **Estudos estruturais com toxinas de venenos de serpentes**. Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista. Botucatu - SP, 2017. Disponível em: <https://www2.unesp.br/portal#!/noticia/26954/estudos-estruturais-com-toxinas-de-venenos-de-serpentes/> Acesso em: 18 dez.2022.
- FERREIRA JUNIOR, R. S. **Comparação da resposta imune humoral, da capacidade de neutralização dos soros anticrotálicos produzidos em ovinos jovens, avaliação clínica e ponderal entre animais inoculados com veneno de serpente Crotalus durissus terrificus nativo ou irradiado com Cobalto-60**. 2005. Tese (Doutorado em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

GUEDES, I. A.; BARRETO, A. M. S.; MARINHO, D.; KREMPSE, E.; KUENEMANN, M. A.; SPERANDIO, O.; MITEVA, M. A. (2021). **New machine learning and physics-based scoring functions for drug discovery**. Scientific Reports, v. 11, n. 1., p. 3198(1-19), 2021.

GEORGIEV, D. Fazenda de marijuana. Cultivo industrial de maconha para necessidades farmacêuticas. Plantação de marijuana, plantas narcóticas na indústria agrícola, Cannabis sativa plantas no campo. - Banco de fotos e imagens Disponível em: <https://create.vista.com/pt/photos/cannabis-sativa/> Acesso em: 18 de Dez 2022.

KLAUKE, A. L. *et al.* The cannabinoid CB2 receptor-selective phytocannabinoid betacaryophyllene exerts analgesic effects in mouse models of inflammatory and neuropathic pain. **European Neuropsychopharmacology**, v. 24, n. 4, p. 608-620, 2014.

Laboratório Nacional de Computação Científica(LNCC). Portal DockThor. Disponível em: http://www.inct-inofar.ccs.ufrj.br/inofar2009/download/dockthor_port.pdf. Acesso em 24 de dezembro de 2022.

LIMA, T. S. **Caracterização das Ações do Veneno de Crotalus Durissus Terrificus sobre Funções de Neutrófilos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

LUCENA et al. *Cipura paludosa* extract prevents methyl mercury-induced neurotoxicity in mice. **Basic & Clin Pharmacology & Toxicology**, v. 101, n. 2, p. 127-31, 2007.

LUCENA et al. *Cipura paludosa* attenuates long-term behavioural deficits in rats exposed to methylmercury during early development. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 6, p. 1150-8, 2010.

LOPES, M. **Data Mining para estudos de interação entre fármacos e previsão de Efeitos Adversos de Fármacos**. 2018. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Informática e Computação) - Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, 2018.

MENG, J.; LI, C.; HUANG, B.; SHE, Z.; ZHANG, G.; ZHANG, L.; ZHU, Q. Genome and Transcriptome Analyses Provide Insight into the Euryhaline Adaptation Mechanism of *Crassostrea gigas*. **Plos One**, v. 8, n. 3, 2013.

MENESES, E.H.A.; SILVA, A. I. B.; COSTA, A.E.N.; MENDONÇA, C. M. S.; NUNES, L. E.; OLIVEIRA, L.C.; SÁ-FILHO, G. F. CAVALCANTE, J. S. As Plantas do Bioma Caatinga com Potencial Neuroprotetor: Uma Revisão Integrativa. **Revista Biodiversidade**, v. 20, n. 4, p. 86, 2021.

MOLINA, D. A. M. **Produção de anticorpos contra Metaloproteases e Crotoxina usando antígenos sintéticos e caracterização proteômica e toxicológica do veneno de Bothrops brazili**. 2020. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.

MORAES, L. S. **Estudo do potencial efeito neuroprotetor do extrato etanólico obtido da planta medicinal Combretum leprosum em modelo murino da doença de Parkinson**. 2014. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Farmacologia) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.

MORAES, P. L. R.; MACADO, M. C. *Ocotea notata* (Nees & Mart.) Mez. 3024 (HUEFS): Brazil, Bahia, Morro do Chapéu, Ferro Doido, 13 March 2010. Disponível em: <https://lauraceae.myspecies.info/file-colorboxed/10> . Acesso em 05 de jan 2022.

NATAL JUNIOR, C. R. **Estudo Estrutural da Interação da Crotoxina e suas Subunidades com Membranas Modelo**. 2019. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2019.

OLIVEIRA, R. P. R. F. **Desenvolvimento de Nanoemulsões Contendo Flavonoides de Ocotea Notata (Nees) Mez e Avaliação de Atividades Biológicas**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) - Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2014.

PETRY, K.; ROMAN JÚNIOR, W. A. Viabilidade de implantação de fitoterápicos e plantas medicinais no Sistema Único de Saúde (SUS) do município de Três Passos/RS. **Rev Bras Farm**, v. 93, n. 1, p. 60-7, 2012.

PINHO, F. M. O; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Rev. Assoc. Med. Bras**, V. 47, n. 1, mar, 2001.

RODRIGUEZ, I. I. G. **Avaliação da Atividade Antiofídica de Aristolochia sprucei: Isolamento e Caracterização Estrutural de Composto Bioativo**. Universidade de Sao Paulo. Faculdade de Ciencias Farmaceuticas de Ribeirao Preto. 2010.

SAMPAIO, S. C. et al. Crotoxin: Novel activities for a classic β -neurotoxin. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1045-1060, 2010.

SANTOS, Mauricio Fernando de Lima; FARANI, Marina Cumming; ROCHA, Paulo Novis. Insuficiência renal aguda em acidentes ofídicos por *Bothrops* sp. e *Crotalus* sp.: revisão e análise crítica da literatura. **J Bras Nefrol**, São Paulo, v. 1, n. 2, jun. 2009.

SILVA, E. O.; PARDAL, P. P. O. Envenenamento por serpente *Bothrops* no município de Afuá, Ilha de Marajó, estado do Pará, Brasil. **Rev PanAmaz Saude**, Ananindeua, v. 9, n. 3, p. 57-62, set. 2018.

SOUZA, S. M. C. **Efeito do Extrato Hidroalcoólico da Eclipta prostrata em Modelo de Inflamação in Vivo, Induzida pelo Veneno da Serpente Bothrops moojeni**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2006.

VANIN, A. P. **Potencial Neuroprotetor de Óleos a Base de Cannabis sativa em Caenorhabditis elegans**. Erechim-RS, 2022.

VERLI, H. **Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular**. 1. ed. São Paulo:SBBq, 2014. 282 p.

VAZ, V. H. S.; BRAZIL, O. A. V.; PAIXAO, A. E. A. Propriedade intelectual do soro antiofídico: a efetividade a partir da correlação entre os investimentos do governo federal nos principais institutos responsáveis pela produção do soro e realização de pesquisas para o tratamento de acidentes ofídicos no brasil, com relação ao número de vítimas fatais dos acidentes. **Cad Saúde Colet**, v. 28, n.3, p. 409-421, 2020.

Wishart D.S.; Inchehborouni G.; Cao X.; Guo A. C.; Hiebert Giesbrecht M.; LeVatteM.; Liigand J.; Wang F.; Bhumireddy S.; Wang Y.;, Zhang J., Mandal R.; Dyck J.;
Composição química da Cannabis. s.d.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION (Geneva, Switzerland). Snakebite envenoming: A strategy for prevention and control. Geneva: [s. n.], 2019. 55 p. E-book