

ESTUDO DA ESTRUTURA E FUNÇÃO DA RICINA E DE TECNOLOGIA PARA O USO DA TORTA DE MAMONA COMO ALIMENTO ANIMAL

Emanuela Paranhos Lima

Centro Federal de Educação Tecnológica da Bahia: emanuelaparanhos@cefetba.br

RESUMO

Uma das toxinas mais perigosas que existe é a ricina. Esta proteína existente em abundância nas sementes de mamona pertence ao tipo II de uma ampla família de enzimas tóxicas chamada de proteínas inibidoras de ribossomos (RIP). Levam à morte celular ao interagir com uma invariante adenina do 28S rRNA, impossibilitando a síntese protéica. Devido a isto, a torta de mamona, resíduo da extração do óleo das sementes de mamona, utilizado, entre outros, no Biodiesel, não pode ser destinada à alimentação animal. O presente projeto tem como objetivo desenvolver tecnologia voltada para a inibição da ação catalítica da ricina através de modelagem computacional. O programa utilizado foi o GROMACS, uma avançada ferramenta que realiza os cálculos científicos necessários para as simulações de Dinâmica Molecular. Este método consiste em resolver as equações de Newton e considera que os átomos são como esferas e as ligações, como molas. Foram realizadas minimizações de energia para estabilizar a macromolécula, aplicação de solvente para retratar sua condição real de existência e por fim, a dinâmica molecular com temperatura e pressão referentes ao ambiente onde a ricina inativa os ribossomos. A segunda etapa é a escolha de um fármaco, substância que se liga ao sítio ativo da ricina, para realização de novas simulações, constatando a eficiência da interação.

Palavras-chave: ricina, torta de mamona, PDB, GROMACS e dinâmica molecular.

INTRODUÇÃO

A preocupação com o aquecimento global, a veloz redução das reservas de combustíveis fósseis no mundo e o crescente aumento no preço do petróleo levaram ao desenvolvimento de fontes energéticas renováveis, como o álcool e o biodiesel. Este último pode ser usado sem nenhuma modificação no motor e produz níveis bem mais baixos de produtos poluentes e cancerígenos, tendo como grande vantagem ser produzido a partir de oleaginosas, tais como soja, girassol e mamona (COELHO, 1979).

O óleo da semente de mamona torna-se propício para fazer frente ao Programa Nacional de Biodiesel visto que a cultura da mamoneira, além de reduzir as importações de petrodiesel, é de grande importância para a economia do semi-árido do Nordeste por ser resistente à seca e por fixar mão-de-obra, evitando a evasão de divisas (CAVALCANTE, 2004).

Nesse sentido, destaca-se que, além das vantagens sócio-econômicas que propicia, essa oleaginosa apresenta propriedades químicas e físicas únicas. O óleo das sementes de mamona possui um ácido graxo peculiar, o ricinoleico, que tem mais oxigênio do que os demais devido a uma hidroxila (OH) no carbono 12, o que o torna mais denso e viscoso que todos os óleos e o único glicerídeo da natureza solúvel em álcool.

Existem relatos de que antigos egípcios a apreciavam como planta milagrosa e que foi encontrada nos sarcófagos de múmias notáveis, principalmente dos sacerdotes. Desde a antiguidade conhecida por suas propriedades medicinais, esta planta pertencente à família das *Euphorbiaceae* que não possui origem bem clara, foi mencionada a cerca de 1.900 anos na obra *Historiarum Mundi*, de Plínio, o Novo: “*Nenhum animal é capaz de comer a semente da qual se extrai o óleo*” (RODRIGUES, 2002).

O trecho extraído revela que já era conhecida a propriedade tóxica das sementes de mamona. Hoje se sabe que há uma proteína tóxica presente em abundância nas sementes e que a mesma faz parte de uma ampla família de enzimas conhecidas como Proteínas Inibidoras de Ribossomos (RIP). As RIP são capazes de inativar enzimaticamente ribossomos por depurinação de uma invariante adenina do 28s rRNA, ou seja, há quebra da ligação glicosídica entre a adenina e a ribose levando à perda desta base, tornando impossível a síntese protéica, o que leva a morte celular. Estas proteínas podem aparecer de duas formas: as proteínas do tipo I apresentam uma cadeia A polipeptídica enquanto as do tipo II consistem de duas cadeias unidas por uma ponte dissulfeto sendo que uma cadeia B é ligada a um açúcar (geralmente galactose) e a outra é do tipo I (cadeia A). Apesar de ambos os tipos serem igualmente eficientes na inibição da síntese protéica, a ausência da cadeia B no tipo I significa que este não pode se ligar e entrar na célula com alta eficiência e, conseqüentemente, é menos tóxico. Existem proteínas do tipo I que estão presentes em produtos largamente ingeridos na alimentação humana, como gérmen de trigo e cevada (DAY, 1996 e MILLER, 2002).

A proteína tóxica encontrada nas sementes de mamona é a ricina que pertence ao tipo II. Por esta razão, a torta de mamona não é destinada à alimentação animal. Visto isso, o presente projeto de pesquisa tem como objetivo o estudo da estrutura e função da ricina na proposição de novas alternativas tecnológicas para o aproveitamento da mamona como alimento animal.

A macromolécula tóxica, que tem cerca de 60k Da, possui 576 resíduos compreendidos em 262 resíduos da cadeia B, 267 resíduos da cadeia A, 35 resíduos da extensão N-terminal (os 26° primeiros são sinal de sequência) e 12 resíduos de peptídeo ligante, além das cinco pontes dissulfeto, sendo que uma é inter-cadeia e as outras quatro pertencem à cadeia B. A cadeia A, também chamada de RTA, possui predominância do padrão α -hélice (36%) e é dividida em três domínios visualizados na figura 1: do resíduo 01 ao resíduo 117 (acinzentado), do resíduo 118 ao 210 (branca) e do resíduo 211 ao 267 (pontilhado). A estrutura secundária folha- β é a de maior quantidade (37%) na RTB, a qual é dividida em dois domínios iguais tridimensionalmente, cada um possuindo dois pares de pontes dissulfeto e uma galactose (HARTLEY, 2004 e MONTFORT, 1987).

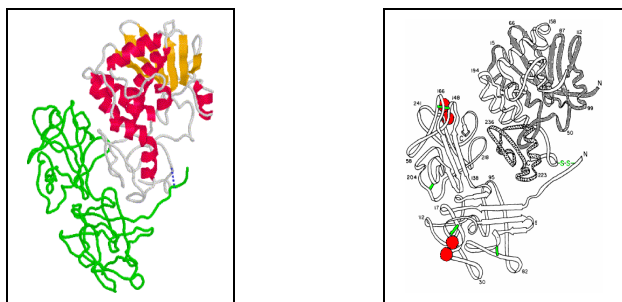


Figura 1.a. (esq.) Estrutura tridimensional da ricina (2,5 Å). Em verde, a cadeia B; em vermelho, as α -hélices da cadeia A; em laranja, as folhas- β da cadeia A; em cinza, as alças da cadeia A.

Figura 1.b. Estrutura tridimensional da ricina. Acima a cadeia A; abaixo a cadeia B; em vermelho, as galactoses; em verde, as pontes dissulfeto.

Para a ricina alcançar seu substrato no citosol, ela precisa ser endocitada e transportada através do sistema endomembranoso, o que envolve alguns procedimentos (figura 2). Glicoproteínas e glicolipídios da superfície celular se ligam ao resíduo de galactose da RTB e a proteína é endocitada. Os endossomos primários, através de transporte vesicular, recolhem a ricina do citoplasma e transferem-na para a rede trans-Golgi (TGN). Em seguida, ainda por transporte vesicular, entra no retículo endoplasmático (ER) onde sofre redução da ponte dissulfeto pela dissulfeto isomerase (PDI). A cadeia A é transportada para o citosol via translocação da Sec61 (proteína chaperona) que facilita o transporte protéico através das membranas, além de promover a sua renaturação. Com sua conformação restabelecida, RTA é ativada enzimaticamente por uma protease-resistente e interage com o domínio sarcin-ricin (SRD) de uma grande subunidade do RNA, realizando uma clivagem de uma simples ligação N-glicosídica do RNA para gerar um depurinado, inativando ribossomos (ALBERTS, 2004 e HARTLEY, 2004).

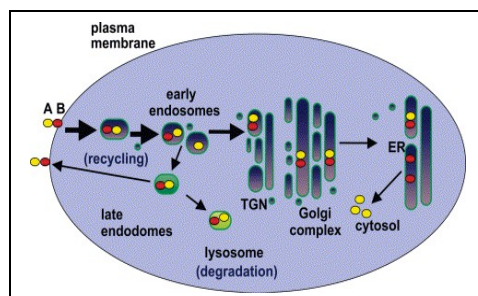


Figura 2. Esquema do processo de entrada da ricina na célula de um mamífero. Círculos amarelos, RTA; Círculos vermelhos, RTB. ER é o retículo endoplasmático e TGN é a rede trans-Golgi.

O sítio ativo da RTA, ou seja, onde a ricina interage com a adenina, é um resíduo entre as cadeias laterais da tirosina 80 e tirosina 123 (figura 3). Logo, as tentativas para inibir a ação catalítica da ricina envolvem diretamente o sítio ativo, seja via interação da RTA com fármacos que o ocupem, seja pela mudança de aminoácidos pertencente a ele a fim de evitar a depurinação.

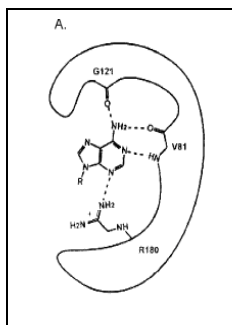


Figura 3. Interação entre a cadeia A (RTA) da ricina e a adenina do rRNA.

Numa experiência com coelhos, constatou-se que os principais sintomas da intoxicação por ricina foram perturbações digestivas, inapetência ou anorexia, cólicas, fezes escassas, escuras e, às vezes, pastosas. Na necropsia revelou-se que os principais sintomas são percebidos no intestino delgado. O período entre a administração da ricina e morte do coelho variou entre 12 e 68 horas, ressaltando-se que os primeiros sintomas foram percebidos após 8 horas. Apesar da alta toxidez, alguns estudos provaram que é possível desenvolver imunidade contra a ricina. Pesquisadores trabalharam aplicando pequena dose de ricina (por ingestão) em bovinos que criaram certa imunidade e posteriormente suportaram uma dose mais alta, apresentando sintomas de intoxicação, mas permanecendo vivos, enquanto animais que receberam diretamente a dose mais alta, não resistiram. Já outros cientistas vacinaram ratos subcutaneamente em intervalos de 14 dias com 25.10^{-6} g/kg de ricina. Os animais vacinados foram expostos a doses muito altas de ricina por inalação (DL99) e, com exceção de uma morte não ocasionada pela intoxicação, todos os ratos sobreviveram à dose letal, confirmando a capacidade de imunização (HEWETSON, 1993).

A ação enzimática da ricina pode ser revertida para outros fins. Na área médica, tem se destacado dentre um grupo de proteínas tóxicas que vêm sendo usadas com o objetivo de matar células indesejadas. Para chegar ao alvo, a toxina é ligada a um anticorpo que reconhece especificamente a célula que se deseja eliminar, possibilitando que a ricina penetre a célula e provoque a toxidez. Também já foi utilizada pelos terroristas no assassinato do jornalista búlgaro Georgi Markov (Umbrella Tip), em 1978, na cidade de Londres. Presente na torta de mamona, apresenta propriedade inseticida e fertilizante, além de ser uma excelente fonte de Nitrogênio. Elevar a capacidade da mamona de absorver metais do solo é o que pretende desenvolver, através de sementes geneticamente modificadas da oleaginosa, um grupo de pesquisadores da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O objetivo do grupo é utilizá-la como agente de descontaminação em áreas degradadas por cádmio, chumbo e cobre e conforme os testes há um acúmulo em torno de 0,25 gramas de metais por quilo de planta seca (WOO, 1998).

Portanto, este trabalho tem como meta propor um modelo computacional a partir da seleção de uma estrutura experimental da enzima no *Protein Data Bank* (PDB), obter sua topologia através de um campo de forças do GROMACS e, em seguida, realizar minimização de energia para otimização da estrutura, resultando em um modelo apropriado para o desenvolvimento posterior de simulações de dinâmica molecular.

METODOLOGIA

As proteínas estão presentes em praticamente todos os processos biológicos dos seres vivos. Elas são cadeias peptídicas formadas pela combinação de 20 aminoácidos diferentes e conformação tridimensional única. Para investigar a estrutura da ricina foram realizadas simulações de Dinâmica Molecular (DM). Este método consiste em resolver as equações de Newton acopladas para todas as partículas do sistema. Logo, é necessário o uso de um programa tipo "core" (programa que realiza os cálculos científicos) como o Gromacs.

O primeiro passo para se iniciar uma minimização é inserir um arquivo de estrutura molecular (*arquivo.pdb*). Este tipo de arquivo é encontrado no *Protein Data Bank* (PDB), uma base de dados sobre macromoléculas onde é permitido o acesso a estruturas e outras informações científicas. O modelo escolhido não deve ser recombinado ou mutante, nem estar ligado a um inibidor. Após uma pesquisa, o 2AAI, determinado estruturalmente por difração de raio x, foi sagrado o melhor por possuir ambas as cadeias com menor resolução. Para o GROMACS, heteroátomo é tudo que não está incluído nos parâmetros do campo de força. Logo, foi utilizado o programa PRODRG para obtenção dos parâmetros da galactose pertencente à cadeia B através de métodos semi-empíricos. Estes dados foram inseridos no *arquivo.gro*, que foi gerado, juntamente com o *arquivo.top*, a partir do *arquivo.pdb* através do comando *pdb2gmx*. Um campo de forças é

um conjunto de equações e parâmetros que descreve o comportamento dos átomos. Cada campo de forças tem particularidades para descrever melhor as propriedades moleculares do sistema a ser simulado. O *campo de força 07* (GROMOS 87) foi o escolhido.

Para realizar a minimização de energia, é preciso determinar uma caixa onde a proteína está imersa em solvente. O comando *editconf* especificou o uso de uma caixa dodecaédrica rômica, onde as moléculas da ricina estão centradas na caixa e distam 0.7 nm da mesma. O *arquivo.mdp*, que contém toda a informação acerca da minimização (método de integração, número de passos e energia de tolerância), também é necessário para iniciar a minimização. No processo de minimização, um dos critérios de parada é quando se atinge uma força menor do que a determinada no *arquivo.mdp*. A partir dessa força consideravelmente grande, os comandos de minimização *grompp* e *mdrun* são executados repetidamente até encontrar a mínima força, e consequentemente, a mínima energia. É preciso salientar que uma energia menor não corresponde ao mínimo de energia real do peptídeo e sim, a uma convergência para um mínimo local. Os algoritmos do Gromacs procuram rearranjar as posições dos aminoácidos visando diminuir a energia potencial do sistema, fazendo com que esta atinja o valor inicialmente estipulado.

Nas minimizações de energia foram utilizados dois solventes: o vácuo (implícito) e a água (explícito). O procedimento para ambas as simulações é praticamente o mesmo, apenas diferindo na necessidade de solvatar a caixa (água) ou não (vácuo). Para realizar este processo, usa-se o comando *genbox* que cria uma caixa com água do modelo *simple point charge* (SPC) baseado nas especificações do *editconf*. Foram adicionadas 21650 moléculas de água para solvatar à caixa nas dadas dimensões.

Como a macromolécula estava carregada negativamente, dois átomos de sódio foram incluídos com o comando *genion* a fim neutralizar o sistema. Antes de realizar a dinâmica molecular, é executada uma restrição com o objetivo de acomodar as moléculas de água junto ao peptídeo. Os átomos terão restrições de movimento, mas não estarão fixos, enquanto os átomos do solvente ficarão livres para relaxar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para investigar a estrutura da Ricina foram realizadas simulações de Dinâmica Molecular (DM), onde se considera que os átomos são como esferas e as ligações, como molas. Com isso, surgem forças que favorecem variações lineares e angulares em torno das ligações, sendo obtidas derivando o potencial em relação às coordenadas atômicas, acrescidas a um sinal negativo (equação 01).

$$\mathbf{F} = -\nabla U \quad [\text{Eq. 01}]$$

As interações empregadas na função energia potencial são descritas no quadro abaixo (figura 4), bem como sua equação (equação 02).

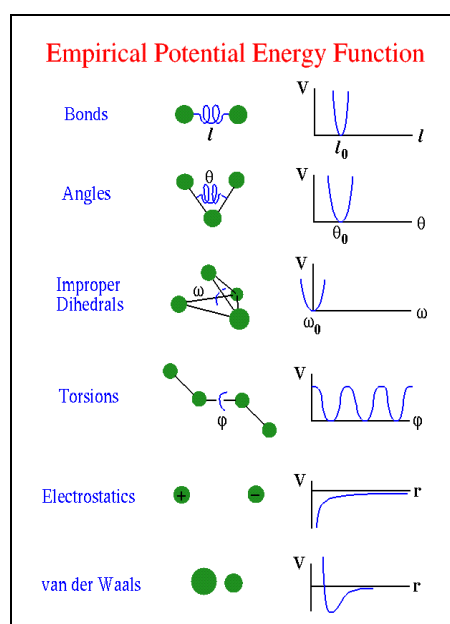


Figura 4. Interações incluídas na função energia potencial para simulação de dinâmica molecular.

$$V_{\text{bonded}}(\mathbf{R}) = \sum_{\text{bonds}} K_l (l - l_0)^2 + \sum_{\text{angles}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{torsions}} A_n [1 + \cos(n\phi - \phi_0)] + \sum_{\text{impropers}} k_\omega (\omega - \omega_0)^2 + \sum_{i < j} \{ (q_i q_j) / (4\pi\epsilon_0 \epsilon r_{ij}) + \epsilon_{ij} [(r_{ij}^{\text{min}} / r_{ij})^{12} - 2 (r_{ij}^{\text{min}} / r_{ij})^6] \} \quad [\text{Eq. 02}]$$

A equação para a energia total de um dado sistema em estudo em conjunto com parâmetros necessários para descrever o comportamento de diferentes tipos de átomos e ligações, é chamado de campo de força. Há diversos campos de forças, sendo que cada um busca uma metodologia para descrever propriedades moleculares quânticas em termos das equações de Newton e definem como a energia potencial de uma molécula varia com as posições de seus átomos, dependendo do ambiente onde se encontra.

Definido o sistema com suas coordenadas atômicas iniciais, um conjunto de parâmetros prediz a energia para uma dada configuração do mesmo, associando a energia a constantes numéricas, tais como constantes de molas e coeficientes de Lennard-Jones. Contudo, as energias da dinâmica molecular não têm significado de quantidades absolutas. Somente diferenças de energia entre duas ou mais conformações têm significado físico.

Calculando-se a energia para diversas conformações de uma dada molécula (imensa em vácuo, água e com íons), dependendo do campo de força a qual está submetida, a superfície apresentará um grande número de mínimos locais de energia, que correspondem a pontos no espaço de configurações onde todas as forças sobre os átomos do sistema são balanceadas. Para encontrar a menor energia, vários métodos são aplicados em dinâmica molecular, podendo ser divididos em grupos, de acordo com a técnica empregada. O procedimento básico consiste em caminhar sobre a superfície de potencial na direção em que a energia decresce de modo que o sistema é levado a um mínimo de energia local próximo. A expressão geral para a energia potencial U , em coordenadas cartesianas independentes está descrita na equação 03.

$$U = U_0 + \sum A_i \Delta X_i + \frac{1}{2} \sum \sum C_{ij} \Delta X_i \Delta X_j \quad [\text{Eq. 03}]$$

A condição de mínimo é empregada na energia potencial mostrada na equação 04.

$$\partial U / \partial \Delta X_i = 0 \quad [\text{Eq. 04}]$$

Por ser um processo iterativo pode ser representado, em coordenadas cartesianas, pela equação 05:

$$X_i (\text{novas}) = \Delta X_i (\text{antigas}) + \Delta X_i \quad [\text{Eq. 05}]$$

Utilizando os valores de X_i (novas), o processo é repetido, até que os valores, ΔX_i sejam considerados suficientemente pequenos (próximos de zero). Na tabela 1, estão os valores das iterações que foram necessárias para alcançar as energias mínimas nas dadas configurações.

A dinâmica molecular consiste em estudar a evolução temporal de um dado sistema molecular. Uma trajetória que especifica como as posições e velocidades atômicas variam com o tempo pode ser obtida tanto por integração das equações de movimento de Newton ou resolvendo as equações de movimento de Hamilton, o que significa que o sistema pode ser especificado em termos das posições e momentos das partículas que o constituem. Dessa forma, a Hamiltoniana H de um sistema molecular clássico pode ser escrita como a soma das energias cinética T e potencial V , como função das séries de coordenadas generalizadas \mathbf{q}_i e de momentos generalizados \mathbf{p}_i de todos os átomos do sistema, como mostra a equação 06.

$$H(\mathbf{q}_i, \mathbf{p}_i) = T(\mathbf{p}_i) + V(\mathbf{q}_i) \quad [\text{Eq. 06}]$$

A energia potencial $V(\mathbf{q}_i)$ pode ser substituída pela função potencial $V(\mathbf{r}_i)$ da Equação 06 tal que as coordenadas \mathbf{q}_i sejam as coordenadas cartesianas \mathbf{r}_i e \mathbf{p}_i seus momentos conjugados. A energia cinética assume a forma:

$$T(\mathbf{p}_i) = \sum \mathbf{v}_i^2 m_i / 2 = \sum \mathbf{p}_i^2 / 2 m_i \quad [\text{Eq. 07}]$$

Como a energia potencial dada pela Equação 02 independe das velocidades e do tempo, H é igual à energia total do sistema e as equações de movimento de Hamilton são dadas pelas equações 08 e 09, as quais conduzem às equações do movimento de Newton dadas nas equações 10 e 11.

$$\mathbf{q}_i = \partial H / \partial \mathbf{p}_i \quad [\text{Eq. 08}]$$

$$\mathbf{p}_i = -\partial H / \partial \mathbf{q}_i \quad [\text{Eq. 09}]$$

$$\mathbf{r}_i = \partial T / \partial \mathbf{p}_i = \mathbf{p}_i / m_i = \mathbf{v}_i \quad [\text{Eq. 10}]$$

$$\mathbf{p}_i = m \mathbf{v}_i = -\nabla(\mathbf{r}_i) = m \, d\mathbf{v} / dt = \mathbf{F}_i \quad [\text{Eq. 11}]$$

A Dinâmica Molecular consiste, portanto, na resolução numérica das Equações 10 e 11 e na integração das mesmas passo-a-passo no tempo, de maneira eficiente e acurada. Como resultado obtém-se energias e trajetórias para todas as partículas e para o sistema como um todo, a partir das quais várias propriedades podem ser calculadas. O tempo deixa de ser contínuo, sendo discretizado nos sistemas moleculares em passos menores (geralmente 20 vezes menores) que o período das vibrações dos átomos de hidrogênio, o movimento molecular mais rápido. Uma limitação para a simulação da dinâmica molecular reside, então, no fato de que para cada nano segundo de simulação são necessários dois milhões de passos e pode levar horas de tempo de CPU para uma macromolécula com 200 átomos, por exemplo.

Uma das maiores vantagens do GROMACS é seu elaborado conjunto de programas disponíveis para análise de trajetórias. É possível obter os valores da energia, temperatura, pressão entre outros, em todos os passos da Dinâmica na forma de gráfico (figuras 5, 6, 7, 8, e 9).

Tabela 1. Minimização de energia. A energia total corresponde somente à energia potencial.

	Vácuo	Meio solvatado (H2O)	Neutralização (estrutura, solvente e íons)
Força (kJ/ mol. nm)	2.6485956e+00	1.7645119e+00	1.1545674e+00
Passos	15000	25000	25000
Tempo (ps)	0.002	0.002	0.002
Tempo do passo (ns)	0.03	0.05	0.05
Energia Total (kJ/mol)	-5.87915e+04	-1.26645e+06	-1.26696e+06
Iteração	2977	79	94

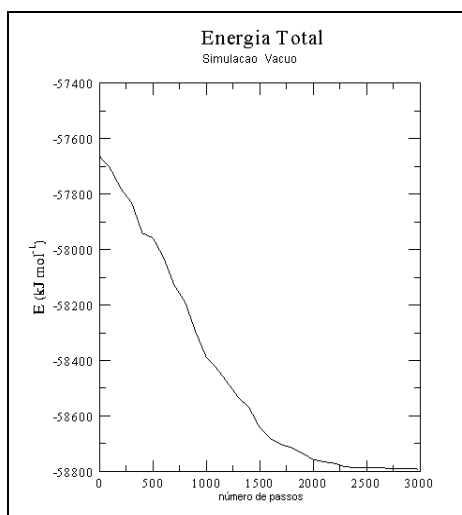


Figura 5. Minimização de energia em meio solvatado implicitamente (vácuo).

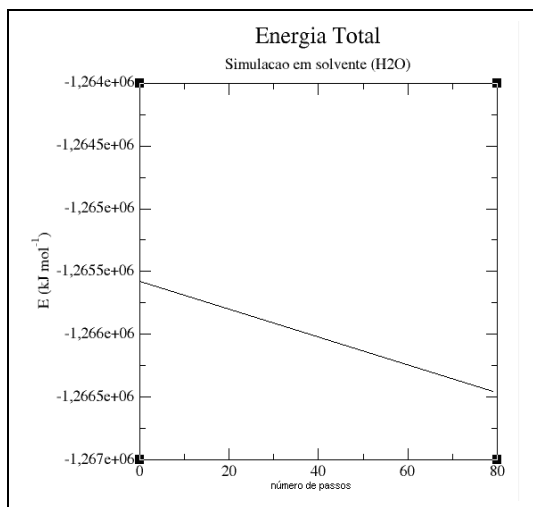


Figura 6. Minimização de energia em meio solvatado explicitamente (água).

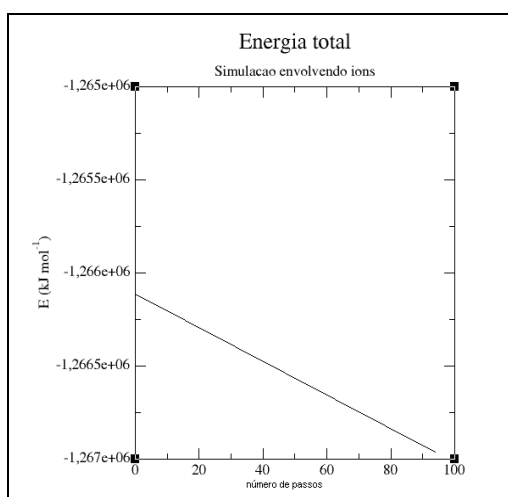


Figura 7. Minimização de energia em meio solvatado com adição de íons.

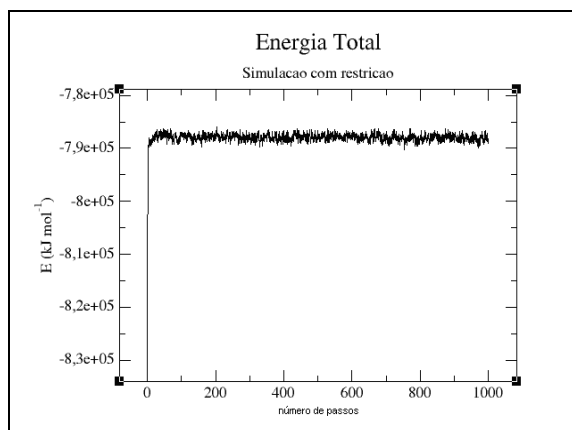


Figura 8. Minimização de energia em meio solvatado com restrição de movimento.

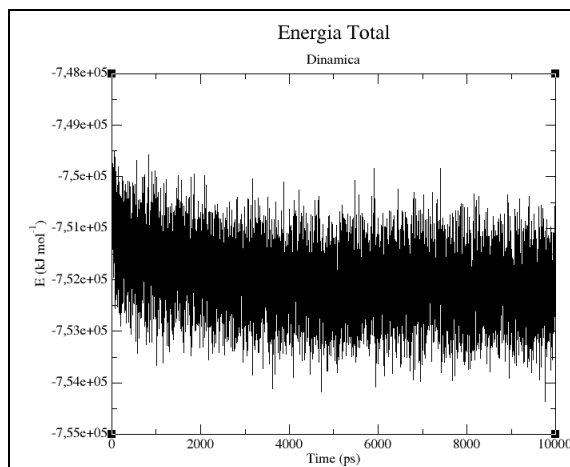


Figura 9. Dinâmica Molecular.

CONCLUSÃO

A Dinâmica Molecular se inicia geralmente a partir da determinação experimental da estrutura. Ela pode ser usada para simular estruturas conhecidas, mas também pode ser usada para descrever uma possível estrutura de uma sequência a partir da minimização da energia potencial.

Para estudar a estrutura e função da Ricina, bem como alternativas tecnológicas para a utilização da torta de mamona como alimento animal, é necessário realizar simulações de Dinâmica Molecular (DM). Porém minimizações de energia devem ser executadas previamente e com os resultados obtidos é gerada uma proteína mais estável, o que possibilitará a realização das simulações com o GROMACS 3.3.1, ou seja, resolver as equações de Newton para o sistema. Como o presente projeto conseguiu reduzir as energias em cada sistema, a estrutura está pronta para a etapa da dinâmica molecular em diferentes condições físico-químicas visando à inativação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. e WALTER, P. **Fundamentos da Biologia Celular : uma introdução à biologia molecular**, 2004 , Porto Alegre, ed. Artmed.

CAVALCANTE, F. de S. **A Importância da Mamona para a Agricultura Familiar no Estado da Paraíba**. *Revista Eletrônica de Ciências*, 2004, nº. 27 (Junho/Julho/Agosto).

COELHO, I. **Avaliação das exportações tradicionais baianas: caso de sisal e mamona**. (Tese de Mestrado), Salvador, UFB, 1979, 174p.

DAY, P. J.; ERNST, S. R.; FRANKEL, A. E.; MONZINGO, A. F.; PASCAL, J. M.; MOLINA-SVINTH, M. C. e ROBERTUS, J. D. **Structure and activity of an active site substitution of ricin A chain**. *Biochemistry*, 1996, v.35, p.11098-11103.

DAY, P. J.; PINHEIRO, T. J. T.; ROBERTS, L. M. e LORD, J. M. **Binding of ricin A-chain to negatively charged phospholipids vesicles leads to protein structural changes and destabilizes the lipid bilayer**. *Biochemistry*, 2002, v. 41, No. 8, p. 2836 -2843.

FULTON, R. J.; BLAKEY, D. C.; KNOWLES, P. P.; UHR, J. W.; THORPE, P. E. e VITETTA, E. S. **Purification of ricin A1, A2 and B chain and characterization of their toxicity.** *Journal of Biological Chemistry*, 1986, v. 261, p. 5314-5319.

HARTLEY, M. R. e LORD, J. M. **Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 2004, v. 1701, No. 1-2, p. 1-14.

HEWETSON, J. F.; RIVERA, V. R.; CREASIA, D. A.; LEMLEY, P. V.; RIPPY, M. K. e POLI, M. A. **Protection of mice from inhaled ricin by vaccination with ricin or by passive treatment with heterologous antibody.** *Vaccine*, 1993, v. 11, No.7, p. 743-6.

LAMBERT, J. M.; MCINTYRE, G.; GAUTHIER, M. N.; ZULLO, D.; RAO, V.; STEEVES, R. M.; GOLDMACHER, V. S. e BLATTNER, W. A. **The Galactose-Binding Sites of the Cytotoxic Lectin Ricin Can Be Chemically Blocked in High Yield with Reactive Ligands Prepared by Chemical Modification of Glycopeptides Containing Triantennary N-Linked Oligosaccharides.** *Biochemistry*, 1991, v. 30, p. 3234-3247.

MARSDEN, C. J.; FÜLÖP, V.; DAY, P. J. e LORD, J. M. **The effect of mutations surrounding and within the active site on the catalytic activity of ricin A chain.** *European Journal of Biochemistry*, 2004, v. 271, No. 1, p. 153.

MILLER, D. J.; RAVIKUMAR, K.; SHEN, H.; SUH, J. K.; KERWIN, S. M. e ROBERTUS, J. D. **Structure-based design and characterization of novel platforms for ricin and shiga toxin inhibition.** *Journal of Medicinal Chemistry*, 2002, v. 45, No. 1, p. 90-98.

MONTFORT, W.; VILAFRANCA, J.E.; MONZINGO, A.F.; ERNST, S.R.; KATZING, B.J.; RUTENBER, E.; COLLINS, E.J.; MLSNA, D.; READY, M.P. e ROBERTUS, J.D. **Crystallographic refinement of ricin to 2.5 Å.** *Proteins*, 1991, v.10, p. 240-50.

MONTFORT, W.; VILAFRANCA, J. E.; MONZINGO, A. F.; ERNST, S. R.; KATZING, B.; RUTENBER, E.; XUONG, N. H.; HAMLIN, R. e ROBERTUS, J. D. **The Three-dimensional Structure of Ricin at 2.8Å.** *Journal of Biological Chemistry*. 1987, v. 262, p. 5398.

MONZINGO, A. F. e ROBERTUS, J. D. **X-ray analysis of substrate analogs in the ricin A-chain active site.** *Journal of Molecular Biology*, 1992, v. 227, No. 4, p. 1136-1145.

PROTEIN DATA BANK. Disponível em: < www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

ROBERTS, L. M. e SMITH, D. C. **Ricin: the endoplasmic reticulum connection.** *Toxicon*, 2004, v. 44, No. 5, p. 469-472.

RODRIGUES, R. F. de O.; OLIVEIRA, F. de e FONSECA, A. M. **As folhas de Palma Christi – Ricinus communis L. Euphorbiaceae Jussieu.** *Revista Lecta*, 2002, v. 20, n. 2, p. 183-194.

YAN, X.; HOLLIS, T.; SVINTH, M.; DAY, P.; MONZINGO, A. F.; MILNE, G. W. A. e ROBERTUS, J. D. **Structure-based identification of a ricin inhibitor.** *Journal of Molecular Biology*, 1997, v. 266, No. 5, p. 1043-1049.

WESCHE, J. **Retrograde transport of ricin.** *International Journal of Medical Microbiology*, 2001, v. 291, No.6-7, p.517-522.

WESCHE, J.; RAPA, A. e OLSNES, S. **Dependence of Ricin Toxicity on Translocation of the Toxin A-chain from the Endoplasmic Reticulum to the Cytosol.** *Journal of Biological Chemistry*, 1999, v. 274, No. 48, p. 34443-34449.

WOO, B.H.; LEE, J.T.; LEE, K.C. **Purification of Sepharose-unbinding ricin from Castor Beans (*Ricinus communis*) by hydroxyapatite chromatography.** *Protein Expression and Purification*, 1998, v.13, p.150-154.