

**ANÁLISE DAS ESTRUTURAS NATIVA E
MUTANTE GLI96ALA DA 5-
ENOLPIRUVILCHIQUMATO-3-FOSFATO
SINTASE VIA ANCORAMENTO
MOLECULAR *IN SILICO* COM INIBIDORES
E ESTUDO MECANÍSTICO**

MELISSA SOARES CAETANO

2009

MELISSA SOARES CAETANO

**ANÁLISE DAS ESTRUTURAS NATIVA E MUTANTE GLI96ALA DA 5-
ENOLPIRUVILCHIQUIMATO-3-FOSFATO SINTASE VIA
ANCORAMENTO MOLECULAR *IN SILICO* COM INIBIDORES E
ESTUDO MECANÍSTICO**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Química da Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do Programa de Pós-
graduação em Agroquímica, para a obtenção do
título de Mestre.

Orientador
Prof. Teodorico de Castro Ramalho

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Caetano, Melissa Soares.

Análise das estruturas native e mutante Gli96Ala da PSP sintase
via ancoramento molecular in silico com inibidores e estudo
mecanístico / Melissa Soares Caetano. – Lavras : UFLA, 2009.

103 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Teodorico de Castro Ramalho.

Bibliografia.

1. Glifosato. 2. EPSP sintase. 3. Modelagem molecular. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.954
– 668.654

MELISSA SOARES CAETANO

**ANÁLISE DAS ESTRUTURAS NATIVA E MUTANTE GLI96ALA DA 5-
ENOLPIRUVILCHIQUIMATO-3-FOSFATO SINTASE VIA
ANCORAMENTO MOLECULAR *IN SILICO* COM INIBIDORES E
ESTUDO MECANÍSTICO**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Química da Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do Programa de Pós-
graduação em Agroquímica, para a obtenção do
título de Mestre.

APROVADA em 19 de março de 2009.

| | |
|-------------------------------------|------|
| Prof. Tanos Celmar Costa França | IME |
| Prof. Raimundo Vicente de Sousa | UFLA |
| Prof. Luiz Carlos Alves de Oliveira | UFLA |

Prof. Teodorico de Castro Ramalho
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

SUMÁRIO

| | Página |
|--|---------------|
| LISTA DE FIGURAS..... | i |
| LISTA DE TABELAS..... | iv |
| RESUMO..... | vi |
| ABSTRACT | vii |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 3 |
| 2.1 Considerações gerais..... | 3 |
| 2.2 Enzima EPSP sintase | 6 |
| 2.3 O herbicida glifosato..... | 18 |
| 2.4 Química computacional | 25 |
| 2.5 Modelagem molecular | 26 |
| 3 OBJETIVOS | 30 |
| 4 METODOLOGIA | 31 |
| 4.1 Ancoramento dos inibidores | 31 |
| 4.1.1 Metodologia utilizada para o ancoramento molecular..... | 33 |
| 4.1.1.1 Tratamento da proteína | 33 |
| 4.1.1.2 Dados biológicos..... | 33 |
| 4.2 Estudo do mecanismo de reação da EPSP sintase | 35 |
| 4.2.1 Metodologia utilizada para o cálculo do mecanismo de reação..... | 39 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 40 |
| 5.1 Estudos de docking | 40 |
| 5.1.1 EPSP sintase nativa..... | 40 |
| 5.1.2 EPSP sintase mutante Gli96Ala..... | 48 |
| 5.1.3 Enzima nativa vs mutante | 56 |
| 5.1.4 Novos análogos do glifosato | 59 |

| | |
|--|----|
| 5.1.4.1 EPSP sintase nativa..... | 60 |
| 5.1.4.2 EPSP sintase mutante Gli96Ala..... | 68 |
| 5.2 Mecanismo de reação da EPSP sintase..... | 77 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS | 89 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 91 |

LISTA DE FIGURAS

| | | Página |
|-----------|--|---------------|
| FIGURA 1 | Estrutura do pesticida DDT..... | 5 |
| FIGURA 2 | Estrutura do glifosato..... | 6 |
| FIGURA 3 | Via do chiquimato: síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano..... | 7 |
| FIGURA 4 | Vias metabólicas para obtenção do ácido indolacético..... | 9 |
| FIGURA 5 | Reação catalizada pela enzima EPSP sintase na qual o glifosato é competidor do substrato natural PEP..... | 10 |
| FIGURA 6 | Caminho estereoquímico para a EPSP sintase envolvendo protonação da face <i>si</i> do PEP e retenção da configuração da dupla ligação..... | 11 |
| FIGURA 7 | Mecanismo de adição-eliminação para a transferência de um grupo carbonila catalisada pela EPSP sintase..... | 13 |
| FIGURA 8 | Glifosato e alguns análogos..... | 17 |
| FIGURA 9 | Análogos do estado de transição estudados por Funke e colaboradores..... | 18 |
| FIGURA 10 | Observação da atividade pós-emergente do glifosato..... | 20 |
| FIGURA 11 | Degradação do glifosato por bactérias do solo com produção do ácido aminometilfosfônico e sarcosina..... | 24 |
| FIGURA 12 | Valores de energia <i>versus</i> variação conformacional..... | 28 |
| FIGURA 13 | Volume da cavidade da EPSP sintase nativa com o S3P ... | 41 |
| FIGURA 14 | Ligações hidrogênio entre o glifosato e os três análogos (1 , 2 e 3) com o S3P e o resíduo Lis-22..... | 45 |
| FIGURA 15 | Sobreposição do glifosato com os compostos 1 , 2 e 3 | 46 |
| FIGURA 16 | Cavidade da EPSP sintase nativa com os inibidores e a | |

| | | |
|-----------|---|----|
| | sobreposição do S3P/PEP e S3P/Glifosato..... | 48 |
| FIGURA 17 | Ligações hidrogênio entre o glifosato e os três análogos com o S3P e o resíduo Lis-22..... | 52 |
| FIGURA 18 | Sobreposição do glifosato com os compostos 1 , 2 e 3 | 54 |
| FIGURA 19 | Cavidade da EPSP sintase mutante com os inibidores..... | 55 |
| FIGURA 20 | Figura com glifosato, S3P e os resíduos Gli-96 e Ala-96... | 56 |
| FIGURA 21 | EPSP sintase nativa e mutante com o composto 1 , S3P e os resíduos Gli-96 e Ala-96..... | 56 |
| FIGURA 22 | EPSP sintase nativa e mutante com o composto 2 , S3P e os resíduos Gli-96 e Ala-96..... | 57 |
| FIGURA 23 | EPSP sintase nativa e mutante com o composto 3 , S3P e os resíduos Gli-96 e Ala-96..... | 57 |
| FIGURA 24 | Modificação proposta na estrutura do glifosato para obtenção dos novos análogos..... | 59 |
| FIGURA 25 | Glifosato apresenta o átomo de nitrogênio fazendo ligação hidrogênio com Gli-96 e tem o ângulo diedro controlado pelas ligações com Lis-22..... | 66 |
| FIGURA 26 | Análogo 5 difere do glifosato por não ter o nitrogênio fazendo ligações hidrogênio..... | 67 |
| FIGURA 27 | Análogo 8 faz apenas uma ligação hidrogênio com o resíduo de aminoácido Lis-22..... | 68 |
| FIGURA 28 | Mecanismo de reação para formação do EPSP e fosfato inorgânico..... | 78 |
| FIGURA 29 | Esquema de reação para primeiro e segundo passo..... | 80 |
| FIGURA 30 | Mecanismo com setas indicativas para o primeiro passo da reação..... | 83 |
| FIGURA 31 | Gráfico da distância de ligação do PEP ao S3P pelo valor de energia intermolecular para as propostas do primeiro | |

| | | |
|-----------|---|----|
| | passo de reação..... | 86 |
| FIGURA 32 | Mecanismo com setas indicativas para o segundo passo da reação..... | 88 |

LISTA DE TABELAS

| | | Página |
|----------|---|---------------|
| TABELA 1 | Estrutura do glifosato, seus análogos e alguns respectivos valores de K_i | 33 |
| TABELA 2 | Principais ligações hidrogênio (distância em Å e energia em kcal/mol) entre os ligantes e a EPSP sintase nativa, os valores de energia eletrostática intermolecular (kcal/mol) e de ligação hidrogênio total (kcal/mol), e os valores de K_i (μM)..... | 42 |
| TABELA 3 | Principais ligações hidrogênio (distância em Å e energia em kcal/mol) entre os ligantes e a EPSP sintase mutante. Valores de energia eletrostática intermolecular (kcal/mol) e de ligação hidrogênio total (kcal/mol)..... | 49 |
| TABELA 4 | Principais ligações hidrogênio (distância em Å e energia em kcal/mol) entre glifosato e análogos e a EPSP sintase nativa. Valores de energia eletrostática intermolecular (kcal/mol) e de ligação hidrogênio total (kcal/mol)..... | 60 |
| TABELA 5 | Principais ligações hidrogênio (distancia em Å e energia em kcal/mol) entre os ligantes e a EPSP sintase mutante Gli96Ala. Valores de energia eletrostática intermolecular (kcal/mol) e de ligação hidrogênio total (kcal/mol)..... | 69 |
| TABELA 6 | Valores de energia intermolecular (kcal/mol) para ancoramento do glifosato e análogos na enzima nativa, na enzima mutante Gli96Ala e o ΔE (Energia _{nativa} – | |

| | | |
|----------|--|----|
| | Energia mutante)..... | 76 |
| TABELA 7 | Valores de energia (kcal/mol) para as diferentes propostas do mecanismo de reação..... | 81 |
| TABELA 8 | Distâncias de ligação entre os resíduos de aminoácidos propostos e os substratos da enzima para o primeiro passo da reação..... | 84 |
| TABELA 9 | Distâncias de ligação entre os resíduos de aminoácidos propostos e o intermediário tetraédrico para o segundo passo da reação..... | 87 |

RESUMO

CAETANO, Melissa Soares. **Análise das estruturas native e mutante Gli96Ala da EPSP sintase via ancoramento molecular in silico com inibidores e estudo mecanístico**. 2009. 103p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

A alta frequência de contaminação do solo por herbicidas sugere a necessidade de herbicidas mais ativos e mais seletivos. Glifosato é o componente ativo de um dos herbicidas mais utilizados, o qual é também um potente inibidor da EPSP sintase. Ela é a enzima chave na via do ácido chiquímico, o qual é encontrado apenas em plantas e alguns microorganismos. Então, EPSP sintase é tida como um alvo promissor para herbicidas. Nesta linha, foram realizados no presente trabalho estudos de modelagem molecular usando simulações de dinâmica molecular e técnicas DFT para entender a interação entre glifosato e análogos com as enzimas EPSP sintase nativa e mutante Gli96Ala. Em adição, foi investigado o mecanismo de reação do substrato natural. Os resultados indicam alguns pontos chave para o desenvolvimento de novos derivados seletivos do glifosato.

PALAVRAS CHAVE: EPSP sintase, glifosato, ancoramento molecular.

ABSTRACT

CAETANO, Melissa Soares. **Analysis of wild type and mutant Gly96Ala structures of EPSP synthase by molecular docking *in silico* with inhibitors and mechanistic study**. 2009. 103p. Dissertation (Master in Agrochemistry) - Federal University of Lavras, Lavras, MG.

The high frequency of contamination by herbicides suggests the need for more active and selective herbicides. Glyphosate is the active component of one of the top-selling herbicides, which is also a potent EPSP synthase inhibitor. That is a key enzyme in the shikimic acid pathway, which is found only in plants and some microorganisms. Thus, EPSP synthase is regarded as a promising target for herbicides. In this line, molecular modeling studies using molecular dynamics simulations and DFT techniques were performed in the present work, in order to understand the interaction of glyphosate and its analogs with the wild type enzyme and Gly96Ala mutant EPSP synthase. In addition, we also investigated the reaction mechanism of the natural substrate. Our findings indicate some key points for the designing of new selective glyphosate derivatives.

KEYWORDS: EPSP synthase, glyphosate, molecular docking.

1 INTRODUÇÃO

O manejo das plantas daninhas com o uso de herbicidas é utilizado na maioria das áreas plantadas. Alguns herbicidas são de uso tradicional em diversas regiões há vários anos. A preferência por este método de controle justifica-se por ser prático, rápido e eficaz quando utiliza-se as boas práticas agrícolas e as recomendações técnicas para a cultura. O que se pretende quando se propõe o manejo de plantas daninhas é que se utilize a recomendação técnica adequada para alcançar condições agronômicas para o melhor desenvolvimento da cultura e conseqüentemente maximizar a produtividade da cultura.

O herbicida é uma ferramenta fundamental no manejo de plantas invasoras porém deve ser utilizado dentro de um programa de manejo integrado de plantas daninhas (MIPD). Cresce sua importância ainda mais com o surgimento de um novo problema: a resistência das plantas daninhas aos herbicidas (Gazziero, 1998).

O glifosato controla efetivamente uma grande variedade de gramíneas e plantas dicotiledôneas através da inibição da 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSP sintetase), uma enzima que participa na via metabólica da biossíntese de compostos aromáticos como os aminoácidos tirosina, fenilalanina e triptofano essenciais ao crescimento das plantas.

Enquanto o glifosato tem provado ser um potente inibidor da EPSP sintase em plantas e *Escherichia coli*, algumas formas de EPSP sintase tolerantes ao glifosato têm sido identificadas. EPSP sintases tolerantes ao glifosato isoladas de organismos incluindo *S.aureus*, *S. pneumoniae*, *Pseudomonas sp* e *Agrobacterium sp* são denominadas enzimas classe II, enquanto aquelas isoladas das plantas e *E. coli* são consideradas enzimas classe I (Priestman et al., 2005). Resultados demonstram que EPSP sintases classe II são menos susceptíveis à

inibição. Segundo Funke et al. (2007) as EPSP sintases classe II de *CP4* ou *S. aureus* são consideravelmente menos sensíveis a inibição que a EPSP sintase da *E. coli*. Esses resultados implicam que estados intermediários tetraédricos de enzimas classe I e II podem diferir consideravelmente em conformação e energia. Tal fenômeno não é tipicamente levado em conta no desenvolvimento de análogos porque é assumido que espécies intermediárias adotam o mesmo estado conformacional durante a reação, independente da origem genética da enzima. Estudos indicam que alguns microorganismos são propensos a exibir tolerância a inibidores desenvolvidos com base em propriedades cinética e estrutural da EPSP sintase da *E. coli* (Funke et al., 2007). Consequentemente, futuros esforços para a descoberta de inibidores da EPSP sintase com potencial espectro antibiótico devem ser realizados usando enzimas classe II de organismos patogênicos.

A compreensão das interações específicas entre ligantes e os seus receptores auxilia no conhecimento das razões moleculares da atividade dos ligantes. Assim sendo, temos como objetivo estudar o modo de interação de análogos do glifosato e as enzimas EPSP sintase nativa e mutante Gli96Ala. Como ainda não são conhecidos os resíduos de aminoácidos que participam no mecanismo de adição-eliminação da enzima EPSP sintase, este trabalho tem como outro objetivo auxiliar na elucidação do mecanismo desta reação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Considerações gerais

O Brasil, recentemente, assumiu a liderança na geração e implantação de tecnologia de agricultura tropical associada a uma denotada agroindústria onde um dos paradigmas é a agroindústria de etanol, reconhecida como a mais eficiente do mundo em termos de tecnologia de processo e de gestão. Entretanto, é importante salientar que, desde o início de seu desenvolvimento, a produção agrícola está diretamente relacionada com a aplicação de agroquímicos para controlar as pestes ou ervas daninhas que atacam os produtos agrícolas, prejudicando as colheitas. O Brasil, desde a década de 70, destaca-se como um dos maiores consumidores mundiais de pesticidas (Primel et al., 2005).

A agricultura moderna vem deparando-se com um grande desafio: conciliar o aumento da produtividade de biomassa com a demanda de energia e alimentos decorrentes do crescimento das populações consumidoras. Até o presente momento uma resposta economicamente viável para se reduzirem perdas na produção causadas por insetos-pragas ou ervas daninhas, sobretudo em culturas extensivas, ainda é o emprego de produtos químicos denominados de agroquímicos (Fitzpatrick, 2006).

A aplicação de agroquímicos, como herbicidas, gera, comumente, grandes problemas, como, por exemplo, os herbicidas muitas vezes são tóxicos, podendo ser cancerígenos, mutagênicos, teratogênicos e mimetizadores de hormônios (Primel et al., 2005). Em geral são aplicados em grande quantidade em áreas bastante extensas e, normalmente, apresentam grande persistência no meio ambiente (Bizuik et al., 1996). Podem também gerar sérios problemas de qualidade das águas superficiais e subterrâneas (Primel et al., 2005). Os agroquímicos aplicados no solo podem sofrer ação de processos físicos,

químicos e biológicos como volatilização, lixiviação, adsorção e fotodecomposição ou fotofragmentação (Baird, 2002). O Brasil, por situar-se, predominantemente, na faixa tropical e subtropical do planeta, recebe intensa radiação solar ao longo do ano e é tido como o maior país tropical do mundo. Desta maneira, a magnitude dos efeitos de fotodecomposição de agroquímicos é intensificada. Este processo é um dos que controlam a disponibilidade das moléculas biologicamente ativas do agroquímico no solo (Fitzpatrick, 2006).

Os seres humanos usam pesticidas para impedir danos às suas colheitas desde aproximadamente 500 a.C., onde o primeiro pesticida conhecido foi o enxofre. Por volta do Século XV, começaram a utilização de elementos químicos tóxicos como o arsênio e o mercúrio no combate a pragas em colheitas. No Século XVII o sulfato de nicotina foi extraído das folhas de tabaco para ser usado como pesticida. Já no Século XIX viu-se a introdução de dois novos pesticidas: um derivado do *Chrysanthemum cinerariaefolium* da família *asteraceae*, e a *rotenone* que é derivada de raízes de leguminosas tropicais. Em 1939 Paul Müller descobriu que o DDT (Figura 1) é um inseticida muito eficaz, transformando-o rapidamente no pesticida mais usado no mundo. Entretanto, na década de 60 descobriu-se que o DDT provocava danos à saúde de diversas espécies de aves prejudicando sua reprodução e oferecendo grandes riscos para a biodiversidade.

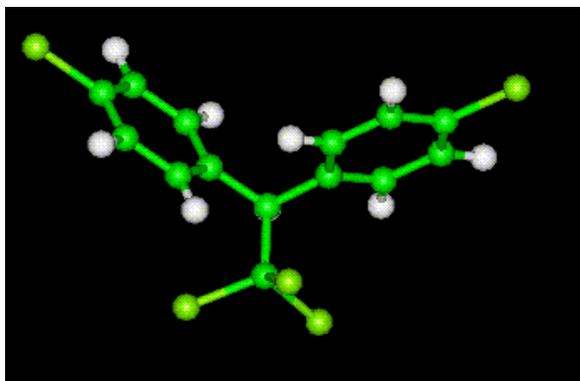


FIGURA 1. Estrutura do pesticida DDT.

O uso de pesticidas dobrou desde a década de 50 e, atualmente, cerca de 2,5 milhões de toneladas de pesticidas industriais são usados todos os anos (Primel et al., 2005).

A presença de plantas daninhas nos plantios florestais é considerada um dos maiores problemas na implantação, manutenção e reforma, por exemplo, do cultivo de eucalipto. Entre as justificativas para a preocupação com o controle de plantas daninhas estão os prejuízos ao crescimento causados pela competição por luz, nutrientes e água e o fato de exercerem interferência de natureza alelopática além de aumentar riscos de incêndio e dificultar os demais tratamentos silviculturais (Pitelli, 1987; Pitelli & Marchi, 1991; Tuffi Santos et al., 2007).

O glifosato é um dos poucos ingredientes ativos registrados para esta cultura, fato que, somado às características favoráveis desse produto, leva à ampla utilização desse herbicida no manejo de plantas daninhas em cultivo comercial de eucalipto. É o principal herbicida usado no mundo sendo responsável por 30% de todos os defensivos agrícolas usados no país. Hoje o mercado do glifosato no Brasil é de cerca de 80 milhões de litros/ano, sendo que a indústria nacional participa com 15 milhões. Atualmente é utilizado em quase

todas as culturas de diferentes maneiras sendo responsável pelo impulso e a viabilidade do sistema de plantio direto.

O glifosato (Figura 2) foi o primeiro herbicida a ser comercializado com sucesso devido à identificação da enzima 5-enolpiruvil chiquimato-3-fosfato sintase como o seu principal alvo (Sikorski & Gruys, 1997).

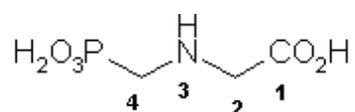


FIGURA 2. Estrutura do glifosato

2.2 Enzima EPSP sintase

A enzima 5-enolpiruvil chiquimato-3-fosfato sintase (EPSP sintase) participa do sexto passo na via do chiquimato e precede a um ponto intermediário importante, o corismato. Este intermediário é requerido para a síntese de metabólitos aromáticos incluindo os aminoácidos aromáticos essenciais: fenilalanina, tirosina e triptofano (Figura 3) (Berman et al., 2000).

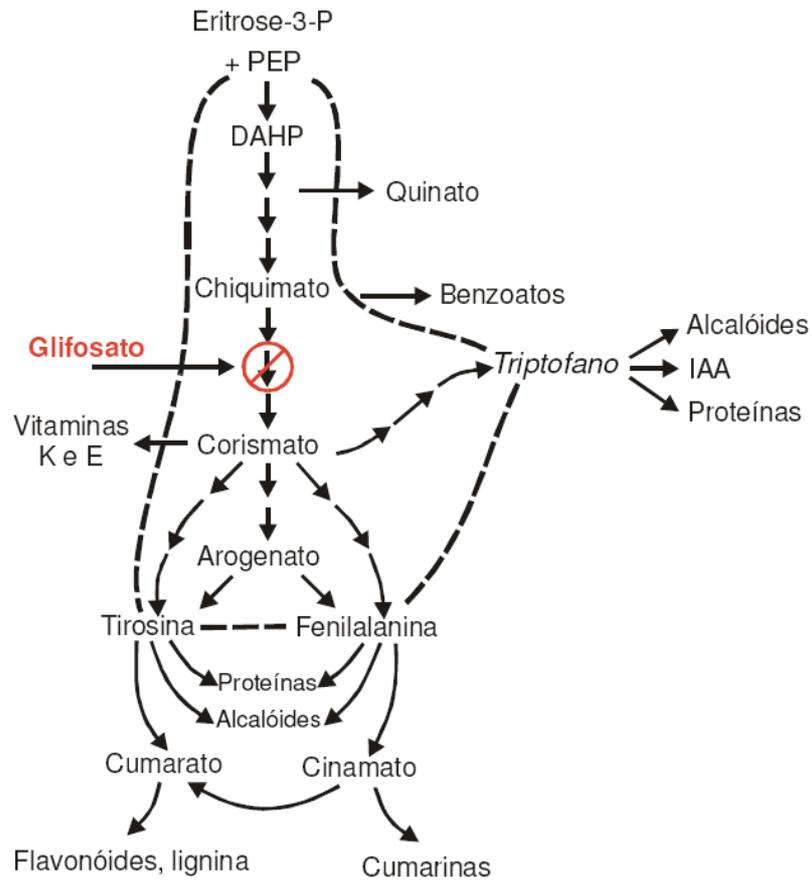


FIGURA 3. Via do chiquimato: síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano.

Na planta, é importante salientar que o promotor de crescimento, a auxina ácido indolilacético (IAA), deriva do aminoácido triptofano através de várias etapas, envolvendo indolpiruvato ou triptamina ou indoletanol para produzir indolilacetaldeído, ou glucobrassicina, para dar indolilacetonitrilo, compostos precursores do IAA. A biossíntese de IAA é inibida pela ação do glifosato, uma vez que já é bem estabelecido que o glifosato inibe a síntese de

corismato e de triptofano (Caetano et al., 2009). A biossíntese de IAA em plantas e bactérias é apresentada na Figura 4. Nela verifica-se a possibilidade da ocorrência de quatro vias de síntese: a via do ácido indol 3-pirúvico, a via bacteriana, a via indol-3-acetonitrila (IAN) e a via da triptamina (TAM).

A biossíntese de IAA, independente do triptofano, tem como precursor o indol-3-glicerol fosfato, que por sua vez depende de corismato para sua formação. Como a síntese de corismato também é inibida pelo glifosato, pode-se dizer que a biossíntese de IAA independente do triptofano e também pode ser inibida pelo herbicida, ou seja, o glifosato bloqueia totalmente a síntese de IAA. Foi demonstrado que o glifosato exerce uma rápida redução no conteúdo de auxina nas plantas através da formação de conjugados e pela degradação oxidativa de IAA. Sabe-se que alguns compostos fenólicos são inibidores de IAA-oxidase. No entanto, como a síntese destes compostos fenólicos é inibida pela ação do glifosato, haverá então aumento da atividade da IAA oxidase, o que levará a um aumento na oxidação do IAA e, conseqüentemente, menor nível de IAA livre (Taiz & Zeiger, 2004).

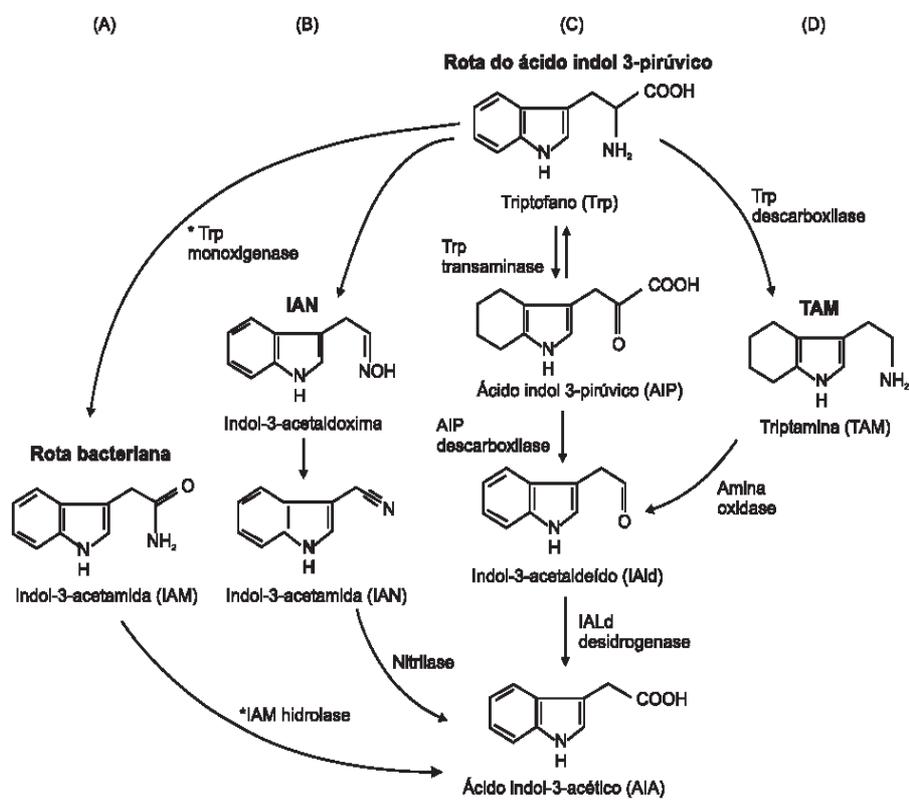


FIGURA 4. (A), (B), (C) e (D) são vias metabólicas para obtenção do ácido indolacético

Esta menor produção de IAA poderia explicar os sintomas de seca de ponteiro e o menor desenvolvimento da parte aérea observados em manejos com glifosato. A produção e o transporte de auxina são restringidos por doses subletais de glifosato.

O uso de doses subletais dos herbicidas também pode ter implicações importantes alterando o balanço de processos metabólicos nas plantas.

Estudos preliminares com o bloqueio parcial da enzima EPSPs através da aplicação de baixas doses de glifosato em eucalipto indicaram que a redução da atividade da enzima a níveis que elevaram a concentração de ácido chiquímico (ou chiquimato) em 278 vezes resultou em um aumento de 69% (com efeito significativo ao nível de 1% de probabilidade) na taxa de crescimento de plantas jovens de eucalipto (Vellini et al., 2008).

A EPSP sintase catalisa a reação que envolve a transferência do enolpiruvil do fosfoenolpiruvato (PEP) para o chiquimato-3-fosfato (S3P) formando os produtos EPSP e fosfato inorgânico (Pi). Esta reação está apresentada na Figura 5 (Berman et al., 2000).

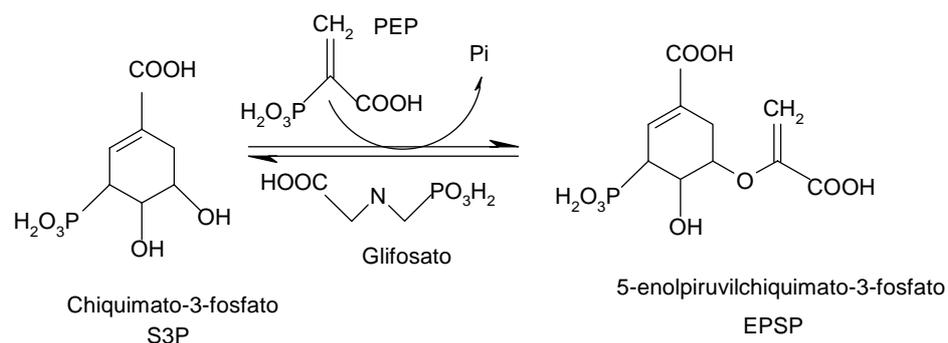


FIGURA 5. Reação catalizada pela enzima EPSP sintase na qual o glifosato é competidor do substrato natural PEP

Para entender esta importante reação enzimática Bondinel et al. (1971) inicialmente sugeriram que a transferência do grupo carbonila proveniente do PEP para o S3P procedia via mecanismo de adição-eliminação. Posteriormente Anderson et al. (1988) confirmaram este fato isolando o intermediário tetraédrico formado no decorrer da reação para formação de EPSP. Ming An et

al. (2003) propuseram duas alternativas para formação e decomposição do estado intermediário de acordo com a Figura 6.

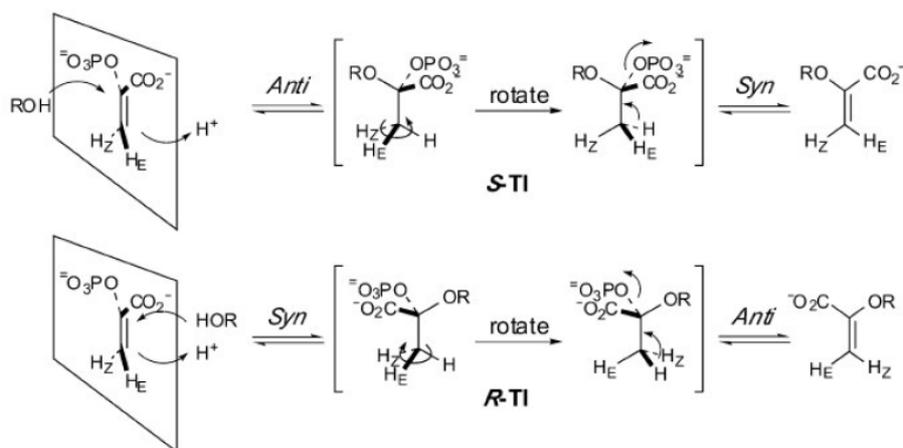


FIGURA 6. Caminho estereoquímico para a EPSP sintase envolvendo protonação da face *si* do PEP e retenção da configuração da dupla ligação

No primeiro, o próton pode ser adicionado pela face *re* ou *si* da ligação dupla do PEP. No segundo, o grupo 5-OH do S3P pode adicionar o hidrogênio no sentido *syn* ou *anti*. Experimentos demonstraram que o intermediário enzimático possui a configuração “S” no centro cetral afirmando que o mecanismo preferencial é a adição *anti*, seguida pela eliminação *syn* (Anderson et al., 1990; Leo et al., 1990).

Schonbrunn et al. (2001) através de análises de Raio-X do complexo EPSP sintase-S3P-glifosato observaram que o resíduo Glu-341, localizado no sítio ativo, está posicionado sobre a face *si* da ligação dupla do PEP, no oposto ao grupo 5-OH do S3P, servindo como um doador de próton no passo da adição

anti para formar o intermediário da reação. Adicionalmente, um resíduo de Asp-313, localizado adjacente ao grupo 5-OH do S3P, servirá como um acceptor do próton proveniente para ligação dupla formada no final da reação.

Contudo, Mizyed et al. (2003) concluíram que não há resíduos de aminoácidos que catalisem somente adição ou eliminação. Glu-341 (na forma neutra) é o doador de próton na formação do intermediário proveniente de S3P e PEP e o acceptor de próton na eliminação para o intermediário, enquanto Lis-22 é acceptora do próton proveniente do S3P no primeiro passo da reação e um catalisador ácido geral para eliminação do fosfato no segundo passo da reação. A localização da Lis-22 é adequada para protonar o oxigênio do fosfato no PEP no estado de transição, o que foi demonstrado ser uma estratégia catalítica efetiva para promover a quebra do intermediário de transição (Byczynski et al., 2003; Souza & Sant'Ana, 2008). Apesar dos extensos estudos atualmente ainda estão obscuros na literatura quais os aminoácidos que participam da reação para formar o EPSP.

Segundo Souza & Sant'Ana (2008) esta controvérsia pode ser clareada pela definição do estado de protonação dos resíduos do sítio ativo enzimático. A estrutura cristalográfica da EPSP sintase contendo o intermediário tetraédrico é conhecida (Eschenburg et al., 2003), mas as posições dos átomos de hidrogênio não podem ser usualmente determinadas por técnica de difração de raio x.

Eschenburg et al. (2003) propuseram que Asp-313 poderia primeiro abstrair o próton do 4-OH do S3P e assim o oxianion resultante abstrairia o próton do C-3 no PEP. As distâncias atômicas observadas nos modelos de Souza & Sant'Ana (2008) estão em concordância com esta proposta. Mas este resultado implica em um processo de eliminação *anti*, porque o Asp-313 está localizado na face oposta do grupo fosfato. Análises bioquímicas da reação da EPSP sintase têm fornecido evidências fortes que adição e eliminação acontecem com estereoquímicas opostas (Grimshaw et al., 1984; Lee et al.,

1984; Lees & Walsh, 1995), então a adição do grupo 5-OH do S3P para C2 e o próton para C3 do PEP pode proceder em modo *syn*.

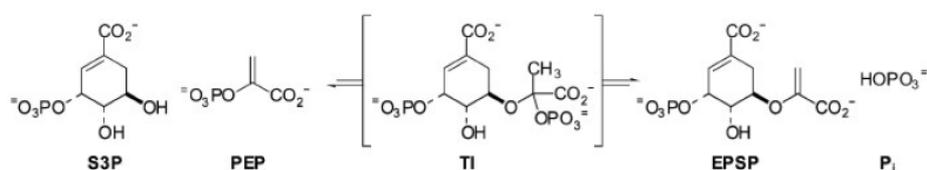


FIGURA 7. Mecanismo de adição-eliminação para a transferência de um grupo carbonila catalisada pela EPSP sintase.

A EPSP sintase é o principal alvo molecular do composto glifosato (Arnaud et al., 1998) e nenhuma outra classe de herbicidas comerciais conhecida inibe essa enzima ou outras enzimas importantes nessa rota. É, entretanto, conhecido que o glifosato pode inibir outras enzimas tais como a DAHP sintase, dehidroquinato sintase e antramilato sintase. Todavia, tais inibições requerem alta concentração do ingrediente ativo (10 nM). Desta forma, a ação do glifosato sobre estas enzimas é provavelmente um efeito secundário (Roisch & Lingens, 1974; Fischer et al., 1986). Estudos experimentais sobre a resistência do glifosato nas células de culturas de plantas e bactérias suportam a conclusão que a EPSP sintase é o alvo bioquímico responsável pela poderosa e bem-conhecida ação do glifosato (Arnaud et al., 1998).

Enzimas são catalisadores de extraordinária eficiência. Os aumentos de velocidade de reações alcançadas por enzimas podem chegar a vinte ordens de magnitude! Por outro lado, enzimas possuem uma grande especificidade pelos substratos. Sua atividade é controlável e totalmente seletiva. Sob uma perspectiva teórica a sugestão de Fischer, conhecida como a hipótese da “chave

e fechadura” foi a primeira proposta para explicar o poder catalítico das enzimas. Com o advento da teoria do estado de transição (Billing & Mikkelsen, 1996) nos anos 1930 Pauling (1948) propôs que esta espécie seria preferencialmente ligada pelo sítio ativo enzimático. Jencks (1987) escreveu que “o estudo dos mecanismos moleculares de catálise enzimática é necessariamente empírico e qualitativo”. No entanto, nos últimos 30 anos, simulações computacionais que permitem determinações quantitativas de propriedades termodinâmicas têm alterado este panorama apontando e quantificando os mecanismos catalíticos empregados por enzimas.

A hipótese da “chave e fechadura” para as enzimas proposta inicialmente por Fischer para racionalizar seu poder catalítico foi estendida pela proposta de Haldane em que o substrato não “encaixa” exatamente na enzima e sofre uma distorção após a formação do complexo ES e pela proposta de Pauling (1948) em que a enzima se liga mais fortemente ao estado de transição (ET) que ao substrato. A hipótese de Pauling (1948) apóia-se no conceito de estado de transição e diz que este é mais estabilizado no sítio ativo da enzima em relação à mesma espécie numa reação de referência em solução aquosa. Esta hipótese é amplamente aceita como principal fonte de catálise e parece válida em todas as enzimas já analisadas quantitativamente (Warshel, 1991; Kollman et al., 2001; Bruice, 2002).

Centenas de estruturas tridimensionais determinadas para enzimas complexadas a análogos de ET apóiam a noção de complementaridade entre as estruturas do sítio ativo e do ET. Estes complexos são de grande utilidade prática no desenho de drogas que funcionam como inibidores enzimáticos competitivos (Voet, 1995). No entanto comprovar a hipótese de Pauling (1948) por experimentos não é diretamente possível já que um ET é um objeto transiente. Simulações computacionais de reações enzimáticas mostram repetidamente (Garcia-Viloca et al., 2004) que a interação eletrostática entre o ambiente

enzimático e o ET é a maior responsável pela diminuição de ΔG_{enz} em relação à ΔG_{sol} , demonstrando que o ET é a principal espécie que sofre catálise ao longo da coordenada de reação na enzima. A afirmação de “maior ligação ou afinidade da enzima pelo ET é por vezes interpretada literalmente como se o ET fosse atingido em solução e, depois, ligado e estabilizado pela enzima”. Esta interpretação é equivocada porque o ET tem um tempo de vida muito pequeno em solução, da ordem de 10^{-15} s e, portanto, não existe por tempo suficiente para que difusão e ligação à enzima ocorram. Na interpretação correta a enzima complexa o substrato no estado fundamental e a ativação ocorre a partir deste complexo. O ET formado possui melhores contatos com a enzima que o substrato maximizando a estabilização apenas quando o complexo é ativado. Assim, o ET tem maior estabilidade no sítio ativo que em solução.

Uma interação seletiva e específica do glifosato com a enzima EPSP sintase ocorre devido às propriedades herbicidas potentes e baixa toxicidade em outras formas de vida. O glifosato inibe a EPSP sintase em uma reação reversível na qual é competitivo com o PEP e não competitivo com o S3P. Certas evidências acumuladas desde 1980 sugerem que há uma substancial semelhança entre o PEP e o glifosato (Anton et al., 1983; Steinrucken & Amrhein, 1984; Sikorski & Gruys, 1997).

Vários estudos usando cinética, fluorescência e RMN de estado sólido demonstraram que o glifosato preferencialmente forma um complexo ternário estável com a enzima e o S3P (EPSP sintase-S3P-glifosato). O complexo ternário EPSP sintase-S3P-glifosato é semelhante ao complexo EPSP sintase-S3P-PEP requerido para a catálise. Entretanto a ligação do glifosato no complexo é mais forte que a ligação do PEP, porém o glifosato não inibe nenhuma outra enzima dependente de PEP. Conseqüentemente o herbicida não pode funcionar como um substituto do PEP (Boocock et al., 1983; Steinrucken

& Amrhein, 1984; Anderson et al., 1988; Castellino, 1989; Christensen & Schaefer, 1993; McDowell et al., 1996; Sikorski & Gruys, 1997).

Os requerimentos estérico e iônico do sítio de ligação do glifosato foram caracterizados e são mais restritos do que os do PEP. Enquanto algumas modificações na estrutura do PEP são toleradas, menores mudanças estruturais no glifosato levam a uma perda significativa do potencial inibidor e reduz a atividade herbicida. Apenas dois análogos, N-aminoglifosato e N-hidroxilglifosato, (**2** e **3** na Figura 8) exibem propriedades de inibição comparadas às do glifosato (Walker et al., 1991; Knowles et al., 1993; Sikorski & Gruys, 1997; Ream et al., 1998).

Como um inibidor análogo do estado de transição do composto planar PEP esperava-se que análogos planares do glifosato tivessem alguma afinidade pela enzima. Entretanto, nenhum dos análogos cíclicos planares do glifosato (**4**, **5**, Figura 8) apresentou alguma atividade significativa contra EPSP sintase (Sikorski & Gruys, 1997; Ream et al., 1998).

Compostos espacialmente cíclicos mais compactos como o fosfonotriazol e o fosfonotiazol (**5** e **6** na Figura 8) são ambos não efetivos como inibidores da EPSP sintase. A falta de atividade observada para todos os análogos cíclicos do glifosato sugere que a flexibilidade conformacional da cadeia principal do glifosato é o componente chave de sua atividade biológica (Anderson et al., 1995; Sikorski & Gruys, 1997).

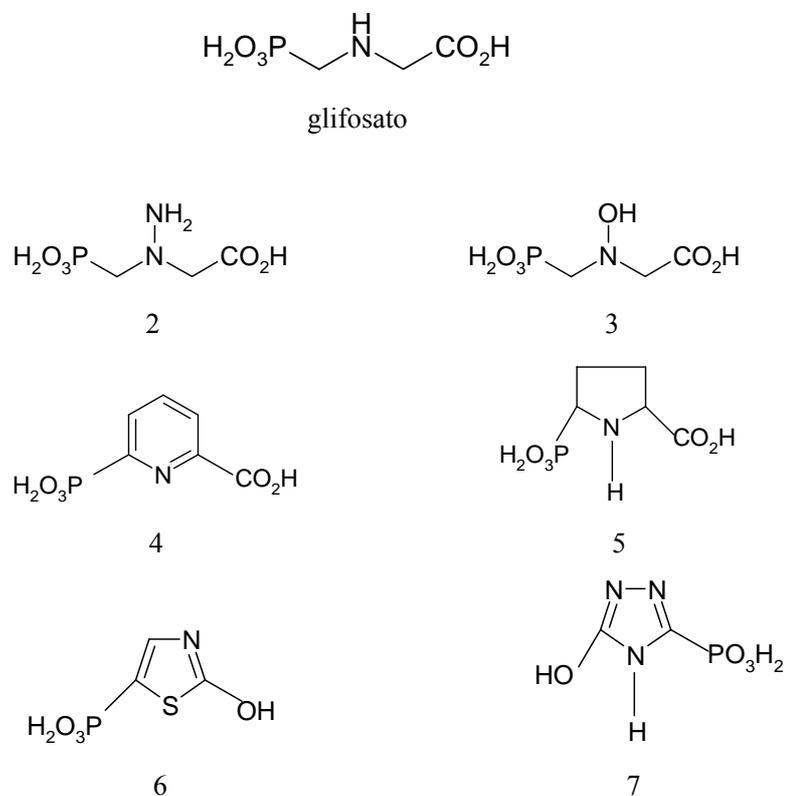


FIGURA 8. Glifosato e alguns análogos.

Funke et al. (2007) investigaram o modelo molecular de ação dos análogos do estado de transição de RP-TI, SP-TI e (R)-difluorometil (Figura 9) usando EPSP sintase classe II de *S. aureus* e *Agrobacterium sp* (CP4) e EPSP sintase classe I da *E. coli*. Os resultados demonstraram que EPSP sintases classe II são menos susceptíveis à inibição por estes análogos do ET. RP-TI é um potente inibidor da EPSP sintase de *E. coli* ($k_i = 3.9\text{nM}$), entretanto exibe 120 e 460 menos potência sobre a EPSP sintase de *S. aureus* e CP4, respectivamente. SP-TI, um inibidor moderado da enzima de *E. coli* ($k_i = 760\text{nM}$), é 16 vezes

menos ativo na enzima de *S. aureus* (Funke et al., 2007). Estes resultados indicam que as enzimas classe II como as de *S. aureus* ou *CP4* exibem não só tolerância ao glifosato, mas também consideravelmente menos susceptibilidade à inibição por esses análogos do estado de transição.

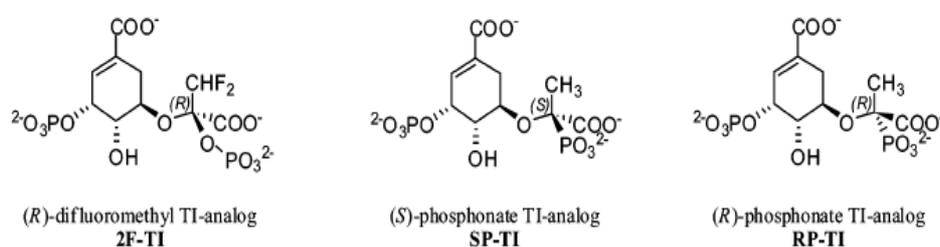


FIGURA 9. Análogos do estado de transição estudados por Funke et al. (2007).

2.3 O herbicida glifosato

A propriedade herbicida do glifosato foi descoberta pela empresa Monsanto em 1970 e a primeira formulação comercial foi lançada nos Estados Unidos em 1974 com o nome comercial de Roundup®. Hoje ele é utilizado em mais de 130 países sendo aplicado para controle de plantas daninhas nas áreas agrícolas, industriais, florestais, residenciais e ambientes aquáticos, de acordo com os registros obtidos em cada país (Galli & Montezuma, 2005).

O glifosato é um herbicida pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas e classificado como não seletivo (Galli & Montezuma, 2005). É indicado no controle de ervas daninhas anuais e perenes, monocotiledôneas ou dicotiledôneas, em culturas de arroz irrigado, cana-de-açúcar, café, citros, maçã, milho, pastagens, soja (plantio direto ou indireto), fumo, uva e soqueira em cana-de-açúcar. É indicado, ainda, para as culturas de ameixa, banana, cacau,

nectarina, pêra, pêssego, seringueira e plantio direto do algodão. Pode, ainda, ser aplicado na água para o controle de ervas aquáticas (Amarante Júnior et al., 2002).

Em condições ambientais o glifosato é um sólido cristalino muito solúvel em água (12 g/L a 25 °C) e quase insolúvel em solventes orgânicos comuns, tais como acetona e etanol, entre outros. Possui densidade aparente de 0,5 g/cm³, ponto de fusão de 200 °C e é estável na presença de luz, inclusive em temperaturas superiores a 60 °C (Amarante Júnior et al., 2002).

É um herbicida pós-emergente que tem sido usado para o controle de 300 plantas anuais, perenes e bienais tais como gramíneas herbáceas e folhosas assim como em árvores por mais de 30 anos. Franz et al. (1996) notaram que o glifosato controla 74 de 76 das piores ervas daninhas do mundo. Glifosato comercial está disponível em formulações líquidas e sais com diversos sistemas adjuvantes. O tipo e quantidade de adjuvante influenciam fortemente na atividade biológica e propriedades da formulação (Green, 2007).

Características físico-químicas favoráveis, baixo custo, alta absorção no solo, flexibilidade de aplicação e baixa toxicidade têm ajudado a fazer do glifosato o herbicida mais usado.

Em diversos tipos de cultivo este herbicida costuma ser pulverizado e absorvido na planta através de suas folhas e dos caulículos novos sendo transportado por toda a planta agindo nos vários sistemas enzimáticos, inibindo o metabolismo de aminoácidos. As plantas tratadas com glifosato morrem lentamente em poucos dias (Figura 10), meia vida por hidrólise de mais de 35 dias (Galli & Montezuma, 2005; Kollman & Segawa, 1995) e devido ao transporte do princípio ativo por todo o sistema nenhuma parte da planta sobrevive (Amarante Júnior et al., 2002).



FIGURA 10. As plantas tratadas com glifosato apresentam um menor crescimento quando comparadas às plantas sem o tratamento com o herbicida e morrem em poucos dias por falta de alguns nutrientes essenciais.

Quando aplicado diretamente no solo apresenta baixa atividade devido à degradação microbiológica para produtos não fitotóxicos (CO_2 , PO_4^{-3} e NH_3) e à grande absorção pelos constituintes do solo (Ramstedt et al., 2004).

O grupo fosfonato $\text{R-PO}(\text{OH})_2$ do composto tem a habilidade de formar complexos fortes com metais. Todos os processos de absorção, fotodegradação e biodegradação dos fosfonatos são modificados pela presença de íons metálicos devido à formação de complexos solúveis e não solúveis (Barja et al., 2001; Coutinho & Mazo, 2005). Além do grupo fosfonato o herbicida possui outros dois grupos funcionais, (amino e carboxilato), que podem se coordenar fortemente com íons metálicos, especialmente com os de transição em pH próximo do neutro no qual os grupos carboxilato e fosfonato estão desprotonados. A habilidade para se coordenar como um ligante tridentado

coloca o glifosato numa posição privilegiada entre os herbicidas (Subramaniam & Hoggard, 1988; Coutinho & Mazo, 2005).

O movimento no interior das células é a maior barreira para absorção e translocação de glifosato pelas plantas (Nilsson, 1985; Hall et al., 2000). O glifosato é absorvido pelas células através de difusão passiva ou via um transportador fosfatado energizado pela ATPase da planta (Hetherington et al., 1998). É continuamente transportado via floema e se acumula em folhas jovens, raízes e meristemas (Bromilow et al., 1993; Bernards et al., 2005). A absorção foliar é reduzida quando o glifosato é aplicado em solução com cálcio, ferro, magnésio, manganês e zinco (Nilsson, 1985; Wills & Mcwhorter, 1985; Thelen et al., 1995; Bernards et al., 2005). Contudo, cloreto de cálcio em solução aumenta a absorção de glifosato em culturas de milho e soja (Hetherington, 1998) e adicionando ferro e manganês aumenta-se a translocação do glifosato da solução da raiz para as folhas de trigo (Nilsson, 1985; Bernards et al., 2005). Alguns dos efeitos negativos de cátions divalentes e trivalentes na absorção foliar de glifosato são reduzidos quando o glifosato é aplicado em solução com sulfato de amônio (Hall et al., 2000).

A toxicidade relativamente baixa pode ser atribuída à modalidade bioquímica de ação do glifosato em um caminho metabólico nas plantas (chamado mecanismo do ácido “chiquímico”) similar ao existente em alguns microorganismos mais complexos, não existindo, entretanto, em animais (Amarante Júnior et al., 2002).

Apesar da toxicidade relativamente baixa alguns dos componentes dos produtos do ingrediente ativo formulados apresentam elevada toxicidade. As formulações encontradas no mercado contêm, geralmente, surfactante, cuja finalidade é impedir a formação de gotas e o alcance de áreas além das folhas que são pulverizadas. Alguns destes surfactantes são irritantes, tóxicos para peixes e os mais usados em formulações do glifosato são as etilaminas. Os

compostos deste grupo são significativamente mais tóxicos do que o glifosato, causando sérios problemas no sistema respiratório e na pele (Amarante Júnior et al., 2002).

Os sintomas visuais de fitotoxicidade de glifosato causados por queima das folhas ou caule foram por muito tempo confundidos com sintomas de deficiências de boro, cálcio, cobre, manganês e zinco. Quando esses sintomas apareciam nos povoamentos, por exemplo, de eucalipto, os profissionais das áreas de solos e nutrição florestal eram chamados para realizarem diagnóstico acreditando que se tratava de um distúrbio nutricional. No entanto, em 50% das ocorrências, o problema era devido a fitotoxicidade do glifosato (Silveira, 2003).

A literatura (Sandberg et al., 1980; Danieri et al., 1990; Satichivi et al., 2000; Monquero et al., 2004) demonstra que a tolerância de plantas ao glifosato ocorre devido à penetração ou translocação diferencial deste herbicida na planta. As taxas de absorção foliar do herbicida e, conseqüentemente, sua eficácia, estão diretamente ligadas aos tipos de estruturas encontradas na folha e à permeabilidade da cutícula (Baker, 1982; Tuffi Santos et al., 2006), que, por sua vez, depende da constituição e da polaridade desta. Estudos demonstram que nos estômatos e na base dos tricomas a cutícula é mais fina e mais permeável à substâncias polares (menor teor de cera epicuticular) sendo uma via de penetração de herbicidas (Hess & Falk, 1990; Schreiber, 2005; Tuffi Santos et al., 2006). Esse fato pode favorecer a penetração do glifosato em plantas onde a presença dessas estruturas epidérmicas seja freqüente.

Segundo Schönherr (2002), a presença de água é fundamental para uma boa penetração de glifosato nas folhas, sendo evidente que grande parte do herbicida que penetra em seus tecidos passa por poros hidratados da cutícula. Estudos sobre a micromorfologia foliar de espécies do gênero *Eucalyptus* mostram que a superfície epidérmica é ondulada e a junção entre as células adjacentes apresenta-se em depressão (Louro et al., 1999). Tal fato pode

predispor as regiões dos contornos celulares a uma maior hidratação e a um possível acúmulo da calda herbicida aplicada, favorecendo assim a absorção do glifosato. Logo, maior densidade de células epidérmicas implicaria maior número de regiões mais propensas à penetração do glifosato, o que explicaria a alta correlação positiva entre esta característica e a porcentagem de intoxicação causada por este herbicida em eucalipto (Tuffi Santos et al., 2006).

O composto livre no solo é degradado rapidamente a dióxido de carbono pela atividade microbiana enquanto o composto adsorvido é degradado mais lentamente, ou não degradado, persistindo inativo durante anos. Devido à rápida absorção no solo o glifosato não é facilmente lixiviado sendo pouco provável a contaminação de águas subterrâneas (Amarante Júnior et al., 2002).

A degradação do herbicida no solo pode seguir duas rotas. A primeira consiste na transformação do glifosato em sarcosina por ação da bactéria *Agrobacterium radiobacter* ou da *Enterobacter aeroneges* (enzima C-P liase): a sarcosina entra no metabolismo destes microorganismos e de outros, degradando-se. A segunda rota consiste na transformação em ácido aminometilfosfônico, AMPA. Ambas as rotas de degradação são apresentadas na Figura 11 (Dick & Quinn, 1995; Giesy et al., 2000).

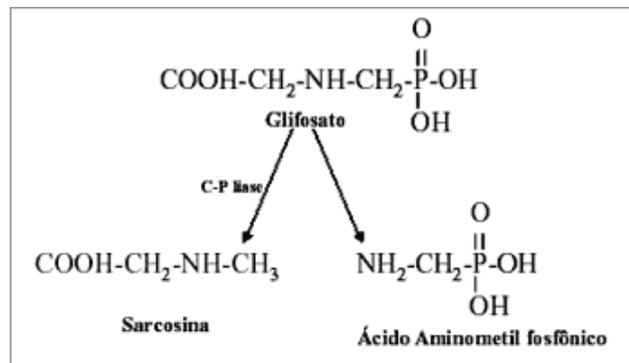


FIGURA 11. Degradação do glifosato por bactérias do solo com produção do ácido aminometilfosfônico e sarcosina.

A degradação do glifosato no solo é muito rápida e realizada por grande variedade de microorganismos que usam o produto como fonte de energia e fósforo (Galli & Montezuma, 2005).

Ghassemi et al. (1984) concluíram que a taxa de degradação em água é geralmente menor porque existem menos microorganismos na água que na maioria dos solos.

Uma das primeiras enzimas caracterizadas como insensíveis ao glifosato foi a EPSP sintase mutante Gli96Ala da *Klebsiella pneumoniae*. A enzima mutante é insensível ao glifosato com afinidade inalterada pelo primeiro substrato, chiquimato-3-fosfato (S3P), mas apresenta uma afinidade 30 vezes menor pelo segundo substrato, fosfoenolpiruvato (PEP) (Eschenburg et al., 2002). De acordo com Eschenburg et al. a concentração mínima do glifosato capaz de inibir 50% da atividade enzimática (IC_{50}) da EPSP sintase nativa da *Escherichia coli* é 0,01 mM e da mutante Gli96Ala >10mM.

Para investigar as interações entre as enzimas EPSP sintase nativa e mutante Gli96Ala com o inibidor glifosato e propor novos agroquímicos a

química computacional mostra-se uma opção bastante econômica, rápida e precisa.

2.4 Química computacional

Com o avanço e sofisticação da informática nos últimos anos grande quantidade de informações tem sido cada vez mais rapidamente processadas, e, com o auxílio de novas ferramentas e metodologias computacionais resultados melhores e mais precisos vêm sendo obtidos na tentativa de simular uma variedade de parâmetros químicos e correlatos. Uma das grandes vantagens dos métodos computacionais é seu baixo custo frente a métodos experimentais, uma vez que evitam repetição de análises e reações, além de gastos com reagentes e material, visto que simulações podem ser feitas para otimizar e compreender processos, reações, interações intra e intermoleculares, etc. A aplicação de métodos computacionais para solucionar problemas químicos estende-se às áreas onde a química desempenha um importante papel, direto ou indireto. Nesse contexto, conhecimentos mais detalhados sobre processos biológicos, como interação entre agroquímico e receptor deve ser avaliada, predita e simulada utilizando métodos de química computacional. Seguindo essa mesma linha de aplicação em biotecnologia, novos compostos podem ser modelados e propostos como potenciais princípios ativos (agroquímicos).

Deste modo, a inserção da química computacional no cenário de desenvolvimento de novos agroquímicos poderá proporcionar um grande salto quantitativo e qualitativo na pesquisa científica e no desenvolvimento tecnológico de produtos voltados ao agronegócio. A busca por novas tecnologias aplicadas à minimização dos impactos ambientais gerados pelo setor produtivo associada ao desenvolvimento científico e tecnológico e a busca por novos materiais naturais que possuam atividade biológica estende-se diretamente às diversas áreas. Este tipo de pesquisa é necessariamente multidisciplinar,

obrigando ao grupo de pesquisa ampliar o panorama dos seus conhecimentos, incluindo as mais diversas áreas da ciência (Ramalho et al., 2007).

A disponibilidade dos programas computacionais de modelagem molecular e os bancos de dados em rede são, atualmente, ferramentas fundamentais para a descoberta e planejamento de compostos. Estas informações permitem uma análise rápida da atividade biológica *versus* propriedades físico-químicas de uma série de moléculas de interesse (Carvalho et al., 2003; Wermuth et al., 1998).

2.5 Modelagem molecular

Um estudo das relações estrutura-atividade de um composto-protótipo e de seus análogos pode ser usado para determinar as partes da estrutura do protótipo que são responsáveis por sua atividade biológica e também por seus efeitos adversos. Subsequentemente, esta informação é usada para desenvolver um novo composto que possui a atividade aumentada, poucos efeitos colaterais indesejáveis e maior facilidade de administração (Thomas, 2003).

Modelagem molecular, segundo a IUPAC, é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica visando fornecer uma representação tridimensional sob um dado conjunto de circunstâncias (Sant'Anna, 2002; Carvalho et al., 2003).

As moléculas, geralmente desenhadas de forma tridimensional não estão, necessariamente, na conformação mais estável. Durante a geração de uma determinada estrutura ocorrem distorções na molécula com formação desfavorável de comprimentos e ângulos de ligações e ângulos diédricos. Átomos não-ligados também interagem em uma mesma região do espaço e provocam repulsão estérica(?) e eletrostática. Para corrigir estas distorções as moléculas são otimizadas pelo processo de minimização de energia, a partir de

dois modelos matemáticos (i) mecânica molecular ou (ii) mecânica quântica. Interações não previsíveis, relacionadas à sobreposição de orbital molecular, distribuição de densidade eletrônica ou interferências estéricas podem ser solucionadas pelos métodos computacionais. A minimização de energia e a análise conformacional são usadas interativamente para otimizar a geometria de uma molécula (Patrick & Flanagan, 2001; Carvalho et al., 2003).

O processo de mecânica molecular promove a modificação dos ângulos e comprimentos das ligações dos átomos originais e fornece novas conformações com os correspondentes cálculos de energia. O programa reconhece as mudanças que conduzem a estruturas mais estáveis, de menor energia estérica e os cálculos são interrompidos quando as modificações da estrutura mais estável, em relação à molécula original, não resultam em alteração considerável de energia. O objetivo da mecânica molecular é prever a energia associada com determinada conformação de uma molécula (Patrick & Flanagan, 2001; Carvalho et al., 2003).

Na minimização os cálculos de energia estérica são interrompidos quando a molécula atinge a primeira conformação estável e levam a uma estrutura semelhante à original com energia mínima local. Nesta fase a minimização não é continuada porque variações na estrutura resultam em mudanças pequenas de energia. A Figura 12 mostra que esta conformação “estável” pode estar separada de outra, ainda mais estável, por uma barreira de energia que o programa de minimização é incapaz de sobrepujar. Neste caso, para identificar a conformação mais estável, com uma energia mínima global, é necessário gerar várias conformações de uma molécula e comparar os valores de energias obtidos a cada modificação (Kumosinski & Liebman, 1994; Foye et al., 1995; Gringauz, 1997; Carvalho et al., 2003).

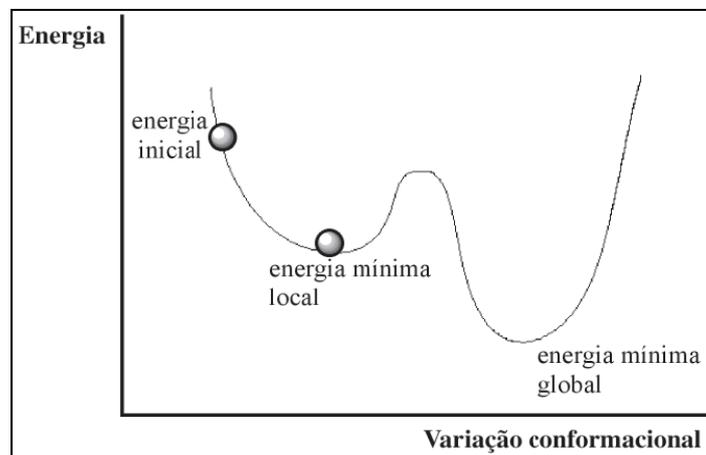


FIGURA 12. Valores de energia *versus* variação conformacional.

A escolha do método de minimização de energia depende de fatores relacionados ao tamanho da molécula, disponibilidade de parâmetros, dados armazenados e recurso computacional (Carvalho et al., 2003).

Os modelos moleculares gerados pelo computador são resultantes de equações matemáticas que estimam as posições e propriedades dos elétrons e núcleos; os cálculos realizados exploram, de forma experimental, as características de uma estrutura fornecendo uma molécula sob nova perspectiva. (Carvalho et al., 2003).

Para entender o mecanismo de interação de um fármaco é essencial saber o posicionamento tridimensional para a sua interação molecular com a proteína alvo. A predição da geometria e da energia de ligação é de grande interesse para o planejamento de novos medicamentos (Hillisch et al., 2004). Uma das conformações estruturais mais confiáveis é obtida por análise de raios-X de cristais do complexo mas não é fácil obter dados experimentais sobre todos os compostos de interesse. A simulação computacional do ancoramento

molecular (“docking”) é uma das mais importantes técnicas de investigação das interações moleculares entre uma proteína e um ligante nos casos em que a estrutura 3D da proteína já foi elucidada (Silveira, 2003). Este tipo de simulação encontra a estrutura mais estável do complexo proteína-ligante e calcula essa estabilidade relativa. Para encontrar a estrutura de menor energia, sem qualquer suposição prévia, é necessário analisar todos os modos de interação considerando a flexibilidade conformacional do ligante a ser introduzido no sítio ativo da proteína. Como esses dois problemas estão interligados eles podem ser resolvidos ao mesmo tempo. Contudo, o número de combinações envolvidas é enorme (Mizutani et al., 1994).

Uma maneira interessante de pesquisar a estrutura mais estável do complexo (não necessariamente o mínimo global) foi proposta por Kuntz et al. (1982). A idéia fundamental inicial desse método é representar ambos, a molécula ligante e a superfície macromolecular, por um conjunto de esferas e procurar (método estocástico) qual o melhor emparelhamento das esferas. A complementaridade da forma molecular é muito importante no método de ancoramento. Posteriormente um método mais eficiente para o acoplamento molecular de ligantes flexíveis foi desenvolvido por Leach & Znojil (1992). O método consiste em primeiro determinar a posição e a orientação dos fragmentos rígidos do ligante e então pesquisar as conformações da região flexível do ligante de modo sistemático. A energia de interação intermolecular é calculada através da soma das contribuições de energia entre todos os átomos das duas moléculas desconsiderando as interações entre os átomos da mesma molécula.

3 OBJETIVOS

A compreensão das interações específicas entre ligantes e os seus receptores auxilia no conhecimento das razões moleculares da atividade dos ligantes. Devido à importância do desenvolvimento de novos herbicidas e como não são conhecidos os resíduos de aminoácidos que participam no mecanismo adição-eliminação da enzima EPSP sintase este trabalho tem por objetivos:

1) Estudar o modo de interação de análogos do glifosato e as enzimas EPSP sintase da *E. coli* nativa e mutante Gli96Ala utilizando a técnica de ancoramento molecular.

2) Esclarecer, utilizando cálculos quânticos, uma vez que ainda estão obscuros na literatura, quais seriam os aminoácidos envolvidos nas catálises ácida e básica da EPSP sintase. Desta forma pretende-se auxiliar na elucidação do mecanismo desta reação e, juntamente com outros resultados, projetar novos inibidores da EPSP sintase que venham a ser promissores herbicidas.

4 METODOLOGIA

4.1 Ancoramento dos inibidores

A posição e orientação inicial usada para o ancoramento dos derivados do glifosato nas enzimas nativa e mutante da EPSP sintase da *E. coli* foram obtidas pela modificação do ligante extraído do PDB. Modificou-se o átomo de hidrogênio ligado ao nitrogênio na estrutura do inibidor por grupamentos metila, amina e hidroxila, dando origem às estruturas dos três primeiros análogos. Para os nove novos análogos propostos modificou-se o hidrogênio ligado ao carbono próximo ao grupo fosfato por grupamentos hidroximetileno, metila, etila, carboximetileno, aminometileno, carboxila, hidroxila, amina, hidroxilamino.

Utilizou-se, para os cálculos das energias de ancoramento, o programa *Molegro Virtual Docker (MDV)*, onde cada ligante foi ancorado no sítio ativo da enzima. Nesta etapa a identificação dos modos de interação do ligante é interativa avaliando um número de soluções (conformação e orientação do ligante) e estimando a energia de suas interações com a proteína. As melhores soluções são retornadas para uma análise adicional.

Os valores da função de desempenho do ancoramento (*Docking Scoring Function*), E_{score} são definidos pela eq. 1:

$$E_{score} = E_{inter} + E_{intra}$$

Eq. 1

Onde:

$$E_{inter} = \sum_{i=ligant} \sum_{j=protein} \left[E_{PLP}(r_{ij}) + 332.0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2} \right]$$

Eq.2

O termo de E_{PLP} é um potencial “piecewise linear” que usa dois conjuntos diferentes de parâmetros: um para a aproximação do termo estérico (van der Waals) entre átomos e um outro potencial para a ligação hidrogênio. O segundo termo descreve as interações eletrostáticas entre átomos carregados. É um potencial de Coulomb com uma constante dielétrica dependente da distância ($D(r) = 4r$). O valor numérico de 332,0 fixa as unidades de energia eletrostática em quilocalorias por mol (Thomsen & Christensen, 2006).

E_{intra} é a energia interna do ligante:

$$E_{intra} = \sum_{i=ligant} \sum_{j=ligant} E_{PLP}(r_{ij}) + \sum_{flexiblebonds} A[1 - \cos(m\theta - \theta_0)] + E_{clash} \quad \text{Eq.3}$$

As duas primeiras somas referem-se a todos os pares de átomos do ligante excluindo os pares de átomos conectados por duas ligações. O segundo termo refere-se à torção da energia, onde θ é o ângulo de torção da ligação. A média da contribuição de torção da ligação da energia é usada se diversas torsões são determinadas. O último termo, E_{clash} , atribui uma penalidade de 1000 se a distância entre dois átomos pesados (mais de duas ligações distantes) for menor que 2.0 Å, punindo conformações inexistentes do ligante (Molegro ApS). Em resumo, estas funções são usadas para sobrepor automaticamente uma molécula flexível em uma molécula molde rígida (proteína).

Foi selecionada a conformação de cada composto usando seu maior grau de similaridade espacial com o glifosato obtido do PDB que foi representada pela estrutura com a energia de interação mais estável entre a posição do ligante e a respectiva proteína (Sippl et al., 2003).

4.1.1 Metodologia utilizada para o ancoramento molecular

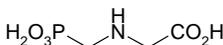
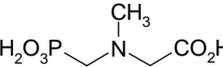
4.1.1.1 Tratamento da proteína

As enzimas EPSP sintase nativa e EPSP sintase mutante Gli96A1a, incluindo águas de cristalização, S3P, e o inibidor glifosato foram obtidos do “Protein Data Bank” (PDB), códigos: 1G6S e 1MI4, respectivamente (Eschenburg et al., 2002).

4.1.1.2 Dados biológicos

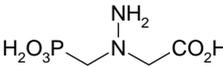
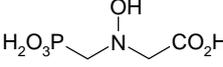
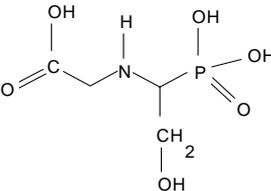
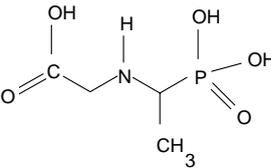
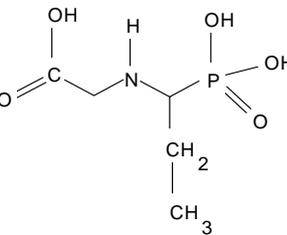
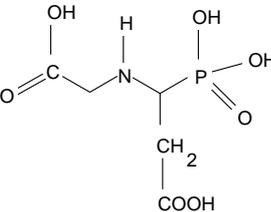
Na Tabela 1 estão apresentados o glifosato, seus análogos aqui estudados e os respectivos valores de K_i para os três primeiros análogos. Estes primeiros compostos foram selecionados a partir de uma série de inibidores desenvolvidos por Knowles e colaboradores, onde a constante de inibição do substrato foi expressa a partir da *Escherichia coli* (Knowles et al., 1993; Sikorski & Gruys, 1997). Os demais análogos foram propostos por nosso grupo de química teórica de pesquisa (Ramalho et al., 2007).

TABELA 1. Estrutura do glifosato, seus análogos e alguns respectivos valores de K_i (Sikorski & Gruys, 1997).

| Composto | Estrutura | k_i (microM) |
|-----------|---|----------------|
| Glifosato |  | 0,16 |
| 1 |  | 78,0 |

...continua...

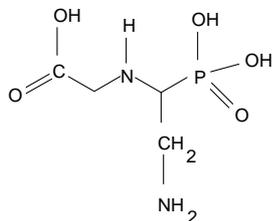
TABELA 1, Cont.

| | | |
|---|---|-------------|
| 2 |  | 0,61 |
| 3 |  | 2,2 |
| 4 |  | |
| 5 |  | |
| 6 |  | |
| 7 |  | |

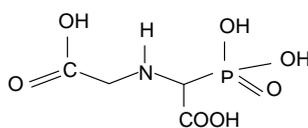
...continua...

TABELA 1, Cont.

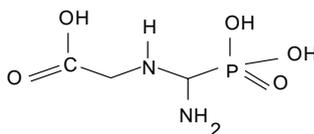
8



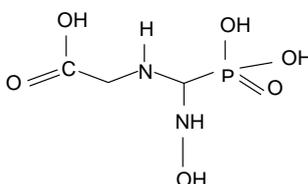
9



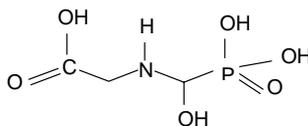
10



11



12



4.2 Estudo do mecanismo de reação da EPSP sintase

Devido ao grande número de átomos em proteínas e ao fato de reações envolverem a quebra e formação de ligações químicas a catálise enzimática é um grande desafio para a química computacional (Borman, 2004). Métodos quanto-

mecânicos de alto nível teórico são limitados à aplicação em sistemas com número relativamente pequeno de átomos. A combinação dos métodos quânto-mecânicos e de mecânica molecular (QM/MM) excede o domínio dos cálculos QM a macromoléculas. A estratégia básica nesta metodologia primeiramente introduzida por Levitt e colaboradores (Warshel & Levitt, 1976) pode ser descrita da seguinte forma: assume-se que o sistema molecular pode ser dividido em dois subsistemas, região QM e MM. As regiões MM contém todos os átomos que são tratados explicitamente no cálculo. Na região QM os átomos são representados por núcleos e elétrons e a superfície de potencial é construída dentro da aproximação Born-Oppenheimer (Szabo & Oslund, 1996).

Um método para se obter os resultados de QM é o de funcional de densidade (Density Functional Theory, DFT). A formulação do método ficou a cargo de Hohenberg, Kohn e Sham (Kohn & Holthausen, 2001). Segundo Ziegler (1991) a noção básica em DFT, de que a energia de determinado sistema eletrônico possa ser expressa em função de sua densidade, é quase tão antiga quanto a própria mecânica quântica. Hohenberg e Kohn mostraram também que a energia, função de onda e outras propriedades moleculares são equivocadamente determinadas por essa densidade de probabilidade eletrônica ρ [x,y,z] (segundo teorema de Hohenberg-Kohn), ou seja, a densidade eletrônica e o Hamiltoniano têm uma relação funcional que permite a computação de todas as propriedades moleculares no estado fundamental sem uma função de onda. Mas esses teoremas não mencionam como encontrar a energia do estado fundamental a partir de ρ ou a partir de ψ . Este problema foi contornado por Kohn e Sham na década de 60 quando eles propuseram que a energia puramente eletrônica de uma molécula com muitos elétrons no estado fundamental seria (Eq.4):

$$E_o = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \langle \Psi_i(\mathbf{1}) | \nabla_1^2 | \Psi_i(\mathbf{1}) \rangle - \sum_{\alpha} \int \frac{Z_{\alpha} \rho(\mathbf{1})}{r_{1\alpha}} dV_1 + \frac{1}{2} \iint \frac{\rho(\mathbf{1})\rho(\mathbf{2})}{r_{12}} dV_1 dV_2 + E_{xc}[\rho]$$

Eq.4

Onde $\Psi_i(\mathbf{1})$, $i=1, 2, \dots, n$ são os orbitais Kohn-Sham, e $E_{xc}[\rho]$ é a energia de troca e correlação, Kohn e Sham também mostraram que “ ρ ” exato para o estado fundamental pode ser determinado pelos orbitais Ψ_i (Eq.5):

$$\rho = \sum_{i=1}^n |\Psi_i|^2$$

Eq.5

O terceiro teorema de Hohenberg-Kohn diz que $E_0[\rho] \leq E_0[\rho']$, onde ρ é a densidade exata e ρ' a densidade aproximada pela expansão (Eq.5) para “n” finito. Este teorema é equivalente ao teorema variacional de Hartree-Fock. Os orbitais Kohn-Sham podem ser determinados pela expressão (Eq.6):

$$\hat{F}_{KS}(\mathbf{1})\Psi_i(\mathbf{1}) = \varepsilon_{i,KS\Psi_i}(\mathbf{1})$$

Eq.6

Onde \hat{F}_{KS} é o operador de Kohn-Sham apresentado pela equação (Eq.7):

$$\hat{F}_{KS} = -\frac{1}{2} \nabla_1^2 - \sum_a \frac{Z_a}{r_{1a}} + \sum_{j=1}^n J_j(\mathbf{1}) + V_{xc}(\mathbf{1})$$

Eq.7

Onde o potencial V_{xc} é a principal diferença entre os métodos Hartree-Fock e DFT (Morgon & Custódio, 1995).

Desta forma pode-se minimizar a energia em relação à densidade através das condições de contorno (Eq.8):

$$\frac{\partial E_0}{\partial \rho} = 0 \quad \text{Eq.8}$$

sendo a integral $\rho^2 dr = N$, onde N é o número de elétrons do sistema.

O principal problema do método é a falta de um processo sistemático para determinar $E_{xc}[\rho]$. Assim, vários tipos de funcionais já foram propostos (Levine et al., 1991). Este funcional é, na realidade, dividido em duas partes: uma de troca e outra de correlação. Um dos funcionais de troca mais utilizados é o B3 proposto por Becke em 1993 (Becke, 1993), que utilizamos neste trabalho (Eq.9):

$$E_x = (1 - a_0) E_x^{LSDA} + a_0 E_x^{HF} + a_x \Delta E_x^{B88} \quad \text{Eq.9}$$

Para correlação foi utilizado o funcional proposto por Lee, Yang e Parr (Lee & Chung, 2009) (Eq.10):

$$E_c = -a \int \frac{1}{1 + d\rho^{\frac{1}{3}}} \left\{ \rho + b\rho^{\frac{-2}{3}} \left[C_{F\rho^{\frac{5}{3}}} - 2t_w + \left(\frac{1}{9}t_w + \frac{1}{18}\nabla^2\rho \right) \right] \exp\left(-c\rho^{\frac{-1}{3}}\right) \right\} dr \quad \text{Eq.10}$$

A partir daí conceitos importantes na descrição teórica das reações químicas tais como potencial químico e conceito de dureza e moleza (*hardness e softness*), são incorporados na DFT uma vez que $\rho(\mathbf{r})$ e o número de elétrons N podem ser relacionados mais facilmente do que funções de onda de muitos elétrons e a estrutura estudada.

4.2.1 Metodologia utilizada para o cálculo do mecanismo de reação

No presente trabalho a parte MM foi obtida dos resultados de ancoramento molecular. A conformação dos substratos e dos resíduos de aminoácidos da enzima EPSP sintase obtida do ancoramento foi recortada de forma a deixar somente a parte que será utilizada nos cálculos de QM.

Os cálculos de QM foram efetuados nos programas Spartan Pro e Gaussian 98. A região QM, a qual consiste de Asp-313, Lis-22, Glu-341, Lis-83 e Arg-386, ligações peptídicas vizinhas, átomos ligados, moléculas de água cristalográficas, co-fator inibidor tem um total de 87 átomos. As coordenadas iniciais para átomos de Asp-313, Lis-22, Glu-341, Lis-83 e Arg-386, ligações peptídicas vizinhas e moléculas de água foram tomadas da estrutura do cristal.

Todos os estados de transição, intermediários e precursores envolvidos foram calculados. Cada conformero foi totalmente otimizado em ambos os níveis PM3 e DFT com gradiente de conjugação e algoritmos quasi-Newton-Raphson. A geometria final foi obtida com o funcional de densidade Becke's e o gradiente funcional corrigido de Lee, Yang e Paar (B3LYP) usando a base 6-311G**. Depois de cada otimização o cálculo da constante de força foi realizado para verificar se as estruturas otimizadas eram mínimos locais (frequências não imaginárias) ou estados de transição (frequência imaginária). Os efeitos do solvente foram avaliados com a utilização do cálculo de solvatação modelo contínuo polarizado (PCM), inicialmente proposto por Barone e Tomasi, usando o funcional B3LYP e base 6-311G**.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seção de resultados e discussão está dividida em duas partes. Na primeira são discutidos os resultados da aplicação das ferramentas de química teórica para entender a interação entre ligante e enzima alvo, e assim, propor novos análogos do glifosato, inibidor já disponível no mercado. Na segunda parte, estudamos o possível mecanismo de reação para a EPSP sintase, com o auxílio dos resultados obtidos na primeira parte do trabalho.

5.1 Estudos de docking

Realizamos o estudo de docking entre a EPSP sintase nativa e mutante Gly96Ala e três análogos, para, assim, desvendarmos as importantes ligações hidrogênio que ocorrem entre os análogos e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima, obter a conformação adotada por esses análogos e compará-las à conformação do glifosato para então, descobrirmos quais são os grupos essenciais da molécula de glifosato que não podem ser modificados e quais os grupos que são passíveis de modificação molecular para melhorar a atividade herbicida desse inibidor.

5.1.1 EPSP sintase nativa

Um algoritmo de predição da cavidade baseado em uma caixa 3D foi usado para gerar o sítio de ligação da EPSP sintase nativa através do programa *MDV*. O volume da cavidade foi de 35,84 Å e está representada na Figura 13 juntamente com o S3P e o glifosato do cristal.

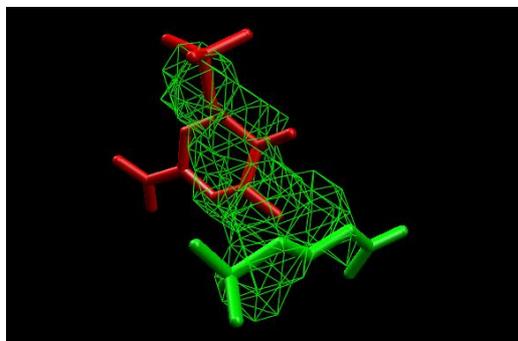


FIGURA 13. Volume da cavidade da EPSP sintase nativa com o S3P e o glifosato ancorados.

As energias de interação e de ligação hidrogênio ligante-proteína foram calculadas para melhor entendermos quais são as variações entre os modos de ligação dos compostos no sítio ativo da enzima e verificar quais os fatores que são responsáveis pela maior atividade do glifosato. A Tabela 2 apresenta os aminoácidos que participam destas ligações, os valores de energia e a constante de inibição experimental referente ao glifosato e cada um dos análogos.

TABELA 2. Principais ligações hidrogênio (distância em Å e energia em kcal/mol) entre os ligantes e a EPSP sintase nativa, os valores de energia eletrostática intermolecular (kcal/mol) e de ligação hidrogênio total (kcal/mol), e os valores de K_i (μM) (Knowles et al., 1993; Sirkorski & Gruys, 1997).

| Composto | Resíduos | Dist. (Å) | Energia (kcal/mol) | E. Intermol. (kcal/mol) | E. ligação hidrog.* (kcal/mol) | K_i (μM) |
|------------------|----------|-----------|--------------------|-------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| Glifosato | Lis-22 | 2,87 | -2,50 | -115,46 | -24,44 | 0,16 |
| | | 3,25 | -1,75 | | | |
| | Asp-49 | - | - | | | |
| | Asn-94 | - | - | | | |
| | Gli-96 | 2,72 | -2,50 | | | |
| | Arg-100 | 3,38 | -0,14 | | | |
| | Arg-124 | 2,67 | -1,24 | | | |
| | | 3,00 | -2,50 | | | |
| | Gln-171 | 3,03 | -1,38 | | | |
| | | 2,71 | -2,50 | | | |
| | Asp-313 | 3,13 | -0,04 | | | |
| | Arg-344 | 2,55 | -2,11 | | | |
| | | 2,84 | -1,81 | | | |
| | Arg-386 | 2,77 | -1,69 | | | |
| | | 2,97 | -2,50 | | | |
| | Lis-411 | 2,65 | -2,50 | | | |
| 1 | Lis-22 | 2,90 | -2,50 | -102,67 | -24,58 | 78,0 |
| | | 2,72 | -2,50 | | | |
| | Asp-49 | - | - | | | |
| | Asn-94 | - | - | | | |
| | Gli-96 | 3,13 | -2,35 | | | |
| | Arg-100 | - | - | | | |
| | Arg-124 | 2,60 | -2,48 | | | |
| | | | | | | |
| | Gln-171 | 3,78 | -0,41 | | | |
| | | 3,16 | -1,57 | | | |
| | Asp-313 | 3,13 | -0,04 | | | |
| | Arg-344 | 2,86 | -1,93 | | | |
| | | 2,65 | -2,50 | | | |
| | Arg-386 | 2,80 | -1,82 | | | |
| | Lis-411 | 2,65 | -2,50 | | | |

...continua...

TABELA 2, Cont.

| | | | | | | | |
|----------|----------|--------|-------|---------|--------|------|-------|
| 2 | Lis-22 | 2,86 | -2,50 | -109,87 | -26,82 | 0,61 | |
| | | 2,83 | -2,50 | | | | |
| | | 3,28 | -0,68 | | | | |
| | Asp-49 | 3,46 | -0,69 | | | | |
| | Asn-94 | - | - | | | | |
| | Gli-96 | 2,48 | -1,33 | | | | |
| | Arg-100 | - | - | | | | |
| | Arg-124 | 2,92 | -2,50 | | | | |
| | | 3,40 | -0,60 | | | | |
| | Gln-171 | 2,98 | -2,50 | | | | |
| | Asp-313 | 3,09 | -2,50 | | | | |
| | Glu-341 | 3,50 | -0,47 | | | | |
| | Arg-344 | 3,12 | -1,99 | | | | |
| | | 2,88 | -2,50 | | | | |
| | Arg-386 | 2,73 | -1,86 | | | | |
| | | 2,50 | -1,79 | | | | |
| | Lis-411 | 2,60 | -2,50 | | | | |
| | 3 | Lis-22 | 2,69 | | | | -2,50 |
| | | | 2,91 | | | | -2,50 |
| | | Asp-49 | - | | | | - |
| Asn-94 | | 3,44 | -0,07 | | | | |
| Gli-96 | | 3,39 | -0,78 | | | | |
| Arg-100 | | - | - | | | | |
| Arg-124 | | 2,57 | -2,30 | | | | |
| | | 3,30 | -1,50 | | | | |
| Gln-171 | | 3,38 | -0,38 | | | | |
| | | 3,11 | -2,11 | | | | |
| Asp-313 | | 3,18 | -2,08 | | | | |
| Glu-341 | | 3,22 | -1,89 | | | | |
| Arg-344 | | 2,96 | -2,50 | | | | |
| | | 3,24 | -1,50 | | | | |
| | | 3,02 | -1,06 | | | | |
| Arg-386 | | 2,61 | -2,50 | | | | |
| | | 2,66 | -1,81 | | | | |
| Lis-411 | 2,66 | -2,50 | | | | | |

* Energia de ligação hidrogênio total entre ligante e proteína com exceção do S3P.

O glifosato e o composto **1** interagem com a EPSP sintase nativa através de ligações do tipo ligação hidrogênio com os mesmos aminoácidos com exceção do resíduo Arg-100 porém com distâncias e valores de energia diferentes (Tabela 2). A diferença da energia de ligação hidrogênio total entre os dois compostos com a proteína nativa foi de apenas 0,14 kcal/mol. Os dois compostos também interagem com o S3P: o glifosato formando três ligações hidrogênio e o composto **1** quatro ligações. Podemos observar na Figura 14 que estes compostos formam um “quelato” com o resíduo Lis-22 e o S3P que direciona a conformação do ângulo diedro da cadeia principal destes compostos. O glifosato adotou um ângulo diedro de 10,55° e o composto **1**, 171,03°.

O composto **2** interage com a EPSP sintase nativa através de quinze ligações hidrogênio, uma a mais que com o glifosato. Esta interação é formada entre o oxigênio do grupamento fosfato e o aminoácido Asp-49. O composto **2** interage com o S3P através de seis ligações hidrogênio fazendo com que o composto **2** adote um ângulo diedro entre os átomos C-C1-N-C2 de 23,49°. O grupamento amina interage com os resíduos Asp-313, Glu-341 e com S3P. A diferença da energia de ligação hidrogênio total entre o composto **2** e o glifosato com a proteína nativa foi de 2,38 kcal/mol.

O composto **3** interage com a EPSP sintase nativa através de dezesseis ligações hidrogênio, duas a mais que com o glifosato. A primeira interação é formada entre o oxigênio do grupamento fosfato e o aminoácido Asn-94 e a segunda entre o oxigênio do substituinte hidroxila e o aminoácido Arg-344. O grupamento hidroxila interage com os resíduos Asp-313, Glu-341, Arg-344 e com S3P. O composto **3** interage com o S3P através de seis ligações hidrogênio fazendo com que o composto **3** adote um ângulo diedro entre os átomos C-C1-N-C2 de 173,09°. A diferença da energia de ligação hidrogênio total entre o composto **3** e o glifosato com a proteína nativa foi de 3,52 kcal/mol.

Utilizando-se a cadeia principal da EPSP sintase nativa fez-se a sobreposição dos quatro complexos (proteína-ligante) apresentados na Figura 15. A sobreposição dos quatro compostos deixa claro que a conformação do glifosato (verde) obtida no ancoramento é diferente da conformação adotada pelos três análogos.

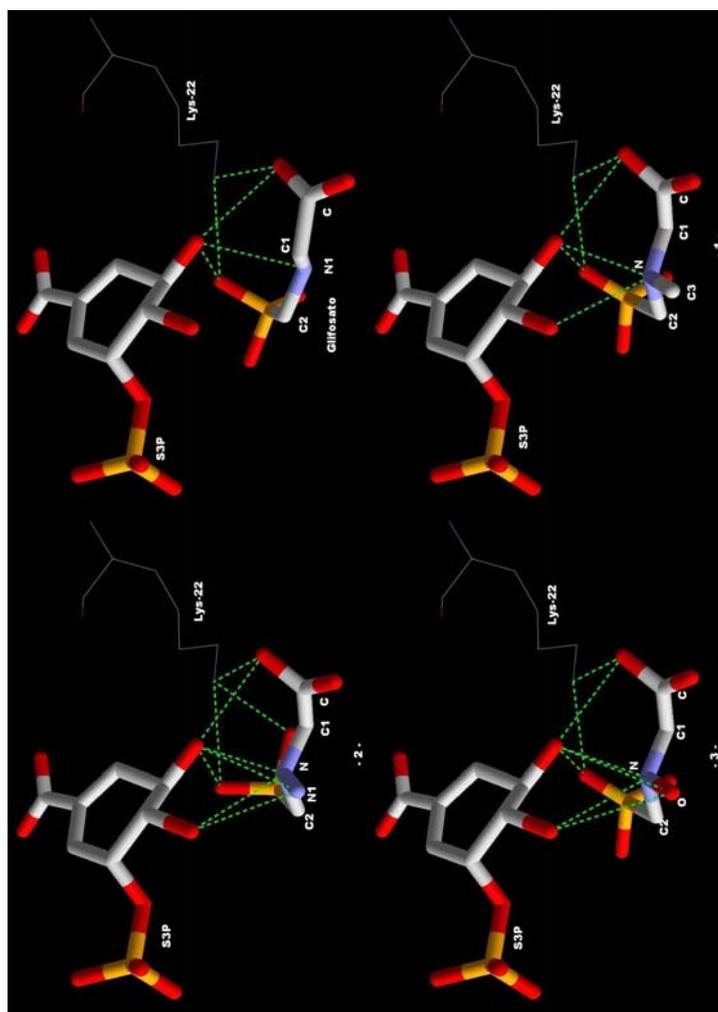


FIGURA 14. Ligações hidrogênio entre o glifosato e os três análogos (1, 2 e 3) com o S3P e o resíduo Lis-22.

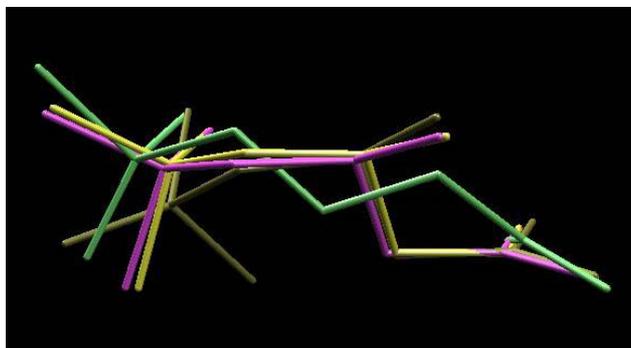


FIGURA 15. Sobreposição do glifosato (verde) com os compostos **1** (amarelo), **2** (rosa) e **3** (mostarda). Para uma melhor visualização omitiu-se a proteína.

Na Tabela 2 observa-se que a energia intermolecular entre a posição de cada ligante e a EPSP sintase nativa é mais estável para o glifosato (mais negativa), seguida dos compostos **2**, **3** e por último do composto **1**. A diferença de energia entre o glifosato e o composto menos estável é de 12,79 kcal/mol. Os substituintes, amina, hidroxila e metila estão voltados, no sítio ativo, na direção dos aminoácidos polares Asp-313, Glu-341 e Arg-344. Comparando os compostos **1**, **2** e **3** no sítio ativo temos que os grupamentos amina e hidroxila interagem melhor com estes aminoácidos do que o grupamento metila (não polar). Este resultado sugere que os compostos **2** e **3** têm uma potência maior que o composto **1** por favorecerem a formação de interações eletrostáticas com a EPSP sintase. Estes dados corroboram com a tendência da constante de inibição, onde o composto mais estável é o glifosato, seguido do substituinte amina, hidroxila e por último, metila.

O glifosato, assim como seus análogos, é bastante flexível na interação com a enzima. A cavidade calculada para a EPSP sintase nativa usando o programa MDV é pequena e foi observado que a cadeia principal de cada

inibidor deve permanecer no interior desta cavidade. Isso nos leva a crer que uma das causas do glifosato ser um potente inibidor é o fato de que ele pode adquirir uma conformação que o possibilita permanecer dentro da cavidade do sítio ativo da mesma maneira que o substrato natural da EPSP sintase, o PEP. Isso pode ser observado na Figura 16. O análogo com o grupamento amina como substituinte (composto **2**, $K_i = 0,61\mu\text{M}$) permanece, em parte, no interior da cavidade, porém substituintes dos análogos, grupamento hidroxila (composto **3**, $K_i = 2,2\mu\text{M}$) e metila (composto **1**, $K_i = 78\mu\text{M}$) permanecem no exterior.

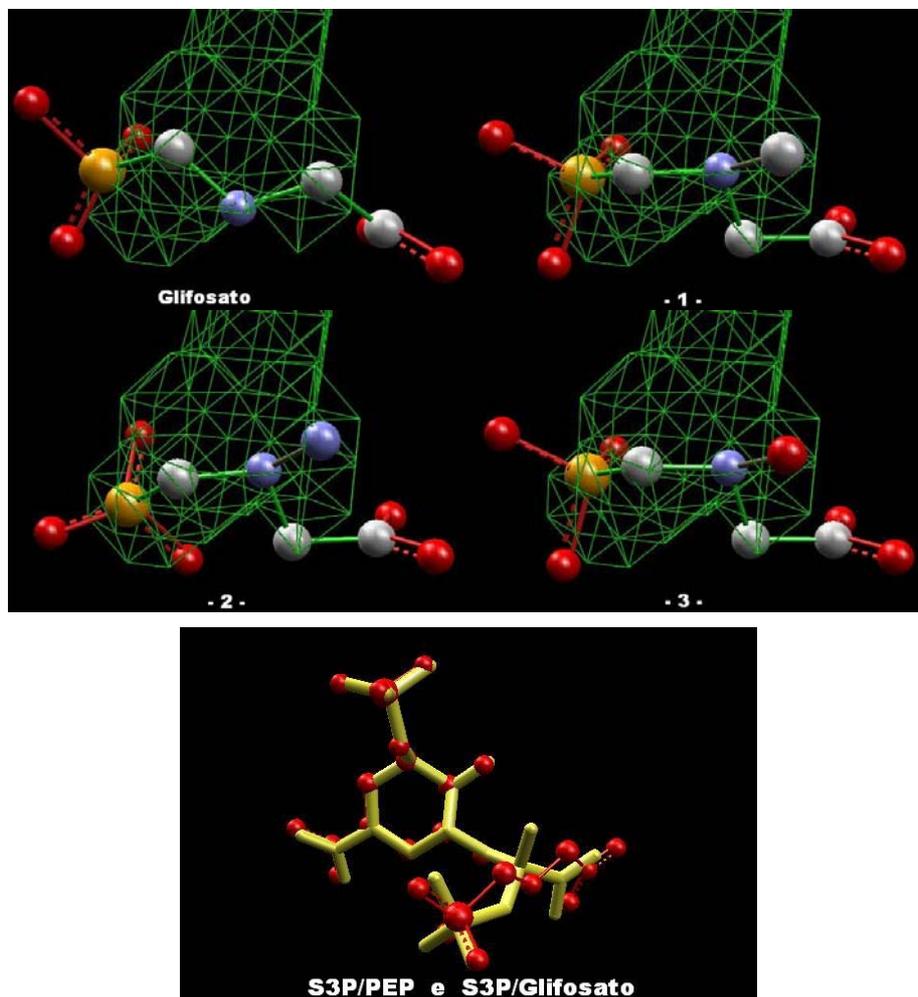


FIGURA 16. Cavidade da EPSP sintase nativa com os inibidores e a sobreposição do S3P/PEP (amarelo) e S3P/Glifosato (vermelho).

5.1.2 EPSP sintase mutante Gli96Ala

Da mesma maneira que para a EPSP sintase nativa o mesmo algoritmo de predição da cavidade baseado em uma caixa 3D foi usado para gerar o sítio

de ligação da EPSP sintase mutante (Gli96Ala) através do programa *MDV*. O volume da cavidade (35,32 Å³) foi um pouco menor que o da nativa.

As energias de interação e de ligação hidrogênio ligante-proteína também foram calculadas para verificar como o resíduo alanina influencia no sítio ativo da EPSP sintase diminuindo a potência do glifosado como herbicida. A Tabela 3 apresenta os aminoácidos que participam destas ligações e os valores energia referentes ao glifosato e a cada um dos análogos.

TABELA 3. Principais ligações hidrogênio (distância em Å e energia em kcal/mol) entre os ligantes e a EPSP sintase mutante. Os valores de energia eletrostática intermolecular (kcal/mol) e de ligação hidrogênio total (kcal/mol).

| Composto | Resíduos | Dist. (Å) | Energia (kcal/mol) | E. Intermol (kcal/mol) | E. ligação hidrog. * (kcal/mol) |
|------------------|----------|-----------|--------------------|------------------------|---------------------------------|
| Glifosato | Lis-22 | 2,75 | -2,50 | | |
| | | 2,89 | -2,50 | | |
| | Asp-49 | 3,33 | -0,96 | | |
| | Ala-96 | -2,65 | -2,50 | | |
| | Arg-100 | - | - | | |
| | Arg-124 | 2,89 | -2,50 | | |
| | | 3,50 | -0,32 | | |
| | Gln-171 | 3,14 | -2,30 | | |
| | | | | -100,88 | -21,65 |
| | Asp-313 | - | - | | |
| | Arg-344 | 2,56 | -2,17 | | |
| | | 2,85 | -1,39 | | |
| | Arg-386 | 3,41 | -0,95 | | |
| | | 2,64 | -1,63 | | |
| Lis-411 | 2,53 | -1,92 | | | |

...continua...

TABELA 3, Cont.

| | | | | | | |
|----------|---------|-------|-------|--------|--------|--------|
| 1 | Lis-22 | 2,56 | -2,15 | | | |
| | | 2,60 | -2,46 | | | |
| | Asp-49 | - | - | | | |
| | Ala-96 | 2,82 | -1,84 | | | |
| | Arg-100 | - | - | | | |
| | Arg-124 | - | - | | | |
| | Gln-171 | - | - | | | |
| | Asp-313 | | | | -96,43 | -16,37 |
| | | 2,38 | -0,05 | | | |
| | Arg-344 | 2,65 | -0,30 | | | |
| | | 2,55 | -2,11 | | | |
| | Arg-386 | 3,04 | -1,11 | | | |
| | | 3,14 | -2,32 | | | |
| | Lis-411 | 3,02 | -1,53 | | | |
| 2,98 | | -2,50 | | | | |
| 2 | Lis-22 | 2,74 | -2,50 | | -24,92 | |
| | | 3,54 | -0,30 | | | |
| | | 2,79 | -2,50 | | | |
| | | 2,94 | -1,73 | | | |
| | Asp-49 | 3,33 | -1,35 | | | |
| | Ala-96 | 2,56 | -2,19 | | | |
| | Arg-100 | - | - | | | |
| | Arg-124 | 3,12 | -2,42 | | | |
| | Gln-171 | 3,36 | -1,21 | -97,05 | | |
| | Asp-313 | 3,00 | -2,50 | | | |
| | | 2,62 | -2,50 | | | |
| | Arg-344 | 3,06 | -2,50 | | | |
| | | 3,28 | -1,39 | | | |
| | Arg-386 | 2,34 | -0,27 | | | |
| 2,59 | | -2,40 | | | | |
| Lis-411 | 2,49 | -1,57 | | | | |

...continua...

TABELA 3, Cont.

| | | | | | |
|----------|---------|-------|-------|--------|--------|
| 3 | Lis-22 | 2,64 | -2,50 | | |
| | | 3,20 | -0,24 | | |
| | | 2,95 | -2,50 | | |
| | Asp-49 | 3,54 | -0,31 | | |
| | Ala-96 | 2,67 | -2,50 | | |
| | Arg-100 | - | - | | |
| | Arg-124 | 3,00 | -2,50 | | |
| | Gln-171 | - | - | | |
| | Asp-313 | 3,00 | -2,50 | -98,04 | -26,33 |
| | Arg-344 | 2,82 | -2,50 | | |
| | | 3,12 | -1,92 | | |
| | | 3,43 | -0,46 | | |
| | Arg-386 | 2,43 | -0,84 | | |
| | | 2,61 | -2,50 | | |
| | Lis-411 | 3,15 | -0,15 | | |
| 2,72 | | -2,50 | | | |

* Energia de ligação hidrogênio total entre ligante e proteína com exceção do S3P.

O glifosato interage com o sítio ativo da EPSP sintase mutante através de ligações hidrogênio que totalizam -21,65 kcal/mol de energia. Com o S3P o glifosato também interage formando quatro ligações hidrogênio. Da mesma maneira que na EPSP sintase nativa o glifosato também forma um “quelato” com o resíduo Lis-22 e o S3P da enzima mutante, como está apresentado na Figura 17. O glifosato adotou um ângulo diedro (C-C1-N-C2) de 101,22°.

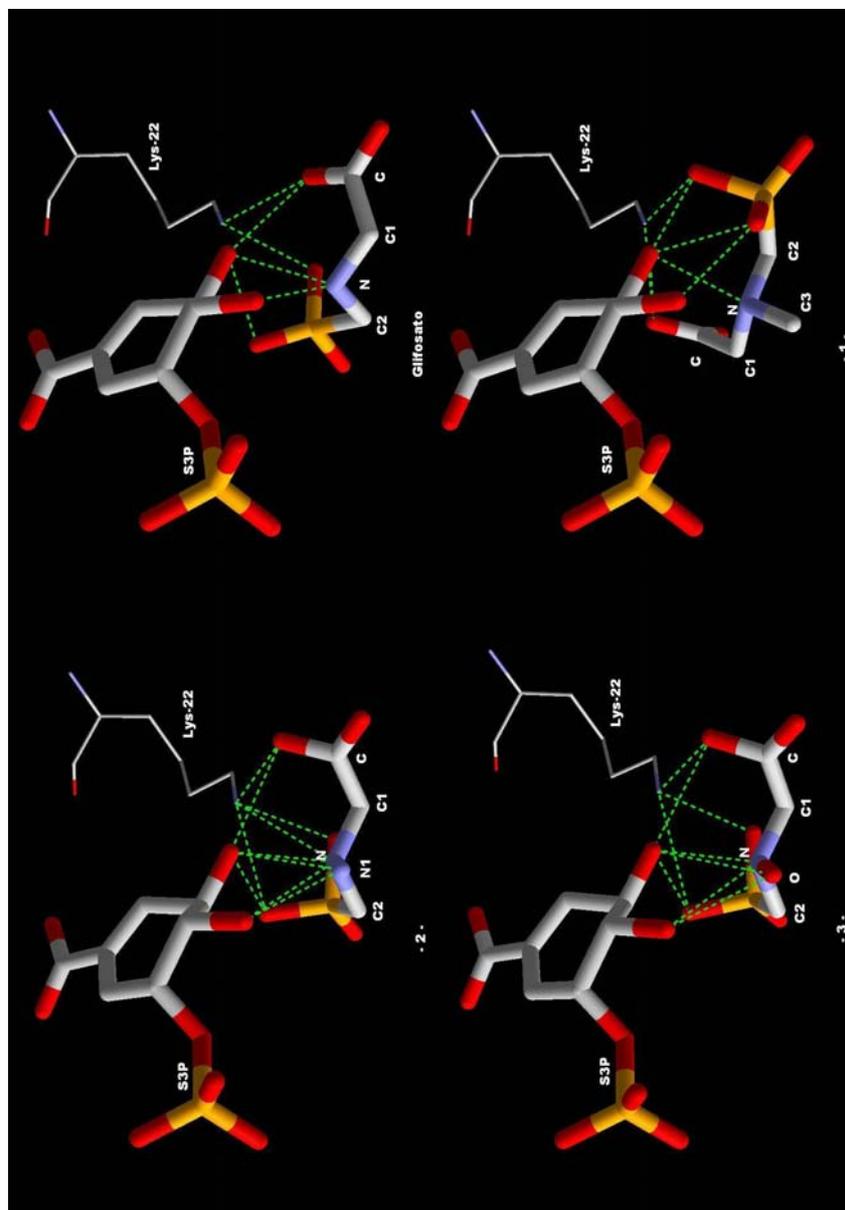


FIGURA 17. Ligações hidrogênio entre o glifosato e os três análogos (1, 2 e 3) com o S3P e o resíduo Lis-22.

O composto **1** interage com a enzima mutante formando apenas dez ligações hidrogênio, de forma que a diferença de energia de ligação hidrogênio total entre este composto e a proteína é de 5,31 kcal/mol a menos que entre o glifosato e a proteína. Contudo, o composto **1** interage com o S3P formando cinco ligações hidrogênio, uma a mais que o glifosato. Na Figura 18 observa-se que na conformação preferencial do composto **1** no sítio ativo da EPSP sintase o grupamento fosfato está direcionado para a região no espaço onde se encontra o grupamento carboxilato no complexo com o glifosato. O composto **1** adotou um ângulo diedro entre os átomos C-C1-N-C2 de 52,83°.

O composto **2** interage com a EPSP sintase mutante através de quinze ligações hidrogênio, três a mais que com o glifosato: uma entre -NH₂ e Asp-313, outra entre o oxigênio do grupamento carboxilato e Asp-313 e a última entre o nitrogênio do grupamento amina e Lis-22. O composto **2** interage com o S3P através de seis ligações hidrogênio fazendo com que o composto **2** adote um ângulo diedro entre os átomos C-C1-N-C2 de 178,52°. O grupamento amina interage com os resíduos Asp-313, e com S3P. A diferença da energia de ligação hidrogênio total entre o composto **2** e o glifosato com a proteína mutante foi de 3,27 kcal/mol.

O composto **3** interage com a EPSP sintase mutante através de quatorze ligações hidrogênio, uma a menos que com o composto **2**. Contudo, a energia de ligação hidrogênio total é superior ao composto **2** em 1,41 kcal/mol. Isto é devido ao fato de algumas ligações hidrogênio serem mais intensas em **3** do que em **2**. O grupamento hidroxila interage com os resíduos Asp-313, Arg-344 e com S3P. O composto **3** interage com o S3P através de seis ligações hidrogênio que fazem com que ele adote um ângulo diedro entre os átomos C-C1-N-C2 de 176,57°. A diferença da energia de ligação hidrogênio total entre o composto **3** e o glifosato com a proteína mutante foi de 4,68 kcal/mol.

Utilizando-se a cadeia principal da EPSP sintase mutante fez-se a sobreposição dos quatro complexos (proteína-ligante) apresentados na Figura 18. A sobreposição dos quatro compostos deixa claro que os compostos **2** e **3** têm ângulos diedros da cadeia principal semelhantes e que o do glifosato (verde, obtida no ancoramento) é diferente da adotada pelos três análogos.

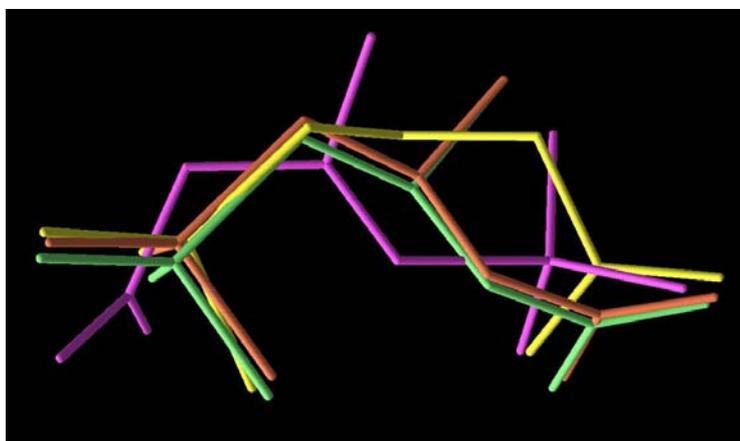


FIGURA 18. Sobreposição do glifosato (amarelo) com os compostos **1** (rosa), **2** (verde) e **3** (laranja). Para uma melhor visualização omitiu-se a proteína.

Na Tabela 3 observa-se que o glifosato interage com a enzima mutante conservando o menor valor de energia, ou seja, maior estabilidade, seguido dos compostos **3**, **2** e, por último, o composto **1**. A diferença de energia entre o glifosato e o composto menos estável é de 4,45 kcal/mol.

Através do ancoramento pode-se observar que os substituintes amina e hidroxila estão voltados, no sítio ativo mutante, na direção dos aminoácidos Asp-313, Lis-340 e Arg-344. O composto **1** está voltado para a cadeia lateral do

resíduo Lis-340, afastando-se dos outros dois aminoácidos que interagem com os compostos **2** e **3**.

A cavidade calculada para a EPSP sintase mutante usando o programa MDV é menor que a nativa. Com exceção do composto **1** todos os outros compostos se posicionaram de forma que o átomo de fósforo permanecesse no interior da cavidade. Da mesma maneira, os substituintes ligados ao átomo de nitrogênio da cadeia principal permaneceram no interior da cavidade. Os átomos C1 e C2 (Figura 2) permaneceram no exterior.

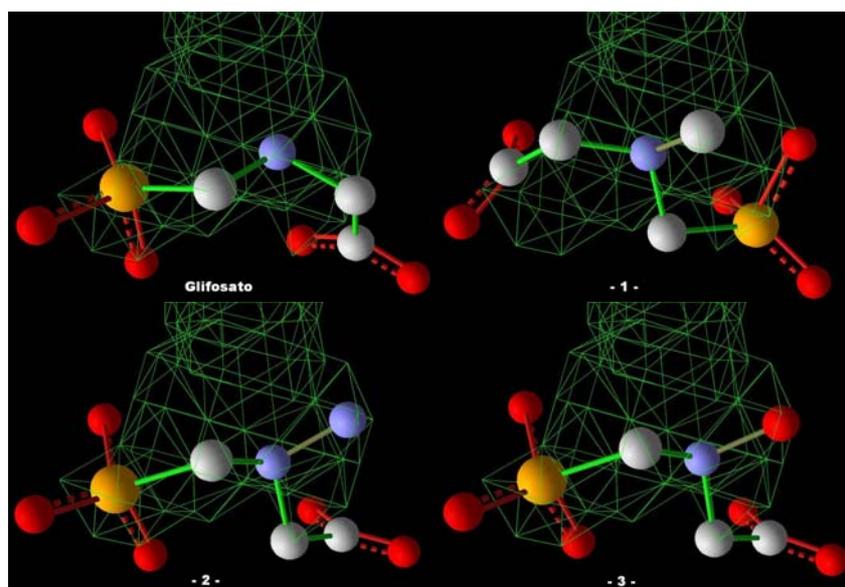


FIGURA 19. Cavidade da EPSP sintase mutante com os inibidores.

5.1.3 Enzima nativa vs mutante

O complexo com maior variação foi o do composto **1** com o substituinte metila, provavelmente por ser o substituinte de maior volume. Nas Figuras 20, 21, 22 e 23 estão representados as sobreposições usando a cadeia principal das proteínas nativa e mutante.

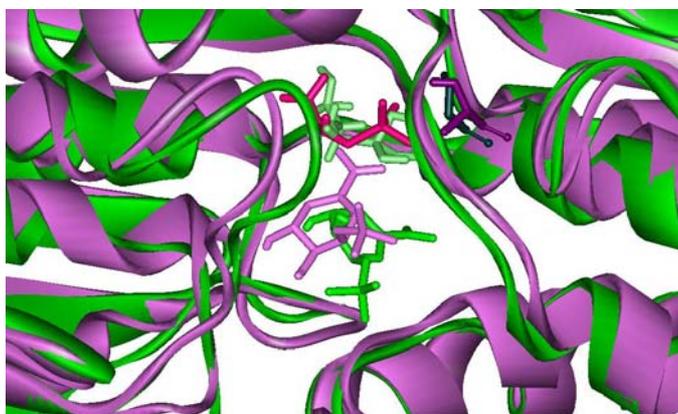


FIGURA 20. EPSP sintase nativa (verde) e mutante (rosa) com glifosato, S3P e os resíduos Gli-96 (verde escuro) e Ala-96 (lilás).

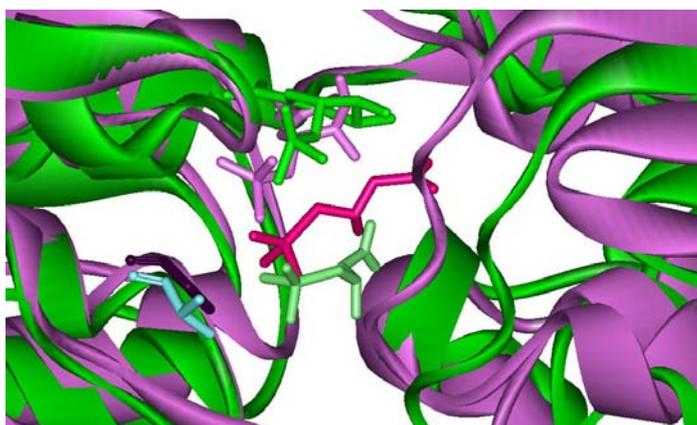


FIGURA 21. EPSP sintase nativa (verde) e mutante (rosa) com o composto 1, S3P e os resíduos Gli-96 (verde escuro) e Ala-96 (lilás).

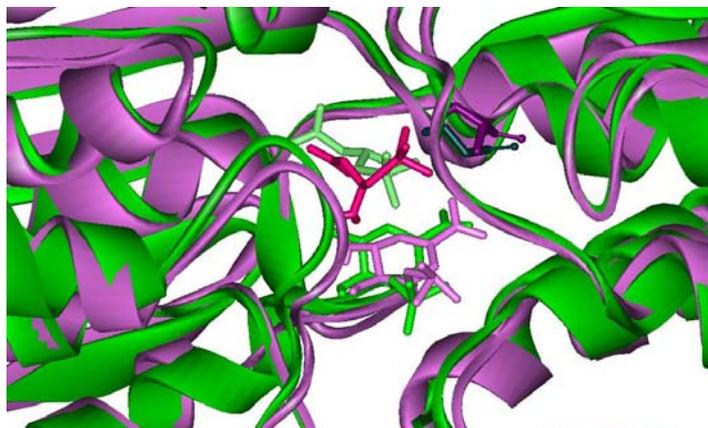


FIGURA 22. EPSP sintase nativa (verde) e mutante (rosa) com o composto **2**, S3P e os resíduos Gli-96 (verde escuro) e Ala-96 (lilás).

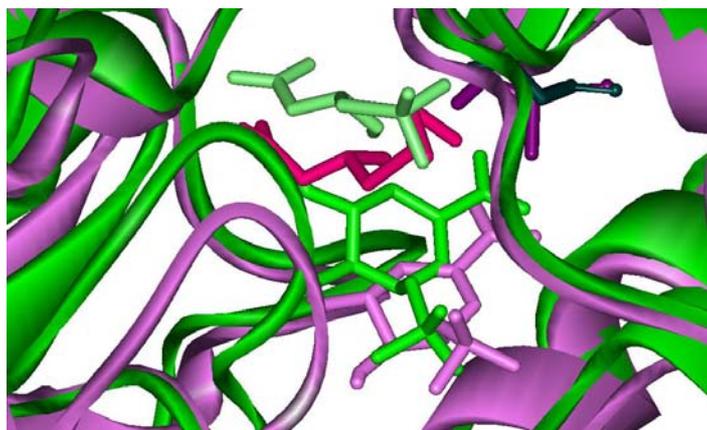


FIGURA 23. EPSP sintase nativa (verde) e mutante (rosa) com o composto **3**, S3P e os resíduos Gli-96 (verde escuro) e Ala-96 (lilás).

Apesar da alanina, o aminoácido mutante, ter sua cadeia lateral maior que da glicina e estar mais próxima dos átomos de oxigênio do grupamento fosfato dos inibidores (com exceção do composto **1**), isto não impede que estes

realizem ligações hidrogênio com a cadeia principal da alanina. Contudo, a maior mudança conformacional ocorreu no lado oposto dos inibidores, onde se encontra o grupamento carboxilato. Acreditamos que, devido às interações do tipo ligações hidrogênio entre o grupamento fosfato e o resíduo Ala-96 (Tabela 3), o glifosato e seus análogos se deslocaram no espaço do sítio ativo (Figuras 20 a 23) para acomodar o grupamento carboxilato, variando esta região dos inibidores para diminuir o impedimento estérico com a proteína.

De acordo com as Tabelas 2 e 3 pôde-se observar um decréscimo na energia de interação entre todos os complexos inibidores- EPSP sintase mutante com relação aos complexos inibidores-EPSP sintase nativa. Com o glifosato esta diferença foi de 14,58 kcal/mol; com o composto **1**, 6,24 kcal/mol; com o composto **2**, 12,82 kcal/mol; e com o composto **3**, 10,66 kcal/mol. A maior diferença de energia de interação foi encontrada para o glifosato, corroborando com os dados de resistência divulgados por Eschenburg *et al.*, onde a concentração mínima do glifosato capaz de inibir 50% da atividade enzimática (IC_{50}) da EPSP sintase da *Escherichia coli* nativa é 0,01 mM e da mutante Gli96Ala >10mM (Eschenburg et al., 2002).

Na enzima nativa a ordem decrescente de estabilidade é: glifosato, seguido dos compostos **2**, **3** e **1**, enquanto que, na enzima mutante a ordem decrescente de estabilidade é: glifosato, seguido dos compostos **3**, **2** e **1**. Este resultado sugere que tanto para a EPSP sintase nativa quanto para a mutante o complexo formado com o glifosato é o mais estável.

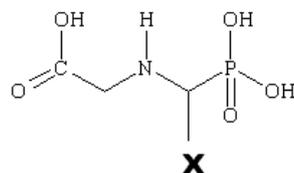
Adicionalmente observou-se que a conformação preferencial do glifosato na enzima nativa é muito similar à conformação do substrato natural da EPSP sintase PEP (Figura 16). Quando ocorreu a modificação do resíduo de aminoácido Gli-96 pelo resíduo de alanina na enzima nativa para formar a enzima mutante observou-se que o ângulo diedro C-C1-N-C2 do glifosato variou de 10,55° na EPSP sintase nativa para 101,22° na mutante. Provavelmente esta

alteração conformacional confere resistência ao glifosato à EPSP sintase. Assim, na EPSP mutante o glifosato se afasta de forma significativa da conformação do substrato natural da enzima e do interior da cavidade do sítio ativo.

Finalmente, com base em nossas observações, acreditamos que compostos que adotem uma conformação que mantenha a maior parte dos seus átomos dentro da cavidade da EPSP sintase nativa poderão ser potentes inibidores.

5.1.4 Novos análogos do glifosato

Foram propostos nove novos análogos com base no estudo anteriormente descrito com substituição não mais do hidrogênio ligado ao nitrogênio na molécula de glifosato, mas a substituição de um hidrogênio do carbono ligado ao grupamento fosfato (Análogos **4** a **12** na Tabela 1 e Figura 24).



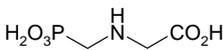
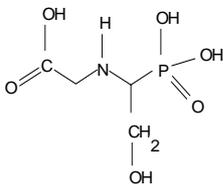
- | | |
|--|-------------------------------|
| 4 X = CH ₂ OH | 9 R = COOH |
| 5 X = CH ₃ | 10 R = OH |
| 6 X = CH ₂ CH ₃ | 11 R = NHOH |
| 7 X = CH ₂ COOH | 12 R = NH ₂ |
| 8 X = CH ₂ NH ₂ | |

FIGURA 24 Modificações propostas na estrutura do glifosato para obtenção dos novos análogos.

5.1.4.1 EPSP sintase nativa

As energias de interação e de ligação hidrogênio ligante-proteína foram calculadas para esses novos análogos observando como eles interagem no sítio ativo da EPSP sintase nativa.

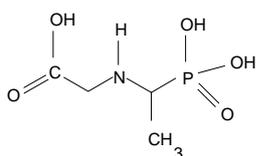
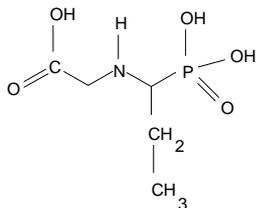
TABELA 4. Principais ligações hidrogênio (distância em Å e energia em kcal/mol) entre glifosato e análogos e a EPSP sintase nativa. Os valores de energia eletrostática intermolecular (kcal/mol) e de ligação hidrogênio total (kcal/mol).

| Composto | Resíduos | Dist. (Å) | Energia (kcal/mol) | E. Intermol. (kcal/mol) |
|---|----------|-----------|--------------------|-------------------------|
|  Glifosato | Lis-22 | 3,11287 | -2,44 | -115,46 |
| | | 3,20518 | -1,97 | |
| | Glu341 | 2,87657 | -2,50 | |
| | Asn-94 | 3,10232 | -2,49 | |
| | Gli-96 | 2,91547 | -1,89 | |
| | Arg-100 | 3,32174 | -0,08 | |
| | Arg-124 | 2,50629 | -1,72 | |
| | | 3,09562 | -1,14 | |
| | Gln-171 | 3,11309 | -0,30 | |
| | | 3,00340 | -1,20 | |
| | Arg-344 | 2,85561 | -2,50 | |
| | | 2,51680 | -1,79 | |
| | Arg-386 | 3,16014 | -2,20 | |
| | 2,69105 | -2,25 | | |
| Lis-411 | 2,71792 | -2,50 | | |
|  4 | Lis-22 | 3,13872 | -2,31 | -132,85 |
| | | 2,73418 | -2,50 | |
| | Gli-96 | 2,63575 | -2,50 | |
| | Arg-100 | 3,17756 | -0,19 | |
| | Arg-124 | 2,54540 | -1,20 | |
| | | 3,26384 | -1,68 | |
| | | 2,92402 | -2,50 | |
| Gln-171 | 3,54650 | -0,27 | | |
| | 2,81536 | -2,00 | | |

...continua...

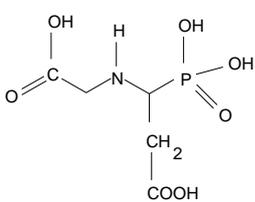
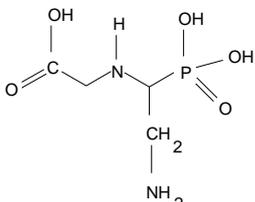
TABELA 4, Cont.

| | | | | |
|--|---------|---------|-------|----------|
| | His-385 | 3,44066 | -0,80 | |
| | Glu 341 | 3,28371 | -1,58 | |
| | Arg-344 | 2,94844 | -2,23 | |
| | | 2,88479 | -2,50 | |
| | Arg-386 | 2,58700 | -1,98 | |
| | | 3,57754 | -0,07 | |
| | | 3,40943 | -0,94 | |
| | Lis-411 | 3,00440 | -2,50 | |
| | Lis-22 | 3,13872 | -2,31 | |
| | | 2,73418 | -2,50 | |
| | Gli-96 | 2,63575 | -2,50 | |
| | Arg-100 | 3,17756 | -0,19 | |
| | Arg-124 | 2,92402 | -2,50 | |
| | | 3,26384 | -1,68 | |
| | | 2,54540 | -1,20 | |
| | Gln-171 | 3,54650 | -0,27 | |
| | | 2,81536 | -2,00 | |
| | His 385 | 3,44066 | -0,80 | -119, 31 |
| | Glu-341 | 3,28371 | -1,58 | |
| | Arg-344 | 2,88479 | -2,50 | |
| | | 2,94844 | -2,23 | |
| | Arg-386 | 3,40943 | -0,94 | |
| | | 3,57754 | -0,07 | |
| | | 2,58700 | -1,98 | |
| | Lis-411 | 3,00440 | -2,50 | |
| | Lis-22 | 3,15894 | -2,21 | |
| | | 3,05846 | -2,50 | |
| | Thr -97 | 3,37915 | -0,71 | |
| | Gli-96 | 2,78802 | -1,93 | |
| | Arg-124 | 3,13764 | -1,16 | |
| | | 3,14323 | -2,28 | |
| | Gln-171 | 2,81046 | -2,50 | |
| | Glu-341 | 2,99424 | -2,31 | -116, 85 |
| | Arg-344 | 2,56502 | -2,07 | |
| | | 2,75720 | -2,50 | |
| | Arg-386 | 3,01320 | -2,50 | |
| | | 2,86372 | -2,20 | |
| | Lis-411 | 2,82301 | -2,50 | |

**5****6**

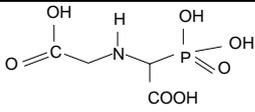
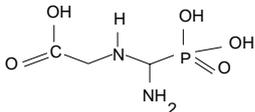
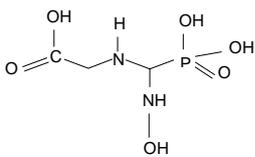
...continua...

TABELA 4, Cont.

| | | | | | |
|---|---------|---------|---------|----------|--|
|  <p style="text-align: center;">7</p> | Lis-22 | 2,84525 | -2,50 | | |
| | | | 2,99823 | -2,50 | |
| | Lis-340 | 3,21977 | -1,90 | | |
| | Glu-341 | 2,75274 | -1,06 | | |
| | Asp-313 | 3,06501 | -2,50 | | |
| | Arg-386 | 2,73627 | -2,50 | | |
| | | 2,71175 | -1,66 | | |
| | Arg-344 | 2,53964 | -2,00 | | |
| | | 2,82314 | -1,80 | | |
| | Thr-97 | 3,08190 | -0,66 | -143, 96 | |
| | Gln-171 | 2,69750 | -2,50 | | |
| | | 2,95497 | -2,50 | | |
| | Arg-100 | 3,09329 | -1,65 | | |
| | Asp-49 | 3,24687 | -1,77 | | |
| | Lis-411 | 3,31434 | -0,611 | | |
| | 3,06070 | -2,50 | | | |
| Gli-96 | 2,83078 | -2,32 | | | |
| Arg-124 | 3,14903 | -2,25 | | | |
| | 2,48674 | -1,56 | | | |
|  <p style="text-align: center;">8</p> | Lis-22 | 3,03434 | -2,50 | | |
| | Asp-49 | 3,14430 | -2,28 | | |
| | Glu-341 | 3,05712 | -2,50 | | |
| | Arg-344 | 2,57222 | -2,27 | | |
| | | 2,46575 | -1,14 | | |
| | Arg-386 | 3,01275 | -2,03 | | |
| | | 3,14056 | -2,30 | | |
| | Asp-313 | 2,87140 | -2,50 | -92, 69 | |
| | Gln-171 | 2,34416 | -0,05 | | |
| | Arg-100 | 3,49037 | -0,02 | | |
| | Gli-96 | 3,23810 | -0,35 | | |
| | Arg-124 | 2,58266 | -2,36 | | |
| | 3,40453 | -0,52 | | | |
| <td>Lis-22</td> <td>2,98881</td> <td>-2,50</td> <td></td> | Lis-22 | 2,98881 | -2,50 | | |
| | | 2,70389 | -2,50 | | |
| | Arg-344 | 2,49400 | -1,62 | | |
| | | 2,77761 | -1,75 | | |
| | Arg-386 | 2,80667 | -1,50 | -132,49 | |
| | | 2,79560 | -2,50 | | |
| | Asp-313 | 3,13147 | -2,34 | | |
| | Asp-49 | 3,16924 | -2,15 | | |
| | Thr-97 | 2,93900 | -0,66 | | |

...continua...

TABELA 4, Cont.

| | | | | | |
|--|----------|---------|---------|----------|--|
|  <p style="text-align: center;">9</p> | Gli-96 | 2,83847 | -2,50 | | |
| | Gln-171 | 3,25843 | -1,71 | | |
| | | 2,72123 | -2,50 | | |
| | Arg-124 | 2,43752 | -1,15 | | |
| | | 3,35966 | -1,20 | | |
| | | 2,72336 | -2,50 | | |
| | Lis-411 | 3,21028 | -1,26 | | |
| | | 3,16887 | -2,16 | | |
| <hr/> | | | | | |
|  <p style="text-align: center;">10</p> | Lis-22 | 2,88742 | -2,50 | | |
| | | | 3,34588 | -1,27 | |
| | Asp-313 | 2,89382 | -2,50 | | |
| | Arg-386 | 2,71318 | -1,53 | | |
| | | 2,91465 | -2,50 | | |
| | Arg-344 | 2,97565 | -1,61 | | |
| | | 2,56496 | -2,21 | | |
| | Asn-94 | 3,13566 | -2,32 | | |
| | Lis-411 | 2,89238 | -2,50 | | |
| | Arg- 124 | 2,97355 | -2,50 | -127, 14 | |
| | | 2,55470 | -2,12 | | |
| | Thr-97 | 3,49077 | -0,30 | | |
| | Gli-96 | 2,83918 | -2,46 | | |
| | Gln-171 | 3,25432 | -0,64 | | |
| | 3,13531 | -1,39 | | | |
| <hr/> | | | | | |
|  <p style="text-align: center;">11</p> | Lis-22 | 3,03217 | -2,50 | | |
| | | | 2,83792 | -2,50 | |
| | Asp-313 | 3,14348 | -2,28 | | |
| | Arg-386 | 2,78534 | -1,43 | | |
| | | 2,85214 | -2,50 | | |
| | Gln-171 | 3,01200 | -2,50 | | |
| | | 2,63000 | -2,50 | | |
| | Thr-97 | 3,09088 | -0,63 | -128,63 | |
| | Gli-96 | 2,78095 | -2,50 | | |
| | Arg-344 | 2,43873 | -1,16 | | |
| | | 2,72217 | -1,71 | | |
| | Lis-411 | 3,32993 | -0,61 | | |
| | | 3,15310 | -2,01 | | |
| Asp-49 | 3,23014 | -1,85 | | | |
| Arg-124 | 3,18423 | -2,08 | | | |
| | 2,54775 | -2,06 | | | |

...continua...

TABELA 4, Cont.

| | | | | | |
|--|---------|---------|---------|---------|--|
| <p style="text-align: center;">12</p> | Lis-22 | 2,98421 | -2,50 | | |
| | | | 2,73790 | -2,50 | |
| | Glu-341 | 2,76197 | -2,50 | | |
| | | | 2,64487 | -1,51 | |
| | Asp-313 | 2,95795 | -2,50 | | |
| | Arg-386 | 2,82952 | -2,50 | | |
| | | | 2,75808 | -1,50 | |
| | Arg-344 | 2,89147 | -1,65 | | |
| | | | 2,46780 | -1,40 | |
| | Gln-171 | 2,73183 | -2,50 | -124,39 | |
| | Gli-96 | 2,73023 | -2,50 | | |
| | Arg-124 | 3,24851 | -0,37 | | |
| | | | 2,82045 | -2,50 | |
| | | | 3,25856 | -0,27 | |
| | | 3,23377 | -1,83 | | |
| Asn-94 | 3,15079 | -2,25 | | | |
| Lis-411 | 2,80370 | -2,50 | | | |

Comparando os valores de energia intermolecular obtidos (Tabela 4) podemos observar que quase todos os compostos apresentam um valor de energia menor que o glifosato, ou seja, são mais estáveis no sítio ativo da enzima. Apenas o análogo **8** é menos estável que o glifosato.

A diferença de energia entre o composto **7** e o glifosato é de 28,50 kcal/mol. Esse composto mostrou-se o mais estável quando comparado aos demais análogos. Este análogo faz quatro ligações hidrogênio a mais que o glifosato. Os resíduos de aminoácidos ligantes do sítio ativo da enzima são parecidos para os dois compostos exceto pelos resíduos Lis-340, Asp-313, Thr-97 e Asp-49 que se ligam apenas ao análogo **7** e o resíduo Asn-94 que liga-se apenas ao glifosato.

O análogo **8** apresenta uma diferença energética de 22,77 kcal/mol para o glifosato sendo o único análogo que não apresentou valor de energia menor que

a energia encontrada para o glifosato. Esse análogo faz 13 ligações hidrogênio, duas a menos que o glifosato.

Os análogos **4**, **5**, **9** e **12** fazem todos 17 ligações hidrogênio, duas a mais que o glifosato. Os análogos **4** e **5** fazem ligações hidrogênio com os mesmos resíduos de aminoácidos mas com diferentes valores de energia e diferentes distâncias de ligação. Diferem-se do glifosato fazendo uma ligação a mais com Arg-124 e com Arg-386 além de ligarem-se a His-385 enquanto o glifosato liga-se a Asn-94. Apesar de fazerem ligação hidrogênio com os mesmos resíduos de aminoácido apresentam uma diferença de energia de 13,54 kcal/mol. Os análogos **4** e **9** apresentam a menor diferença de energia entre si, 0,36 kcal/mol. O análogo **9** difere do glifosato ligando-se aos resíduos Asp-313, Asp-49, Thr-97 e fazendo uma ligação a mais com Arg-124 e Lis-411. Os resíduos de Arg-100, Glu-341 e Asn-94 ligam-se apenas ao glifosato. Os resíduos de aminoácido que diferem nas ligações hidrogênio entre o análogo **12** e o glifosato são Asp-313, Arg-124, fazendo duas ligações hidrogênio a mais que o glifosato e Glu-341 fazendo uma ligação hidrogênio a mais que o glifosato. Além disso não há ligação hidrogênio do composto **12** com Gln-171 e Arg-100.

Assim como o glifosato, o composto **10** faz 15 ligações hidrogênio mas apresenta uma diferença de energia de 11,68 kcal/mol. Os resíduos de aminoácidos Arg-100 e Glu-341 ligam-se apenas com o glifosato enquanto Asp-313 e Thr-97 ligam-se apenas ao composto **10**.

Apesar dos análogos **6** e **8** formarem o mesmo número de ligações hidrogênio (13) a diferença de energia entre esses composto é de 24,16 kcal/mol. O composto **8** é o menos estável dos análogos e o único com maior energia intermolecular quando comparado ao glifosato. Os resíduos de aminoácidos Thr-97 e Lis-411 ligam-se apenas ao composto **6** enquanto Asp-49, Asp-313 e Arg-100 ligam-se apenas ao composto **8** que faz também uma ligação hidrogênio a menos com a Lis-22.

O composto **11** faz uma ligação hidrogênio a mais que o glifosato e apresenta uma diferença de energia comparada ao glifosato de 13,17 kcal/mol. Os resíduos de aminoácido Asn-94, Arg-100 e Glu-341 fazem ligação hidrogênio apenas com o glifosato enquanto Asp-313, Thr-97, Asp-49 ligam-se apenas ao análogo **11**, fazendo este também uma ligação hidrogênio a mais com o resíduo Lis-411.

Como já mencionado no estudo de docking anterior o glifosato faz ligação hidrogênio com a Lis-22 formando uma espécie de quelato que controla o ângulo diedro adotado pelos compostos. Outro importante detalhe molecular é que o glifosato possui o seu átomo de nitrogênio fazendo ligação hidrogênio com o resíduo de aminoácido Gli96 (Figura 25). Os análogos **4**, **6**, **7** e **12**, assim como o glifosato, fazem duas ligações hidrogênio com Lis-22 e tem o átomo de nitrogênio fazendo uma ligação hidrogênio com o resíduo de aminoácido Glu-341 em vez do resíduo Gli-96.

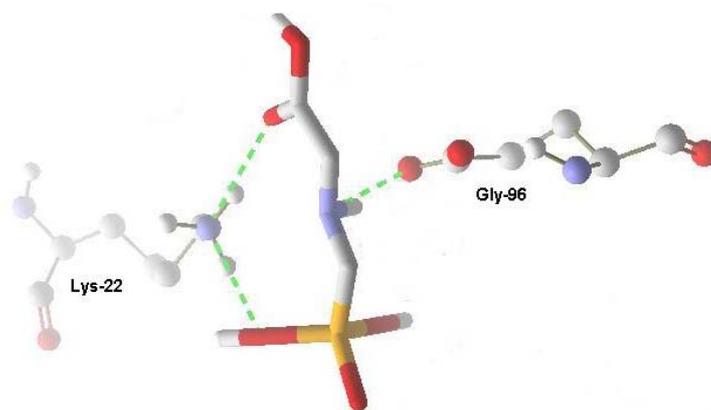


FIGURA 25. Glifosato apresenta o átomo de nitrogênio fazendo ligação hidrogênio com Gli-96 e tem o ângulo diedro controlado pelas ligações com Lis-22.

Diferente do glifosato, os compostos **5**, **9**, **10** e **11** não possuem o seu átomo de nitrogênio formando ligação hidrogênio com qualquer resíduo de aminoácido e possuem apenas as duas ligações hidrogênio com Lis-22 direcionando o ângulo diedro (Figura 26).

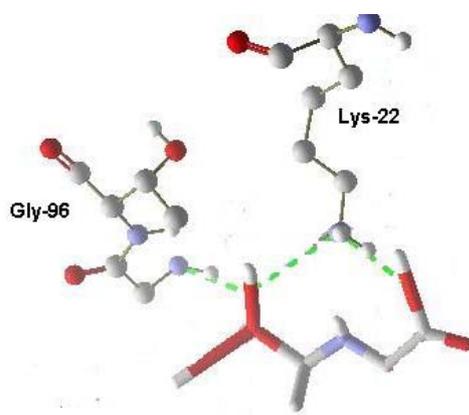


FIGURA 26. Análogo **5** difere do glifosato por não ter o nitrogênio fazendo ligações hidrogênio.

O análogo **8**, exclusivamente, não faz duas ligações hidrogênio com o resíduo de aminoácido Lis-22. Faz apenas uma ligação hidrogênio (Figura 27). Talvez esse fato possa explicar a menor estabilidade e o maior valor de energia de interação proteína-ligante desse composto frente ao glifosato e demais análogos, uma vez que essas ligações com Lis-22 controlam o ângulo diedro adotado pelos compostos. Esse composto adota uma conformação bastante diferente do glifosato no sítio ativo da enzima EPSP sintase.

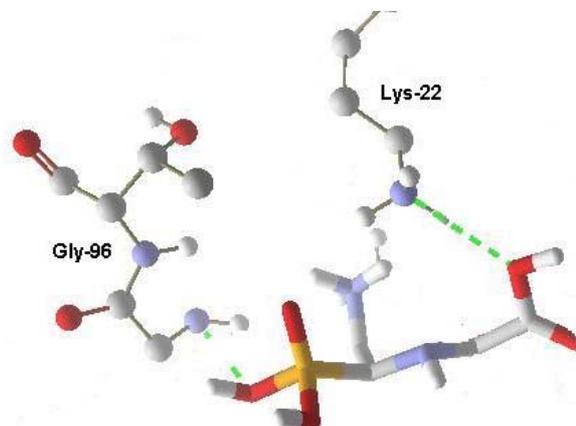
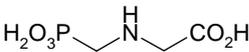
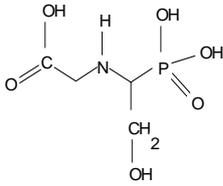
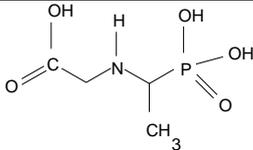


FIGURA 27. Análogo **8** faz apenas uma ligação hidrogênio com o resíduo de aminoácido Lis-22.

5.1.4.2 EPSP sintase mutante Gli96Ala

As energias de interação e de ligação hidrogênio ligante-proteína foram calculadas também para os novos análogos na enzima mutante Gli96Ala (Tabela 5) para assim observarmos se esta enzima é insensível a esses novos compostos como é ao glifosato. Dessa forma poderemos entender melhor quais são as variações entre os modos de ligações dos compostos no sítio ativo da enzima para acomodar essa mutação.

TABELA 5. Principais ligações hidrogênio (distância em Å e energia em kcal/mol) entre os ligantes e a EPSP sintase mutante Gli96Ala. Os valores de energia eletrostática intermolecular (kcal/mol) e de ligação hidrogênio total (kcal/mol).

| Composto | Resíduos | Dist. | Energia | E. Intermol. | |
|---|----------|---------|---------|--------------|-------|
|  Glifosato | Lis-22 | 3,12377 | -2,38 | -100,88 | |
| | | | 3,08851 | | -2,50 |
| | Glu-341 | 2,86050 | -1,81 | | |
| | Ala-96 | 3,21200 | -1,94 | | |
| | Arg-100 | 3,28159 | -0,36 | | |
| | Arg-124 | 2,45793 | -0,97 | | |
| | | 2,70596 | -2,36 | | |
| | Gln-171 | 2,78560 | -2,50 | | |
| | Arg-344 | 2,90984 | -0,73 | | |
| | | 2,39561 | -0,80 | | |
| | Arg-386 | 2,61755 | -2,50 | | |
| | Asp-313 | 2,86607 | -2,50 | | |
| | Lis-411 | 3,08601 | -2,50 | | |
|  4 | Lis-22 | 2,61370 | -2,50 | -108,98 | |
| | | 2,20955 | 0,79 | | |
| | Ala-96 | 2,82219 | -1,90 | | |
| | Asn-94 | 3,18900 | -2,05 | | |
| | Arg-124 | 3,36531 | -1,17 | | |
| | | 2,54742 | -0,60 | | |
| | Gln-171 | 2,67684 | -2,50 | | |
| | His-385 | 3,05722 | -2,50 | | |
| | Glu-341 | 3,49114 | -0,53 | | |
| | Arg-344 | 3,14471 | -1,23 | | |
| | | 2,62942 | -2,50 | | |
| | Arg-386 | 2,74340 | -1,43 | | |
| | | 3,33965 | -1,30 | | |
| Asp-49 | 3,40704 | -0,96 | | | |
| Lis-411 | 2,99518 | -2,50 | | | |
| | 2,77186 | -2,50 | | | |
|  | Lis-22 | 2,35687 | -0,47 | -88,07 | |
| | | 3,12269 | -2,39 | | |
| | Ala-96 | 2,71043 | -2,38 | | |
| | Arg-124 | 3,01463 | -2,50 | | |
| | Gln-171 | 2,50505 | -1,71 | | |

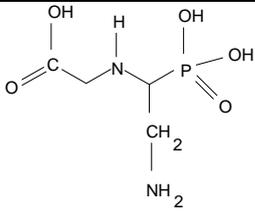
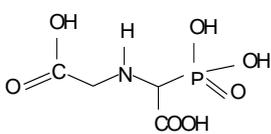
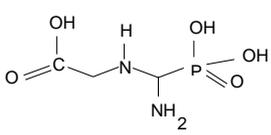
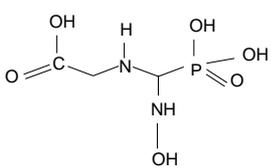
...continua...

TABELA 5, Cont.

| | | | | |
|----------|---------|---------|-------|--------|
| 5 | His-385 | 3,19759 | -2,01 | |
| | Glu-341 | 3,41458 | -0,93 | |
| | Arg-344 | 2,21913 | 0,70 | |
| | | 2,83080 | -0,04 | |
| | Arg-386 | 3,03759 | -2,50 | |
| | Lis-411 | 2,56226 | -0,58 | |
| | 2,97012 | -2,50 | | |
| 6 | Lis-22 | 3,17941 | -2,10 | |
| | | 2,57693 | -2,31 | |
| | His-385 | 2,77678 | -2,50 | |
| | Ala-96 | 2,72149 | -1,80 | |
| | Arg-124 | 3,13624 | -2,32 | |
| | | 2,96932 | -2,50 | |
| | Gln-171 | 2,25645 | 0,38 | |
| | Glu-341 | 3,50229 | -0,43 | -92,86 |
| | | 2,63683 | -2,00 | |
| | Arg-344 | 2,43272 | -1,11 | |
| | Arg-386 | 2,57989 | -2,33 | |
| | Lis-411 | 3,38283 | -1,09 | |
| Asp-49 | 3,36187 | -1,19 | | |
| Thr-97 | 3,53613 | -0,01 | | |
| 7 | Lis-22 | 2,65035 | -0,78 | |
| | Glu-341 | 2,54861 | -1,91 | |
| | | 3,11273 | -2,44 | |
| | Arg-386 | 2,55263 | -0,55 | |
| | | 2,83445 | -2,50 | |
| | Arg-344 | 2,37733 | -0,61 | -98,99 |
| | Thr-97 | 3,51301 | -0,32 | |
| | Gln-171 | 1,84388 | 3,97 | |
| | Asp-49 | 2,80367 | -2,50 | |
| | Lis-411 | 2,36061 | -0,51 | |
| Ala-96 | 2,80093 | -2,50 | | |
| | Lis-22 | 2,70103 | -2,50 | |
| | | 3,27875 | -1,61 | |
| | Glu-341 | 2,71092 | -1,71 | |
| | | 2,94801 | -2,50 | -94,56 |
| | Arg-344 | 2,86974 | -2,00 | |
| | Arg-386 | 2,69723 | -2,50 | |
| | 3,32436 | -1,38 | | |

...continua...

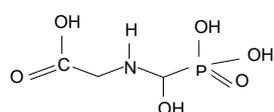
TABELA 5, Cont.

| | | | | |
|--|-------------|---------|-------|----------|
|  <p style="text-align: center;">8</p> | His-385 | 2,51925 | -1,31 | |
| | Gln-171 | 2,71701 | -2,50 | |
| | Lis-411 | 2,60310 | -2,50 | |
| | Ala-96 | 2,78728 | -2,50 | |
| | Arg-124 | 2,77425 | -2,50 | |
| | Arg-124 | 3,51455 | -0,39 | |
| <hr/> | | | | |
|  <p style="text-align: center;">9</p> | Lis-22 | 3,42218 | -0,89 | |
| | Arg-344 | 2,91199 | -2,50 | |
| | Arg-386 | 2,58000 | -2,33 | |
| | Asp-49 | 3,04607 | -2,50 | |
| | Thr-97 | 2,92485 | -2,50 | |
| | Ala-96 | 3,15911 | -2,20 | |
| | Gln-171 | 3,15087 | -0,58 | |
| | Arg-124 | 2,85421 | -2,45 | -104, 78 |
| | Arg-124 | 2,60655 | -2,50 | |
| | Arg-124 | 2,49816 | -1,65 | |
| | Arg-124 | 3,12288 | -2,39 | |
| Arg-124 | 2,55139 | -2,09 | | |
| Glu-341 | 3,21070 | -1,95 | | |
| Lis-411 | 3,08286 | -2,50 | | |
| Lis-411 | 3,37658 | -0,28 | | |
| <hr/> | | | | |
|  <p style="text-align: center;">10</p> | Lis-22 | 3,18325 | -1,19 | |
| | Arg-386 | 2,81467 | -2,50 | |
| | Arg-386 | 2,93930 | -2,50 | |
| | Arg-344 | 2,61232 | -2,40 | |
| | Arg-344 | 2,75474 | -2,50 | |
| | Lis-411 | 3,00975 | -2,50 | |
| | Arg-124 | 2,84921 | -2,50 | |
| | Arg-124 | 2,68621 | -2,50 | -117, 74 |
| | Arg-124 | 3,35304 | -1,13 | |
| | Glu-341 | 2,85575 | -2,50 | |
| Glu-341 | 2,79041 | -2,50 | | |
| Ala-96 | 2,72920 | -2,45 | | |
| Gln-171 | 2,72920 | -2,45 | | |
| Gln-171 | 3,15338 | -2,23 | | |
| <hr/> | | | | |
|  | Lis-22 | 3,26869 | -1,66 | |
| | Asp-313 (1) | 2,78303 | -2,50 | |
| | Arg-386 (2) | 2,88944 | -2,50 | -97, 44 |
| | Arg-386 (2) | 3,02113 | -2,50 | |
| | Gln-171 (1) | 2,61932 | -2,07 | |
| Gln-171 (1) | 2,49381 | -1,62 | | |

...continua...

TABELA 5, Cont.

| | | | | |
|-----------|-------------|---------|-------|--------|
| 11 | Glu-341 (1) | 3,12574 | -2,25 | |
| | Ala-96 (1) | 2,90842 | -2,50 | |
| | Arg-344 (2) | 2,49162 | -1,45 | |
| | | 2,76025 | -2,50 | |
| | Lis-411 (1) | 3,12312 | -2,38 | |
| | Arg-124 (2) | 2,83238 | -2,50 | |
| | | 1,57423 | 6,31 | |
| | Lis-22 | 3,12445 | -2,38 | |
| | | 2,91234 | -1,57 | |
| | | 3,12683 | -0,12 | |
| 12 | Glu-341 | 3,54022 | -0,30 | |
| | Asp-313 | 2,61297 | -2,50 | |
| | Arg-386 | 2,94240 | -1,86 | |
| | | 3,01957 | -2,50 | |
| | Arg-344 | 2,58630 | -1,78 | |
| | | 2,49944 | -1,66 | |
| | Gln-171 | 2,83813 | -2,50 | -89,07 |
| | Ala-96 | 2,35739 | -0,21 | |
| | Arg-124 | 3,55859 | -0,21 | |
| | | 3,47232 | -0,64 | |
| | | 3,28980 | -0,45 | |
| | Thr-97 | 3,42705 | -0,38 | |
| | Lis-411 | 2,73067 | -2,50 | |
| Asp-49 | 3,23752 | -1,81 | | |



Analisando a Tabela 5 verifica-se que apenas os análogos **4**, **9** e **10** são (?) estáveis que o glifosato. Os demais apresentaram valores de energia de interação com a proteína maior que o valor de energia encontrado para o glifosato. O composto **10**, o mais estável, apresenta uma diferença de 16,86 kcal/mol de energia em relação ao glifosato e uma diferença de 12,96 kcal/mol para o análogo **9**.

Enquanto o análogo **10** faz 13 ligações hidrogênio, assim como o glifosato, o análogo **9** faz 15 ligações hidrogênio, duas a mais que o composto mais estável e o glifosato. O glifosato faz as mesmas ligações hidrogênio que o

análogo **10** exceto pelo fato de Asp-313 e Arg-100 ligarem-se apenas ao glifosato e Lis-22 e Arg-386 fazerem uma ligação a mais com análogo **10**. O composto **9**, diferente do glifosato, liga-se a Asp-49 e Thr-97, faz uma ligação a mais que o glifosato com Arg-124, Arg-386 e Lis-411 e uma ligação a menos com Arg-344.

Os compostos **8** e **11** fazem ligações hidrogênio semelhantes ao o glifosato e o composto **10** (13 ligações hidrogênio), mas a diferença de energia do glifosato para o análogo **8** é de 6,32 kcal/mol e para o análogo **11**; 3,44 kcal/mol. Os resíduos de aminoácido Asp-313 e Arg-100 ligam-se apenas ao glifosato enquanto para o composto **8** há uma ligação a mais com Glu-341 e Arg-386 e uma ligação a menos que Arg-124 e His-385 que ligam-se apenas ao composto **8** e não ao glifosato. Comparando o glifosato e o composto **11** temos como diferença apenas Arg-100 que faz ligação hidrogênio apenas com glifosato e uma ligação hidrogênio a mais com Arg-386 para o composto **11**.

Fazendo 12 ligações hidrogênio, uma a menos que o glifosato, temos os análogos **5** e **7**. A diferença de energia entre esses dois análogos é de 10,92 kcal/mol. O glifosato difere do análogo **7** por 1,89 kcal/mol e do composto **5** por 12,81 kcal/mol. Os resíduos de aminoácido Arg-100 e Asp-313 ligam-se apenas ao glifosato quando comparados com os análogos em questão. Asp-49 e Thr-97 fazem ligação hidrogênio apenas com o análogo **7** além de fazer um ligação hidrogênio a mais com Glu-341, Arg-386 e uma ligação hidrogênio a menos com Arg-344, Lys-22 e Arg-124 quando comparado ao glifosato. As diferenças entre o análogo **5** e o glifosato estão também no fato de que este composto faz uma ligação com His-385, uma ligação hidrogênio a mais com Arg-386 e uma ligação hidrogênio a menos com Arg-124.

Os compostos que fazem o maior número de ligações hidrogênio com o sítio ativo da enzima mutante são **4** e **12** formando 17 e 16 ligações hidrogênio, respectivamente. O composto **4** mostrou-se mais estável que o glifosato por uma

diferença de energia de 8,10 kcal/mol e a diferença energética entre esses dois análogos é de 19,91 kcal/mol sendo que o composto **12** é menos estável que o glifosato e o composto **4**. Diferindo as ligações hidrogênio entre o glifosato e o análogo **4** estão os resíduos de aminoácido Asp-313 e Arg-100 que ligam-se apenas ao glifosato. Asn-94, Asp-49 e His-385 ligam-se apenas ao análogo **4**, além deste análogo fazer uma ligação hidrogênio a mais com Lis-411 e Arg-386. Quando comparamos o glifosato e o análogo **12** podemos verificar que este liga-se exclusivamente a Arg-100. Thr-97 e Asp-49 e ligam-se somente ao análogo **12** além do análogo ligar-se por uma itegração hidrogênio a mais com Arg-386, Lis-22 e Arg-124.

O análogo **6** forma 14 ligações hidrogênio, uma a mais que o glifosato. A diferença energética entre esses compostos é de 8,02 kcal/mol sendo o glifosato o mais estável dos dois. Como para a maioria dos demais análogos o glifosato difere ligando-se a dois resíduos de aminoácidos com os quais a maioria dos novos análogos não se ligam, Asp-313 e Arg-100. Já o composto **6** liga-se com os mesmos resíduos de aminoácido do glifosato, porém liga-se também a His-385, Asp-49 e Thr-97. Faz também uma ligação hidrogênio a mais com Glu-341 e uma ligação hidrogênio a menos com Arg-344.

Assim como na enzima nativa, na enzima mutante Gli96Ala, os compostos também fazem duas ligações hidrogênio com a Lis-22 mimetizando um quelato que direciona o ângulo diedro adotado por esses compostos, exceto o análogo **7** que faz apenas uma ligação hidrogênio com Lis-22 e os análogos **10** e **12** que fazem não duas, mas três ligações hidrogênio com este resíduo de aminoácido.

Na enzima nativa o átomo de nitrogênio na estrutura do glifosato está ligado ao resíduo de aminoácido Gli-96. Como este resíduo de aminoácido foi substituído pela Ala que possui na cadeia lateral um grupo metila, por impedimentos espaciais na enzima mutante, o átomo de nitrogênio

preferencialmente se liga ao Glu-341. Também diferente da enzima nativa onde grande parte dos compostos, assim como o glifosato, possuíam o seu átomo de nitrogênio formando ligação hidrogênio com o resíduo de aminoácido do sítio ativo da enzima Glu-341, na enzima mutante apenas os análogos **6** e **11** possuem os seus átomos de nitrogênio formando ligação hidrogênio.

Os valores de energia intermolecular proteína-ligante para o glifosato e os análogos sofreram um decréscimo na enzima mutante Gli96Ala em relação à enzima nativa (Tabelas 4 e 5). Apenas um dos nossos novos análogos propostos não foi mais estável que o glifosato no sítio ativo da enzima nativa, enquanto para enzima mutante apenas três análogos apresentaram energia intermolecular menor que a energia do glifosato. Mas, apesar disso, os cálculos realizados sugerem que os análogos propostos estão exibindo a tendência encontrada pelos resultados experimentais de Eschenburg et al. (2002) que mostram que a concentração mínima do glifosato capaz de inibir 50% da atividade enzimática (IC_{50}) da EPSP sintase da *Escherichia coli* nativa é 0,01 mM e da mutante Gli96Ala >10mM (Eschenburg et al., 2002).

A diferença de energia de interação para o complexo glifosato-EPSP sintase nativa e glifosato-EPSP sintase mutante foi de 14,54 Kcal/mol (Tabela 6). Para o composto **7**, análogo mais estável na enzima nativa, a diferença entre os valores de energia para enzimas nativa e mutante é de 44,97 kcal/mol. Assim sendo mostrou-se bastante estável na enzima nativa e para enzima mutante Gli96Ala o valor de energia aumenta consideravelmente tornando a enzima insensível a esse análogo mais que ao glifosato.

TABELA 6. Valores de energia intermolecular (kcal/mol) para ancoramento do glifosato e análogos na enzima nativa, na enzima mutante Gli96Ala e o ΔE (Energia_{nativa} – Energia_{mutante}).

| | Energia intermolecular para os compostos na enzima nativa | Energia intermolecular para os compostos na enzima mutante | ΔE |
|------------------|---|--|------------|
| Glifosato | -115,46 | -100,88 | 14,58 |
| 4 | -132,85 | -108,98 | 23,87 |
| 5 | -119,31 | -88,07 | 31,24 |
| 6 | -116,85 | -92,86 | 23,99 |
| 7 | -143,96 | -98,99 | 44,97 |
| 8 | -92,69 | -94,56 | 1,87 |
| 9 | -132,49 | -104,78 | 27,72 |
| 10 | -127,14 | -117,74 | 9,41 |
| 11 | -128,63 | -97,44 | 31,19 |
| 12 | -124,39 | -89,07 | 35,32 |

O análogo **10** foi o único análogo que apresentou uma diferença entre energia na enzima nativa e mutante menor que a diferença energética encontrada para o glifosato. A diferença energética para o glifosato foi de 14,58 kcal/mol e para o composto **10**; 9,41 kcal/mol. Esse composto apresenta uma maior estabilidade na enzima nativa e também na enzima mutante quando comparado ao glifosato. Com isso, podemos eleger o composto **10** como um promissor agroquímico substituto ao glifosato.

Os resultados obtidos até o momento sugerem que substituições no ligante do carbono próximo ao grupamento fosfato podem ser bastante

promissoras para aumentar atividade tanto na enzima nativa quanto na enzima mutante.

5.2 Mecanismo de reação da EPSP sintase.

É bem conhecido que o EPSP é um intermediário importante para a síntese de aminoácidos aromáticos essenciais (fenilalanina, tirosina e triptofano). Entretanto, esse mecanismo de reação ainda não foi completamente elucidado (Figura 3) e os resíduos de aminoácidos que fazem parte do mecanismo da reação de adição-eliminação não são conhecidos ainda. Sendo assim, aplicamos o método semi-empírico e Teoria do Funcional de Densidade (DFT) em combinação com métodos de modelagem molecular numa tentativa de mapear quais são os resíduos de aminoácido que participam do mecanismo dessa reação para o projeto de novos inibidores da EPSP sintase que possam tornar-se herbicidas mais potentes.

Conforme a figura 28, no primeiro passo da reação, um resíduo de aminoácido do sítio ativo da enzima (Enzima-Y-H) funcionaria como um doador de próton para a estrutura do PEP. Um outro resíduo de aminoácido (Enzima-X:) atuaria como acceptor de próton na estrutura do S3P deixando, portanto, o oxigênio do S3P com um par de elétrons livres. Este par de elétrons rapidamente iria atacar o carbocátion formado na estrutura do PEP levando a formação do intermediário tetraédrico. Após a formação do intermediário tetraédrico, no segundo passo da reação um novo resíduo de aminoácido (Enzima-Z:) atuaria como um acceptor de próton, formando o EPSP e liberando o fosfato inorgânico.

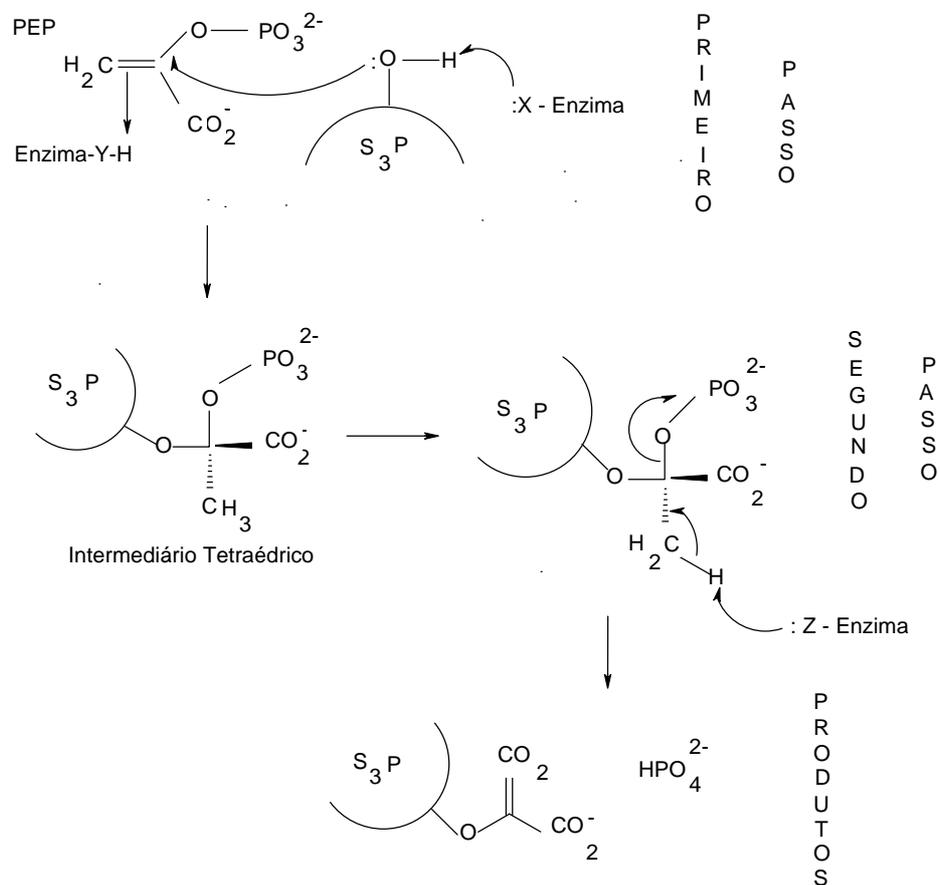


FIGURA 28. Mecanismo de reação para formação do EPSP e fosfato inorgânico (Ming Na et al., 2003).

Schonbrunn et al. (2001) sugeriram para a primeira etapa do mecanismo de reação da EPSP sintase o Glu-341 funcionando apenas como doador do próton e Lis-83 agindo como acceptor do próton (I.3). Mized et al. (2003) fizeram duas propostas para essa primeira etapa mecanística: uma proposta (I.2) na qual apenas um resíduo de aminoácido funcionaria como doador e acceptor do

próton, Glu-341. Outra proposta é o resíduo de aminoácido Glu-341 como doador do próton para PEP apenas e Lis-22 como acceptora do próton na estrutura do S3P (I.4). Houve novas propostas feitas por nosso grupo, nas quais primeiramente: Asp-313 como doador de próton e Lis-22 como acceptor do próton: Proposta I.1 e outra onde Glu-341 agiria como doador do próton e Arg-386 (I.5), por estar em um local favorável a reação, funcionaria como acceptor do próton para primeira etapa mecanística. Para segunda etapa da reação temos como proposta apenas o Asp-313 ou Glu-341 agindo como o acceptor de próton na estrutura do intermediário tetraédrico para formação dos produtos. As propostas foram resumidas na Tabela 7.

Foram empregados cálculos teóricos para que fosse desvendado qual o melhor caminho de reação. Deve ser lembrada a importância de levar-se em conta os efeitos dinâmicos no mecanismo de reação e orientação dos ligantes. Sendo assim, foi empregada uma metodologia teórica para relaxar o sistema e foi introduzido o efeito do solvente. Esse procedimento computacional já foi previamente empregado em sistemas similares com sucesso (Josa et al., 2008; Souza et al., 2008; Caetano et al., 2009).

De acordo com os cálculos realizados o primeiro passo da reação tem a barreira de mais alta energia (Figura 29). Isto significa que a formação do intermediário tetraédrico é a etapa limitante dessa reação, o que pode ser entendido se pensarmos que o primeiro passo da reação depende de uma sincronia entre dois resíduos de aminoácido do sítio ativo da enzima, onde um age retirando um próton do S3P e outro age doando um próton para o PEP para a posterior formação do intermediário tetraédrico (Figura 28). Já o segundo passo da reação depende apenas de um resíduo de aminoácido acceptor de próton e um posterior rearranjo do intermediário liberando o fosfato e formando o EPSP.

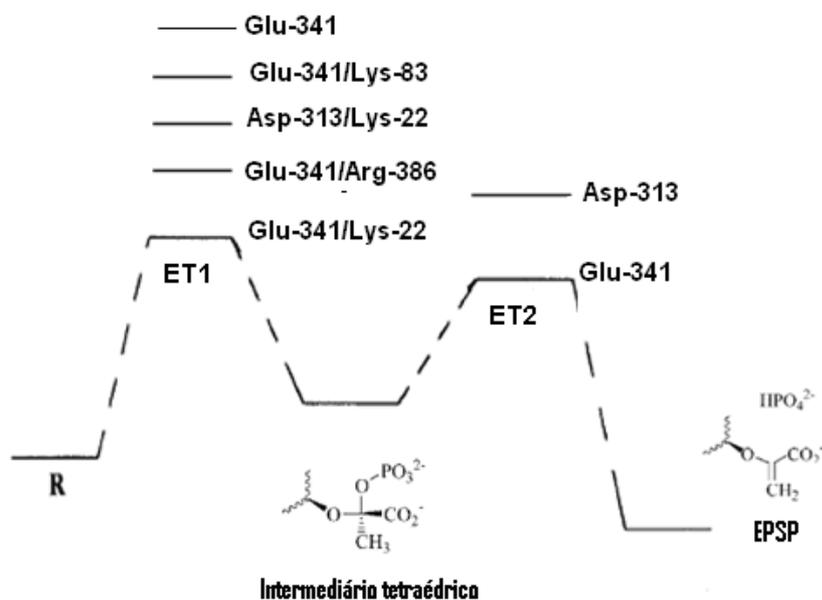


FIGURA 29. Esquema de reação para o primeiro e o segundo passos.

Estamos perfeitamente cientes das limitações do método semi-empírico, mas, como mostrado em outras publicações, pelo menos para pequenos sistemas os métodos semi empíricos não introduzem qualquer alteração no mecanismo, apenas nas energias de reação. Portanto, o mecanismo de reação foi estudado também via cálculos *ab initio* para obter-se valores de energia mais exatos.

Nos cálculos *ab initio* relatados aqui há uma consideração primária: a escolha da função de base e a forma de correlação de funcionais. Para carbono e oxigênio, foi utilizada uma função de base grande para todos os elétrons (6-311++G**). A partir desses cálculos pôde-se notar uma boa concordância entre as geometrias calculadas e experimentais para os ligantes. Depois da otimização dos confôrmeros selecionados um cálculo da constante de força foi realizado

para garantir que as estruturas relatadas na Tabela 7 sejam todas estados de transição.

TABELA 7. Valores de energia (kcal/mol) para as diferentes propostas do mecanismo de reação.

| Propostas | Doador/Aceptor | Energia de ativação (kcal/mol) | $\Delta\Delta E^{\#}$ (kcal/mol) |
|--------------------------------------|-----------------------------|---|--|
| Primeiro passo da reação | | | |
| I.1 Caetano (2009) | Asp-313/ Lis-22 | +58,18 | +18,18 |
| I.2 Mizyed (2003) | Glu-341 | + 101,14 | +61,14 |
| I.3 Schonbrunn (2001) | Glu-341/ Lis-83 | +59,44 | +19,44 |
| I.4 Mizyed (2003) | Glu-341/ Lis-22 | + 40,00 | 0,00 |
| I.5 Caetano (2009) | Glu-341/ Arg-386 | +55.67 | +15.67 |
| Segundo passo da reação | | | |
| II.1 | Asp-313 | + 47.79 | +33.23 |
| II.2 | Glu-341 | +14.56 | 0.00 |

Foram empregados cálculos teóricos para obter a estabilidade química relativa dos intermediários e estados de transição no sítio ativo da enzima EPSP sintase. Dos resultados obtidos ficou claro que Asp-313/Lis-22 é menos estável que Glu-341/Lis-22 por + 18,18 Kcal/ mol. O oxigênio do grupo carboxil do Glu-341 estabiliza melhor o estado de transição que o oxigênio do grupo carboxil do Asp-313. Do Glu-341/Lis-22 para Asp-313/Lis-22 e Glu-341/Arg-386 as mudanças no $\Delta\Delta E^\ddagger$ para o estado de transição são +18,18 e +15,67 kcal/mol, respectivamente. Estes resultados teóricos sugerem que Lis-22 age preferencialmente como uma base catalítica para desprotonar S3P 5-OH enquanto Glu-341 age como ácido para protonar o PEP no sítio ativo da enzima no primeiro passo da reação para formação do intermediário tetraédrico (Figura 28).

A energia de ativação do Glu-341 agindo como base é muito alta, +101, 14 kcal/mol. Desta forma, nossos resultados teóricos reforçam a necessidade de se ter um resíduo de aminoácido para promover a desprotonação do S3P 5-OH no primeiro passo da reação.

Dos resultados de docking pôde-se notar que o resíduo de aminoácido Arg-386 está no sítio ativo perto do S3P. Conseqüentemente, ele pode também agir como uma base para desprotonar S3P 5-OH. A fim de investigar as possibilidades para catálise ácido/base foram realizados alguns cálculos com Arg-386 agindo como base e Glu-341 agindo como ácido. Surpreendentemente, a diferença energética entre o estado de transição Glu-341/Lis-22 e Glu-341/Arg-386 é apenas de +15,67 kcal/mol.

É também importante notar que uma etapa inicial com a formação do carbocátion na estrutura do PEP e uma etapa posterior com o ataque do par de elétrons do S3P a esse carbocátion é completamente desfavorável no primeiro passo da reação pois não há estabilização de cargas no sítio ativo da enzima

EPSP sintase. De fato, o estado de transição que conduz apenas a formação do carbocátion tem energia de ativação muito mais alta.

A figura 30 mostra as setas indicativas para a primeira etapa da reação. A seta 1 mostra o par de elétrons da dupla ligação do PEP buscando o próton do Glu-341. A seta 2 ilustra a Lis-22 agindo comoceptor do próton do S3P deixando o oxigênio com um par de elétrons livres que irão atacar o carbocátion formado no PEP (seta 3) para formação do intermediário tetraédrico.

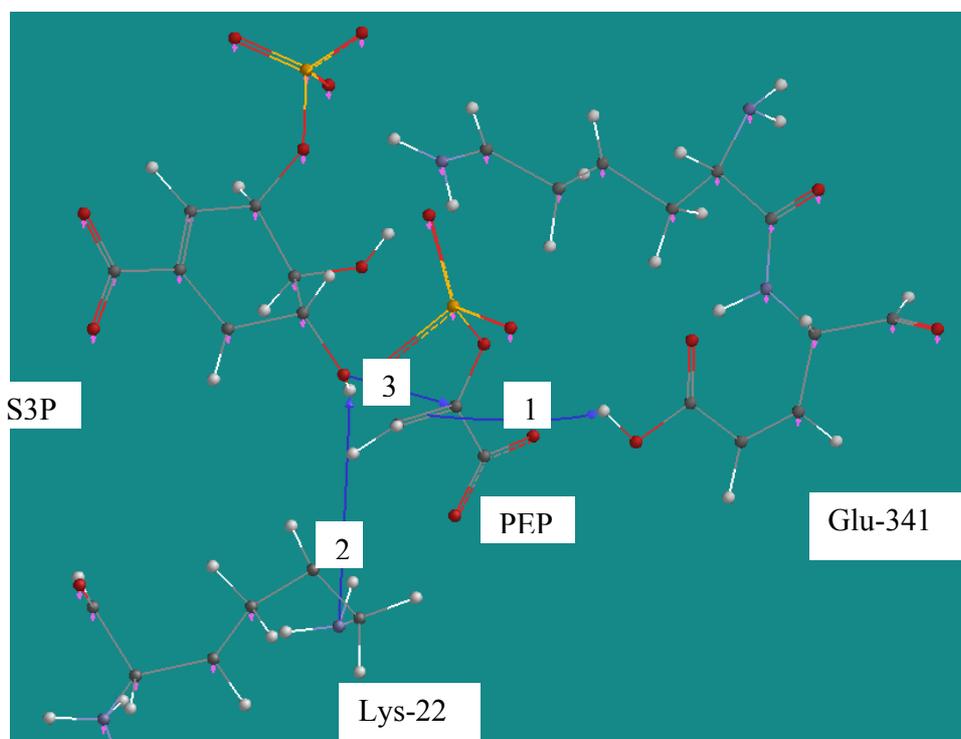


FIGURA 30. Mecanismo com setas indicativas para o primeiro passo da reação.

As distâncias de ligação entre os resíduos de aminoácido do sítio ativo estão reportadas na Tabela 8. Pode-se observar que a distância de ligação entre PEP e S3P para formação do intermediário tetraédrico no primeiro passo da reação para ambas as propostas, Glu-341/Lis-83 e Asp-313/Lis-22 não são muito grandes, com uma diferença de 0,07 Å.

TABELA 8. Distâncias de ligação entre os resíduos de aminoácidos propostos e os substratos da enzima para o primeiro passo da reação.

| Propostas | Distância do resíduo doador de próton a dupla ligação do PEP (Å) | Distância do resíduo acceptor de próton ao oxigênio do S3P (Å) | Distância do carbocátion formado no PEP no par de elétrons do oxigênio do S3P (Å) |
|------------------------|---|---|--|
| Asp-313/Lis-22 | 3,25 | 4,51 | 2,71 |
| Glu-341 | 3,08 | - | 3,44 |
| Glu-341/Lis-83 | 2,13 | 3,48 | 2,78 |
| Glu-341/Lis-22 | 3,53 | 5,07 | 2,62 |
| Glu-341/Arg-386 | 0,40 | 3,42 | 2,65 |

Analisando a Tabela 8 e comparando com os valores de energia da Tabela 7 observamos que Glu-341/Lis-22 foi a proposta de menor valor energético e é também a proposta que possui uma menor distância de ligação do carbocátion formado no PEP ao oxigênio com par de elétrons livres do S3P. As diferenças nas distâncias de ligação do carbocátion ao oxigênio do S3P para as propostas Glu-341/Lis-22 e Asp-313/Lis-22, Glu-341/Lis-22 e Glu-341/Arg-386

são, respectivamente, 0,09 e 0,04 Å. Apesar do resíduo de aminoácido Glu-341 estar um pouco mais distantes do PEP em relação ao Asp-313 a distância do PEP ao S3P 5-OH para reagir e formar o intermediário tetraédrico é menor.

A menor distância de ligação do carbocátion ao oxigênio do S3P foi para a proposta de Mizyed Glu-341/Lis-22 com uma diferença pequena para a nossa proposta Glu-341/Arg-386, que foi a segunda melhor em termos de valor de energia. Assim houve uma tendência para as demais propostas, onde a seqüência de menor energia para maior energia está em concordância com a seqüência de distância de ligação entre PEP e S3P (Figura 31). Para Glu-341/Arg-386 foi também observada a menor distância de ligação entre os resíduos de aminoácidos doador/acceptor de próton e os substratos naturais da enzima que deveriam ser ativados por eles quando comparados às demais propostas.

Para o Glu-341 funcionando como doador e acceptor do próton temos uma menor distância de ligação do resíduo de aminoácido ao PEP quando comparado a Glu-341/Lis-22. Apesar disso, a distância entre o PEP e o S3P para formação do intermediário tetraédrico é a maior dentre todas as propostas.

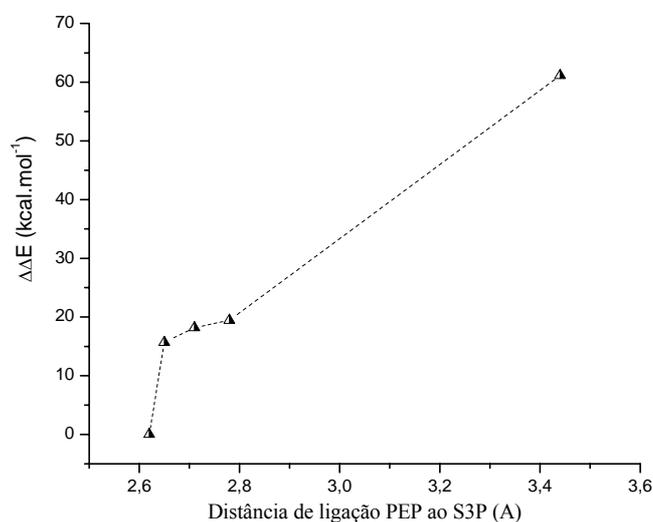


FIGURA 31. Gráfico da distância de ligação do PEP ao S3P pelo valor de energia intermolecular para as propostas do primeiro passo de reação.

O resultado encontrado para o primeiro passo da reação enzimática corrobora com a proposta de Eschenburg et al. (2003) onde há formação do intermediário tetraédrico na enzima mutante Asp313Ala. Isto claramente demonstra que o ataque nucleofílico ao PEP é devido à presença do Glu-341 no sítio ativo.

O segundo passo também tem um estado de transição definido como ET2. O estado de transição 2 está envolvido na transformação do intermediário tetraédrico, via abstração de próton em 5-enolpiruvilchiquimicato 3- fosfato (EPSP) e fosfato inorgânico (PI) (Figura 28). De acordo com nossos cálculos (Tabela 5.6) quando Enzima- Z: é Glu-341 há uma menor energia de ativação quando comparado ao Asp-313. Uma diferença de + 33,23 kcal/mol é encontrada. Portanto, o resíduo de aminoácido que age desprotonando o

intermediário tetraédrico para formação dos produtos é, possivelmente, o Glu-341.

Isto pode indicar que os resultados teóricos obtidos estão coerentes uma vez que o Glu-341 foi desprotonado no primeiro passo da reação estando apto a receber um próton na segunda etapa da reação.

TABELA 9. Distâncias de ligação entre os resíduos de aminoácidos propostos e o intermediário tetraédrico para o segundo passo da reação.

| Propostas | Distância (Å) |
|------------------|----------------------|
| Asp-313 | 4,83 |
| Glu-341 | 2,56 |

Corroborando com os resultados de energia de ativação da Tabela 6 temos as distâncias de ligação da Tabela 9. O Glu-341 possui uma menor energia de ativação para o segundo passo da reação quando comparado ao Asp-313 e é também, dentre os resíduos de aminoácido em questão, aquele que possui uma menor distância de ligação ao intermediário tetraédrico. Uma diferença de distâncias de ligação significativa de 2,27 Å foi encontrada. Essa maior proximidade do Glu-341 ao intermediário tetraédrico em relação ao Asp-313 só vem reforçar sua preferência como resíduo acceptor de próton para segundo passo da reação da EPSP sintase.

Na Figura 32 podemos observar as setas indicativas do mecanismo para o segundo passo da reação, onde há o resíduo Glu-341 ativando o intermediário tetraédrico. Este funciona como acceptor do próton (seta 1) deixando o carbono com um par de elétrons livres para formar a dupla ligação do EPSP (seta 2) e liberar o fosfato inorgânico (seta 3).

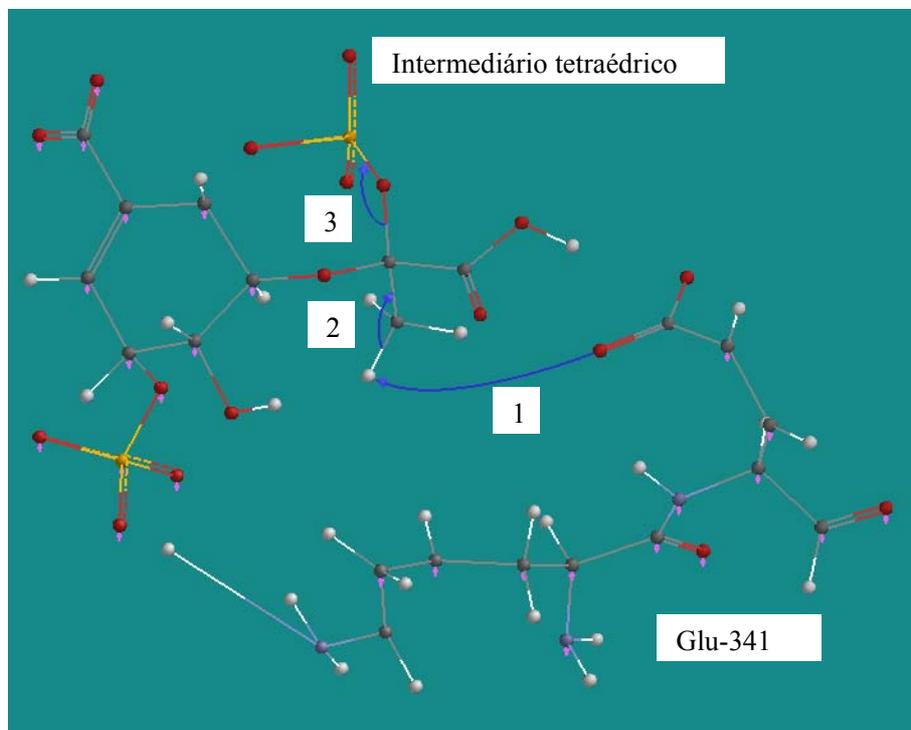


FIGURA 32. Mecanismo com setas indicativas para o segundo passo da reação.

Dessa forma, os possíveis resíduos de aminoácido que participam do mecanismo enzimático da reação da EPSP sintase foram apontados, sendo Glu-341 o doador de próton e Lis-22 aceptora de próton na primeira etapa da reação. O Glu-341 que foi desprotonado nessa primeira etapa reacional recebe novamente um próton na segunda etapa enzimática agindo como base.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Neste trabalho analisamos o modo de interação entre o glifosato e análogos com as enzimas EPSP sintase da *E. Coli*, nativa e mutante Gli96Ala utilizando a técnica de ancoramento molecular. As substituições propostas no hidrogênio do carbono próximo ao grupo fosfonato levou-nos a novos análogos bastante promissores como ingredientes ativos para novos herbicidas. Estes novos análogos apresentaram-se mais estáveis que o glifosato na enzima nativa enquanto que a enzima mutante Gli96Ala apresentou-se insensível a esses novos compostos assim como é insensível ao glifosato. Dessa forma, houve um aumento nos valores de energia de interação ligante-proteína para enzima mutante Gli96Ala quando comparado à energia encontrada para enzima nativa.

O análogo **10**, dentre os novos análogos propostos, é visto como o análogo mais promissor como um potencial inibidor da EPSP sintase, uma vez que apresentou energia intermolecular menor que o glifosato para ambas as enzimas nativa e mutante Gli96Ala. Além de ser mais estável que o glifosato tanto na enzima nativa quanto na enzima mutante, foi o composto que apresentou também um ΔE de energia (Energia para enzima nativa - Energia para enzima mutante) pequeno, menor que o valor encontrado para o glifosato. Fato interessante, pois a mutação Gli96Ala é uma mutação de ocorrência natural e, assim sendo, não é desejável um valor de ΔE muito grande.

Encontramos que para a primeira etapa da reação da EPSP sintase o resíduo Glu-341, provavelmente, atua como doador e o resíduo Lis-22 atua como acceptor do próton. Para a segunda etapa da reação enzimática o resíduo Glu-341 desprotonado na primeira etapa da reação provavelmente atua como resíduo de aminoácido acceptor do próton.

Apesar dos resultados encontrados neste trabalho de dissertação apontando novos potenciais herbicidas inibidores da EPSP sintase e os possíveis resíduos de aminoácido que participam do mecanismo de reação catalítica, pretende-se continuar a busca por novos herbicidas mais ativos através do estudo:

1) Das interações entre o glifosato e os análogos de estado de transição com a enzima EPSP sintase no intuito de se projetar novos inibidores para EPSP sintases classe I e II ;

2) Dos complexos entre o glifosato e os metais: Cr^{3+} ; Co^{3+} ; Fe^{3+} ; Al^{3+} ; Mg^{2+} ; Ca^{2+} ; Cu^{2+} ; Zn^{2+} ; Cd^{2+} utilizando cálculos teóricos de propriedades termodinâmicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, J.S.; BIEGLER, L.T. Data reconciliation and gross-error detection for dynamic systems. **Aiche Journal**, New York, v.42, p.2841-2856, 1996.
- AMARANTE JÚNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M.; RIBEIRO, M.L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, São Paulo, v.25, n.4, p.589-593, 2002.
- ANDERSON, D.K.; DEUWER, D.L.; SIKORSKI, J.A. Syntheses of new 2-hydroxythiazol-5-yl and 3-hydroxy-1,2,4-triazol-5-ylphosphonic acids as potential cyclic spatial mimics of glyphosate. **Journal Heterocyclic Chemistry**, Albuquerque, v.32, p.893-898, 1995.
- ANDERSON, K.S.; SAMMONS, R.D.; LEO, G.C.; SIKORSKI, J.A. **Biochemistry**, New York, v.29, p.1460-1465, 1990.
- ANDERSON, K.S.; SIKORSKI, J.A.; JOHNSON, K.A. A tetrahedral intermediate in the EPSP synthase reaction observed by rapid quench kinetics. **Biochemistry**, New York, v.27, p.7395-7406, 1988.
- ANDERSON, K.S.; SIKORSKI, J.A.; BENESI, A.J.; JOHNSON, K.A. Isolation and structural elucidation of the tetrahedral intermediate in the EPSP synthase enzymatic pathway. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v.110, p.6577-6579, 1988.
- ANTON, D.L.; HEDSTROM, L.; FISH, S.M.; ABELES, R.H. Mechanism of enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase exchange of phosphoenolpyruvate with solvent protons. **Biochemistry**, New York, v.22, p.5903-5908, 1983.
- ARNAUD, L.; SAILLAND, A.; LEBRUN, M.; PALLET, K.; RAVANEL, P.; NURIT, F.; TISSUT, M. Physiological behavior of two tobacco lines expressing EPSP synthase resistant to glyphosate. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.62, p.27-39, 1998.
- BAIRD, C. **Química ambiental**. 2.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 622p.

BAKER, E.A. Chemistry and morphology of plant epicuticular waxes. In: CUTLER, D.F.; ALVIN, K.L.; PRICE, C.E. (Ed.). **The plant cuticle**. London: Academic, 1982. p.140-161.

BARJA, B.C.; HERSZAGE, J.; AFONSO, M.S. Iron(III)-phosphonate complexes. **Polyhedron**, New York, v.20, p.1821-1830, 2001.

BECKE, A.D. Density-functional thermochemistry: 3., the role of exact exchange. **Journal of Chemical Physics**, v.98, p.5648-5652, 1993.

BENKOVIC, S.J.; HAMMES-SCHIFFER, S. A perspective on enzyme catalysis. **Science**, New York, v.301, p.1196-1202, 2003.

BERMAN, H.M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHA, T.N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I.N.; BOURNE, P.E. The protein data bank. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.28, p.235-242, 2000.

BERNARDS, M.L.; THELEN, K.D.; PENNER, D.; MUTHUKUMARAN, R.B.; MCCracken, J.L. Glyphosate interaction with manganese in tank mixtures and its effect on glyphosate absorption and translocation. **Weed Science**, Champaign, v.53, p.787-794, 2005.

BILLING, G.D.; MIKKELSEN, V. **Introduction to molecular dynamics and chemical kinetics**. New York: Wiley, 1996. No page.

BISCH, D.; JONES, V. Singly generated planar algebras of small dimension. **Duke Mathematical Journal**, Durham, v.101, p.41-75, 2000.

BIZUIK, M.; PRZYJAZNY, A.; CZERWINSKI, J.; WIERGOWSKI, M. Occurrence and determination of organic pollutants in tap and surface waters of the Gdansk district. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.733, p.171-183, 1996.

BONDINEL, W.E.; VNEK, J.; KNOWLES, P.F.; SPRECHER, M.; SPRINSON, D.B. Mechanism of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthetase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.246, n.20, p.61-91, 1971.

BOOCOCK, M.R.; COGGINS, J.R. FEBS kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. **Febs Letters**, Amsterdam, v.154, p.127-133, 1983.

BORMAN, S.A. Much ado about enzyme mechanism. **Chemical and Engineering News**, Washington, v.82, n.8, p.35, 2004.

BROMILOW, R.H.; CHAMBERLAIN, K.; TENCH, A.J.; WILLIAMS, R.H. Phloem translocation of strong acids—glyphosate, substituted phosphonic, and sulfonic acids-in *Ricinus communis*. **L. Pesticide Science**, v.37, p.39-47, 1993.

BRUICE, T.C. Ground state near attack conformers (NACS) and transition states in enzyme reaction. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v.224, p.U479-U479, 2002.

BYCZYNSKI, B.; MIZYED, S.; BERTI, P.J. Nonenzymatic breakdown of the tetrahedral (alpha-carboxyketal phosphate) intermediates of MurA and AroA, two carboxyvinyl transferases: protonation of different functional groups controls the rate and fate of breakdown. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v.125, p.12541-12550, 2003.

CAETANO, M.S.; SOUZA, T.C.S.; CUNHA, E.F.F. da; JOSA, D.; RAMALHO, T.C. Analysis of wild-type and Gly96Ala mutant EPSP synthase structures via in silico docking with inhibitors and molecular dynamics simulation. **Current Bioactive Compounds**, v.4, p.1-8, 2009.

CARVALHO, I.; PUPO, M.T.; BORGES, A.D.L.; BERNARDES, L.S.C. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, São Paulo, v.26, n.3, p.428-438, 2003.

CASTELLINO, S.; LEO, G.C.; SAMMONS, R.D.; SIKORSKI, J.A. P-31,N-15, and C-13 NMR of glyphosate- comparison of PH titrations to the herbicidal dead-end complex with 5-enolpyruvoylshikimate-3-phosphate synthase. **Biochemistry**, New York, v.28, p.3856-3868, 1989.

CHRISTENSEN, A.M.; SCHAEFER, J. Solid-state NMR determination of intramolecular and intermolecular P-31-C-13 distances for shikimate 3-phosphate and [1-C-13] glyphosate bound to enolpyruvyshikimate-3-phosphate synthase. **Biochemistry**, New York, v.32, p.2868-2873, 1993.

COUTINHO, C.F.B.; MAZO, L.H. Complexos metálicos com o herbicida glifosato: revisão. **Química Nova**, São Paulo, v.28, n.6, p.1038-1045, 2005.

DANIERI, P.; ZEDAKER, S.M.; SEILER, J.R.; KREH, R.E. Glyphosate translocation and efficacy relationships in red maple, sweet gum and loblolly pine seedlings. **Forest Science**, Lawrence, v.36, p.438-447, 1990.

DICK, R.E.; QUINN, J.P. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v.43, n.3, p.545-550, 1995.

ESCHENBURG, S.; HEALY, M.L.; PRIESTMAN, M.A.; SCHONBRUNN, G.H.; LUSHINGTON, E. How the mutation glycine96 to alanine confers glyphosate insensitivity to 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. **Planta**, Berlin, v.216, p.129-135, 2002.

ESCHENBURG, S.; KABSCH, W.; HEALY, M.L.; SCHONBRUNN, E. A new view of the mechanisms of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) and 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (AroA) derived from X-ray structures of their tetrahedral reaction intermediate states. **Journal Biology Chemistry**, v.278, p.49215-49222, 2003.

FISCHER, R.S.; BERRY, A.; GAINES, C.G.; JENSEN, R.A. Comparative action of glyphosate as a trigger of energy drain in eubacteria. **Journal Bacteriology**, Oxford, v.168, p.1147-1154, 1986.

FITZPATRICK, D. Evolution and chaos in property rights systems: the third world tragedy of contested access. **Yale Law Journal**, New Haven, v.115, p.996-1048, 2006.

FOYE, W.O.; LEMKE, T.L.; WILLIAMS, D.A. **Principles of medicinal chemistry**. 4.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995. 995p.

FRANZ, J.E.; MAO, M.K.; SIKORSKI, J.A. **Glyphosate**: a unique global pesticide. Washington, DC: American Chemical Society, 1996. 653p.

FUNKE, T.; HEALY-FRIED, M.L.; HAN, H.; ALBERG, D.G.; BARTLETT, P.A.; SCHONBRUNN, E. Differential inhibition of class I and class II 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases by tetrahedral reaction intermediate analogues. **Biochemistry**, New York, v.46, p.13344-13351, 2007.

GALLI, A.J.B.; MONTEZUMA, M.C. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura**. São Paulo: Monsanto do Brasil, 2005. 60p.

GARCIA-VILOCA, M.; GAO, J.; KARPLUS, M.; TRUHLAR, D.G. How enzymes work: analysis by modern rate theory and computer simulations. **Science**, New York, v.303, p.186-195, 2004.

GAZZIERO, D.L.P. Manejo de plantas daninhas na cultura da soja. In: CARVALHO, J.A.; CORREIA, N.M. **Manejo de plantas daninhas nas culturas da soja e do milho**. Uberlândia: UFU, 1998. p.8-18.

GHASSEMI, M.; FARGO, L.; PAINTER, P.; QUINLIVAN, S.; SCOFIELD, R.; TAKATA, A. **Environmental fates and impacts of major forest use pesticides**. Washington, DC: United States Department of agriculture, 1984. 168p.

GIESY, J.P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K.R. Ecotoxicological risk assessment for roundup herbicide. **Review Environmental Contamination and Toxicology**, v.167, p.35-120, 2000.

GREEN, J.M. Review of glyphosate and ALS-inhibiting herbicide crop resistance and resistant weed management. **Weed Technology**, Champaign, v.21, p.547-558, 2007.

GRIMSHAW, C.E.; SOGO, S.G.; COPLEY, J.R.; KNOWLES, S.D. Synthesis of stereoselectively labeled [9-H-2,H-3] chorismate and the stereochemical course of "5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthetase". **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v.106, p.2699-2700, 1984.

GRINGAUZ, A. **Introduction to medicinal chemistry: how drugs act and why**. New York: Wiley, 1997. 721p.

HALL, G.J.; HART, C.A.; JONES, C.A. Plants as sources of cations antagonistic to glyphosate activity. **Pest Management Science**, Sussex, v.56, p.351-358, 2000.

HESS, F.D.; FALK, R.H. Herbicide deposition on leaf surfaces. **Weed Science**, Champaign, v.38, n.3, p.280-288, 1990.

HETHERINGTON, P.R.; MARSHALL, G.; KIRKWOOD, R.C.; WARNER, J.M. Absorption and efflux of glyphosate by cell suspensions. **Journal and Experimental Botany**, Elmsford, v.49, p.527-533, 1998.

HILLISCH, A.; PETERS, O.; KOSEMUND, D.; MULLER, G.; WALTER, A.; SCHNEIDER, B.; REDDERSEN, G.; ELGER, W.; FRITZEMEIER, K.H. Dissecting physiological roles of estrogen receptor alpha and beta with potent selective ligands from structure-based design. **Molecular Endocrinology**, Bethesda, v.18, p.1599-1609, 2004.

JENCKS, W.P. **Catalysis in chemistry and enzymology**. New York: Dover, 1987. 866p.

JOSA, D. da; CUNHA, E.F.F.; RAMALHO, T.C.; SOUZA, T.C.S.; CAETANO, M.S. Homology modeling of wild-type, D516V, and H526L Mycobacterium tuberculosis RNA polymerase and their molecular docking study with inhibitors. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, v.25, p.373-376, 2008.

KARPLUS, M.; ICHIYE, T. Fluctuation and cross correlation analysis of protein motions observed in nanosecond molecular dynamics simulations. **Journal of Molecular Biology**, Dordrecht, v.263, p.120-122, 1996.

KNOWLES, W.S.; ANDERSON, K.S.; ANDREW, S.S.; PHILLION, D.P.; REAM, J.E.; JOHNSON, K.A.; SIKORSKI, J.A. Synthesis and characterization of N-amino-glyphosphate as a potent analog inhibitor of Escherichia coli EPSP synthase. **Bioorganic and Medical Chemistry Letters**, New York, v.3, p.2863-2868, 1993.

KOHN, W.; HOLTHAUSEN, M.C. **A chemist's guide to density functional theory**. 2.ed. New York: Wiley, 2001. 293p.

KOLLMAN, P.A.; LEE, M.R.; DUAN, Y. State of the art in studying protein folding and protein structure prediction using molecular dynamics methods. **Journal of Molecular Graphics & Modelling**, v.19, p.146-149, 2001.

KOLLMAN, W.; SEGAWA, R. **Interim report of the pesticide chemistry database**: environmental hazards assessment program. California: Department of Pesticide Regulation Environmental Monitoring and Pest Management Branch, 1995. 45p.

KOTLIAROV, Y.; IWATA, S. Application of graph theory to detect disconnected structures in a crystallographic database: copper oxide perovskites as a case study **Acta Crystallographica Section B-Structural Science**, v.56, p.936-939, 2000.

KUMOSINSKI, T.; LIEBMAN, M.N. **Molecular modeling**: from virtual tools to real problems. Denver: ACS, 1994. 530p. (ACS Symp. Serie 576).

KUNTZ, I.D.; BLANEY, J.M.; OATLEY, S.J. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **Journal of Molecular Biology**, Dordrecht, v.161, p.269-288, 1982.

LEACH, P.G.L.; ZNOJIL, M. On the elementary schrodinger bound-states and their multiplets. **Journal of Mathematical Physics**, New York, v.33, p.2785-2794, 1992.

LEE, J.J.; ASANO, Y.; SHIEH, T.L.; SPREAFICO, F.; LEE, K.; FLOSS, H.G. Steric course of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthetase and anthranilate synthetase reactions. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v.106, p.3367-3368, 1984.

LEE, S.G.; CHUNG, Y.C. Molecular dynamics investigation of interfacial mixing behavior in transition metals (Fe, Co, Ni)-Al multilayer system. **Journal of Applied Physics**, v.105, n.34902, 2009.

LEES, W.J.; WALSH, C.T. Analysis of the enol ether transfer catalyzed by UDP-GLCNAC enolpyruvyl transferase using (E)-isomer and (Z)- isomer of phosphoenolbutyrate- stereochemical, partitioning, and isotope effect studies. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v.117, p.7329-7337, 1995.

LEO, G.C.; SIKORSKI, J.A.; SAMMONS, R.D. Novel product from EPSP synthase at equilibrium. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v.112, p.1653-1654, 1990.

LEVINE, R.D.; ZEWAİL, A.; ELSAYED, M.A.; BERNSTEIN, R.B. Memorial issue on molecular-dynamics: introduction. **Journal of Physical Chemistry**, v.95, p.7961-7961, 1991.

LOURO, R.P.; SANTOS, A.V.; MACHADO, R.D. Ultrastructure of *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* I. shoots cultivated in vitro in multiplication and elongation-rooting media. **International Journal Plant Science**, v.160, n.2, p.217-227, 1999.

MAO, M.K.; FRANZ, J.E.; REAM, J.E. Sulfoxide functionality as a potential carbonium-ion mimid in enzyme-inhibitor design- synthesis of a novel inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. **Journal Chemical Society Communication**, v.7, p.556-557, 1992.

MCDOWELL, L.M.; KLUG, C.A.; BEUSEN, D.D.; SCHAEFER, J. Ligand geometry of the ternary complex of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from rotational-echo double resonance NMR. **Biochemistry**, New York, v.35, p.5395-5403, 1996.

MING, A.N.; UDAY, M.; NEIDLEIN, U.; PAUL, A. 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase: chemical synthesis of the tetrahedral intermediate and assignment of the stereochemical course of the enzymatic reaction. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v.125, p.12759-12767, 2003.

MIZUTANI, M.; NIWA, T.; TANAKA, S. On the law of entropy increasing of a one-dimensional infinite system. **Journal of Mathematics of Kyoto University**, Kyoto, v.34, p.699-708, 1994.

MIZYED, S.; WRIGHT, J.E.I.; BYEZYNSKI, B.; BERTI, P.J. Identification of the catalytic residues of AroA (Enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase) using partitioning analysis. **Biochemistry**, New York, v.42, p.6986-6995, 2003.

MONQUERO, P.A.; CHRISTOFFOLETI, P.J.; MATAS, J.A.; HEREDIA, A. Caracterização da superfície foliar e das ceras epicuticulares em *Commelina benghalensis*, *Ipomoea grandifolia* e *Amaranthus hybridus*. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v.22, n.2, p.203-210, 2004.

MORGON, N.H.; CUSTÓDIO, R. The density-functional theory. **Química Nova**, São Paulo, v.18, p.44-55, 1995.

NILSSON, G. Interactions between glyphosate and metals essential for plant growth. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p.35-47.

PATRICK, D.L.; FLANAGAN, J. Contact mechanics and bond rupture in chemical force microscopy: a study using atomistic molecular dynamics simulation. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v.221, p.U341-U341, 2001.

PATRICK, G.L. **An introduction to medicinal chemistry**. 2.ed. Oxford: Oxford University, 1988. 377p.

PAULING, L. Nature of forces between large molecules of biological interest. **Nature**, London, v.161, p.707-709, 1948.

PITELLI, R.A. Competição e controle de plantas daninhas em áreas agrícolas. **IPEF**, Piracicaba, v.4, n.12, p.25-35, 1987.

PITELLI, R.A.; MARCHI, S.R. Interferência das plantas invasoras nas áreas de reflorestamento. In: SEMINÁRIO TÉCNICO SOBRE PLANTAS DANINHAS E O USO DE HERBICIDAS EM REFLORESTAMENTO, 1., 1991, Rio de Janeiro, RJ. **Anais...** Rio de Janeiro, 1991. p.110-123.

PRIESTMAN, M.A.; FUNKE, T.; SINGH, I.M.; CRUPPER, S.S.; SCHONBRUNN, E. 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Staphylococcus aureus* is insensitive to glyphosate. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.579, p.728-732, 2005.

PRIMEL, E.G.; ZANELLA, R.; KURZ, M.H.S.; GONÇALVES, F.F.; MACHADO, S.O.; MARCHEZAN, E. Poluição das águas por herbicidas utilizados no cultivo do arroz irrigado na região central do estado do Rio Grande do Sul: predição teórica e monitoramento. **Química Nova**, São Paulo, v.28, p.605-609, 2005.

RAMALHO, T.C.; CUNHA, E.F.F.; CAETANO, M.S. **Compostos inibidores da EPSP sintase como ingredientes ativos de herbicidas**. BR n. PI 014080003038. Lavras: UFLA, 2007.

RAMSTEDT, M.; NORGRÉN, C.; SHEALS, J.; BOSTROM, D.; SJEÖBERG, S.; PERSSON, P. Thermodynamic and spectroscopic studies of cadmium(II)-N-(phosphonomethyl)glycine (PMG) complexes. **Inorganica Chimica Acta**, Amsterdam, v.357, p.1185-1192, 2004.

RAPASSI, R.M.A.; TARSITANO, M.A.A.; PEREIRA, J.C.R.; ARAÚJO, C.A.M. e. Cultura do eucalipto na região de Suzanápolis, Estado de São Paulo: análise econômica. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.38, n.4, p.7-13, 2008.

REAM, J.E.; STEINRUCKEN, H.C.; PORTER, C.A.; SIKORSKI, J.A. Purification and properties of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from dark-grown seedlings of sorghum-bicolor. **Plant Physiology**, Washington, v.87, p.232-238, 1998.

REAM, J.E.; ANDERSON, K.S.; SAMMONS, R.D.; SIKORSKI, J.A. Synthesis and characterization of N-amino-glyphosphate as a potent analog inhibitor of *Escherichia coli* EPSP synthase. **Bioorganic and Medical Chemistry Letters**, New York, v.3, n.12, p.2863-2868, 1993.

ROISCH, U.; LINGENS, F. Effect of the herbicide N- phosphonomethylglycine on the biosynthesis of aromatic amino acids. **Angewandte Chemie-International Edition in English**, v.13, n.6, p.400, 1974.

SANDBERG, C.L.; MEGGITT, W.F.; PENNER, D. Absorption, translocation and metabolism of ¹⁴C-glyphosate in several weed species. **Weed Research**, Oxford, v.20, p.195-200, 1980.

SANT'ANNA, C.M.R. Glossary of terms in theoretical organic chemistry. **Química Nova**, São Paulo, v.25, p.505-512, 2002.

SATICHIVI, N.M.; MAX, L.M.; STOLLER, E.M.; BRISKIN, D.P. Absorption and translocation of glyphosate isopropylamine and trimethylsulfonium salts in *Abutilon theophrasti* and *Setaria faberi*. **Weed Science**, Champaign, v.48, p.675-679, 2000.

SCHONBRUNN, E.; ESCHENBURG, S.; SHUTTLEWORTH, W.; SCHLOSS, J.V.; AMRHEIN, N.; EVANS, J.N.S.; KABSCH, W. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. **Proceeding of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v.98, n.4, p.1376-1386, 2001.

SCHÖNHERR, J. A mechanistic analysis of penetration of glyphosate salts across stomatous cuticular membranes. **Pest Management Science**, Sussex, v.58, p.343-351, 2002.

SCHREIBER, L. Polar paths of diffusion across plant cuticles: new evidence for an old hypothesis. **Annual Botany**, Oxford, v.95, p.1069-1073, 2005.

SIKORSKI, J.A.; GRUYS, K. Understanding Glyphosate's molecular mode of action with EPSP synthase: evidence favoring an allosteric inhibitor model. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v.30, p.2-8, 1997.

SILVEIRA, R.L.V. de A. Fitotoxicidade de glifosato em Eucalyptus. In: WORKSHOP SOBRE O USO DE HERBICIDAS, 2003, Piracicaba, SP. **Addubare**, Piracicaba, ano 2, n.9, p.4-7, out./dez. 2003.

SIPPL, W.; HOLTJE, H.D.D.; ROGNAN, G. **Folkers, molecular modelling: basic principles and applications**. 2.ed. Weinheim: J.Wiley, 2003. 240p.

- SOUZA, A.X.; SANT'ANNA, C.M.R. 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: determination of the protonation state of active site residues by the semiempirical method. **Bioorganic Chemistry**, New York, v.36, p.113-120, 2008.
- SOUZA, T.C.S.; JOSA, D.; RAMALHO, T.C.; CAETANO, M.S. da; CUNHA, E.F.F. Molecular modelling of Mycobacterium tuberculosis acetolactate synthase catalytic subunit and its molecular docking study with inhibitors. **Molecular Simulation**, v.34, p.707-713, 2008.
- SPOEL, D. van der; LINDAHL, E.; HESS, B.; GROENHOF, G.; MARK, A.E.; BERENDSEN, H.J.C. GROMACS: fast, flexible and free. **Journal Comp. Chemistry**, v.26, p.1701-1718, 2005.
- STEINRUCKEN, H.C.; AMRHEIN, N. 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of klebsiella-pneumoniae: 1., purification and properties. **European Journal Biochemistry**, Berlin, v.143, p.341-349, 1984.
- SUBRAMANIAM, V.; HOGGARD, P.E. Metal-complexes of glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.36, p.1326-1329, 1988.
- SZABO, A.; OSTLUND, N.S. **Modern quantum chemistry**: introduction to advanced electronic structure theory. New York: Courier Dover, 1996. 466p.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.
- THE AGROCHEMICALS handbook. 10.ed. Tomlin: Surrey, 1994. 213p.
- THELEN, K.D.; JACKSON, E.P.; PENNER, D. The basis for the hardwater antagonism of glyphosate activity. **Weed Science**, Champaign, v.43, p.541-548, 1995.
- THOMAS, G. **Química medicinal**: uma introdução. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 413p.
- THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M.H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal Medical Chemistry**, v.49, p.3315-3321, 2006.

TUFFI SANTOS, L.D.; IAREMA, L.; THADEO, M.; FERREIRA, F.A.; MEIRA, R.M.S.A. Características da epiderme foliar de eucalipto e seu envolvimento com a tolerância ao glyphosate. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v.24, n.3, p.513-520, 2006.

TUFFI SANTOS, L.D.; MACHADO, A.F.L.; VIANA, R.G.; FERREIRA, L.R.; FERREIRA, F.A.; SOUZA, G.V.R. Crescimento do eucalipto sob efeito da deriva de glyphosate. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v.25, n.1, p.133-137, 2007.

VELLINI, E.D.; ALVES, E.; GODOY, M.C.; MESCHEDE, D.K.; SOUZA, R.T. de; DUKE, S. Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. **Pest Management Science**, v.64, p.489-496, 2008.

VOET, C.; KIEBEREMMONS, T.; GODILLOT, A.P.; WEINER, D.B.; WILLIAMS, W.V. Molecular design of GM-CSF antagonist peptides. **Arthritis and Rheumatism**, v.38, p.720-720, 1995.

WALKER, M.C.; REAM, J.E.; SAMMONS, R.D.; LOGUSCH, E.W.; O'LEARY, M.H.; SOMERVILLE, R.L.; SIKORSKI, J.A. Structural requirements for PEP binding to EPSP synthase. **Bioorganic and Medical Chemistry Letters**, New York, v.1, p.683-688, 1991.

WARSHEL, A. Computer-simulations of quantum dynamics in electron-transfer and proton-transfer reactions in proteins. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v.202, p.131, 1991.

WARSHEL, A.; LEVITT, M. Theoretical studies of enzymatic reactions-dielectric, electrostatic and steric stabilization of carbonium-ion in reaction of lysozyme. **Journal Molecular Biology**, Dordrecht, v.103, p.227-245, 1976.

WERMUTH, G.; GANELLIN, C.R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L.A. Glossary of terms used in medicinal chemistry: IUPAC recommendations. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v.70, p.1129-1143, 1998.

WILLS, G.D.; McWHORTER, C.G. Effect of inorganic salts on the toxicity and translocation of glyphosate and MSMA in purple nutsedge (*Cyperus rotundus*). **Weed Science**, Champaign, v.33, p.755-761, 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Glyphosate**: environmental health criteria 159. Geneva, 1994. No page.

ZIEGLER, T. Approximate density functional theory as a practical tool in molecular energetics and dynamics. **Chemical Review**, v.91, p.651-667, 1991.