



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

SAMUEL DE SOUZA FARIAS

**DETERMINAÇÃO DE POSSÍVEIS INIBIDORES DA RICINA ATRAVÉS
DO USO DO DOCKING MOLECULAR.**

**SUMÉ - PB
2018**

SAMUEL DE SOUZA FARIAS

**DETERMINAÇÃO DE POSSÍVEIS INIBIDORES DA RICINA ATRAVÉS
DO USO DO DOCKING MOLECULAR.**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientador: Professor Dr. Rafael Trindade Maia.

SUMÉ - PB

2018

F244d Farias, Samuel de Souza.

Determinação de possíveis inibidores da ricina através do uso de docking molecular. / Samuel de Souza Farias. - Sumé - PB: [s.n], 2018.

64 f. : il. Collor.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Trindade Maia.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Bioinformática. 2. Inibidores da ricina. 3. Docking molecular. 4. Biotecnologia I. Título.

CDU: 60 (043.1)

Elaboração da Ficha Catalográfica:

Johnny Rodrigues Barbosa

Bibliotecário-Documentalista

CRB-15/626

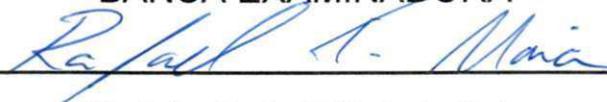
SAMUEL DE SOUZA FARIAS

**DETERMINAÇÃO DE POSSÍVEIS INBIDORES DA RICINA ATRAVÉS
DO USO DE *DOCKING* MOLECULAR**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Aprovado em: 21/12/2018

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Rafael Trindade Maia

UAEDUC/CDSA/UFCG



Dr. Franklin Ferreira de Farias Nóbrega

UAEB/CDSA/UFCG



Prof. Dr.ª. Glauciane Danusa Coelho

UAEB/CDSA/UFCG

SUMÉ – PB

2018

A Deus primeiramente, por me dar a vida e possibilitar
que esteja aqui neste momento, além de sempre esta
ao meu lado me protegendo;
E não posso esquecer de meus pais, que sem seu apoio
eu não estaria aqui

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo agradeço a Deus, por ter dado a minha vida, família e amigos, além de ter me dado forças para alcança meus objetivos e me apoiado em todos os momentos da minha vida.

A minha mãe e meu pai, pelo amor, incentivo e apoio incondicional, possibilitando que eu não desistisse nos momentos mais difíceis.

Ao professor Rafael Trindade Maia, por aceitar me orientar, e pela sua contribuição ao meu crescimento acadêmico e pelo empenho e dedicação na realização deste trabalho.

A Universidade Federal de Campina Grande-CDSA (*Campus Sumé*), pela oportunidade de realiza este curso, além da disponibilização do ambiente necessário para o meu desenvolvimento acadêmico.

Aos professores do CDSA, pela sua grande contribuição no meu desenvolvimento acadêmico.

Aos meus colegas que me ajudaram nos momentos que estava com dificuldade.

Muito obrigado.

RESUMO

A ricina é uma proteína altamente tóxica provinda de uma 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 tornou a ricina uma arma biológica em potencial. O foco deste trabalho é encontrar moléculas que combatam a ação da ricina e sejam viáveis em um tratamento pós-exposição, visto que a maioria dos casos de intoxicação deve-se a ingestão por via oral acidental por crianças pequenas e animais, bem como a tentativa de suicídio, no caso de adultos. Neste trabalho avaliou-se o potencial das moléculas de baicalin, lactose e α -D-gactose, assim como dos isômeros do baicalin e da lactose na inibição da ação da ricina, utilizando método de biologia computacional (*docking molecular*). Dentre os ligantes estudados o baicalin, bem como os isômeros estruturais demonstraram alta capacidade de inibir a molécula de ricina associadamente com uma facilidade de realizar uma ligação espontânea, corroborando com a eficácia sugerida na literatura. Os dados obtidos para a beta-D-galactose mostraram que essa molécula tem capacidade de realizar ligação espontânea com a molécula de ricina, demonstrando a viabilidade no uso na inibição da ricina, como na literatura. A lactose demonstrou capacidade inibitória, de entretanto a sua capacidade de realizar uma ligação espontânea com a molécula é baixa, de forma ao comparar com os resultados da literatura provou que necessita de uma grande dosagem para realizar uma inibição eficiente. Todas as moléculas avaliadas apresentaram capacidade de inibir a atividade da ricina, com destaque para o baicalin.

Palavras-chaves: Inibição da ricina. Lactose. Galactose. Baicalin.

ABSTRACT

Ricin is a highly toxic protein derived from a plant, *Ricinus communis*, better known as castor bean. This toxin has the ability to inactivate the ribosomes, resulting in inhibition of protein synthesis and as a consequence cell death by apoptosis. This characteristic makes ricin a potential biological weapon. The focus of this work is to find molecules that combat the action of ricin and are viable in a post-exposure treatment, since most cases of intoxication are due to accidental oral intake by small children and animals, as well as the attempt of suicide in the case of adults. In this work the potential of the molecules of baicalin, lactose and α -D-galactose, as well as the isomers of baicalin and lactose in the inhibition of the action of ricin, using a computational biology (molecular docking) method, was evaluated. Among the ligands studied, baicalin as well as structural isomers demonstrated a high capacity to inhibit the ricin molecule associated with an ease of spontaneous binding, corroborating with the efficacy suggested in the literature. The data obtained for beta-D-galactose showed that this molecule has the capacity to spontaneously bind to the ricin molecule, demonstrating the viability of the use of ricin inhibition, as in the literature. Lactose has demonstrated inhibitory ability, however its ability to carry out a spontaneous binding with the molecule is low, compared to the literature results it has been shown that it requires a large dosage to effect efficient inhibition. All the molecules evaluated had the capacity to inhibit ricin activity, with emphasis on baicalin.

Keywords: Ricin Inhibition. Lactose. Galactose. Baicalin.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos obtidos para simulação de docking molecular com a RIC_END. Fonte:Este trabalho.....	16
Tabela 2 - Resultados melhores obtidos através do docking molecular do ligante Baicalin com o receptor RIC_END. Fonte: Este trabalho.....	24
Tabela 3 - Resultados melhores obtidos através do docking molecular do ligante Balcalin 3 com o receptor RIC_END. Fonte: Este trabalho.....	26
Tabela 4 - Resultados melhores obtidos através do docking molecular do ligante Baicalin 7 gluturode com o receptor RIC_END. Fonte: Este trabalho.....	29
Tabela 5 - Resultados melhores obtidos através do docking molecular do ligante Balcalin 4 com o receptor RIC_END. Fonte: Este trabalho.....	31
Tabela 6 - Resultados melhores obtidos através do docking molecular do ligante Beta-D-galactose com o receptor RIC_END.Fonte:Este trabalho.....	36
Tabela 7 - Resultados melhores obtidos através do docking molecular do ligante Lactose com o receptor RIC_ENDFonte: Este trabalho.....	40
Tabela 8 - Resultados melhores obtidos através do docking molecular do ligante Alpha-d-lactose com o receptor RIC_END.Fonte: Este trabalho.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Molécula de Ricina. Fonte: Este trabalho.....	6
Figura 2 - conformação1 da molécula de Baicalin ligada a molécula RIC_END Fonte: Este trabalho.....	25
Figura 3 - conformação2 da molécula de Baicalin ligada a molécula RIC_END Fonte: Este trabalho.....	25
Figura 4 - Conformação3 da molécula de Baicalin ligada a molécula RIC_END Fonte: Este trabalho.....	26
Figura 5 - conformação1 da molécula Baicalin 3 ligada a molécula RIC_END. Fonte: Este trabalho.....	27
Figura 6 - conformação2 da molécula Baicalin 3 ligada a molécula RIC_END Fonte: Este trabalho.....	28
Figura 7 - conformação3 da molécula Baicalin 3 ligada a molécula RIC_END Fonte: Este trabalho.....	28
Figura 8 - Conformação1 da molécula Baicalin 7 gluturode a molécula RIC_END Fonte: Este trabalho.....	30
Figura 9 - Conformação2 da molécula Baicalin 7 gluturode a molécula RIC_END Fonte: Este trabalho.....	30
Figura 10 - Conformação3 da molécula Baicalin 7 gluturode a molécula RIC_END Fonte: Este trabalho.....	31
Figura 11 - conformação1 da molécula de Baicalin4 ligada a molécula RIC_END Fonte: Este trabalho.....	32
Figura 12 - conformação2 da molécula de Baicalin4 ligada a molécula RIC_END Fonte: Este trabalho.....	32
Figura 13 - conformação3 da molécula de Baicalin4 ligada a molécula RIC_END Fonte: Este trabalho.....	32
Figura 14 - Conformação1 da molécula de beta-D-galactose ligada a molécula RIC_END Fonte: Este trabalho.....	37
Figura 15 - Conformação 2 da molécula de beta-D-galactose ligada a molécula RIC_END. Fonte: Este trabalho.....	38
Figura 16 - Conformação 3 da molécula de beta-D-galactose ligada a molécula RIC_END. Fonte: Este trabalho.....	38

Figura 17 -Conformação1 da molécula de Lactose ligada a molécula RIC_END Fonte: Este trabalho.....	41
Figura 18 - Conformação2 da molécula de Lactose ligada a molécula RIC_END Fonte: Este trabalho.....	41
Figura 19 - Conformação3 da molécula de Lactose ligada a molécula RIC_END Fonte: Este trabalho.....	42
Figura 20 - Conformação1 da molécula de Alpha-d-lactose ligada a molécula RIC_END Fonte: Este trabalho.....	43
Figura 21 - Conformação2 da molécula de Alpha-d-lactose ligada a molécula RIC_END Fonte: Este trabalho.....	44
Figura 22 - Conformação3 da molécula de Alpha-d-lactose ligada a molécula RIC_END Fonte: Este trabalho.....	44

Lista de gráficos

Gráfico 1 - Fluxograma dos passos utilizados na metodologia.).

Fonte: Este trabalho.....**14**

Gráfico2 - Gráfico de bolsão residual (molécula 4mx1). Fonte: Este trabalho.....**18**

Gráfico3 - Gráfico de bolsão residual (2aai).Fonte: Este trabalho.....**19**

Gráfico 4- Gráfico de Ramachandran da molécula 2aai possuindo 79,6% dos resíduos em regiões favoráveis, 15,9% dos resíduos em regiões adicionais permitidas, 3,35% dos resíduos em regiões generosamente permitidas e 1,3% em regiões não permitidasFonte: Este trabalho.....**20**

Gráfico 5- Gráfico de Ramachandran da molécula 2aai possuindo 86,5% dos resíduos em regiões favoráveis, 10,4% dos resíduos em regiões adicionais permitidas, 1,7% dos resíduos em regiões generosamente permitidas e 1,3% em regiões não permitidasFonte: Este trabalho.....**21**

Gráfico 6- GraficosAnolea, Qmean e Gromos que mostram o posicionamento das regiões que possuem estabilidade energética Fonte: Este trabalho.....**22**

SUMÁRIO

1	Introdução.....	1
2	Justificativa.....	3
3	Objetivos.....	5
3.1	Objetivos gerais.....	5
3.2	Objetivos específicos.....	5
4	Fundamentação teórica.....	6
4.1	Mecanismo de ação.....	6
4.2	Sintomas clínicos de intoxicação.....	7
4.3	Tratamento da intoxicação por ricina.....	8
4.4	Modelagem molecular.....	10
4.5	Docking molecular.....	13
5	Metodologia.....	14
5.1	Minimização de energia.....	15
5.2	Docking molecular.....	15
5.2.1	Preparação do receptor (ricina).....	15
5.2.2	Mineração e preparação dos ligantes.....	15
5.2.3	Simulação de docking.....	17
6	Resultados e Discussões.....	17
6.1	Preparação da molécula de ricina.....	17
6.2	Resultados do docking da ligante Baicalin e seus isômeros com a molécula RIC_END.....	23
6.3	Resultados do docking do ligante Beta-d-galactose e a molécula RIC_END.....	36

6.4.Resultados do docking do ligante lactose e se isômero e a molécula RIC_END.....	40
7.Conclusão.....	47

1 INTRODUÇÃO

A ricina faz parte do grupo de proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) do tipo 2, que possui como principal característica a presença de cadeias polipeptídicas divididas em cadeia A e cadeia B, sendo a cadeia A uma toxina com a capacidade de inibir a síntese de proteínas e a cadeia B que possui como função facilitar a entrada da cadeia A no interior da célula, de forma que esta é capaz de unir-se a glicoproteínas e glicolípido contendo galactosídeos (COOK, DAVID e GRIFFITHS,2007).

A ricina é uma fitotoxina encontrada presente nas sementes de mamona (*Ricinus communis L.*, família Euphorbiaceae), uma planta que se originou na África, mas atualmente esta planta acabou por ser distribuída por vários locais do mundo por causa de fins industriais e ornamentais (ANADÓN, 2004). Mesmo a ricina sendo uma das principais proteínas encontradas nas sementes de mamona a ricina representa 2% do peso da semente, sendo que o óleo da mamona representa a maior parte deste peso (60% do peso da semente) e os 38% restantes são compostos por proteínas solúveis presentes que incluem o *Ricinus aglutinina*, praticamente um dímero de ricina, mas muito menos tóxico, assim como muitas proteínas menores (COOK, DAVID and GRIFFITHS,2007).

A ricina se destaca dentre as toxinas mais letais encontradas em plantas, visto que uma dose letal de ricina em humanos é supostamente de 5-10 mg / kg por injeção, enquanto a ingestão tem uma dose letal na ordem de 1 a 20 mg / kg (Røen et al., 2013). Além disto, a ricina é muito mais fácil de se obter do que outros agentes biológicos considerados de alta capacidade letal, como o antraz e a toxina botulínica, pois sua obtenção e refinamento requer somente o conhecimento básico de técnicas laboratoriais (SPIVAK e HENDRICKSON, 2005).

A ricina é classificada como um agente de prioridade da Categoria B pelos Centros dos EUA para Controle e Prevenção de Doenças (CDC), sendo um dos agentes biológicos com uma das maiores toxicidades conhecidas. A ricina 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 todos eles representam uma grande ameaça do ponto de vista do bioterrorismo (ZHAO et al, 2012).

Tendo todas estas informações pode-se notar 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 e em casos de ingestão intencional por adultos, sendo nestes casos a ingestão é feita por motivos de suicídio ou em alguns casos de assassinato. Nestes casos quando percebida a intoxicação é necessário tratamento imediato, para preservar a vida do paciente e evitar complicações.

2 JUSTIFICATIVA

A maioria dos casos de intoxicação por ricina são provocados pela ingestão de sementes de mamona. Quando são ingeridas inteiras as sementes de mamona podem passar pelo trato gastrointestinal intacta, enquanto a trituração das sementes pela mastigação pode provocar a liberação da ricina (BRADBERRY, 2016). Este tipo de intoxicação não é raro em países que possuem uma grande quantidade de mamona crescendo em abundância (BALINT, 1974 *apud* ALEXANDER *et al*, 2008).

Em pesquisa realizada por Albuquerque *et al* (2014) em Salgado de São Félix, um município do estado da Paraíba, região em que a mamona ocorre em abundancia, foi observado que o intenso consumo das folhas e frutos do vegetal pelo gado promoveu a intoxicação e que os animais consumiam muito estas partes da planta, principalmente por causa da falta de pastagem adequada, o que provoca a morte dos animais por intoxicação.

Mesmo que não se tenha muitos registros de mortes por intoxicação não significa que não ocorram, pois existe a possibilidade das mortes serem registradas ou mesmo não serem diagnosticadas como mortes por intoxicação por ricina. Isto da entender que podem existir mais casos de intoxicação em humanos registrados. Em casos de intoxicação em humanos tais fatos ocorrem principalmente em casos de acidentes com crianças pequenas, que ingerem a semente sem ter conhecimento da toxicidade e em casos de suicídio ou assassinato, sendo este tipo de ocorrência mais comum em adultos.

Os efeitos da ricina no corpo podem ser vistos em um caso de intoxicação relatado por Røenet *al* (2013). Neste caso um paciente de 21 anos foi internado no hospital 4 horas após a ingestão intencional de extrato de mamona. O paciente apresentou vomito, diarreia e dor por todo o corpo, e mesmo sobre cuidados intensivos o paciente não conseguiu resistir, morrendo por falência múltipla de órgãos 42 horas após a ingestão do extrato.

Os tratamentos hoje conhecidos para intoxicação contra ricina são em maioria só eficazes nas primeiras horas após a exposição (ROY *et al.*, 2015). O tratamento para intoxicação por ricina é em maior parte de suporte, como o uso de doses de carvão ativado ou lavagem gastrointestinal para impedir a absorção de ricina pelo trato gastrointestinal (NUNEZ *et al.*, 2017).

Existem inibidores que estão em estágio de desenvolvimento, mas a maioria deles não são acessíveis para a população em geral. Estes tratamentos se dividem em três linhas de ação: a imunização passiva pós-exposição, que se trata da administração de anticorpos anti-ricina, altamente eficaz quando administrado pouco tempo após a exposição a ricina, tratamento pós-exposição com pequenas moléculas, que se trata do uso de moléculas inibidoras contra a ricina e por fim o uso de vacinas profiláticas (MARCONESCU *et al.*, 2010).

Como foi dito, a ricina é uma toxina extremamente letal e causa intoxicação que pode facilmente levar a morte. A disposição de uma substância inibidora nos primeiros momentos da intoxicação pode ser o que determina a diferença entre a vida e a morte de uma de um paciente intoxicado.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Fazer a modelagem computacional da molécula da ricina e testar possíveis inibidores.

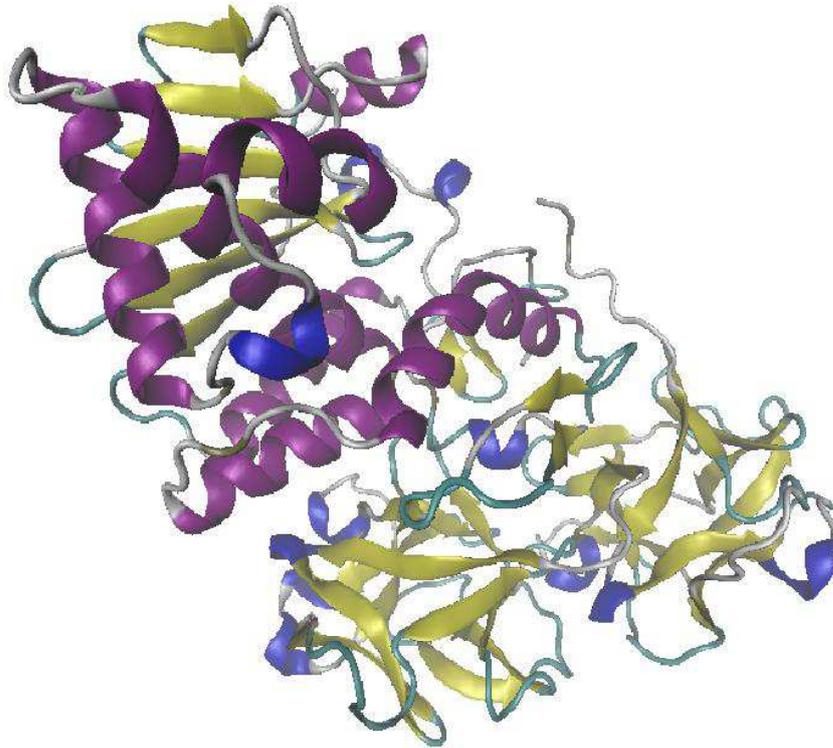
3.2 Objetivos específicos

- Realizar uma pesquisa na literatura procurando possíveis inibidores da molécula da ricina;
- Utilizar a técnica *dedocking* molecular para comprovar o potencial das moléculas indicadas como inibidores em potencial da ricina;
- Estimar a eficiência dos potenciais inibidores da ricina por meio da análise do *docking* molecular;

4 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1 Mecanismos de ação

Figura 1 - Molécula de Ricina.



Fonte: Dados da pesquisa.

O modo como a ricina entra na célula através da membrana celular e alcança os ribossomos e a partir deste ponto proporciona uma atividade inibidora na síntese de proteína, é um processo complexo (LORD e ROBERTOS,2014).

A ricina por via endocitose entra na célula, em grande parte através sítios de ligação da galactose, ocorrendo ligação oportunista por meio da cadeia B para componentes de superfície que possuem um terminal de galactose, após a entrada da mesma ocorre a separação da cadeia A e cadeia B da ricina (LORD e ROBERTOS,2014). Uma vez no interior da célula, a ricina é internalizada pelos endossomos iniciais, uma parte das moléculas da ricina é reciclada e retorna para fora da membrana, outra parte é transportada por endossomos tardios para ser degradada por lisossomos, e uma pequena parte da ricina absorvida é transportada para o complexo de Golgi (ANADÓN; LARRAÑAGA, 2004).

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 (SPIVAK; HENDRICKSON, 2005).

Após o processo de absorção e entrada em 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 impede a síntese de proteína (FONSECA e BLACO, 2014).

4.2 Sintomas Clínicos de Intoxicação

A grande maioria das informações disponíveis sobre intoxicação por ricina são de relatos de casos de intoxicação pela ingestão de semente de mamona e casos de testes *in vivo*, que são feitos em ratos de laboratório (ANADÓN e LARRAÑAGA, 2004).

A intoxicação por ricina pode apresentar diferentes sintomas dependendo da via de acesso, da quantidade de ricina absorvida, da concentração e o tempo que antes do diagnóstico e o tratamento da intoxicação. Os sintomas da intoxicação por ricina normalmente se assemelham muito a os sintomas de várias doenças comuns (MARCONESECU *et al*, 2010).

Em casos da entrada da toxina por via digestiva o aparecimento dos primeiros sintomas da intoxicação pela ricina ocorre entre 1 a 6 horas após a ingestão, entretanto existem casos que a ocorrência destes sintomas pode aparecer de 15 a 45 minutos após a ingestão. Sendo os sintomas mais frequentes vômito, dor abdominal, diarreia (ANADÓN e LARRAÑAGA, 2004), perda do apetite, hematêmese, ataxia, sialorreia, decúbito, taquicardia (FONSECA e SOTO-BLANCO, 2014), hipotensão, hepatite, pancreatite, nefrite, lesão miocárdica, edema cerebral e supressão da medula óssea (SPIVAK; HENDRICKSON, 2005).

Os sintomas de intoxicação pela ricina são um reflexo dos danos que essa causa no corpo, o dano causado pela ingestão de ricina pode ser devastador como é dito por Nunez *et al* (2017), que após a ingestão do extrato da mamona, a ricina começa a danificar o sistema gastrointestinal, causando sérios danos, levando a desidratação e a sério dano visceral. Este dano pode ser explicado pelo fato da

ricina ingerida danificar o epitélio intestinal, e desta forma afetar os vasos sanguíneos e linfáticos, alcançando o fígado e o baço.

Nos poucos casos registrados de absorção de ricina por via inalatória os pacientes afetados apresentaram os seguintes sintomas: congestão nasal e de garganta, urticaria, pressão torácica e broncoesparmos (SPIVAK; HENDRICKSON, 2005) febre, dor torácica, tosse, dispnéia, náusea e artralgia (ANADÓN e LARRAÑAGA, 2004).

No grupo de controle para teste de vacinas anti-ricina realizado por *Roy et al* (2015), os camundongos apresentavam lesões macroscópicas principalmente nos pulmões e linfonódulo traqueobrônquicos, e além disto, possuíam edema perivascular e alveolar grave, e uma infiltração neutrofílica misturada com um número pequeno de macrófagos dentro e ao redor dos bronquíolos terminais.

Ainda existem casos de intoxicação cutânea, entretanto, para que isto ocorra é necessário o contato com a ricina por longos períodos de tempo e em grandes quantidades, esse tipo de intoxicação é raro.

A detecção da ricina no corpo de um paciente intoxicado é essencial para o tratamento, visto que o tratamento imediato poder salvar uma vida. O diagnóstico da intoxicação pela ricina pode ser feito por meio de testes clínicos e como por detecção de ricina no sangue e nos fluidos corporais por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) (FONSECA, et al, 2014 *apud* COOK; DAVID; GRIFFITHS, 2006; ROELS *et al*, 2010), por radioimunoensaio, por cadeia de polimerase reação (PCR) e por fluorescência resolvida no tempo imunoensaio (TRF) (SPIVAK e HENDRICKSON, 2005).

4.3 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, que são usados para impedir a absorção da toxina pelo sistema gastrointestinal, (NUNEZ *et al*, 2017). O tratamento com a lavagem gástrica é susceptível a remoção de uma quantidade significativa de ricina, àssimé importante que seja feito pelo menos 1 hora após a ingestão da ricina (SPIVAK; HENDRICKSON, 2005). Além destes tratamentos também pode ser feita a indução ao vomito, sucralfato, dieta suave, intensa fluidoterapia intravenosa e terapia eletrolítica (Fonseca, N. B. da S. *et al*,

2014 *apud* GARLAND; BAILEY, 2006 e SOTO-BLANCO *et al.*, 2002), sendo que isto depende da ocorrência.

Existem tratamentos em desenvolvimento para a intoxicação por ricina, sendo que estes podem ser divididos em três tipos distintos: imunização passiva pós-exposição, tratamento pós-exposição com moléculas pequenas e imunização profilática. Todos estes novos tipos de tratamentos possuem suas desvantagens, como o primeiro e o segundo possuem como desvantagem o fato de que somente são eficazes se aplicados nos pacientes algumas horas depois da intoxicação e antes do aparecimento dos primeiros sintomas, já o terceiro possui como desvantagem o fato de ser de difícil fabricação, e não funcionam sempre como o esperado (MARCONESCU *et al.*, 2010).

Uma desvantagem que pode ser encontrada no caso do uso de moléculas inibidoras de ricina, que em sua maioria são compostos sintéticos com a capacidade de inibir a toxicidade da ricina, entretanto podem não ser seguros para o uso (RASOOLY R., HE X. e FRIEDMAN M., 2012). Além disto, muitos destes inibidores não demonstraram muita eficácia em tratar a intoxicação contra a ricina (DONG *et al.*, 2015). O uso de moléculas inibidoras possui o desafio de encontrar moléculas adequadas para um tratamento contra a intoxicação pela ricina, este problema pode ser resolvido pelo uso de moléculas que podem ser encontradas no nosso dia a dia.

Algumas das substâncias naturais que possuem a capacidade de inibição da ricina estão presentes no leite, sendo estas a lactose e a galactose, que em teste *in vitro* provaram que podem reduzir a disponibilidade da ricina para as células, inibindo assim a atividade biológica da ricina, mas estes efeitos dependem da concentração tanto das moléculas de ricina quanto das moléculas inibidoras (RASOOLY R., HE X. e FRIEDMAN M., 2012).

A lactose provoca a inibição da ricina por meio da ligação das suas moléculas às moléculas da ricina, desta forma reduz a ligação da ricina com os receptores presentes na superfície da célula e aumenta a taxa de dissociação da ricina dos receptores celulares (LUMOR *et al.*, 2013 *apud* SANDVIG *et al.*, 1975). Este tipo de inibição pode ocorrer com a galactose, visto que a ricina liga-se a carbonos na superfície celular que contem receptores de galactose (BRADBERRY, 2016).

Outra molécula natural que provou ter uma boa capacidade de inibir a ação da ricina foi o baicalina, uma flavona derivada principalmente das raízes da

Scutellariabaicalensis (GUO *et al*, 2011), que interage com a cadeia A da molécula de ricina por e redes de potes de hidrogênio e interações de força eletrostática, que proporcionam 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 (DONG *et al*, 2015).

4.4 Modelagem molecular

O avanço da computação, principalmente o aumento da capacidade processamento de dados dos computadores mais recente permitiu um maior desenvolvimento no estudo da bioinformática e de sistemas biológicos, possibilitando que tais temas sejam abordados com mais sucesso (CAPRILES *et al*, 2014).

A modelagem molecular computacional que estuda a estrutura tridimensional das proteínas por meio de simulação de soluções para os problemas científicos relacionados a estrutura proteica das moléculas. Esses estudos permitem a elaboração de códigos computacionais para a obtenção das informações relevantes sobre as posições dos aminoácidos (MENETTI, 2006).

A importância deste tipo de estudo está nas sequências codificadas que acabam por gerar estruturas tridimensionais, possibilitando que efeitos biológicos possam ser estudados e avaliados de maneira precisa: como o estudo da estrutura das proteínas gera milhões de dados, os quais geram mais possibilidades de estudo (ABREU, 2015).

Entre as áreas que foram beneficiadas pelo avanço do desenvolvimento computacional está o estudo das estruturas tridimensionais das proteínas, pois as proteínas existem em forma de estruturas tridimensionais, que dificilmente podem ser compreendidas totalmente através da análise em um plano bidimensional, tais estudos permitem uma verificação da estrutura da proteína mais detalhada.

Um aspecto que possibilitou o benefício do estudo da estrutura das proteínas e a bioinformática é o a utilização de cristalografia de raios-X e espectroscopia de RMN (Ressonância Magnética), que proporcionou um aumento exponencial do número de proteínas que tiveram sua estrutura estudada, desta forma aumentando a quantidade de dados sobre as mesmas e começaram a ser colocados em um banco de dados (MURZIN *et al*, 1995). Estas técnicas são atualmente as principais métodos utilizados para a detecção da estrutura da proteína, entretanto estes

processos possuem limitações que podem variar de acordo com cada tipo de proteína, como no caso de um atraso do isolamento e a purificação, assim como um excesso de tempo no seu uso (ABREU, 2015).

Além disto, a utilização destes métodos podem ser caros e possivelmente falhos em algumas condições tornando o método experimental inviável. Vale notar que por causa destas características os métodos que utilizam modelagem computacional provaram-se muito úteis para ajudar nestes estudos, pois além de mais baratos em comparação com as formas de modelagem experimentais citadas anteriormente, e os modelos computacionais possibilitam uma previsão do resultado dos modelos experimentais. Entretanto, os métodos computacionais não descartam os métodos experimentais, visto que estes ainda são considerados os melhores procedimentos para se determinar uma estrutura tridimensional de uma proteína (CAPRILE *et al.*, 2014).

A sequência de aminoácidos de uma proteína contém informações de interesse por si só, pois esta sequência pode ser comparada com outras para que assim seja estabelecida uma relação entre a proteína a ser estudada e aquelas que podem estar relacionada a mesma, possibilitando assim entender a evolução bioquímica, entretanto vale nota que para entender a função de uma proteína e o conhecimento da estrutura tridimensional possui tanta importância quanto o de sua sequência, pois a estrutura fornece um maior número de informações que a sequência (GIBAS; JAMBECK, 2001).

Vale notar que as proteínas em sua forma nativa tem que apresentar determinadas características como baixa energia livre e uma relevância biológica, possibilitando que a cadeia estabeleça suas funções no meio em que encontram (ABREU, 2015).

Quando ocorre a modelagem da estrutura proteica por via computacional existem duas abordagens possíveis: a primeira é baseada no conhecimento sobre a modelagem, com o uso de do conhecimento e parâmetros retirados de bancos de dados de estruturas, possibilitando analisar e aperfeiçoar a estrutura ou até prevê a mesma a partir da sequência, já o segundo método se baseia na simulação de forças físicas e moleculares, de modo que simulações físico-químicas são usadas com frequência para modelar uma proteína se dobrando de sua forma nativa e funcional (GIBAS e JAMBECK, 2001).

Os tipos de métodos computacionais de predição da estrutura proteica podem depender da medida em que o banco de dados de proteínas é explorado, podendo ser classificados em três métodos distintos que são estes: *ab initio*, “*threading*” e modelagem por homologia ou comparativa (ROYeZHANG, 2012).

No caso do método *ab initio*, este é fundamentado na termodinâmica e além disso se baseia no fato de que a estrutura proteica nativa corresponde ao mínimo global de energia livre. Esta metodologia consiste na simulação do espaço conformacional da proteína estudada, para isto ocorre à utilização de uma função de energia potencial, desta forma descrevendo a energia interna de uma proteína e suas interações com o meio em que esta inserida, com o objetivo de encontrar o mínimo global de energia que corresponde ao nativo (DORN, 2008).

Este tipo de modelagem é utilizado quando existe pouca informação sobre a proteína que esta sendo estudada (NICOLAU JUNIOR, 2013). Visto que este método é usado quando se tem pouca informação sobre a proteína, para determinar a estrutura da proteína com este método é necessário no mínimo o conhecimento a sequência dos resíduos de aminoácidos e suas interações físico-químicas entre si e com o meio (MENETTI, 2006).

A modelagem *Threading* é um método de modelagem que consiste na entrada de uma sequência de aminoácidos, a qual não possui estruturas características, e a partir desta sequência um modelo é desenvolvido através das informações de um banco topologias existentes (ABREU, 2015 *apud* MURZIN *et al*, 1995). Este tipo de metodologia é usado com mais frequência para detectar homologias remotas, as quais não podem ser detectadas por outros métodos padrões, desta forma se umas algumas partes da sequência se encaixam em uma dobra, é possível que seja inferido um alinhamento, mesmo que não seja possível forma um modelo completo (GIBAS; JAMBECK, 2001).

O método de comparação entre sequências de proteínas se chama modelagem comparativa ou homóloga, sendo este um dos métodos mais utilizados para determinar a estrutura das proteínas. Seu princípio consiste na utilização de uma sequência de aminoácidos como molde e a mesma é alinhada com a sequência de aminoácidos que se deseja modelar, para que isto ocorrer é necessário que a sequência escolhida como molde seja similar a que esta sendo estudada (DORN, 2008). Além de que a sequência de aminoácido da proteína que esta sendo

estudada tenha também sido elucidada, além de que as sequencias que estão sendo estudadas devem possuir um determinado grau de identidade (PACHECO, 2009).

4.5 Docking molecular

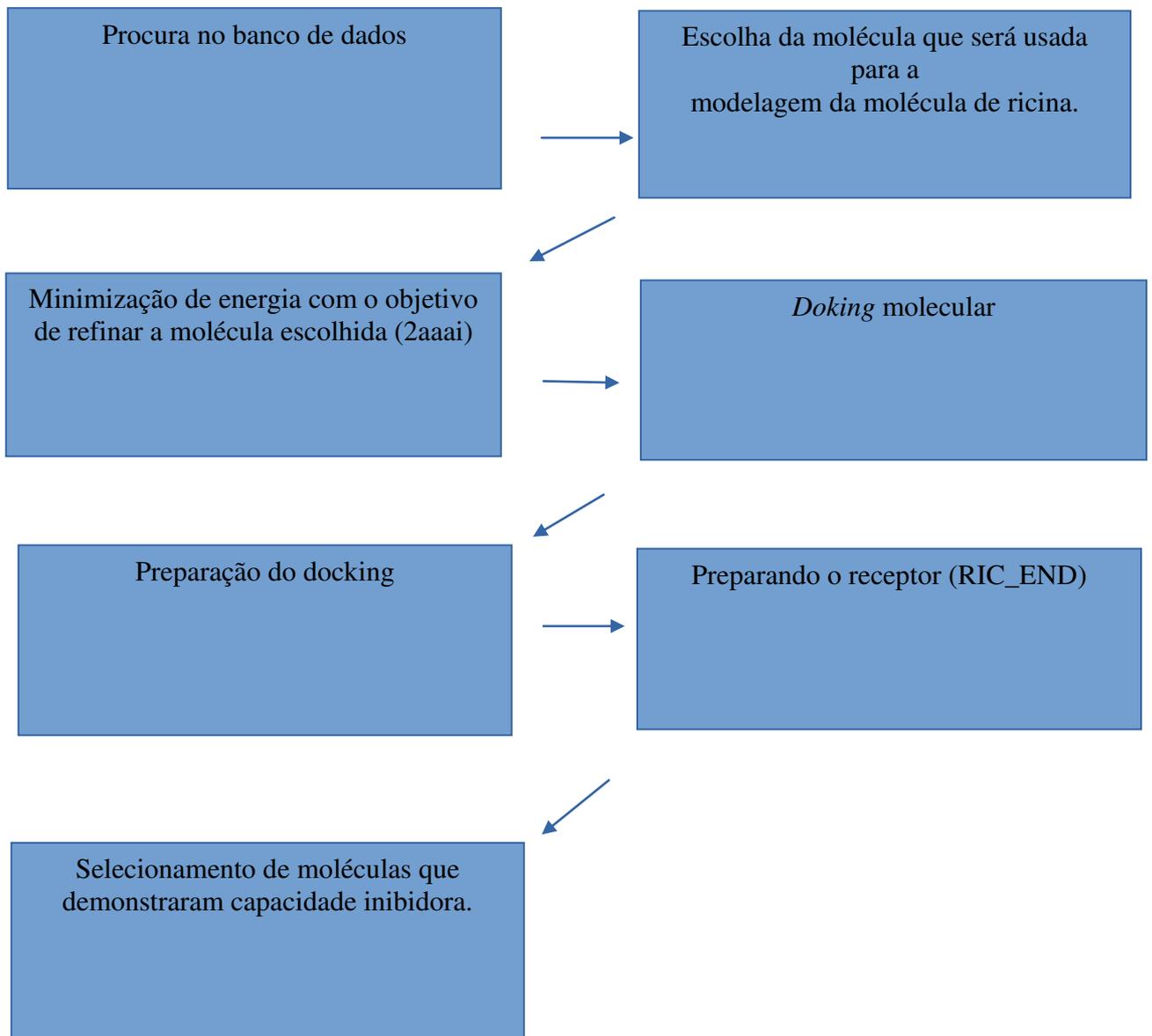
Docking molecular é a representação computacional de um reconhecimento molecular, que ocorre entre o ligante e a proteína, tal representação simula os vários métodos de encaixe possíveis entre a proteína e o ligante, além de mostra as formas como são tratadas a colocação do ligante, possibilitar a exploração do espaço conformacional, representar as interações de ligante e proteína e a estimativa da possibilidade de afinidade de ligação (ERICKSON *et al.*, 2004).

O processo de *docking* molecular tem como função a simulação do curso natural da interação que ocorre entre o ligante e sitio ativo de seu receptor, sendo que o docking visa a via de menor energia por meio da química entre as estruturas (ABREU, 2015). Este processo torna possível uma melhor compreensão da interação entre ligante e receptor, de forma que possa determinar como ocorre a ligação, a região que o ligante e o receptor se ligam, a energia para que esta ligação ocorra, entre outras informações úteis para o estudo do processo.

Os métodos de docking molecular se dividem em duas classes de métodos distintos: o receptor-ligante e receptor-proteína (GUEDES, MAGALHÃES E DARDENNE, 2014). 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 ranqueir as possíveis posições espaciais para um determinado composto (NICOLAU JUNIOR, 2013 *apud*ROGNAN, 2011).

5 METODOLOGIA

Gráfico 1 - Fluxograma dos passos utilizados na metodologia.



Fonte: Esta pesquisa.

Utilizando informações providas do Banco De Dados De Proteínas (PDB - *Protein Data Bank*). O foi possível obter dados sobre as moléculas de ricina, no caso em questão foram obtidas as seguintes moléculas: 4mx1 e 2aaai. Neste experimento foi utilizada a molécula 2aaai por motivos que serão explicados nos resultados e discussões. Com esta situação foi visto que existia necessidade da utilização de uma minimização de energia, para assim ser possível melhora a qualidade na molécula 2aaai, de forma que esta possa ser utilizada.

Para encontrar possíveis ligantes foi realizado uma pesquisa na literatura, a qual possibilitou encontrar as seguintes moléculas e seus isômeros: Lactose, Galactose e Baicalina.

5.1 Minimização de energia

Para o refinamento da geometria molecular e das condições termodinâmicas foi necessário que a estrutura passasse por uma minimização de energia. Visto que a quantidade de resíduos em regiões favoráveis é considerada insuficiente para a obtenção dos resultados desejados, de forma que não seria possível obter resultados com a qualidade necessária. A minimização de energia é uma técnica que usa de algoritmos e outros métodos computacionais para melhorar a qualidade do modelo. Para que isso, os algoritmos e métodos computacionais buscam conformações que possuem uma menor perturbação entrópica entre as possíveis conformações, desta forma aumentando o número de resíduos em regiões favoráveis.

Para a realização da minimização de energia do modelo proposto foi utilizado o servidor Yasara (www.yasara.org/minimizationserver.htm). Após a minimização o modelo final passou pelo processo de validação.

5.2 Docking molecular

5.2.1 Preparação do receptor (ricina)

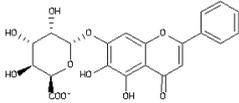
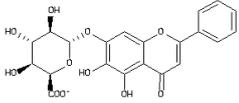
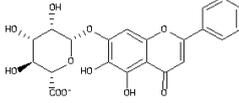
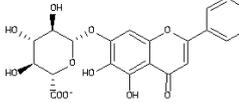
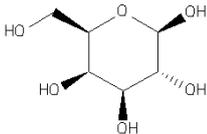
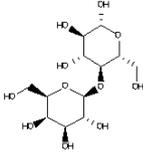
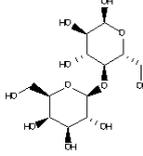
O receptor (macromolécula) utilizado para as simulações de *docking* foi o modelo tridimensional refinado da ricina (2aai), o qual foi nomeado de RIC_END. O arquivo foi convertido de .pdb para .pdbqt e foram adicionados e assinalados parâmetros de carga Kollman (WEINER *et al.*, 1984), assim como hidrogênios foram adicionados à estrutura.

5.2.2 Mineração e preparação dos ligantes

Para a realização do experimento de docking foram selecionadas moléculas que tiveram a capacidade inibidora comprovada na literatura, sendo estas: Lactose, Galactose e Baicalina (Tabela 1). As coordenadas atômicas destes ligantes foram adquiridas por meio de arquivos .mol2 disponíveis na base de dados Zinc (zinc.docking.org). Os ligantes foram assinalados com parâmetros de carga

Gasteiger(GASTEIGER; MARSILI, 1980), de forma que os seus arquivos foram convertidos para *.pdbqt*, para possibilitar seu uso no programa Autodock1.5.6.

Tabela 1 - Compostos obtidos para simulação de docking molecular com a RIC_END.

Nome	Estrutura	Formula	Acesso	Base de dados
Baicalin (3)		C ₂₁ H ₁₈ O ₁ 1	12153569	http://zinc.docking.org
Baicalein 7-glucuronide		C ₂₁ H ₁₈ O ₁ 1	4349040	http://zinc.docking.org
Baicalin (4)		C ₂₁ H ₁₈ O ₁ 1	5973694 1	http://zinc.docking.org
Baicalin		C ₂₁ H ₁₈ O ₁ 1	3943903	http://zinc.docking.org
α-D-galactose		C ₆ H ₁₂ O ₆	2597049	http://zinc.docking.org
Lactose		C ₆ H ₁₂ O ₆	4095761	http://zinc.docking.org
α-d-lactose monohydrate		C ₁₂ H ₂₂ O ₁ 1	4095793	http://zinc.docking.org

Fonte: este trabalho.

5.2.3 Simulação de docking

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.

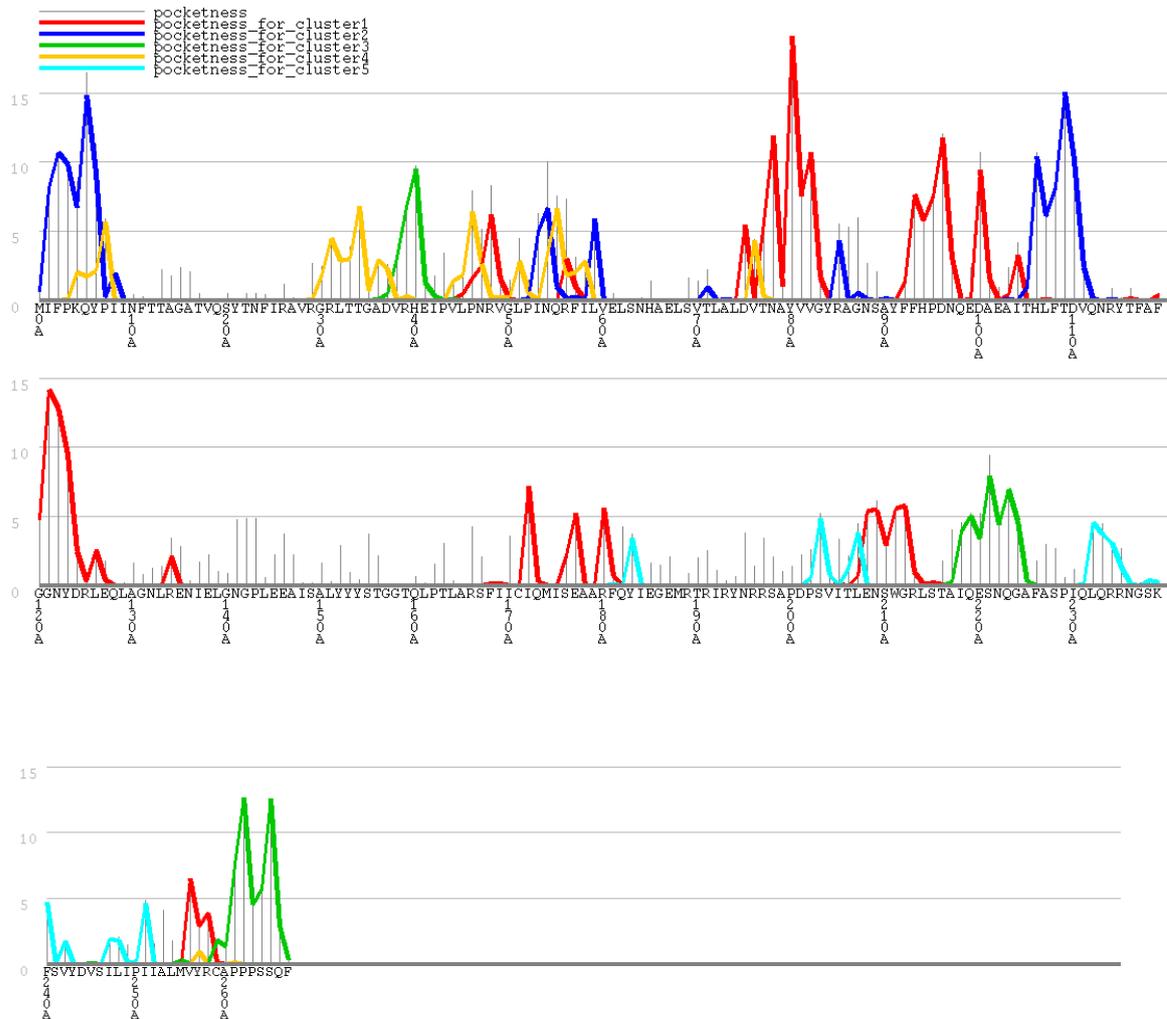
O tamanho populacional escolhido manteve-se as taxas de mutação em 150 e de *crossing-over* foram de 0.02 e 0.8, respectivamente. O *docking* gerou 10 conformações ranqueadas por energias distintas para cada molécula utilizada. As conformações obtidas foram organizadas, coletadas e analisadas através do uso dos recursos disponibilizados pela opção Autodock tools. As conformações que demonstraram energia de ligação “negativa alta” ou em condições com energia de ligação “negativa” situadas ente -0,5 e -3, além de possuírem um alto potencial de inibição foram selecionadas.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Preparação da molécula de ricina

As primeiras moléculas obtidas para a realização do experimento foram a 4mx1 e 2aai. Com o objetivo de determinar as regiões com potencial de ligação com o inibidor. Os resultados podem ser vistos nos gráficos mostrados no Gráfico 2.

Gráfico 2: gráfico de bolsão residual (molécula 4mx1). Linhas vermelhas: locais que possuem maior capacidade de gerar reação espontânea. Linhas azuis: representam os locais que possuem maior capacidade de gerar uma reação espontânea depois dos locais indicados pelas linhas vermelhas. Linhas verdes escuras: locais que tem chance de ocorrer uma ligação espontânea. Linhas amarelas: locais que possuem pouca chance de gerar uma reação espontânea. Linhas azuis claro: não ocorre a reações espontâneas.

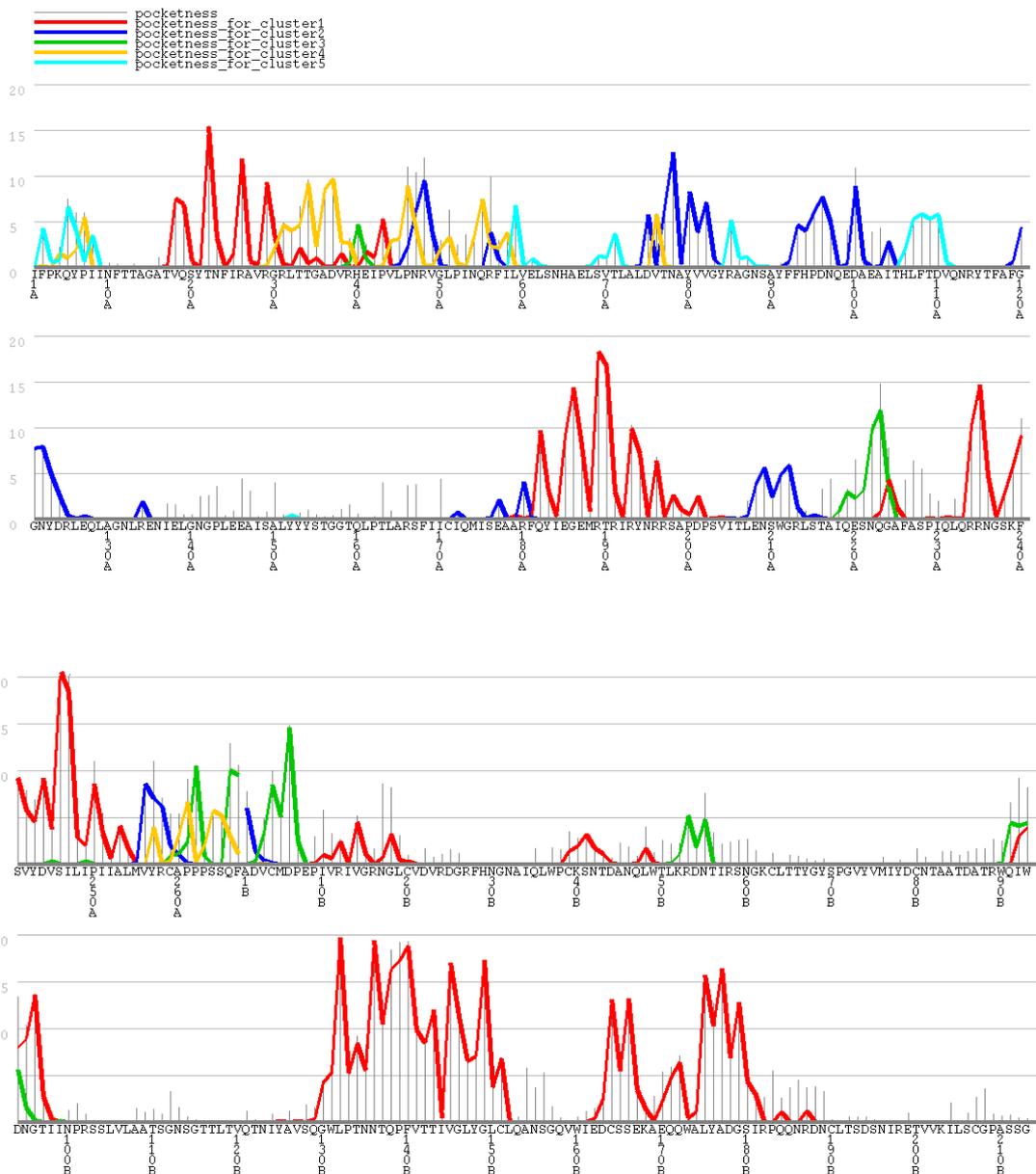


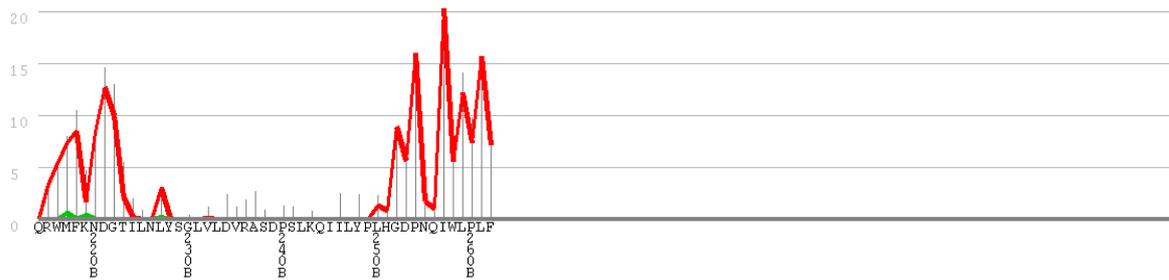
Fonte: Este trabalho.

O gráfico da Figura 2 mostra os locais que possuem uma maior chance de ocorrer uma ligação espontânea, sendo estes locais representados pelas linhas vermelhas, ornando-o estes locais mais indicados para a ligação de inibidores..Entretanto, vale nota que os gráficos mostram somente a existência da cadeia A da molécula de ricina, indicando que a molécula 4mx1 não é uma molécula completa mais sim uma cadeia, pois a molécula de ricina é um dímero, desta forma essa molécula não pode ser usada para a realização dos experimentos.

.OGráfico 2 representaas localizações que possuem uma maior capacidade de ocorrer uma ligação espontânea na molécula 2aai, diferente do primeiro gráfico pode-se nota a existência de uma cadeia B, desta forma esta molécula tonou-se utilizável para o experimento.

Gráfico 3: gráfico de bolsão residual (2aai). Linhas vermelhas: locais que possuem maior capacidade de gerá razão espontânea . Linhas azuis: representam os locais que possuem maior capacidade de gerá uma reação espontânea depois dos locais indicados pealas linhas vermelhas. Linhas verdes escuras: locais que tem chance de ocorrer uma ligação espontaneista. Linhas amarelas: locais que possuem pouca chance de gerá uma reação espontânea. Linhas azuis claro: não ocorre a reações espontâneas.

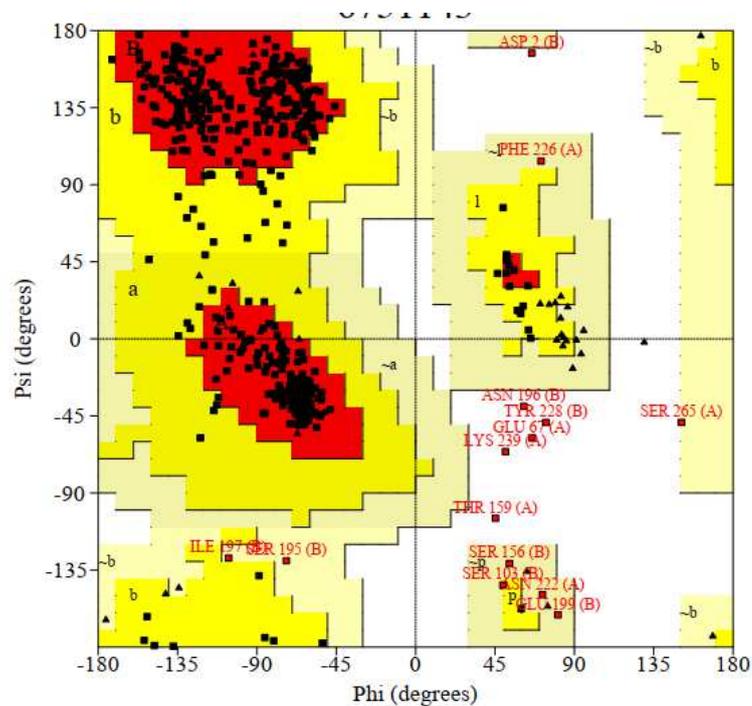




Fonte: Este trabalho.

Diferente da molécula 4mx1 pode-se notar a existência de uma cadeia B mostrando que a molécula 2aai é uma molécula de ricina completa, por está completa o modelo 2aai foi o escolhido para ser utilizado neste experimento. O modelo 2aai, referente não possuía a qualidade necessária para a obtenção de resultados significativos, visto que essa possuía muitos resíduos em regiões que não são termodinamicamente favoráveis, podendo ocorre colisões entre os resíduos da molécula. Pode-se visualizar a qualidade do modelo 2aai no gráfico de Ramachandran na figura 4.

Gráfico 4 : Gráfico de Ramachandran referente a molécula 2aai apresentou que: 79,6% dos resíduos em regiões favoráveis, 15,9% dos resíduos em regiões adicionais permitidas, 3,35% dos resíduos em regiões generosamente permitidas e 1,3% em regiões não permitidas.

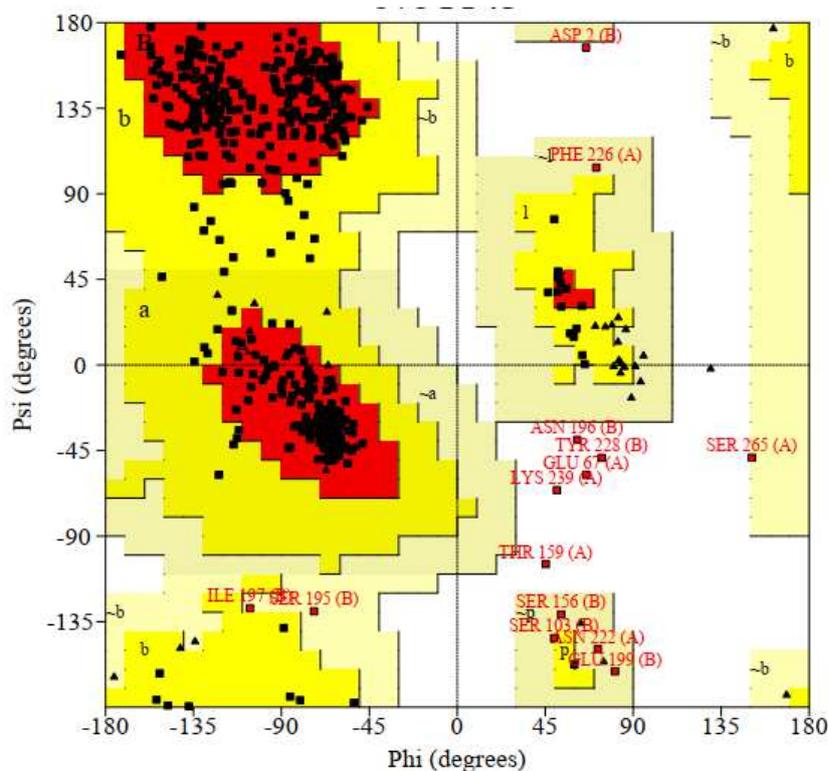


Fonte: Este trabalho.

As informações mostradas na figura 4 indicam que a molécula de ricina (2aai) não possui a qualidade estereoquímica suficiente para a realização dos testes de *docking* molecular foi necessário o refinamento da molécula de ricina, pois muitos dos resíduos encontrados no modelo estavam em posições que atrapalhava o bom funcionamento da molécula e podem provocar perda de energia desnecessária. Para poder utiliza o modelo 2aai foi necessário a utilização de minimização de energia, primeiramente foram usadas as ferramentas do Chiron para realizar a minimização de energia, entretanto não foi possível a obtenção dos resultados devido a falha na realização da minimização, visto isto, foi necessário a mudança do servidor para o Yasara, o qual possibilitou a obtenção dos resultados desejados.

A molécula obtida após o refinamento foi nomeada de RIC_END, a qual apresentou um aumento significativo na sua qualidade estequiométrica. Informações sobre as suas qualidades estereoquímicas podem ser vistos na firura 5.

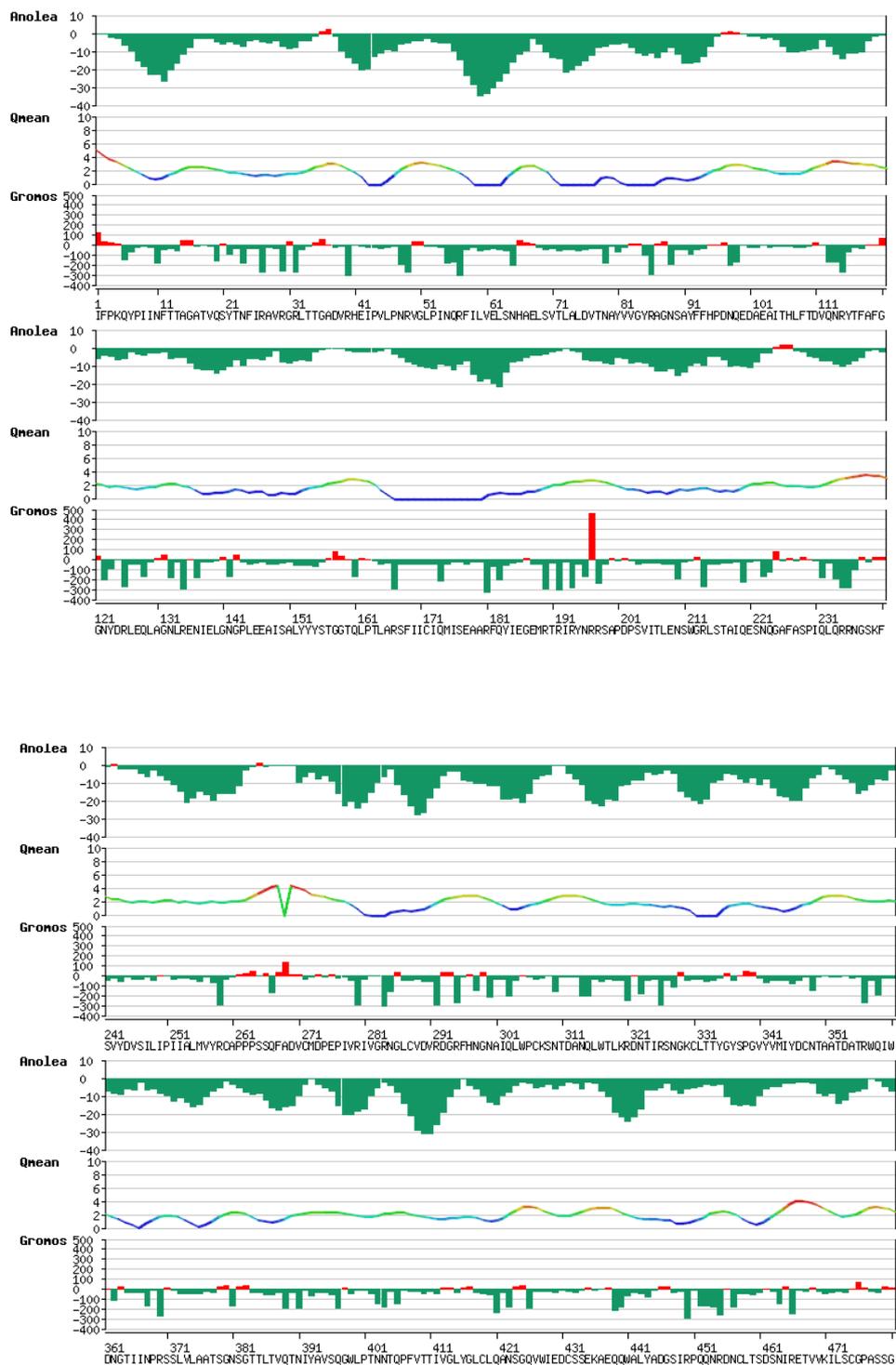
Gráfico 5:Gráfico de Ramachandran referente\ molécula 2aai : 86,5% dos resíduos em regiões favoráveis, 10,4% dos resíduos em regiões adicionais permitidas, 1,7% dos resíduos em regiões generosamente permitidas e 1,3% em regiões não permitidas

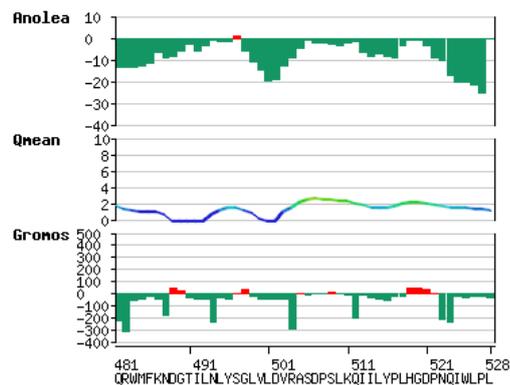


Fonte: Este trabalho.

Após a obtenção da molécula refinada RIC_END e a formação do gráfico de Ramachandran, foi realizada a análise da nova molécula no do servidor anoleia-swiss, obtendo os resultados mostrados nos gráficos a seguir.

Gráfico 6: Gráficos Anolea, Qmean e Gromos, respectivamente mostram o posicionamento das regiões que possuem estabilidade energética. Verde: regiões com estabilidade energética. Vermelho : regiões sem estabilidade energética.





Fonte: Este trabalho.

Os gráficos apresentados na Figura 6 são compostos por três gráficos distintos, sendo o primeiro Anoleia, o segundo Qmean e o terceiro o Gromos. Cada um mostra aspectos distintos do posicionamento das regiões que possuem estabilidade energética, de forma que os pontos encontrados em vermelho representam os locais que possuem uma maior perda de energia e as regiões com cor esverdeada (Anoleia e Gromos) e em coloração mais clara (Qmean) representam os locais com alta capacidade de manter energia. Deste modo as regiões de coloração esverdeada no caso dos gráficos Anoleia e Gromos e as regiões de coloração mais clara no caso do gráfico Qmean são termodinamicamente instáveis e estão em condições que não ocorre perda de energia por causa de choques entre os resíduos da molécula. Desta forma ligações podem ocorrer com uma maior facilidade, tornando a molécula melhor para se trabalhar.

6.2 Resultados do *docking* da ligante Baicalin e dos isômeros estruturais com a molécula RIC_END

Com a obtenção da molécula refinada a realização do *docking* molecular obteve resultados satisfatórios, mostrando a eficiência de alguns inibidores citados na literatura. Os resultados do *docking* molecular podem ser visto na tabela 2 que serão exibidas a seguir:

Tabela 2: Resultados melhores obtidos através do docking molecular do ligante Baicalin com o receptor RIC_END.

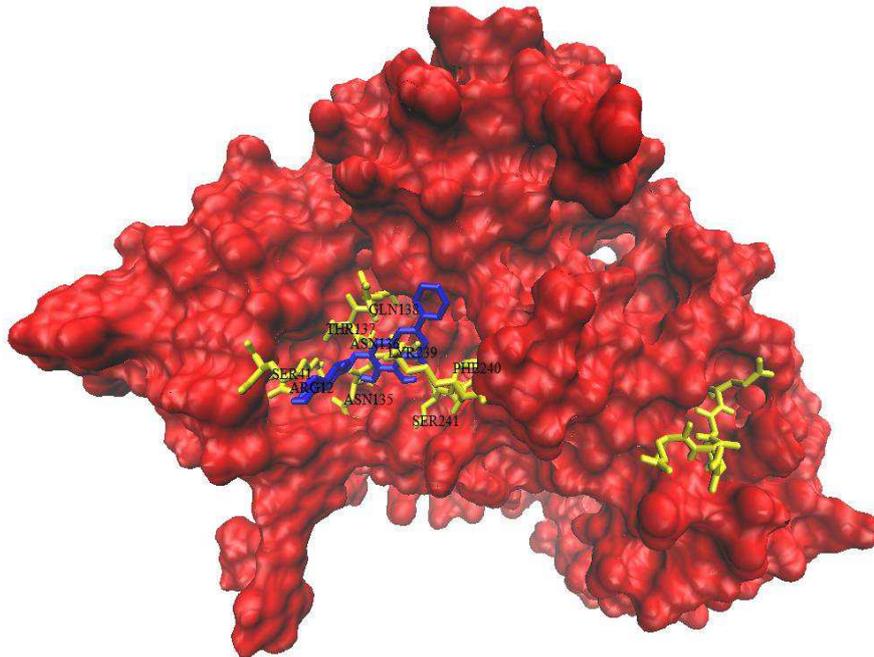
Nome	Energia de ligação(kJ/mol)	Constante de inibição(μ M)	Energia intermolecular (kcal/mol)
Baicalin (conformação 1)	-5,3	129,24	-7,99
Baicalin (conformação 2)	-4,73	342,55	-7,41
Baicalin (conformação 3)	-4,65	388,64	-7,34

Fonte: Este trabalho..

A Tabela 1 mostra os melhores resultados obtidos no docking molecular do ligante Baicalin com a molécula RIC_END. Pode-se notar a facilidade que o ligante possui em formar ligações com a molécula receptora, visto que a energia de ligação foi “negativa”, ou seja, o ligante tem alta capacidade de gerar uma ligação espontânea com a molécula alvo sem ajuda externa. As constantes de inibição apresentaram altos valores, o que faz com que os ligantes sejam considerados eficazes na inibição da ricina, devido à capacidade de estabelecer ligações espontâneas com a ricina. A energia intermolecular propulsiona uma ligação mais firme e duradoura, possibilitando que a molécula e o ligante não se desliguem por variações, que pode acontecer no decorrer do tempo.

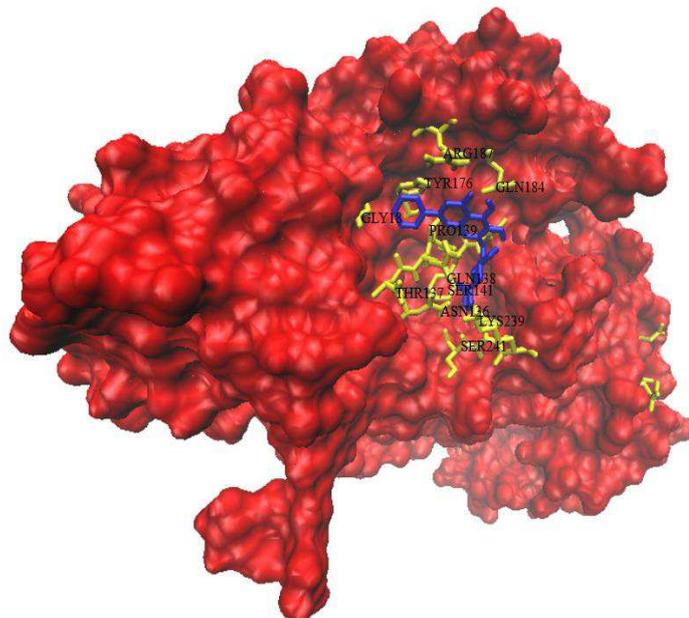
As figuras 2,3 e4 mostram a ligação entre a molécula alvo e o ligante, sendo que cada figura mostra uma conformação distinta que ocorre a ligação.

Figura 2: conformação1 da molécula de Baicalin ligada a molécula RIC_END. Vermelho: Molécula RIC_END. Amarelo: sítios de ligação entre RIC_END e o ligante. Azul: ligante.



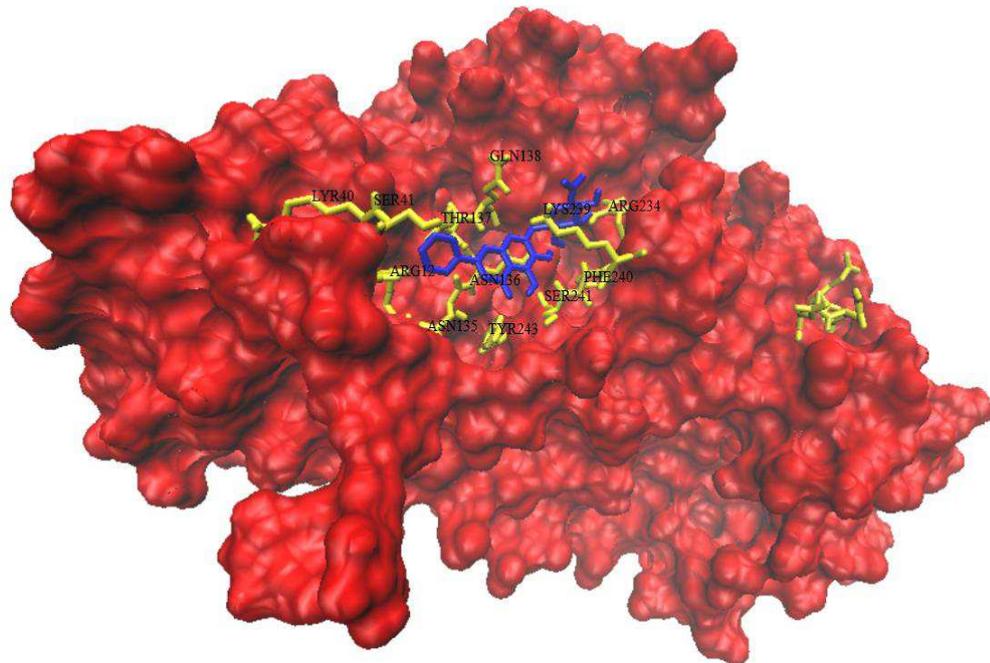
Fonte: Este trabalho.

Figura 3: conformação2 da molécula de Baicalin ligada a molécula RIC_END. Vermelho: Molécula RIC_END. Amarelo: sítios de ligação entre RIC_END e o ligante. Azul: ligante.



Fonte: Este trabalho.

Figura 4: Conformação 3 da molécula de Baicalin ligada a molécula RIC_END. Vermelho: Molécula RIC_END. Amarelo: sítios de ligação entre RIC_END e o ligante. Azul: ligante.



Fonte: Este trabalho.

Tabela 3: Resultados melhores obtidos através do docking molecular do ligante Baicalin 3 com o receptor RIC_END.

Nome	Energia de ligação (kJ/mol)	Constante de inibição (μM)	Energia intermolecular (kcal/mol)
Baicalin 3 (conformação 1)	-4,95	237,37	-7,63
Baicalin 3 (conformação 2)	-4,7	360,75	-7,38
Baicalin 3 (conformação 3)	-4,93	244,47	-7,61

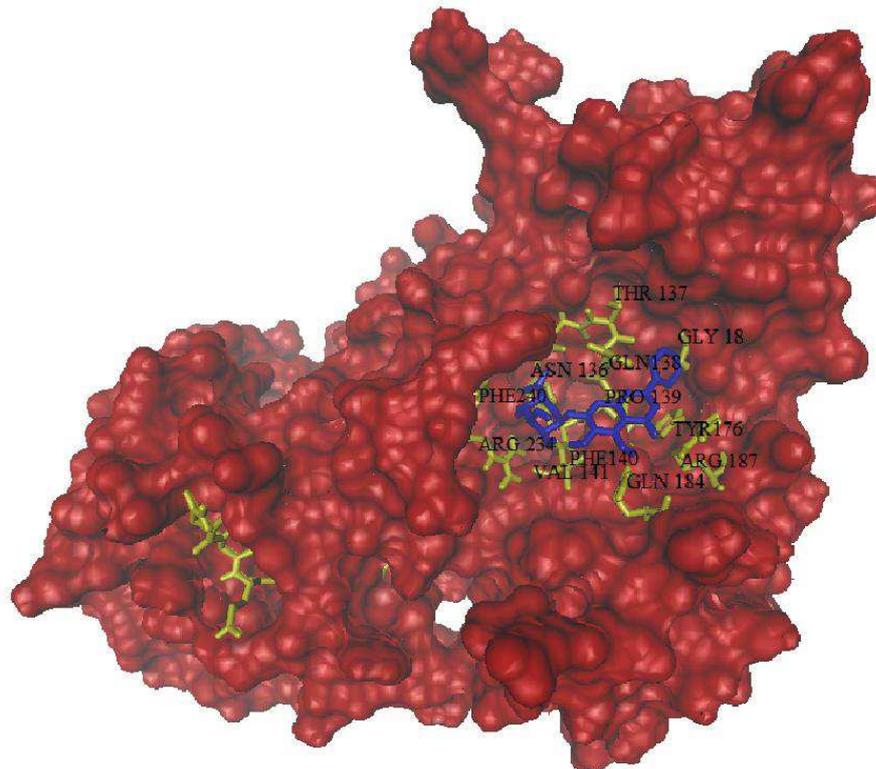
Fonte: Este trabalho.

A Tabela 3 mostra melhores resultados obtidos a partir do docking molecular do ligante Baicalin 3 com a molécula RIC_END. Esse ligante é um dos isômeros da molécula de Baicalin. Assim como o isômero mostrado anteriormente o Baicalin 3 pode realizar ligação espontânea com facilidade, visto que sua energia de ligação foi apresentada como “negativa”, desta forma mostra a capacidade deste isômero de proporcionar uma ligação sem que ocorra uma interferência externa é alta, não necessitando de ajuda para realiza uma ligação, pois a ligação entre a molécula alvo

e o ligante propulsiona que ambas as moléculas obtenham estabilidade. As altas constantes de inibição, que o tornam viável como inibidor e energia intermolecular alta tonando mais difícil a separação da molécula e o ligante.

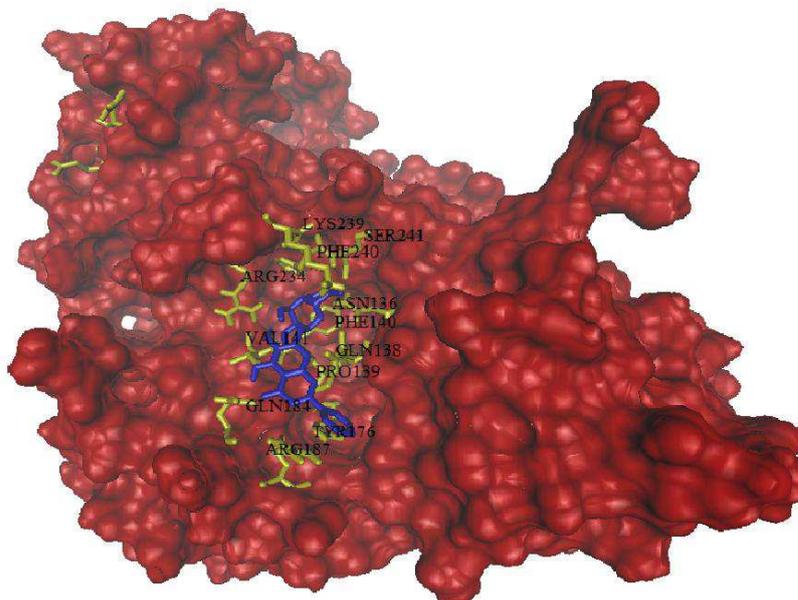
As figuras 5, 6 e 7 mostram a ligação entre a molécula alvo e o ligante, sendo que cada figura mostra uma conformação distinta que ocorre a ligação.

Figura 5: conformação1 da molécula Baicalin 3 ligada a molécula RIC_END. Vermelho: Molécula RIC_END. Amarelo: sítios de ligação entre RIC_END e o ligante. Azul: ligante.



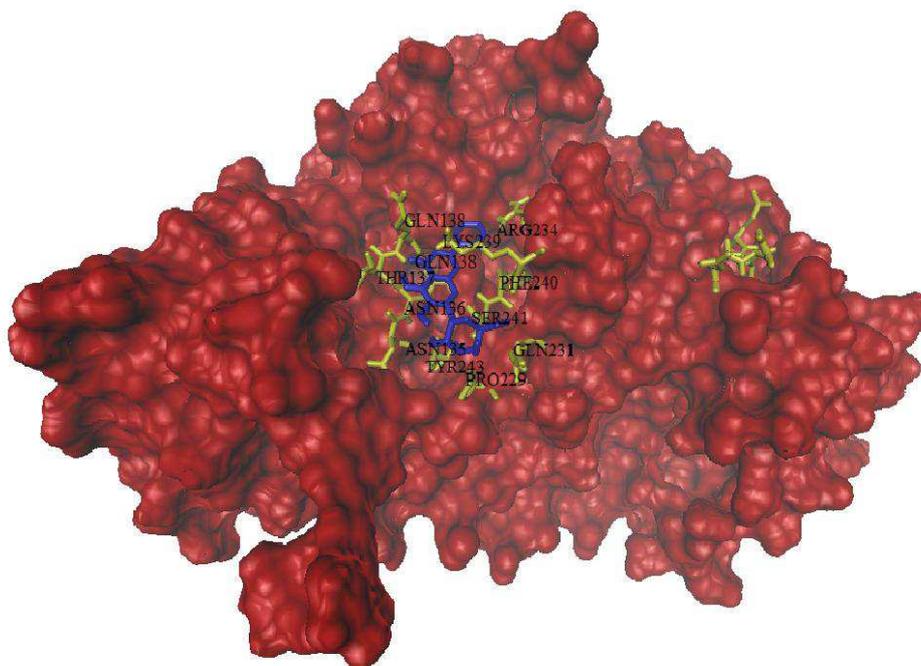
Fonte: Este trabalho.

Figura 6:conformação2 da molécula Baicalin 3 ligada a molécula RIC_END. Vermelho: Molécula RIC_END. Amarelo: sítios de ligação entre RIC_END e o ligante. Azul: ligante.



Fonte: Este trabalho.

Figura 7:conformação3 da molécula Baicalin 3 ligada a molécula RIC_END. Vermelho: Molécula RIC_END. Amarelo: sítios de ligação entre RIC_END e o ligante. Azul: ligante.



Fonte: Este trabalho.

Tabela 4: Resultados melhores obtidos através do docking molecular do ligante Baicalin 7 gluturode com o receptor RIC_END.

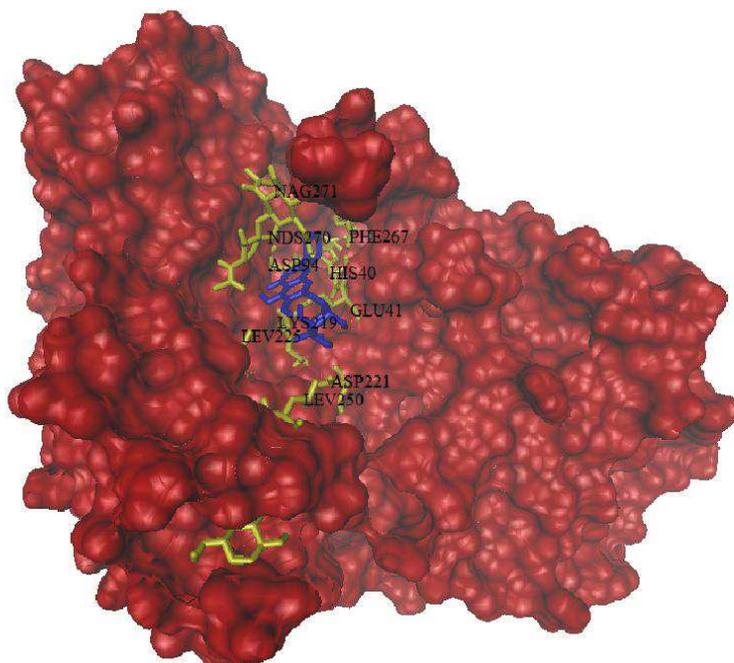
Nome	Energia de ligação(kJ/mol)	Constante de inibição(μ M)	Energia intermolecular (kcal/mol)
Baicalin 7 gluturode (conformação 1)	-3,26	4,08	-5,94
Baicalin 7 gluturode (conformação 2)	-4,86	273,18	-7,55
Baicalin 7 gluturode (conformação 3)	-4,43	564,41	-7,12

Fonte: Este trabalho.

Os resultados apontados na tabela 4 apontam os melhores resultados alcançados no *docking* molecular entre o ligante baicalin-7-gluturode, sendo este um isômero da molécula de baicalin, e a molécula RIC_END. Os resultados revelaram que assim como os demais isômeros de baicalin este apresentou tanto energia de ligação “negativa”, que proporciona uma ligação espontânea entre o ligante e molécula alvo, quanto energia intermolecular e constante de inibição satisfatórias, entretanto a conformação 1 apresentou resultados muito abaixo do desejado, tornando-a não viável para ser utilizada como inibidora.

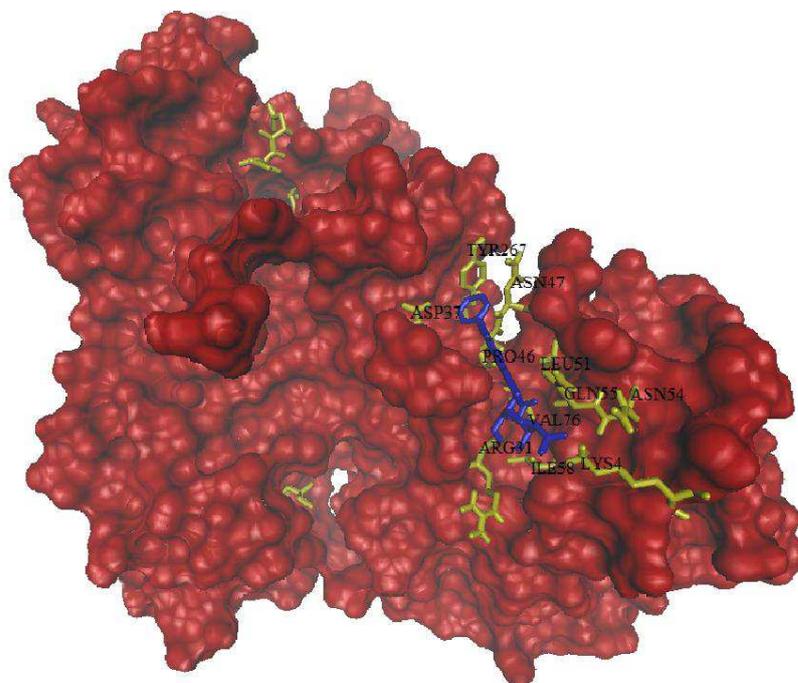
As imagens destas ligações podem ser vistas nas figuras 8,9 e 10, as quais demonstram a ligação entre o ligante Baicalin 7 gluturode.

Figura 8: Conformação 1 da molécula Baicalin 7 gluturode a molécula RIC_END. Vermelho: Molécula RIC_END. Amarelo: sítios de ligação entre RIC_END e o ligante. Azul: ligante.



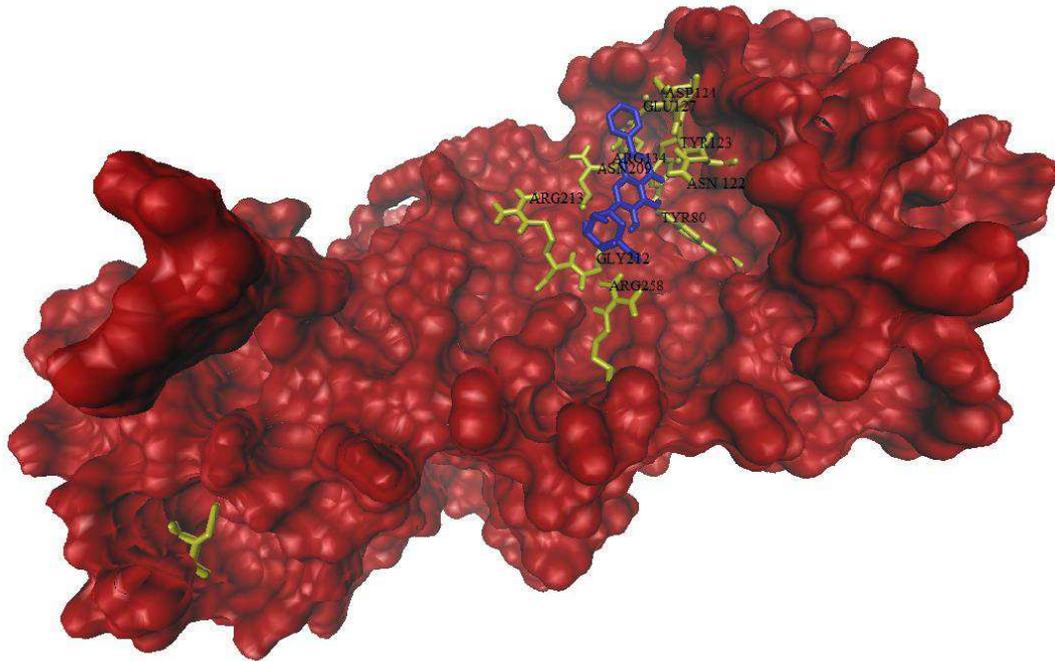
Fonte: Este trabalho.

Figura 9: Conformação 2 da molécula Baicalin 7 gluturode a molécula RIC_END. Vermelho: Molécula RIC_END. Amarelo: sítios de ligação entre RIC_END e o ligante. Azul: ligante.



Fonte: Este trabalho.

Figura 10: Conformação 3 da molécula Baicalin 7 gluturode a molécula RIC_END . Vermelho: Molécula RIC_END. Amarelo: sítios de ligação entre RIC_END e o ligante. Azul: ligante.



Fonte: Este trabalho.

Tabela 5: Resultados melhores obtidos através do docking molecular do ligante Baicalin 4 com o receptor RIC_END.

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

Fonte: Este trabalho.

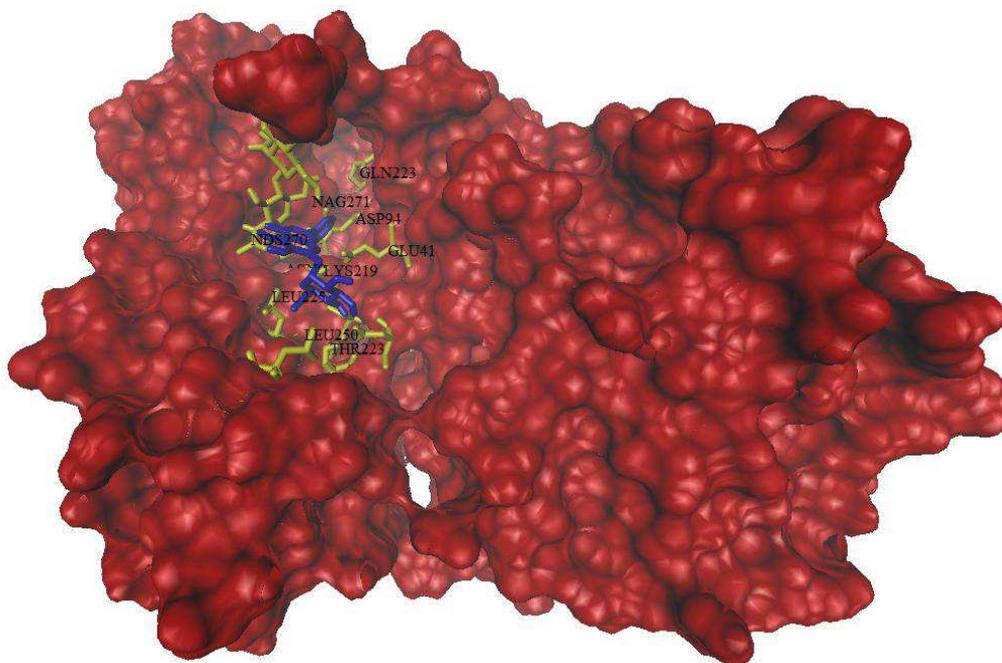
A tabela 5 mostra os melhores resultados obtidos através do uso do *docking* molecular do ligante nomeado como baicalin 4, sendo este assim como os anteriores um isômero da molécula de baicalin, e a molécula RIC-END. Este ligante assim como os demais isômeros de baicalin utilizados anteriormente apresentou valores de energia de ligação que tornam a ligação espontânea possível com relativa facilidade, além de valores de constante de constante de inibição mais elevados do que os demais isômeros, entretanto somente em duas conformações,

sendo a conformação 2 a que apresentou a menor constante de inibição ainda pode ser considerada viável. No caso da energia intermolecular este apresentou valores próximos dos valores encontrados nos demais isômeros de baicalin.

No geral, os isômeros da molécula baicalin apresentaram resultados satisfatórios como inibidor, provando sua eficácia assim como mostrado na literatura. Tornando-o o possível inibidor em potencial para a intoxicação por ricina.

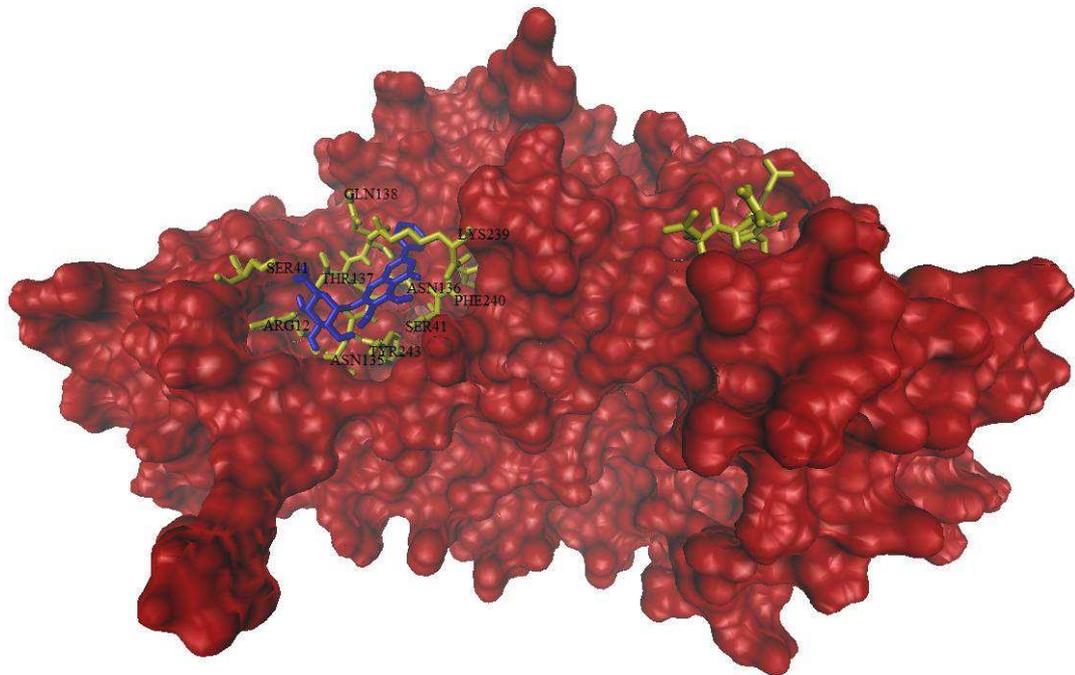
As figuras 11, 12 e 13 mostram a ligação entre a molécula alvo e o ligante, sendo que cada figura mostra uma conformação distinta que ocorre a ligação.

Figura 11: conformação 1 da molécula de Baicalin4 ligada a molécula RIC_END. Vermelho: Molécula RIC_END. Amarelo: sítios de ligação entre RIC_END e o ligante. Azul: ligante.



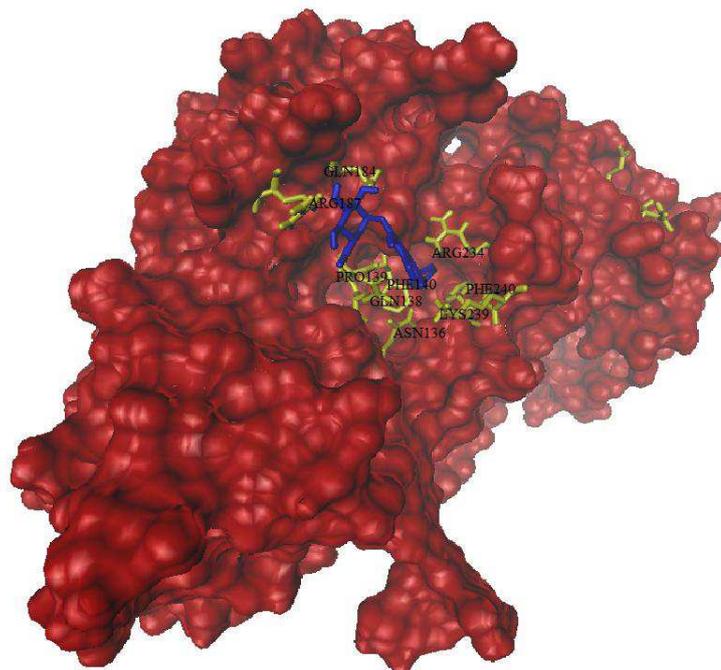
Fonte: Este trabalho.

Figura 12: conformação2 da molécula de Baicalin4 ligada a molécula RIC_END. Vermelho: Molécula RIC_END. Amarelo: sítios de ligação entre RIC_END e o ligante. Azul: ligante.



Fonte: Este trabalho.

Figura 13: conformação3 da molécula de Baicalin4 ligada a molécula RIC_END. Vermelho: Molécula RIC_END. Amarelo: sítios de ligação entre RIC_END e o ligante. Azul: ligante.



Fonte: Estetrabalho.

Vale lembrar de que a ricina é uma toxina que provoca a inibição da síntese proteica, a qual após a entrada na célula via endocitose provoca a morte célula por inativação dos ribossomos, e com isso inibe a produção de proteínas pela célula (ALEXANDER *et al*, 2008). Por possuir esta característica a maioria dos inibidores e formas de tratamentos desenvolvidos visam impedir a entrada da ricina na célula, de modo a interferir nos sítios de ligação entre a célula e o ligante (RASOOLY, HE E FRIEDMAN, 2012). Mas a forma de inibição do baicalin não visa impedir a molécula de ricina de entrar na célula, pois não tem como alvo os sítios de ligação presentes na cadeia B, os quais são responsáveis pela ligação da ricina a célula, mas possuem como alvo sítios de ligação da cadeia A, interferindo diretamente com a toxina.

O Baicalin foi escolhido após a verificação na literatura, na literatura o baicalin mostrou possuir baixa toxicidade para o organismo, de modo que seja possível um limite alto para chegar a uma dose fatal (CHEN *et al*, 2014). A característica apresentada o torna viável como inibidor, pois não seria viável seu uso se o mesmo não apresenta estas características, visto que o ligante não pode ser capaz de causar dano as células e pelo fato de possuir baixa toxicidade sua administração torna-se mais fácil e segura.

Os resultados obtidos com o *docking* molecular podem ser visto como uma constatação da eficiência do Baicalin como inibidor da ricina, por meios computacionais. Estes resultados também podem ser explicados pelo efeito que a molécula de baicalin demonstrou sobre a ricina em testes de laboratório, os quais demonstrou um mecanismo de ação complexo através de sua ligação com a ricina (DONG *et al*, 2015).

Na literatura o baicalin mostrou capacidade de inibição deste ligante foi notado que possui a capacidade de induzir a toxina presente na cadeia A a formação oligômeros. Assim o baicalin exerce proteção direta contra a ricina, além de interferir na cristalização da cadeia A da ricina (DONG *et al*, 2015). Esta capacidade pode ser percebida nos resultados do *docking* pela energia de ligação, a qual mostra uma relativa facilidade para a ocorrência de uma ligação espontânea, tal energia mostra que a ligação do baicalin com a molécula de ricina é uma ligação estável, de forma que isto pode mostrar que para ambas as moléculas a ligação é favorável. Além disto, as energias intermoleculares apresentadas nos resultados

demonstraram uma ligação forte entre a molécula da ricina e a do baicalin, podendo ser um indicativo de que a reação entre além de ser termodinamicamente favorável, possui ligações fortes e duráveis.

Pelo fato do baicalin possuir uma forma de ligação diferenciada da galactose e lactose, que serão apresentados neste estudo, desta forma podemos dizer que este tipo de ligação diferenciada, influencia o comportamento dessa molécula. Isso possibilita uma forma de inibição completamente distinta dos demais inibidores vistos neste trabalho, o que é evidenciado no estudo *Dong et al* (2015) , no qual foi notado que o baicalin se liga à cadeia A da ricina é posicionado em interfaces altamente carregadas positivamente, desta forma a mesma liga duas cadeias A da ricina relacionando-as por um eixo helicoidal cristalográfico, diminuindo assim o numero de sítios ativos presentes na toxina drasticamente, transformando-as em oligômeros menos ativos.

Entretanto, a eficiência demonstrada no *docking* molecular pode ser alterada no experimental, visto que o baicalin possui uma baixa solubilidade em água e uma baixa biodisponibilidade via oral (*CHEN et al*, 2014). Desta forma a via de administração pode alterar a eficiência do baicalin na inibição da ricina, de modo que em experimentos práticos podem ocorrer resultados que podem diferir.

Entretanto os resultados obtidos pelo *docking* molecular mostraram que sem a realização de uma ligação entre suas cadeias A de moléculas de ricina existe a ocorrência de uma forte inibição, de forma que mesmo sem que ocorra a interação de diferentes moléculas de ricina a inibição ocorrerá. A eficiência da molécula de baicalin como inibidor é viável, tanto em estudos laboratoriais quanto em teste computacionais este ligante demonstrou ótimos resultados, os quais o tornam um incrível inibidor em potencial para o tratamento da intoxicação por ricina.

6.3 Resultados do *docking* do ligante Beta-d-galactose e a molécula RIC_END

Tabela 6 - Resultados melhores obtidos através do docking molecular do ligante Beta-D-galactose com o receptor RIC_END. Fote: Esta pesquisa.

Nome	Energia de ligação(kJ/mol)	Constante de inibição(μ M)	Energia intermolecular (kcal/mol)
β -D-galactose (conformação 1)	-1,3	112,12	-3,09
β -D-galactose (conformação 2)	-1,46	84,76	-3,25
β -D-galactose (conformação 3)	-2,21	23,98	-4,42

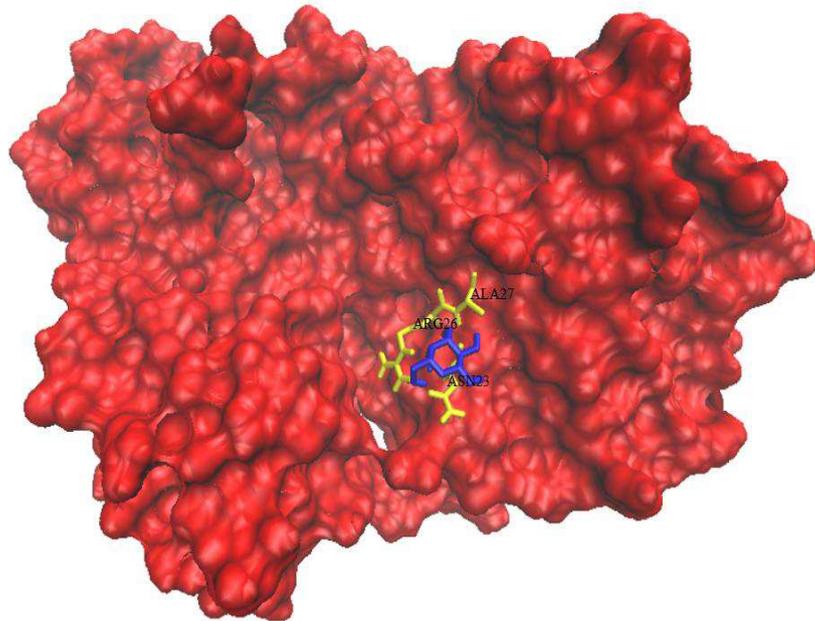
Fonte: Este trabalho.

Os dados da tabela acima mostram os melhores resultados obtidos através do *docking* molecular do ligante Beta-d-galactose e a molécula receptora RIC_END. Este ligante demonstrou possuir uma energia de ligação “negativa”, o que demonstra que a molécula do ligante tem capacidade de estabelecer ligações espontâneas com a molécula alvo, entretanto se comparamos esta molécula com os anteriormente utilizados neste estudo podemos nota que sua capacidade de proporcionar estas ligações é menor que as dos anteriores. As constantes de inibição não são tão altas como as verificadas das moléculas de balcalin e seus isômeros, mas em pelo menos nos casos das conformações 1 e 2 as constantes de inibição estão na medida que possibilita a inibição do molécula alvo. As energias intermoleculares estão em condições que possibilitam ligações duradouras e viáveis.

O ligante apresentou características moderadas em relação a capacidade de ser utilizada como inibidor, não apresentando os melhores resultados em comparação as moléculas de balcalin e seus isômeros, entretanto demonstrou que possui alguma capacidade de ser usado como inibidor.

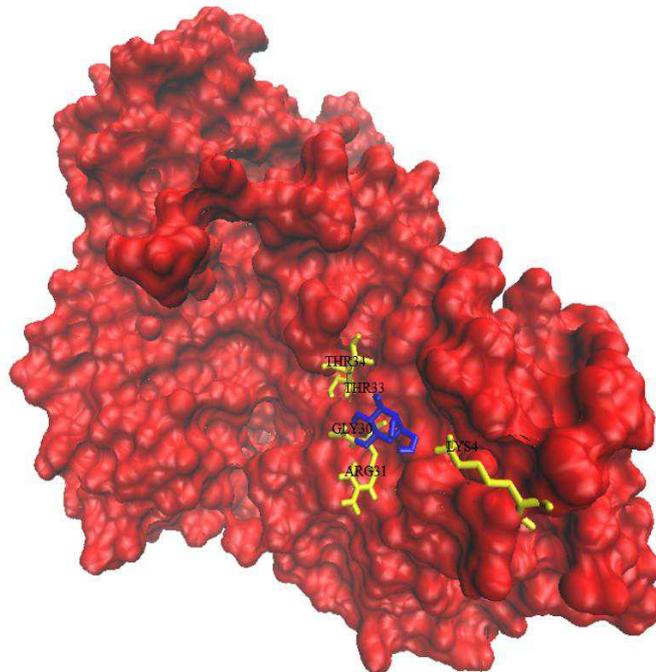
As figuras 14, 15 e 16 mostram as ligações que ocorrem entre a molécula de Beta-D-galactose e a molécula RIC_END, sendo que cada figura mostra uma conformação distinta.

Figura 14 - Conformação 1 da molécula de beta-D-galactose ligada a molécula RIC_END. Vermelho: Molécula RIC_END. Amarelo: sítios de ligação entre RIC_END e o ligante. Azul: ligante.



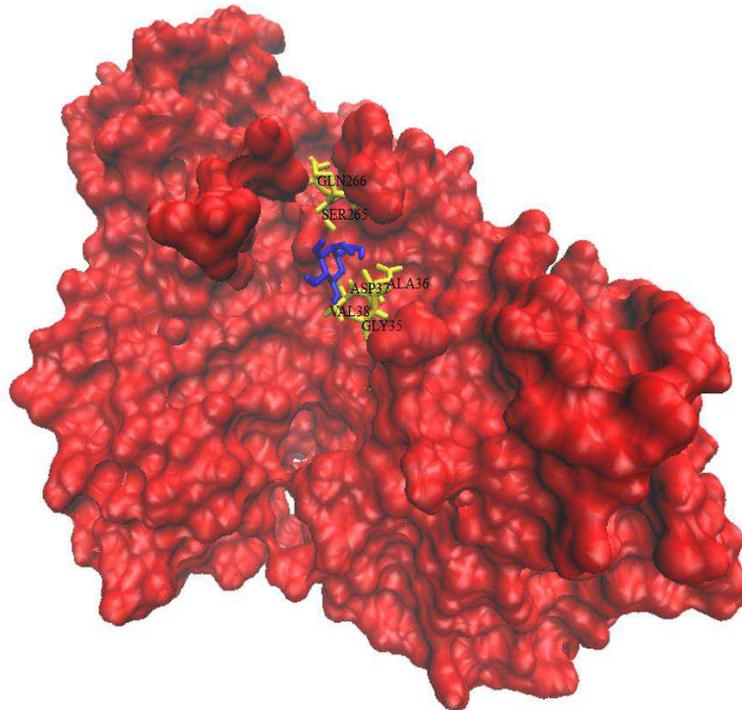
Fonte: Este trabalho.

Figura 15- Conformação 2 da molécula de beta-D-galactose ligada a molécula RIC_END. Vermelho: Molécula RIC_END. Amarelo: sítios de ligação entre RIC_END e o ligante. Azul: ligante.



Fonte: Este trabalho.

Figura 16-Conformação 3 da molécula de beta-D-galactose ligada a molécula RIC_END. Vermelho: Molécula RIC_END. Amarelo: sítios de ligação entre RIC_END e o ligante. Azul: ligante.



Fonte: Este trabalho.

A ricina é uma toxina que pode provocar morte céular, visto isto a estudo sobre o potencial de inibidores viáveis e acessíveis se tornou necessária, desta forma moléculas como a beta-D-galactose se tornaram inibidores viáveis, visto um dos principais meios para a molécula de ricina internalizar a célula é por meio de ligações com sítios de galactose presentes na cadeia B (ALEXANDER *et al*, 2008).

Além disto, existe o fato da molécula beta-D-galactose ser facilmente encontrada na natureza e fazer parte da composição de gêneros alimentares bem comuns, no caso os laticínios. Essa característica determina que a molécula não oferece risco para o seu consumo, de forma a não causa uma segunda intoxicação ou proporciona um agravamento da intoxicação, tornando o seu uso como molécula inibidora segura (THOMPSON, 1995). Tal pensamento foi levado em consideração quando foi feita a escolha desta molécula como um dos inibidores para este trabalho, visto que não adiantaria o ligante escolhido possui a capacidade inibitória se não tivesse um consumo viável.

Devido a sua presença no leite, trabalhos que pesquisam a viabilidade do leite como um potencial inibidor da ricina não são incomuns, e pesquisas sobre sua propriedade inibitória são as mais encontradas, entretanto este ligante não é a única molécula inibitória encontrada no leite, de forma que o efeito de inibição do leite

pode ser resultado da interação da ricina com diferentes moléculas encontradas no mesmo.

Pode-se nota nas imagens obtidas pelos resultados do *docting*, que existe a presença de poucos sítios de ligações reesposáveis pela ligação da molécula com os receptores presentes na superfície celular, entretanto a presença de uma quantidade reduzida não causa grande interferência em sua capacidade de inibi a ricina. Mesmo com a existência de outros sítios de ligação os responsáveis pela interação com a molécula de galactose se mostraram de importância para o efeito toxico da ricina, proporcionando uma forma de absorção efetiva. Além disto, no estudo realizado por Newton *et al* (1992) mostrou-se que citotoxicidade da ricina é influenciada pelos sítios de galactose, de forma a através dos sítios ativos de galactose a molécula da ricina demonstrou uma maior facilidade para a entrada da toxina da cadeia A na célula.

Os resultados obtidos neste estudo podem ser explicados devido a molécula beta-D-galactose proporcionar uma ligação com os sítios de ligação de galactose existentes na molécula da ricina. Tal ligação impede que a cadeia B da ricina e as moléculas de galactose presentes na superfície da célula se liguem, impedindo assim que ocorra a entrada da toxina no interior da célula (RASOOLY, HE E FRIEDMAN, 2012). Desta forma, é possível pode-se dizer que as moléculas de galactose interagem com a ricina, de forma a raptá-la e impedir que esta chegue ao interior da célula, pois a ricina se liga aos sítios de galactose existentes na molécula de ricina, ocupando os sítios que a molécula de ricina utilizaria para a ligação com a célula.

A capacidade de impedir a ligação da ricina com os sítios de ligação presentes na superfície celular não é a única característica possuída pela beta-D-galactose, a mesma e seus isômeros segundo a literatura demonstraram serem rapidamente transportadas e metabolizadas, tornando-as muito eficiente no conjunto de drogas com capacidade de inibir a síntese de ricina (THOMPSON, SCOVIL E PACE, 1995). Tal característica demonstra que a beta-D-galactose pode ter um ação rápida contra a toxina, de forma que a torna útil no tratamento, visto que o tratamento imediato pode salvar a vida do paciente.

Observando todas as características deste ligante torna-se indiscutível a sua viabilidade como um inibidor eficiente, visto que o mesmo possui características que

o tornam seguro e eficaz contra a intoxicação contra a ricina, além de ser uma substancia comum e facilmente encontrada na natureza, tornado tal substancia uma alternativa barata.

6.4 Resultados do *docking* do ligante lactose e seus isômeros e a molécula RIC_END

Tabela 7: Resultados melhores obtidos através do docking molecular do ligante Lactose com o receptor RIC_END.

Nome	Energia de ligação(kJ/mol)	Constante de inibição(μM)	Energia intermolecular (kcal/mol)
Lactose (conformação 1)	-0,22	689,94	-3,8
Lactose (conformação 2)	-0,44	478,11	-4,02
Lactose (conformação 3)	-0,83	248,4	-4,4

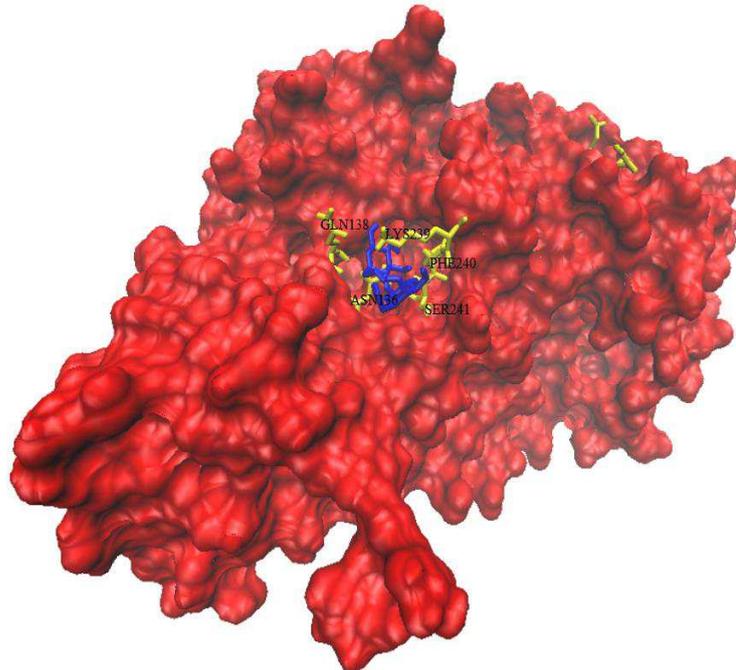
Fote: Este trabalho.

Os resultados que podem ser vistos na tabela 7 são os melhores resultados obtidos através do docking molecular da molécula de lactose (ligante) e a molécula alvo RIC_END. Nos resultados apresentados notou-se que a energia de ligação deste ligante possui a capacidade de gera uma ligação espontânea, entretanto vale-se nota que esta energia de ligação esta bem próxima de zero, desta forma a ligação espontânea não ocorre com tanta facilidade quanto com outros ligantes utilizados neste estudo. No caso da constante de inibição provou-se possuir uma alta capacidade inibitória possuindo altos valores neste parâmetro. Esta molécula possuir energia intermolecular em favoráveis.

Apesar de possuir uma energia de ligação próxima de zero, tornando assim a ocorrência de ligação espontânea mais difícil de ocorrer do que outros ligantes deste estudo, esta molécula tem constantes de inibição em valores elevados tornando-a assim um inibidor em potencial.

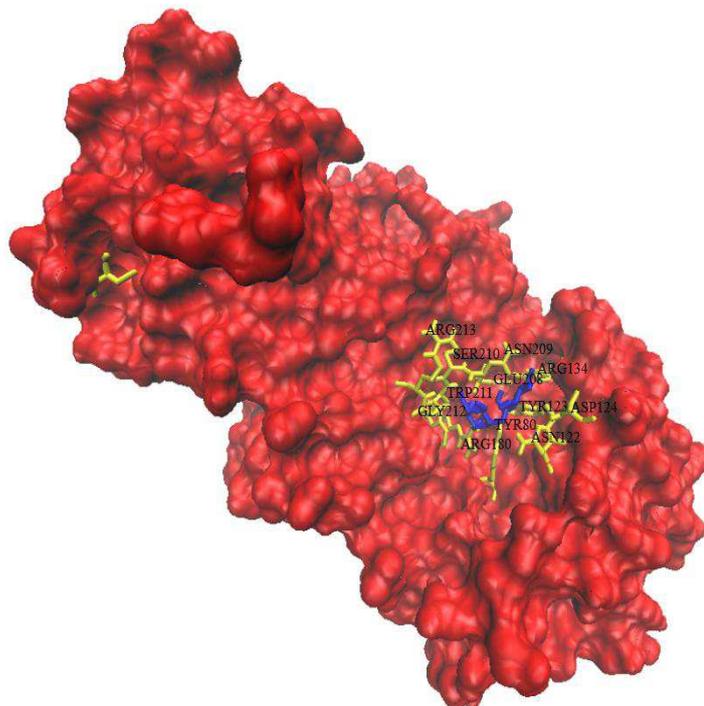
As figuras 17, 18 e 19 demonstram a ligação entre a ligante lactose e a molécula RIC_END, sendo estas ligações ocorrendo em diferentes conformações.

Figura 17: Conformação 1 da molécula de Lactose ligada a molécula RIC_END. Vermelho: Molécula RIC_END. Amarelo: sítios de ligação entre RIC_END e o ligante. Azul: ligante.



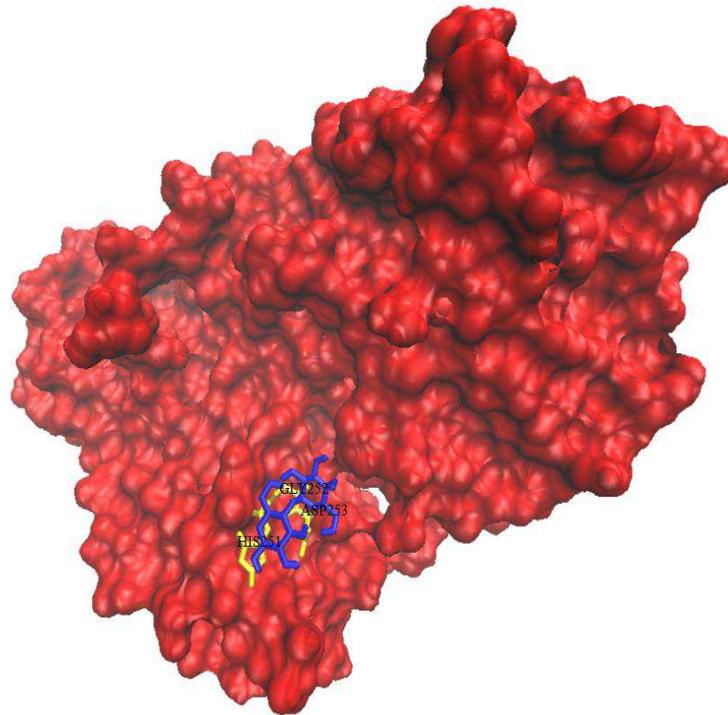
Fonte: esta pesquisa.

Figura 18: Conformação 2 da molécula de Lactose ligada a molécula RIC_END. Vermelho: Molécula RIC_END. Amarelo: sítios de ligação entre RIC_END e o ligante. Azul: ligante.



Fonte esta pesquisa.

Figura 19: Conformação 3 da molécula de Lactose ligada a molécula RIC_END. Vermelho: Molécula RIC_END. Amarelo: sítios de ligação entre RIC_END e o ligante. Azul: ligante.



Fonte: Este trabalho.

Tabela 8: Resultados melhores obtidos através do docking molecular do ligante Alpha-d-lactose com o receptor RIC_END.

Nome	Energia de ligação(kJ/mol)	Constante de inibição(μ M)	Energia intermolecular (kcal/mol)
α -d-lactose (conformação 1)	-0,82	249,8	-4,4
α -d-lactose (conformação 2)	-0,77	270,61	-4,35
α -d-lactose (conformação 3)	-0,38	527,96	-3,96

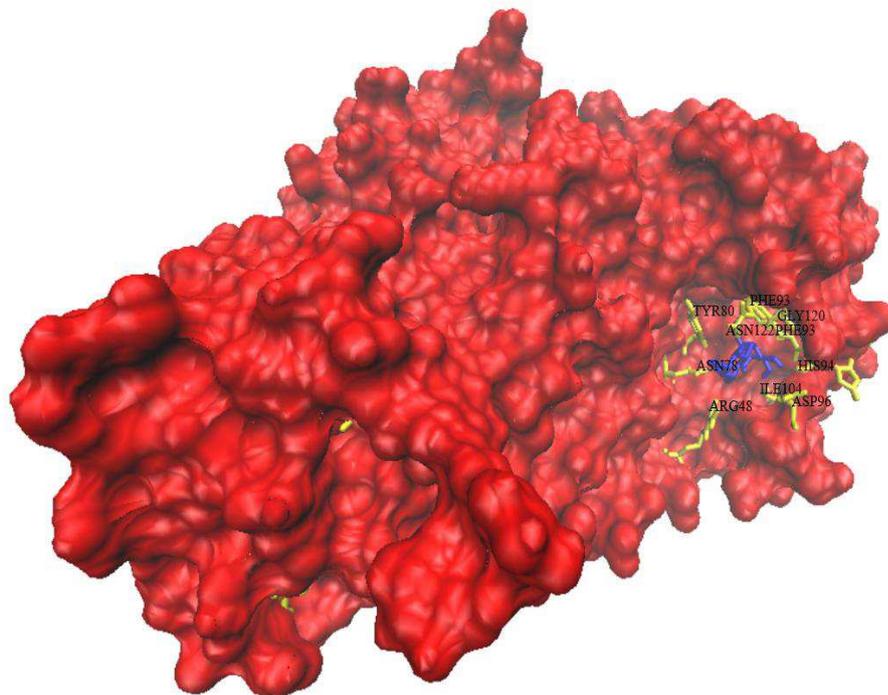
Fote: Esta pesquisa

A tabela 8 se refere aos melhores resultados encontrados a parti do docking molecular do ligante Alpha-d-lactose, o qual é um isômero da lactose, com a molecular receptora RIC_END. Assim como a lactose este ligante apresenta energia de ligação próxima à zero, o que torna a ocorrência de ligação espontâneas mais difíceis de acontecerem em comparação as outros ligantes utilizados neste estudo, entretanto tais ligações podem ocorre tornando assim viável o seu uso. No caso da constante de inibição este ligante apresenta valores elevados, o que mostra uma

alta capacidade de inibição deste ligante com a molécula alvo. Os valores da constante intermolecular são consideráveis significativos para este estudo.

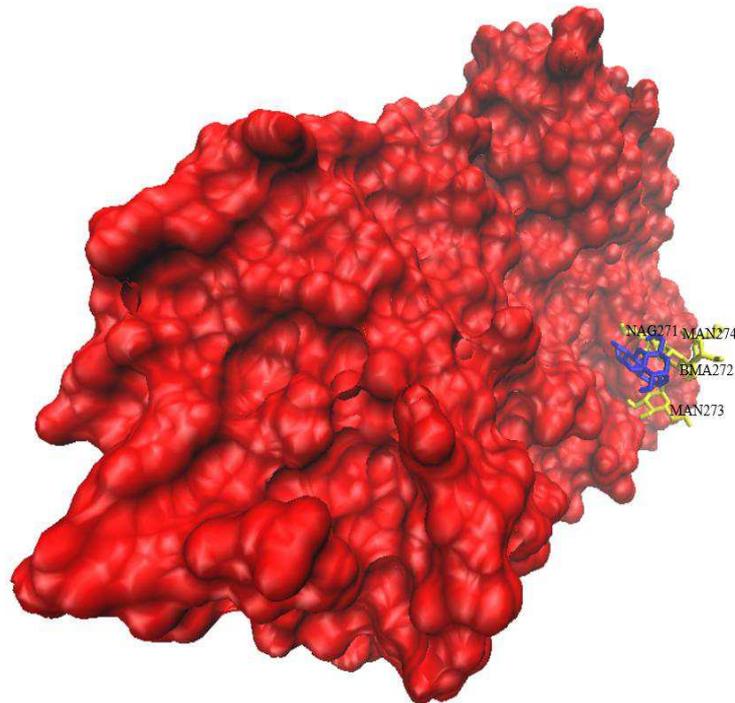
As imagens 20, 21 e 22, representam as melhores conformações vistas na tabela acima, sendo cada uma destas configurações distintas.

Figura 20: Conformação1 da molécula de Alpha-d-lactose ligada a molécula RIC_END. Vermelho: Molécula RIC_END. Amarelo: sítios de ligação entre RIC_END e o ligante. Azul: ligante.



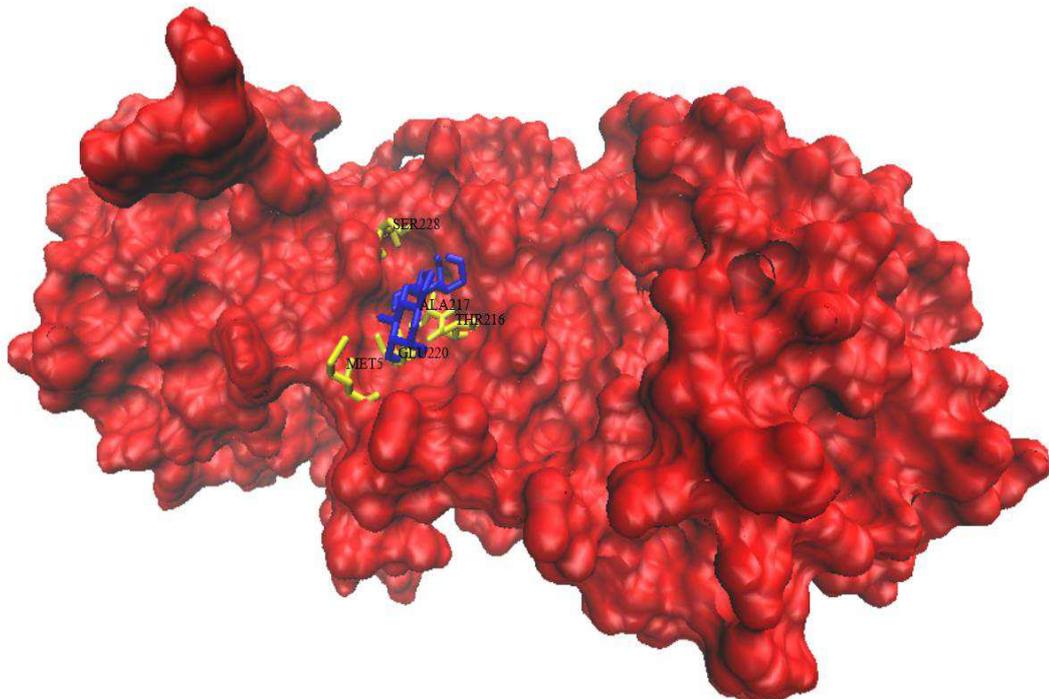
Fonte esta pesquisa.

Figura 21: Conformação 2 da molécula de Alpha-d-lactose ligada a molécula RIC_END. Vermelho: Molécula RIC_END. Amarelo: sítios de ligação entre RIC_END e o ligante. Azul: ligante.



Fonte esta pesquisa.

Figura 22: Conformação 3 da molécula de Alpha-d-lactose ligada a molécula RIC_END. Vermelho: Molécula RIC_END. Amarelo: sítios de ligação entre RIC_END e o ligante. Azul: ligante.



Fonte esta pesquisa.

Por causa da periculosidade que a ricina possui a busca por inibidores gera um grande interesse, o qual possibilitou a identificação de diferentes substâncias que possuem a capacidade de inibir a ação da ricina, sendo algumas delas encontradas no leite, como o caso da galactose e a lactose. O fato destas moléculas se destacarem tanto na inibição da ricina é devido às mesmas possuírem capacidade de se ligar aos sítios de ligação da ricina presentes na cadeia B, os quais são responsáveis por ligar a ricina à célula, possibilitando sua internalização por meio de endocitose (RASOOLY, HE E FRIEDMAN, 2012). Mas neste trecho destacaremos mais a lactose e seu isômero, pois já foi discutido anteriormente sobre a beta-D-galactose, a qual é um isômero da galactose, de modo que não existe a necessidade de tal discussão.

Visto que uma quantidade reduzida de moléculas que possuem capacidade de inibir a ricina de forma efetiva foram descobertas (DONG *et al*, 2015), a utilização de uma molécula que está integrada a um gênero alimentício torna o seu estudo mais fácil, de modo que já existe conhecimento sobre as propriedades da mesma, de modo que a molécula de lactose não necessitaria determinação de sua toxicidade, pois a mesma não é tóxica para o organismo. Além disto, a mesma pode ser encontrada na natureza com relativa facilidade, barateando o processo de aquisição da molécula.

Os resultados obtidos através do docking molécula da reação entre a ricina e a molécula de lactose podem ser explicados pelo fato da lactose ao reagir com a ricina ocupar os sítios de ligação específicos da ricina, os quais são responsáveis pela ligação da cadeia B da ricina com a superfície celular, impedindo assim a entrada da ricina na célula (MOYA *et al*, 1885). Os sítios de ligação usados pela lactose são os mesmos utilizados pela galactose, visto que a molécula de galactose é um dos componentes da molécula de lactose.

Além disto, os resultados obtidos por Leonard, Grothaus e Taetle (1988), mostraram que semelhantes resultados foram obtidos quando ocorreu a substituição da galactose por lactose. Estas similaridades devem ser devido ao fato de tanto a molécula de lactose quanto a de galactose inibirem a ricina de forma semelhante, entretanto os resultados obtidos pelo *docking* da lactose e seu isômero se diferem com os resultados do beta-D-galactose, o qual é um isômero da galactose, os resultados apresentaram uma diferença significativa, de forma que foi possível notar

que a capacidade de inibição da lactose e seu isômero são maiores, mas a beta-D-galactose apresentou uma maior facilidade de ligasse espontaneamente a molécula de ricina.

A lactose no trabalho de Lumor et al (2013) se mostrou mais eficiente em inibir pequenas quantidades da ricina, de forma que esta em concentrações de 1 pg / ml ou superiores não demonstraram resultados significativos enquanto na presença do inibidor. Esta característica pode ser explicada pelo fato das moléculas de lactose possuírem energia de ligação próxima a zero, de modo que as moléculas de ricina e lactose não conseguem realizar uma ligação espontânea com muita facilidade, de modo que uma concentração menor de moléculas de ricina em relação a uma quantidade maior de moléculas de lactose torna mais fácil a realização de ligações.

A lactose e seu isômero possui ótima capacidade de inibição contra os efeitos da ricina, não são substâncias tóxicas e não causam efeitos indesejados, tornando-os inibidores em potencial contra a intoxicação por ricina. Entretanto ambos demonstraram uma energia de ligação próxima à zero, tornando a ligação espontânea mais difícil de ocorrer, de forma é necessária uma quantidade proporcionalmente maior da molécula para que ocorra a inibição, podendo ser inconveniente. Diante de tais fatos pode-se determinar que a lactose e seu isômero podem ser usados como inibidores, mas tais moléculas não podem ser considerados os melhores inibidores, visto os problemas que estes apresentam.

7 CONCLUSÃO

- Neste estudo encontrou-se evidências do potencial destes ligantes como inibidores da molécula de ricina, de modo que foi mostrado os resultados esperados, nos quais os ligantes demonstraram sua eficiência em inibir a ricina.
- Pode-se perceber que a molécula de baicalin, baicalin3, baicalin 4 e baicalin-7-gluturode, apresentaram resultados significativos, de forma que estes ligantes possuem facilidade de gera ligação espontânea e uma capacidade de inibição elevada. Desta forma tais ligantes apresentaram um grande potencial como inibidor da ricina, o maior encontrado neste estudo, tornando-os excelentes na tarefa de inibição da intoxicação pela molécula de ricina.
- O ligante β -D-galactose apresentou resultados não tão expressivos em comparação com os demais ligantes utilizados nesta pesquisa, entretanto ainda pode ser considerado viável. Visto que este ligante pode gera ligações espontâneas, possuir algum grau de capacidade para inibi a molécula de ricina, além de facilmente encontrado na natureza e uma fácil metabolização no organismo, tornando-o um inibidor de ação rápida.
- A lactose e a α -d-lactose provaram ter um alto potencial de inibição, entretanto pode-se nota a existência de energia de ligação próxima à zero, o que torna a ocorrência de ligações espontâneas mais difíceis de ocorre, ou seja, o ligante e a molécula alvo apresenta pouca capacidade de se tornarem termodinamicamente estáveis quando ligados. Entretanto este fato não inviabiliza o uso da lactose e seu isômero como inibidor, pois em outros estudos demonstraram que a lactose conseguir inibirao ser aplicado em quantidades proporcionalmente maior em comparação com a quantidade de ricina, de modo que quantidade de lactose necessária para a inibição efetiva de uma dosagem de ricina letal precisaria ser muito elevada para que exista efeito significativo.
- A molécula de lactose e seu isômero podem ser usados como inibidores, entretanto não podem ser considerados os melhores inibidores

deste estudo, de modo que qualquer outro inibidor visto neste estudo seria considerado mais efetivo do que a lactose.

REFERÊNCIAS

ABREU, Rayane Alexandre. **Caracterização funcional e estrutural comparativa *in silico* de uma proteína PR-5 do tipo Taumatina de *Poncirus Trifoliata***. 2015. 55f. Trabalho de conclusão de curso – Universidade Federal de Campina Grande Centro de Desenvolvimento Sustentável Do Semiárido Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos. Sumé. 2015.

ALBUQUERQUE, Samuel S.C. et al. Spontaneous poisoning by *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) in cattle. Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. **PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA - Brazilian Journal of Veterinary Research**, Recife, v32, n9, set, 2014.

ALEXANDER, Jan *et al.* Ricin (from *Ricinus communis*) as undesirable substances in animal feed. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. **The EFSA Journal**. 726, 1-38. 2008.

ANADÓN, Pita R.; MR, Martínez-Larrañaga. Ricina: una fitotoxina de uso potencial como arma. **Revista de Toxicología**. Madrid. V21, n 2-3, junio 2004.

BRADBERRY, Sally. Ricin and abrin. **Elsevier**. 2016.

CAPRILES, Priscila V. S. Z. et al. Modelos Tridimensionais. VERLI, Hugo. **Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular**. 1 Ed. São Paulo. SBBq. 2014. Cap 7. P. 147-171.

CHEN, Haijun et al. Exploring Therapeutic Potentials of Baicalin and Its Aglycone Baicalein for Hematological Malignancies. **NIH Public Access**. Fujian, Cancer Lett., v354, n 1, nov, 2014.

COOK, David Leslie; DAVID, Jonathan; GRIFFITHS, Gareth David. **Retrospective Identification of Ricin in Animal Tissues Following Administration by Pulmonary and Oral Routes**. (NATO OTAN). Wiltshire: 2007.

DONG, Jing *et al.* Baicalin Inhibits the Lethality of Ricin in Mice by Inducing Protein Oligomerization. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, Tianjin, V 290, N 20, MAY, 2015.

DORN, Márcio. **Uma proposta para a predição computacional da estrutura 3D aproximada de polipeptídeos com redução do espaço conformacional utilizando análise de intervalos.** 152 f. Dissertação-(Mestrado em Ciência da Computação)-Ciência da Computação.Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul Faculdade de Informática,Porto Alegre. 2008.

ERICKSON, Jon A. *et al.* Lessons in Molecular Recognition: The Effects of Ligand and Protein Flexibility on Molecular Docking Accuracy. **Journal of Medicinal Chemistry.** Indianapolis, Vol. 47, No. 1, 2004.

FONSECA, Nayanna B. da S. e BLANCO, Benito Soto. Toxicidade da ricina presente nas sementes de mamona. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 3, p. 1415-1424, maio/jun. 2014

GUEDES, Isabella A.; MAGALHÃES, Camila S. e DARDENNE, Laurent E. Atracamento Molecular. VERLI, Hugo. Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular. 1 ed. São Paulo. SBBq. 2014. Cap 9. Pag 188-208.

GIBAS, Cynthia e JAMBECK, Per. **Developing Bioinformatics Computer Skills.** 1 ed. Gravenstein Highway North, Sebastopol, EUA. O'Reilly e Associados. 2001. 446 pag.

GUO, Ava J. Y. Baicalin, a Flavone, Induces the Differentiation of Cultured Osteoblasts. AN ACTION VIA THE Wnt/ β -CATENIN SIGNALING PATHWAY. **JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.** Hong Kong, VOL. 286, NO. 32, Agosto, 2011.

JUNIOR, Nilson Nicolau. **Diferenças estruturais e “docking” receptor-ligante da proteína E7 do vírus papiloma humano (HPV) de alto e baixo risco para câncer cervical.** 125p. Tese (Doutorado)-genética. Universidade de São Paulo Faculdade de medicina de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto. 2013.

LEONARD, John E; GROTHAUS, Cyrene D. e TAETLE, Raymond. Ricin Binding and Protein Synthesis Inhibition in Human Hematopoietic Cell Lines. **Blood Journal.** San Diego, Vol 72, No 4, Outubro, 1988.

LORD, J. Michael; ROBERTS, Lynne M. e ROBERTUS, Jon D. Ricin: structure, mode of action, and some current applications. **The FASEB Journal**. Aultin, Vol. 8, fevereiro, 1994.

LUMOR, STEPHEN E. *et all.* Assessment of the Inhibition of Ricin Toxicity by Lactose in Milk. **Journal of Food Protection**, Dove, Vol. 76, No. 12, 2013.

MARCONESCU, Praveena S. *et all.* Intradermal administration of RiVax protects mice from mucosal and systemic ricin intoxication. **NIH Public Access**, Dallas, vol.28, No 32, julho, 2011.

MENETTI, Nelson F. da S. **Modelagem da interação estrutural entre os motivos IQ da miosina Va com calmodulina**. 60f. Trabalho de Conclusão de Curso - (Monografia apresentado como parte dos requisitos da disciplina Desenvolvimento de Projeto I (IBM1062) do curso de Informática Biomédica) - Universidade De São Paulo Faculdade De Medicina De Ribeirão Preto Informática Biomédica, Ribeirão Preto, São Paulo, 2006.

MOYA, Maryse *et all.* Inhibition of Coated Pit Formation in Hep2 Cells Blocks the Cytotoxicity of Diphtheria Toxin But Not That of Ricin Toxin. **THE JOURNAL OF CELL BIOLOG**, VOL.101, Agosto, 1985.

MURZIN, Alexey G *et all.* SCOP: A Structural Classification of Proteins Database for the Investigation of Sequences and Structures. **Journal of Molecular Biology**, Vol.1247, 1995.

NEWTON, Dianne L. Cell Surface and Intracellular Functions for Ricin Galactose Binding. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, Coventry, Vol. 267, No. 17, Abril, 1992.

NUNEZ, Oscar F. Lopez; PIZON, Anthony F. e TAMAMA, Kenichi. RICIN POISONING AFTER ORAL INGESTION OF CASTOR BEANS: A CASE REPORT AND REVIEW OF THE LITERATURE AND LABORATORY TESTING. **Journal of Emergency Medicine**, Vol 53, No 5, Novembro, 2017.

RASOOLY, Reuven; HE, Xiaohua e FRIEDMAN, Mendel. Milk Inhibits the Biological Activity of Ricin. **JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, Albany, VOL. 287, NO. 33, Março, 2012.

RØEN, Bent Tore et al. Serial Ricinine Levels in Serum and Urine after Ricin Intoxication. **Journal of Analytical Toxicology**, Tromsø, Vol. 37, No 5, junho, 2013.

ROY, Ambrish e ZHANG, Yang. Protein Structure Prediction. **Encyclopedia of Life Sciences**. John Wiley & Son, Chichester, Agosto, 2012.

ROY, Chad J. *et al.* Thermostable ricin vaccine protects rhesus macaques against aerosolized ricin: Epitope-specific neutralizing antibodies correlate with protection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New Orleans, Vol. 112, no. 12, March, 2015.

SPIVAK, Laura; HENDRICKSON, Robert G. Ricin. **Crit Care Clin**, Portland, Vol 21, No 4, Outubro, 2005.

THOMPSON, William L.; SCOVIL, John P. e PACE, Judith G. Drugs That Show Protective Effects From Ricin Toxicity in In Vitro Protein Synthesis Assays. **NATURAL TOXINS**, Maryland, Wiley-Liss, Março, Vol. 3, No 5, 1995.

ZHAO, Siyan et al. Detection of Ricin Intoxication in Mice Using Serum Peptide Profiling by MALDI-TOF/MS. **International Journal of Molecular Sciences**, Jilim, Vol 13, No 10, Outubro, 2012.