



MELISSA SOARES CAETANO

**AVALIAÇÃO TEÓRICA DO PROCESSO DE
INATIVAÇÃO DO HERBICIDA GLIFOSATO E
FORMAÇÃO DO 5-
ENOLPIRUVILCHIQUMATO-3-FOSFATO
(EPSP)**

LAVRAS – MG

2011

MELISSA SOARES CAETANO

**AVALIAÇÃO TEÓRICA DO PROCESSO DE INATIVAÇÃO DO
HERBICIDA GLIFOSATO E FORMAÇÃO DO 5-
ENOLPIRUVILCHIQUIMATO-3-FOSFATO (EPSP)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Doutora.

Orientador

Dr. Teodorico de Castro Ramalho

Coorientador

Dr. Walclee Carvalho de Mello

LAVRAS - MG

2011

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

Caetano, Melissa Soares.

Avaliação teórica do processo de inativação do herbicida
glifosato e formação do 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP) /
Melissa Soares Caetano. – Lavras : UFLA, 2011.

132 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Teodorico de Castro Ramalho.

Bibliografia.

1. Complexos. 2. EPSP sintase. 3. Modelagem molecular. 4.
Mecanismo de reação. 5. DFT. I. Universidade Federal de Lavras.
II. Título.

CDD – 541.39

MELISSA SOARES CAETANO

**AVALIAÇÃO TEÓRICA DO PROCESSO DE INATIVAÇÃO DO
HERBICIDA GLIFOSATO E FORMAÇÃO DO 5-
ENOLPIRUVILCHIQUMATO-3-FOSFATO (EPSP)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 29 de novembro de 2011.

Dra. Kátia Júlia de Almeida UFU

Dr. Luciano Tavares da Costa UNIFAL

Dr. Matheus Puggina de Freitas UFLA

Dr. Teodorico de Castro Ramalho
Orientador

LAVRAS - MG

2011

AGRADECIMENTOS

Eis que tenho uma oportunidade de expressar sinceros agradecimentos a muitos e tantos:

À minha avó de saudosa memória, Ruth Costa Soares, com quem aprendi tanto e que sempre dedicou-nos tanto amor, carinho e cuidado.

Aos meus pais, Márcia e João Carlos, agradeço o apoio, o amor, a compreensão e a confiança necessária para chegar até aqui. Pessoas queridas que tiveram que aprender a conviver com a distância.

Aos meus irmãos, Maíra e Rafael, pelo carinho e incentivo, pelas brigas e abraços que nos fazem tão unidos.

Ao meu cunhado Glauber, pelo convívio e amizade.

Ao meu namorado Juninho que, mesmo não nos vendo a semana toda, sempre me dispensou apoio, cuidado e amor e aos seus pais, Vicentina e Joaquim, pelo enorme carinho.

Aos amigos “velhos” e aqueles conquistados ao longo desses anos, obrigada pelos sorrisos, conselhos, pelo dia a dia, por cada um contribuir a sua maneira para que eu me torne uma pessoa melhor.

Ao Prof Walclee a quem devo um muito obrigada especial, por ter aceitado participar da minha orientação no doutorado. Com certeza, foi essencial para que esse momento pudesse acontecer.

À Prof^ª. Elaine e Prof. Matheus pelas colaborações nos trabalhos, pelo convívio, pelos insentivos, pelo carinho.

Penso eu que Deus coloca em nossas vidas pessoas especiais não por acaso. Agradeço imensamente a Ele por ter colocado, dentre outros, o Prof. Teodorico no meu caminho. Sempre mais que um orientador, um amigo. Agradeço os inesquecíveis diálogos, toda a força nos momentos difíceis, toda

preocupação e todo carinho. Agradeço o privilégio de tê-lo me orientando nos trabalhos e pela confiança de que tudo daria certo.

RESUMO GERAL

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 e quando aplicado diretamente no solo apresenta baixa atividade. Glifosato é também um potente inibidor da EPSP sintase, enzima chave na via do ácido chiquímico, a qual é encontrada apenas em plantas e alguns micro-organismos, então, EPSP sintase é tida como um alvo promissor para herbicidas. Apesar dos mecanismos propostos serem razoáveis, há ainda muitas questões sobre o mecanismo da EPSP sintase que são difíceis de responder apenas por meios experimentais. Em adição, no mecanismo de reação da EPSP sintase, além dos produtos fosfato inorgânico e EPSP, depois de longo tempo de equilíbrio, também se forma um produto secundário, EPSP cetal. Foram feitos estudos para investigar o mecanismo de reação de formação do EPSP e EPSP cetal. O entendimento das interações específicas entre metais do solo e glifosato é o passo principal para o entendimento de sua baixa atividade quando aplicado diretamente no solo e não pulverizado. Os resultados indicam alguns pontos chave para o desenvolvimento de novos derivados seletivos do glifosato.

Palavras-chave: EPSP sintase. Glifosato. Complexos. Mecanismo de reação.

GENERAL ABSTRACT

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 and when applied directly into the soil it has low activity. Glyphosate is also a potent EPSP synthase inhibitor, 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. Although the proposed mechanisms are reasonable, there are still many questions about the EPSP synthase mechanism that are difficult to answer by experimental means alone. In addition, in the reaction mechanism of EPSP synthase beyond the inorganic phosphate and EPSP products, after long times at equilibrium, it was also shown that a side product is formed, the EPSP ketal. Studies, in this line, were performed to investigate the reaction mechanism of formation of both EPSP and EPSP ketal. Regarding now the inactivation process, to evaluate the specific interactions between metals in the soil and glyphosate is the main step in understanding the low activity of the herbicide when applied directly into the soil and not pulverized. Our findings indicate some key points for the designing of new selective glyphosate derivatives.

Keywords: EPSP synthase. Glyphosate. Complexes. Reaction mechanism.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURE 1	Estrutura do pesticida DDT.....	20
FIGURE 2	Estrutura do glifosato.....	21
FIGURE 3	Via do chiquimato: síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano.....	22
FIGURE 4	Vias metabólicas para obtenção do ácido indolacético.....	24
FIGURE 5	Reação catalizada pela enzima EPSP sintase na qual o glifosato é competidor do substrato natural PEP.....	25
FIGURE 6	Caminho estereoquímico para a EPSP sintase envolvendo protonação da face <i>si</i> do PEP e retenção da configuração da dupla ligação.....	26
FIGURE 7	Mecanismo de adição-eliminação para a transferência de um grupo carbonila catalisada pela EPSP sintase.....	27
FIGURE 8	Glifosato e alguns análogos.....	30
FIGURE 9	Análogos do estado de transição estudados por Funke et al. (2007).....	31
FIGURE 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.....	33
FIGURE 11	Degradação do glifosato por bactérias do solo com produção do ácido aminometilfosfônico e sarcosina.....	37

CAPÍTULO 2

FIGURE 1	Reaction catalyzed by EPSP synthase enzyme.....	64
FIGURE 2	Thermodynamic cycle.....	67
FIGURE 3	Structures of complexes formed by (a) one molecule of	

	glyphosate and metal and (b) two molecules of glyphosate and metal.....	68
FIGURE 4	Complexation forms with two molecules of glyphosate and the metal (green) in octahedral environment: 1. Two molecules of glyphosate with the protonated amino group (blue), binding the two hydrogen atoms (white) (-NH ₂ ⁺ -). 2. Complexation in which one glyphosate molecule has the protonated amino group (-NH ₂ ⁺ -) and the other glyphosate molecule has the amino group performing coordination with the metal. 3. Two glyphosate molecules where the amino group is coordinating with the metal. 4. Two glyphosate molecules with the non-protonated amino group performing only three bonds (-NH-)	72
FIGURE 5	Forms of complexation of two glyphosate molecules and the metal (pink) in tetrahedral environment: 1. Two glyphosate molecules with the protonated amino group (blue), binding the two hydrogen atoms (white) (-NH ₂ ⁺ -) 2. Two glyphosate molecules with the non-protonated amino group performing only three bonds (-NH-)	73
FIGURE 6	(a) Superposition of the 1:1 complex with glyphosate and (b) superposition of the 2:1 complex with glyphosate molecule. In the figure, the glyphosate is the structure in yellow and complex is the structure in red.....	89
CAPÍTULO 3		
FIGURE 1	Reaction catalyzed by EPSP synthase enzyme.....	100
FIGURE 2	Chemical structure of glyphosate and its analogs.....	101
FIGURE 3	Molecular superposition of glyphosate (green) and its analogs 1 (yellow), 2 (pink) and 3 (brown) into the wild-	

	type EPSP synthase.....	111
FIGURE 4	Superposition of glyphosate (yellow) and its analogs 1 (pink), 2 (green) and 3 (orange) into the mutant EPSP synthase.....	113
FIGURE 5	Reaction mechanism of EPSP.....	115
FIGURE 6	The first and second step of the chemical reaction.....	117
FIGURE 7	Reaction mechanism of EPSP synthase. (a) The filled arrows (blue) are representing the first and second step of the direct path; (b) The dashed arrows (red) are representing the indirect path, the formation of EPSP ketal.....	120
FIGURE 8	Two proposed routes to form EPSP ketal. (a) Oxonium route (III); (b) route (II) begins with the attack of an oxygen lone pair of the phosphate group.....	122
FIGURE 9	Route IV: Reaction mechanism for the transformation of the EPSP ketal in EPSP.....	123
FIGURE 10	Routes and steps for the chemical transformations.....	123
FIGURE 11	Route V: Reaction mechanism for the transformation of EPSP in EPSP ketal.....	124

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABLE 1	Bond length values (\AA) between the oxygen atom from glyphosate and the studied metals.....	74
TABLE 2	Relative free energy values (kcal/mol) for the complexes between one glyphosate molecule and some metals in soil in the octahedral environment.....	75
TABLE 3	Relative free energy values (kcal/mol) for the complexes between one glyphosate molecule and some metals in soil in the tetrahedral environment.....	77
TABLE 4	Relative free energy values (kcal/mol) for the 2:1 glyphosate-metal system in the octahedral environment..	78
TABLE 5	Relative free energy values (kcal/mol) for the 2:1 glyphosate-metal system in the tetrahedral environment..	79
TABLE 6	Amino acid residues of active site of EPSP synthase that bind to the complexes and the number of these hydrogen bonds and intermolecular electrostatic energies (kcal/mol).	82

CAPÍTULO 3

TABLE 1	Energy values for glyphosate and analogs in the active site of wild-type enzyme.....	110
TABLE 2	Energy values for glyphosate and analogs in the active site of Gly96Ala mutant enzyme.....	112
TABLE 3	Activation energy ((kcal.mol^{-1})) of the transition states for the first step of the transformation.....	116
TABLE 4	Activation energy ($(\Delta\Delta E^\ddagger (\text{kcal.mol}^{-1}))$) of the transition states for the routes of formation of EPSP ketal and EPSP...	121

LISTA DE ABREVIATURAS

EPSP	5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
AIA	Ácido indoilacético
PEP	Fosfoenolpiruvato
S3P	Chiquimato-3-fosfato
Pi	Fosfato inorgânico
Glu	Glutamato
Lis	Lisina
Asp	Aspartato
Arg	Arginina
Ser	Serina
Gln	Glutamina
Thr	Tirosina
Asn	Asparagina
Gli	Glicina
Ala	Alanina
ET	Estado de transição
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
AMPA	Ácido aminometilfosfônico
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
DFT	Teoria do Funcional de Densidade
HF	Hartree-Fock
EPR	Ressonância paramagnética eletrônica
Zn	Zinco
Cu	Cobre
Ca	Cálcio
Mg	Magnésio
Co	Cobalto
Fe	Ferro
Cr	Cromo
Al	Alumínio
PM3	Método semiempírico de Química computacional
PCM	Modelo contínuo polarizado
IEF	Formalismo da equação integral
B3LYP	Método DFT de Becke, usando correlação de Lee, Yang e Parr
MVD	Molegro Virtual Docker
THI	Intermediário tetraédrico
PDB	Banco de Dados de Proteínas
MD	Dinâmica molecular

QM	Mecânica Quântica
MM	Mecânica Molecular
SM	Semiempírico
TS	Estado de transição
K_i	Constante de inibição
STO	Função de base do tipo Slater
GTO	Função de base do tipo Gaussiana

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1: Introdução geral e Referencial Teórico.....	16
1	INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1	Considerações gerais.....	18
2.2	Enzima EPSP sintase.....	21
2.3	O herbicida glifosato.....	31
2.4	Química computacional.....	38
2.5	Mecânica molecular.....	39
2.5.1	Ancoramento molecular (Docking).....	40
2.5.2	Dinâmica molecular.....	43
2.5.2.1	Método do máximo declive.....	44
2.5.2.2	Método dos gradientes conjugados.....	45
2.5.2.3	Método quasi Newton-Raphson.....	45
2.6	Teoria do funcional de densidade.....	45
2.7	Conjunto de funções de base.....	49
2.8	Modelo contínuo polarizável.....	51
	REFERÊNCIAS.....	53
	CAPÍTULO 2: Understanding the inactivation process of organophosphate herbicides: a DFT study of glyphosate metallic complexes with Zn²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Co³⁺, Fe³⁺, Cr³⁺ and Al³⁺.....	62
1	ABSTRACT.....	63
2	INTRODUCTION.....	63
3	METHODOLOGY.....	66
3.1	QM calculations.....	66
3.2	Docking calculation procedures.....	67
4	RESULTS AND DISCUSSION.....	70
4.1	Structural aspects of the complexes.....	70
4.2	Thermodynamic stability of the system glyphosate-metal 1:1..	75
4.3	Thermodynamic stability of the system glyphosate-metal 2:1..	78
4.4	Docking of the complexes into the binding site on the enzyme.	81
5	CONCLUSIONS.....	90
6	REFERENCES.....	91
	CAPÍTULO 3: Construction and assessment of reaction models of class I EPSP synthase: Part I and II.....	98
1	ABSTRACT.....	99
2	INTRODUCTION.....	99
3	METHODS.....	103
3.1	Ligands data set.....	103

3.2	System relaxation strategy.....	103
3.3	Docking calculation procedures.....	104
3.4	Molecular dynamics simulation.....	106
3.5	Density functional studies.....	107
4	RESULTS AND DISCUSSION.....	108
4.1	Part I.....	108
4.1.1	Docking of compounds into the binding site of the wild-type enzyme.....	108
4.1.2	Mutant Gly96Ala binding site.....	111
4.1.3	Reaction mechanism study.....	114
4.2	Part II.....	119
5	CONCLUSIONS.....	125
6	REFERENCES.....	126
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	131

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL E REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO GERAL

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 se utiliza as boas práticas agrícolas e as recomendações técnicas para a 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. Cresce sua importância ainda mais com o surgimento de um novo problema: a resistência das plantas daninhas aos herbicidas (GAZZIERO, 1998).

O glifosato, por exemplo, controla efetivamente uma grande variedade de gramíneas e plantas dicotiledôneas pela inibição da 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSP sintase), 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. 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 (FUNKE et al., 2007).

Outro ponto que chama bastante atenção é a inativação do glifosato quando aplicado diretamente no solo. De fato, a compreensão das interações específicas entre metais no solo e glifosato é o passo principal para o entendimento da baixa atividade do herbicida quando aplicado diretamente no solo e não pulverizado. Assim sendo, temos um primeiro objetivo que é avaliar os efeitos estruturais, termodinâmicos e eletrônicos que governam a complexação entre o glifosato e alguns metais para racionalizar o processo de inativação de herbicidas organofosforados no solo.

Como ainda não são conhecidos os resíduos de aminoácidos que participam no mecanismo de adição-eliminação da enzima EPSP sintase e tem-se muito pouco a respeito da formação do produto secundário EPSP cetal, este trabalho tem como outro objetivo auxiliar na elucidação do mecanismo dessa reação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Considerações gerais

O Brasil 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 reduzir 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, a toxicidade podendo, muitas vezes, 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. 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. Esse 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., quando o primeiro pesticida conhecido foi o enxofre. Por volta do Século XV, começou 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.

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

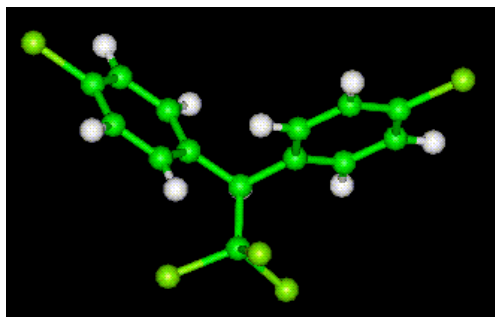


Figura 1 Estrutura do pesticida DDT

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 (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. O glifosato é o principal herbicida usado no mundo, sendo responsável por 30% de todos os defensivos agrícolas usados no país. 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-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase como o seu principal alvo (SIKORSKI; GRUYS, 1997).

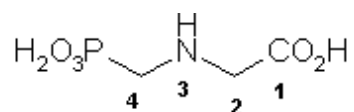


Figura 2 Estrutura do glifosato

2.2 Enzima EPSP sintase

A enzima 5-enolpiruvilchiquimato-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).

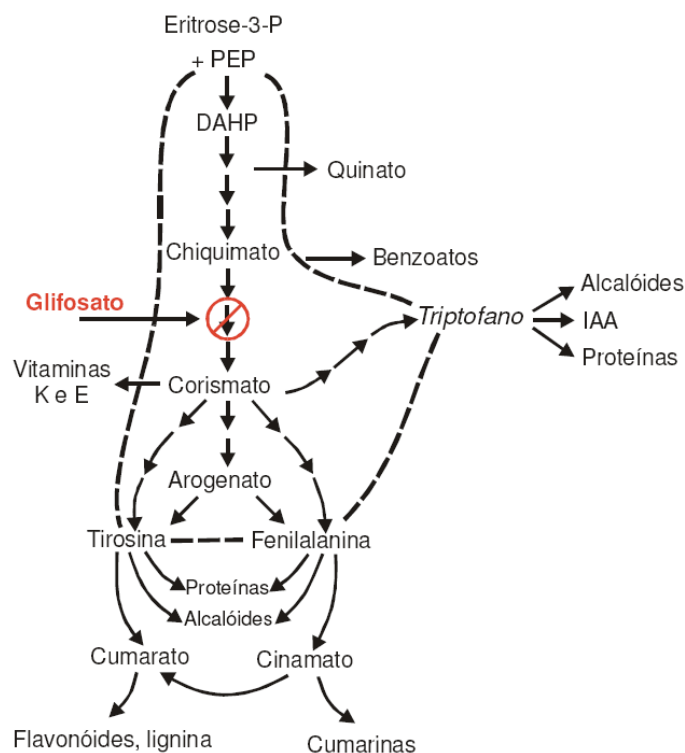


Figura 3 Via do chiquimato: síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano

Na planta, é importante salientar que o promotor de crescimento, a auxina, ácido indolilacético (AIA), 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 AIA. A biossíntese de AIA 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 AIA 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 AIA, 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 AIA independente do triptofano também pode ser inibida pelo herbicida, ou seja, o glifosato bloqueia totalmente a síntese de AIA. 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 AIA. Sabe-se que alguns compostos fenólicos são inibidores de AIA-oxidase. No entanto, como a síntese destes compostos fenólicos é inibida pela ação do glifosato, haverá então aumento da atividade da AIA oxidase, o que levará a um aumento na oxidação do AIA e, conseqüentemente, menor nível de AIA livre (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Esta menor produção de AIA 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 por meio 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).

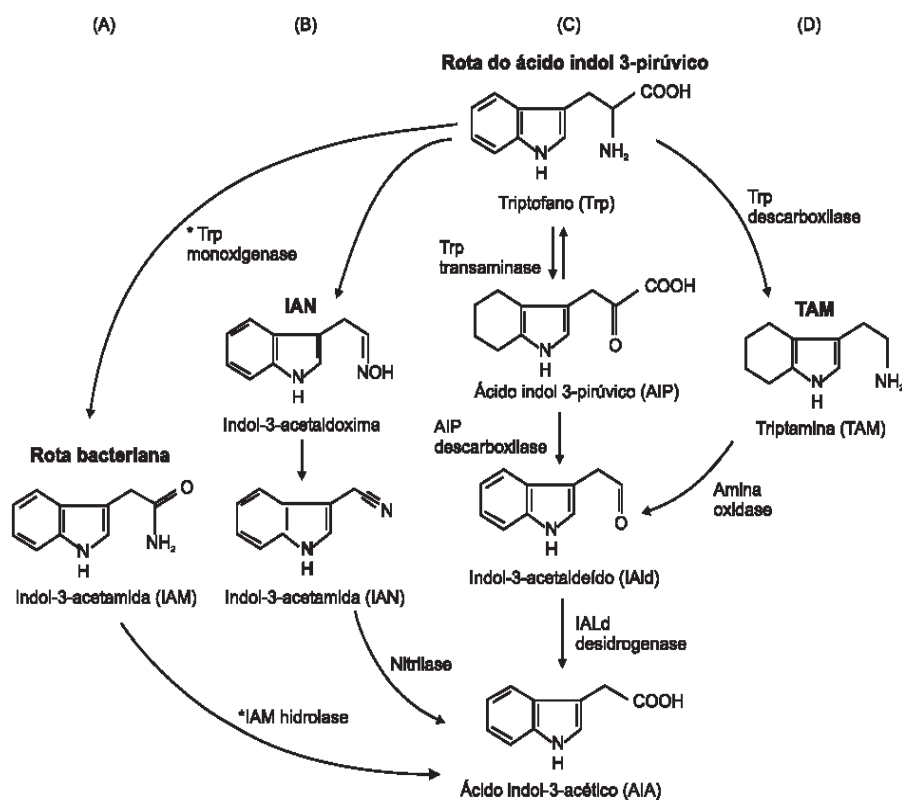


Figura 4 (A), (B), (C) e (D) são vias metabólicas para obtenção do ácido indolacético

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).

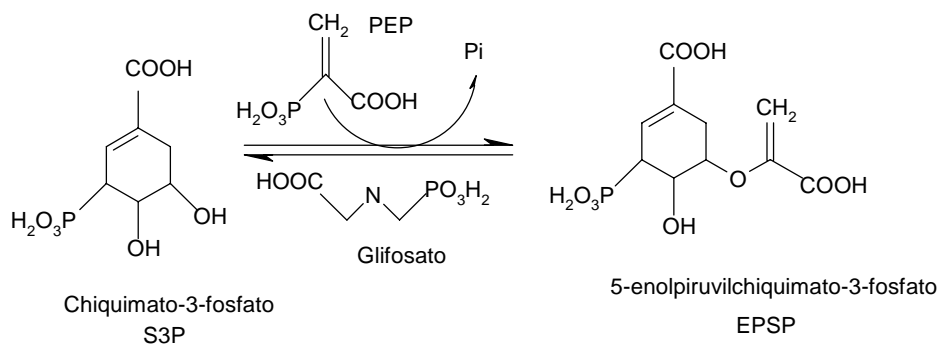


Figura 5 Reação catalizada pela enzima EPSP sintase na qual o glifosato é competidor do substrato natural PEP

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, Sikorski e Johnson (1988) confirmaram este fato isolando o intermediário tetraédrico formado no decorrer da reação para formação de EPSP. Ming et al. (2003) propuseram duas alternativas para formação e decomposição do estado intermediário de acordo com a Figura 6.

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; SIKORSKI; SAMMONS, 1990).

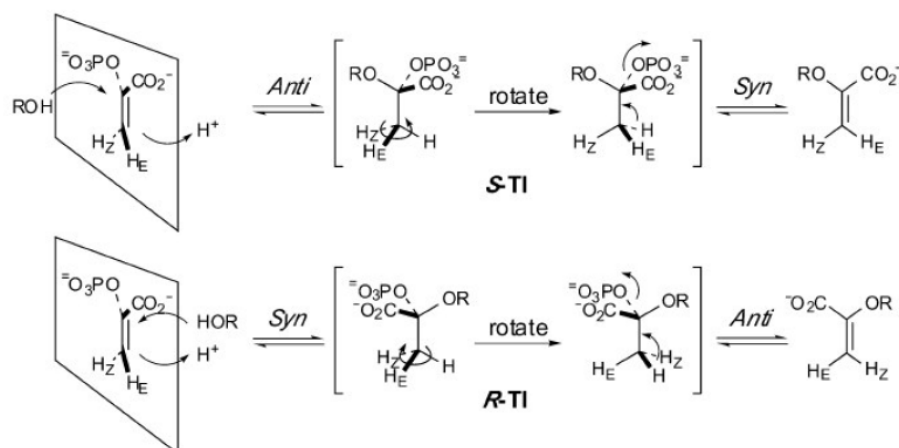


Figura 6 Caminho estereoquímico para a EPSP sintase envolvendo protonação da face *si* do PEP e retenção da configuração da dupla ligação

Schonbrunn et al. (2001), por meio 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 (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.

Eschenburg et al. (2003) propuseram que Asp-313 poderia primeiro abstrair o próton do 5-OH do S3P e assim o oxiânion resultante abstrairia o próton do C-3 no PEP. As distâncias atômicas observadas nos modelos de Souza e 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 (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*.

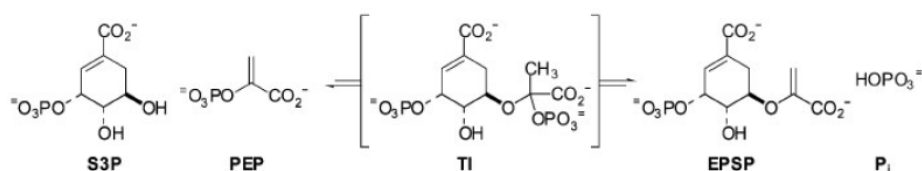


Figura 7 Mecanismo de adição-eliminação para a transferência de um grupo carbonila catalisada pela EPSP sintase

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 (3-Desoxiarabinoheptulose-7-Fosfato sintase), Deidroquinato sintase e Antramilato sintase (FISCHER et al., 1986). Todavia, tais inibições requerem alta concentração do ingrediente ativo (10nM). Desta forma, a ação do glifosato sobre essas enzimas é provavelmente um efeito secundário. Estudos experimentais sobre a resistência do glifosato nas células de culturas de plantas e bactérias suportam a conclusão de que a EPSP sintase é o alvo bioquímico responsável pela poderosa e bem conhecida ação do glifosato (ARNAUD et al., 1998).

Enzimas são catalisadores muito eficazes, porém, 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 esse panorama apontando e quantificando os mecanismos catalíticos empregados por enzimas.

Centenas de estruturas tridimensionais determinadas para enzimas complexadas a análogos de estado de transição (ET) apóiam a noção de complementariedade 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 et al., 1995).

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 (SIKORSKI; GRUYS, 1997; STEINRUCKEN; AMRHEIN, 1984).

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 (ANDERSON; SIKORSKI; JOHNSON, 1988; SIKORSKI; GRUYS, 1997; STEINRUCKEN; AMRHEIN, 1984).

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 (KNOWLES et al., 1993; REAM et al., 1998; SIKORSKI; GRUYS, 1997).

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 (REAM et al., 1998; SIKORSKI; GRUYS, 1997).

Compostos especialmente 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).

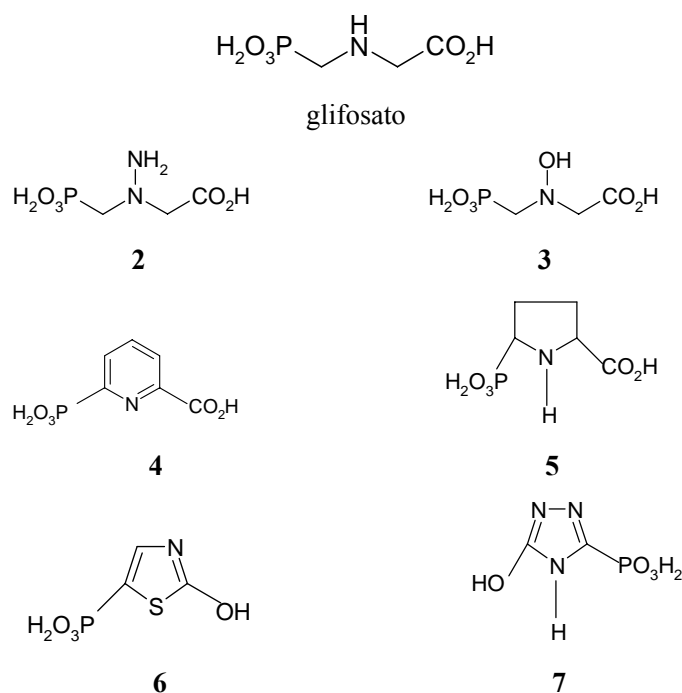


Figura 8 Glifosato e alguns análogos

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). Esses 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.

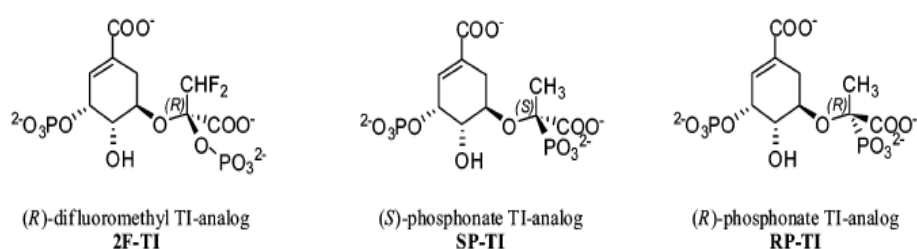


Figura 9 Análogos do estado de transição estudados por Funke et al. (2007)

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, pera, pêssigo, 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, Mao e Sikorski (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.

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 no mundo.

Em diversos tipos de cultivo esse 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) e devido ao transporte do princípio ativo por todo o sistema nenhuma parte da planta sobrevive (AMARANTE JÚNIOR et al., 2002).

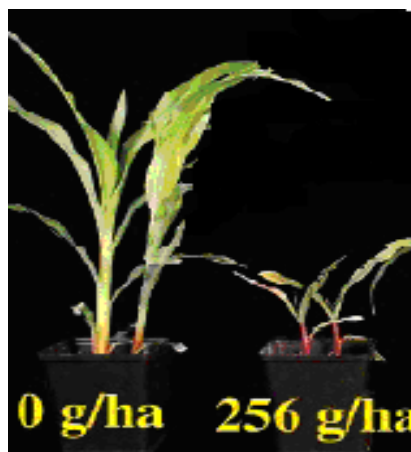


Figura 10 As plantas tratadas com glifosato apresentam um menor crescimento quando comparadas às plantas sem o tratamento com o herbicida e morrem em poucos dias por falta de alguns nutrientes essenciais

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 R-PO (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; HERSZAGE; AFONSO, 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 (COUTINHO; MAZO, 2005).

O movimento no interior das células é a maior barreira para absorção e translocação de glifosato pelas plantas (HALL; HART; JONES, 2000; NILSSON, 1985). 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 (BERNARDS et al., 2005). A absorção foliar é reduzida quando o glifosato é aplicado em solução com cálcio, ferro, magnésio, manganês e zinco (BERNARDS et al., 2005; NILSSON, 1985). Contudo, cloreto de cálcio em solução aumenta a absorção de glifosato em culturas de milho e soja (HETHERINGTON et al., 1998) e adicionando ferro e manganês aumenta-se a translocação do glifosato da solução da raiz para as folhas de trigo (BERNARDS et al., 2005; NILSSON, 1985). 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; HART; JONES, 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 micro-organismos mais complexos, não existindo, entretanto, em animais (AMARANTE JÚNIOR et al., 2002).

Apesar da toxicidade relativamente baixa do glifosato alguns dos componentes dos produtos 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 realizar diagnóstico acreditando que se tratava de um distúrbio nutricional. No entanto, em 50% das ocorrências, o problema era devido à fitotoxicidade do glifosato (SILVEIRA, 2003).

Na literatura (MONQUERO et al., 2004) encontramos 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, 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 a substâncias polares (menor teor de cera epicuticular) sendo uma via de penetração de

herbicidas (TUFFI-SANTOS et al., 2006). Esse fato pode favorecer a penetração do glifosato em plantas onde a presença dessas estruturas epidérmicas seja frequente.

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; SANTOS; MACHADO, 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 micro-organismos 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; DOBSON; SOLOMON, 2000).

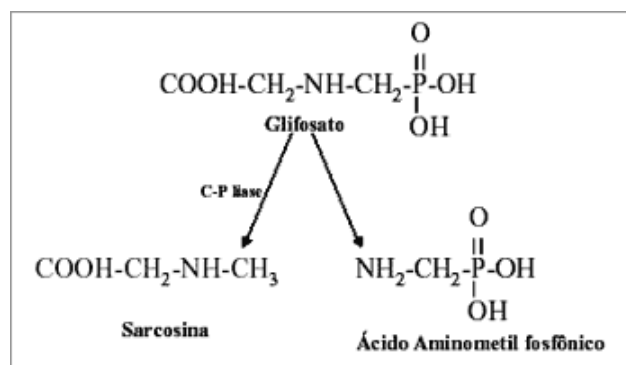


Figura 11 Degradação do glifosato por bactérias do solo com produção do ácido aminometilfosfônico e sarcosina

A degradação do glifosato no solo é muito rápida e realizada por grande variedade de micro-organismos 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 micro-organismos 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. (2002), 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 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 processada 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 materiais, 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 (UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS - UFLA, 2008).

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).

2.5 Mecânica molecular

Os métodos baseados na Mecânica Molecular (MM) utilizam as leis da física clássica para prever propriedades estruturais e moleculares. Este tipo de cálculo ignora os movimentos dos elétrons e calcula a energia de um sistema como uma função apenas das posições nucleares. Isso torna a MM um método adequado para lidar com sistemas contendo um número grande de átomos, como por exemplo, proteínas (FRANÇA, 2004; HIGGINS; TAYLOR, 2001).

O conjunto de equações empíricas e parâmetros usados em cada esquema da MM é chamado de campo de forças. Cada campo de forças é parametrizado para um tipo específico de sistema. No caso de sistemas biomoleculares, os campos de forças mais utilizados são CHARMM (BROOKS et al., 1983; NAMBA; SILVA; SILVA, 2008), GROMOS (GUNSTEREN; BERENDSEN, 1987; NAMBA; SILVA; SILVA, 2008), AMBER (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008; WEINER et al., 1986), OPLS (JORGENSEN; TIRADO-RIVES, 1988; NAMBA; SILVA; SILVA, 2008) e CVFF (HAGLER; HULER; LIFSON, 1974; NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

A maioria dos campos de forças é composta por um simples conjunto de quatro componentes que correspondem às forças intra e intermoleculares do sistema (FRANÇA, 2004), ou seja, os campos de forças são descritos como a

soma de vários termos de energia, incluindo os termos para átomos ligados (comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedros) e os termos para átomos não ligados (interações de Van der Waals e de Coulomb) (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008). Um típico campo de forças pode ser descrito pela equação 1.

$$U(\mathbf{r}^N) = \sum_{\text{ligações}} \frac{k_i}{2} (r_i - r_{i,0})^2 + \sum_{\text{ângulos}} \frac{k_i}{2} (\theta_i - \theta_{i,0})^2 + \sum_{\text{torções}} V_n [1 + \cos(n\omega - \gamma)] + \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \left(4\epsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \right) \quad (1)$$

Em que:

$U(\mathbf{r}^N)$ é a energia potencial total, que é uma função das posições (\mathbf{r}) de N partículas (normalmente átomos). O primeiro termo modela as interações entre pares de átomos ligados, modelados aqui pelo potencial harmônico que dá o aumento na energia quando o seu comprimento r_i desvia do valor de referência $r_{i,0}$. O segundo termo é uma soma sobre todos os ângulos de valência (ângulos A-B-C) na molécula, novamente modelada usando um potencial harmônico. O terceiro termo é o potencial torcional que modela como a energia varia quando as ligações giram. A quarta contribuição é o termo não ligado. Este é calculado entre todos os pares de átomos (i e j) que estão em diferentes moléculas ou na mesma molécula, mas separados por no mínimo 03 ligações.

Em um campo de forças simples o termo não ligado é usualmente modelado usando um termo de potencial de Coulomb para interações eletrostáticas e um termo de potencial de Lennard-Jones para as interações de *van der Waals*, como representado na equação 1.

2.5.1 Ancoramento molecular (Docking)

O processo de ancoramento molecular envolve a predição da conformação do ligante e sua orientação dentro do sítio de interação da proteína.

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 interação é de grande interesse para o planejamento de novos medicamentos (IWATA et al., 2000). Uma das conformações estruturais mais confiáveis é obtida por análise de raios-X de cristais do complexo ou RMN, mas não é fácil obter dados experimentais de todos os inibidores de interesse. A simulação computacional do ancoramento molecular (“*docking*”) é uma das mais importantes técnicas de investigação das interações moleculares entre a proteína e o ligante nos casos em que a estrutura 3D da proteína já foi elucidada (SILVEIRA, 2003). Esse tipo de simulação encontra a estrutura mais estável do complexo proteína-ligante e calcula essa estabilidade relativa.

Os valores da função utilizada no ancoramento (*Docking Scoring Function*), E_{score} , são definidos pela Eq. 2

$$E_{score} = E_{inter} + E_{intra} \quad (2)$$

Em que, o termo E_{inter} , que corresponde a energia de interação ligante-proteína, é definido de acordo com a Eq. 3.

$$E_{inter} = \sum_{i \in \text{ligante}} \sum_{j \in \text{proteína}} \left[E_{PLP}(r_{ij}) + 332.0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2} \right] \quad (3)$$

O primeiro termo E_{PLP} representado na Eq. 3 é um termo de energia potencial que usa dois conjuntos diferentes de parâmetros: um para a aproximação do termo estérico (van der Waals) entre átomos, e 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 para kcal mol⁻¹ (RAMALHO et al., 2009; THOMSEN; CHRISTENSEN, 2006).

O termo E_{intra} que corresponde a energia interna do ligante é definido de acordo com a Eq. 4.

$$E_{intra} = \sum_{i \in \text{ligante}} \sum_{j \in \text{ligante}} E_{PLP}(r_{ij}) + \sum_{\text{ligações flexíveis}} A[1 - \cos(m \cdot \theta - \theta_0)] + E_{penalizada} \quad (4)$$

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 energia de torção, em que θ é o ângulo de torção da ligação. A média da contribuição de torção da ligação da energia é usada se diversas torções forem determinadas. O último termo, $E_{penalizada}$ (termo de correção), atribui uma penalidade de 1.000 se a distância entre dois átomos pesados (mais de duas ligações distantes) for menor que 2,0 Å, punindo conformações inexistentes do ligante. Em resumo, essas funções são usadas para ancorar automaticamente uma molécula flexível em uma molécula molde (proteína).

A técnica de ancoramento molecular encontra uma média de estruturas estáveis do ligante na proteína 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 muito grande (MIZUTANI; NIWA; TANAKA, 1994).

2.5.2 Dinâmica molecular

Os cálculos de dinâmica molecular (DM) são fundamentados nos princípios da Mecânica Clássica e fornecem informações sobre o comportamento dinâmico microscópico, dependente do tempo, dos átomos individuais que compõem o sistema (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

A DM pode ser empregada tanto para sistemas com elétrons, átomos, quanto para sistemas macromoleculares (GONÇALVES, 2009; TUCKERMAN; MARTYNA, 2000). Quando se trata de sistemas biomoleculares, utilizam-se cálculos da mecânica clássica, porém, quando o sistema envolve problemas como reações químicas, são empregados termos quânticos (FRANÇA, 2004; KARPLUS; PETSKO, 1990).

Os cálculos de DM consistem da solução numérica, passo a passo, da equação de movimento de Newton, que pode ser descrita para um sistema atômico simples pelas Equações 5 e 6.

$$F_i(t) = m_i a_i \quad (5)$$

$$F_i(t) = - \frac{\partial V(r_i)}{\partial r_i} \quad (6)$$

Onde F_i representa a força que atua sobre cada partícula do sistema em um instante de tempo t , e a_i é a aceleração do átomo i de massa m_i (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

Quando já se define o campo de forças, é possível determinar a força que atua sobre cada átomo, calculando-se a primeira derivada da energia potencial obtida do campo de forças escolhido com relação à posição dos núcleos (Equação 6) (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008). Essas equações são

resolvidas simultaneamente em um pequeno espaço de tempo, com isso se tem a trajetória de cada átomo do sistema com relação ao tempo.

Existem algumas condições iniciais que são essenciais para simulações de DM. Por exemplo, para se realizar um cálculo de DM é importante especificar as posições iniciais das partículas que compõem o sistema, geralmente elas são situadas na posição de uma rede cristalina, para evitar sobreposições indesejáveis entre elas. O sistema é montado dentro de uma caixa que pode adotar diferentes geometrias, mas, geralmente, se utiliza uma caixa cúbica. No caso de sistemas biomoleculares são adicionadas moléculas de águas dentro do sistema, e na caixa é aplicado o modelo de condição periódica de contorno, evitando que as moléculas de água escapem do meio (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

Antes de se iniciar as simulações de DM, o sistema deve ser minimizado a fim de se evitar maus contatos entre os átomos (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008). A minimização ou otimização do sistema é feita a fim de se obter uma energia próxima do mínimo local. Os algoritmos de minimização mais utilizados são: o método do máximo declive (*steepest descent*), o método dos gradientes conjugados e o método quasi Newton Raphson.

2.5.2.1 Método do máximo declive

O método do máximo declive é um método de primeira derivada que converge vagarosamente nas proximidades do mínimo, mas é poderoso para configurações distantes de um mínimo de energia. De um modo geral, com este algoritmo é possível melhorar estruturas cristalográficas pouco refinadas, otimizar as construídas graficamente ou construir estruturas a partir de informações de RMN ou por modelagem comparativa (FRANÇA, 2004).

2.5.2.2 Método dos gradientes conjugados

Um método mais sofisticado de busca de um mínimo da função energia, além de utilizar a informação sobre a primeira derivada (gradiente), leva em conta o caminho já percorrido na busca do mínimo. Este método, denominado “gradientes conjugados” permite em geral uma convergência mais rápida que o método do máximo declive que utiliza somente a informação do gradiente na coordenada atualizada. O método dos gradientes conjugados utiliza para a determinação do passo seguinte, além do valor do gradiente no ponto atual, o valor do gradiente obtido no passo anterior (FRANÇA, 2004).

2.5.2.3 Método quasi Newton-Raphson

O método Newton-Raphson utiliza tanto as derivadas primeiras quanto as derivadas segundas da função. Assim, além de usar as informações do gradiente, utiliza a curvatura para prever onde a função mudará a direção ao longo do gradiente (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

2.6 Teoria do funcional de densidade

O método DFT apresenta vantagem de ser relativamente rápido com uma precisão similar a outros métodos convencionais de maior demanda computacional. Isto se deve ao fato de que usando a densidade eletrônica, a integral para repulsão de Coulomb necessita ser feita somente sobre a densidade eletrônica, que é uma função tridimensional, logo escala como N^3 , onde N é o número de funções de bases. Já os métodos *ab initio*, escalam acima de N^4 (KIRKPATRICK; GELATT; VECCI, 1983). Comparado aos métodos HF e semiempíricos, os métodos baseados na DFT apresentam vantagem que é a inclusão implícita da correlação eletrônica no cálculo (FERREIRA, 2011).

As vantagens citadas anteriormente são as principais responsáveis pela emergência da aproximação DFT como um método computacional tangível e versátil. Neste sentido, a DFT tem sido empregada, com sucesso, na obtenção de dados termodinâmicos, estruturas moleculares, campos de forças e frequências, estruturas de estados de transição, espectroscopia ultravioleta, EPR (ressonância paramagnética eletrônica), fotoeletrônica e RMN (ressonância magnética nuclear), bem como, na determinação de barreiras de ativação, momentos de dipolos e outras propriedades eletrônicas (BECKE, 1993; FUKUI, 1981; LEE; YANG; PARR, 1988).

A origem do DFT tem suas raízes na teoria estatística dos átomos proposta por Thomas e Fermi, em que a energia cinética e a energia de Coulomb dos elétrons eram expressas somente pela densidade (FERMI, 1928; THOMAS, 1927). O método DFT é baseado, então, na função densidade de probabilidade eletrônica ou função densidade eletrônica, comumente chamada de densidade eletrônica ou densidade de carga, designada por $\rho(x,y,z)$. Um funcional de densidade é então usado para obter a energia para a densidade eletrônica, sendo que a minimização deste funcional leva à energia do estado fundamental do sistema multieletrônico. Cabe ressaltar que, um funcional é uma função de uma função que, neste caso, é a densidade eletrônica. Um funcional exato de densidade não é conhecido. Existe uma gama de diferentes funcionais que podem apresentar vantagens e desvantagens na descrição de um sistema (FERREIRA, 2011).

A DFT moderna pode ser enunciada pelo teorema proposto por Hohenberg e Khon (1964) em que existe uma relação expressa por um funcional (Equação 7), uma função E que está em função de outra função $\rho(r)$, que possibilita obter a energia eletrônica do sistema (E_{ele}).

$$E[\rho(r)] = E_{ele} \quad (7)$$

Além disso, esses dois pesquisadores demonstraram que a densidade eletrônica $\rho(\mathbf{r})$ obedece ao teorema variacional. Isto significa que para uma dada densidade eletrônica de um sistema, sua energia E_{ele} será um valor maior ou igual ao valor de energia exata (E_0) representado na Equação 8.

$$E[\rho(\mathbf{r})] = E_{\text{ele}} \geq E_0 \quad (8)$$

Uma aplicação prática dos dois teoremas apresentados anteriormente foi formulada por Khon e Sham (1965), e este fato possibilitou a aplicação do método DFT a sistemas moleculares. Em sua formulação foram consideradas as seguintes aproximações: (a) a densidade eletrônica $\rho(\mathbf{r})$ (Equação 9) é representada com uma combinação linear de funções de base φ_i , orbitais de Khon-Sham, onde estes orbitais são utilizados para formar um determinante de Khon-Sham que é utilizado para calcular a energia total do sistema; (b) o funcional para o cálculo da energia DFT (Equação 10) é escrito como o somatório dos funcionais energia cinética dos elétrons $T_e[\rho(\mathbf{r})]$ (Equação 11), energia potencial núcleo-elétron $V_{\text{ne}}[\rho(\mathbf{r})]$ (Equação 12), energia potencial elétron-elétron $V_{\text{ee}}[\rho(\mathbf{r})]$ (Equação 13) e energia potencial de correlação e troca ($E_{\text{xc}}[\rho(\mathbf{r})]$).

$$\rho(\mathbf{r}) = \sum |\varphi_i(\mathbf{r})|^2 \quad (9)$$

$$E[\rho(\mathbf{r})] = T_e[\rho(\mathbf{r})] + V_{\text{ne}}[\rho(\mathbf{r})] + V_{\text{ee}}[\rho(\mathbf{r})] + E_{\text{xc}}[\rho(\mathbf{r})] \quad (10)$$

$$T_e[\rho(\mathbf{r})] = -\frac{1}{2} \sum_1^{2n} \varphi_1^*(\mathbf{r}_1) \nabla_1^2 \varphi_1(\mathbf{r}_1) d\mathbf{r}_1 \quad (11)$$

$$V_{ne}[\rho(\mathbf{r})] = -\frac{1}{2} \sum_j^{\text{nucleo}} Z_j \int \frac{\rho(r_1)}{r_{1j}} dr_1 \quad (12)$$

$$V_{ee}[\rho(\mathbf{r})] = +\frac{1}{2} \iint \frac{\rho(r_1)\rho(r_2)}{r_{12}} dr_1 dr_2 \quad (13)$$

c) os orbitais de Kohn-Sham são aqueles que minimizam a energia do sistema e são obtidos a partir da resolução das equações de autovalores monoelétrônicas (Equação 14), onde h_i^{KS} representa o operador de Kohn-Sham, ε_i é a energia orbital e v_{xc} é o potencial de correlação e troca que é definido como a derivada do funcional de correlação e troca pela função de densidade eletrônica $\rho(r)$ (Equação 15) (KOCH; HOLTHAUSEN, 2002; PARR; YANG, 1989).

$$h_i^{\text{KS}} \varphi_i = \varepsilon_i \varphi_i$$

$$\left[-\frac{1}{2} \nabla_i^2 - \sum_j^{\text{Núcleo}} \frac{z_j}{r_{1j}} + \int \frac{\rho(r_2)}{r_{12}} dr_2 + v_{xc}(\mathbf{r}) \right] \varphi_i = \varepsilon_i \varphi_i \quad (14)$$

$$v_{xc} = \frac{\delta E_{xc}[\rho(r)]}{\delta \rho(r)} \quad (15)$$

O desafio do método DFT reside no desenvolvimento de funcionais de energia, sendo mais específico, da parte do funcional relacionada à energia de correlação e troca, E_{xc} (COSTA, 2010). A aproximação do gradiente generalizado (GGA) foi proposta de forma a incluir o gradiente da densidade eletrônica e impondo que as propriedades assintóticas dos funcionais de troca-correlação conhecidas fossem satisfeitas. As diferentes formas de incluir o gradiente da densidade eletrônica formam a família de funcionais GGAs.

Um dos funcionais de troca mais utilizados é o B3 proposto por Becke (1993), que utilizamos neste trabalho (Equação 16):

$$E_x = (1 - a_0)E_x^{LSDA} + a_0E_x^{HF} + a_x\Delta E_x^{B88} \quad (16)$$

Para correlação, foi utilizado o funcional proposto por Lee e Chung (2009) e Lee, Yang e Parr (1988) (Equação 17):

$$E_c = -a \int \frac{1}{1+d\rho^{\frac{1}{3}}} \left\{ \rho + b\rho^{\frac{-2}{3}} \left[C_{\rho\rho}^{\frac{5}{3}} - 2t_w + \left(\frac{1}{9}t_w + \frac{1}{18}\nabla^2\rho \right) \right] \exp\left(-c\rho^{\frac{-1}{3}}\right) \right\} dr \quad (17)$$

2.7 Conjunto de funções de base

Geralmente, as funções de base atômica utilizadas em cálculos de orbitais moleculares são do tipo Slater (STO) ou Gaussianas (GTO). Apesar das funções STO permitirem uma descrição melhor dos orbitais moleculares, elas exigem um esforço computacional maior do que quando são utilizadas as

funções GTO para resolução das integrais de repulsão eletrônica. Logo, a maioria dos cálculos quânticos utiliza o tipo GTO (LEVINE, 1991).

Existem diversos tipos de conjuntos de funções de base. Em geral, de acordo com o número de gaussianas que forma a base, é possível firmar uma sequência hierárquica crescente a partir de um conjunto mínimo de funções de base denominado STO-3G. A sigla STO-3G indica que os orbitais de Slater foram representados pela combinação de três gaussianas primitivas (HEHRE et al., 1986).

A primeira modificação de um conjunto mínimo de funções constitui no emprego de duas funções em substituição a cada uma das funções previamente utilizadas na construção de um conjunto mínimo. Os conjuntos de funções de base, assim construídos, são denominados de conjunto de funções “double zeta” (SZABO; OSTLUND, 1996).

Na prática, como forma de simplificação, normalmente se usa um conjunto de funções de base que apresenta duplicação apenas nas funções que descrevem a “camada de valência” (FERREIRA, 2011).

Para entender como o código de uma base representa suas funções primitivas e contraídas, observe o exemplo da função 6-31G. O primeiro número (no caso 6) remete ao número de gaussianas primitivas (GTO) aplicadas aos orbitais atômicos de camada interna. O segundo algarismo (no caso 3) representa o número de GTO formadoras da função contraída aplicada a parte interna dos orbitais atômicos de valência. Por último, representado pelo número 1, tem-se o número de funções primitivas que representam a parte externa dos orbitais de valência.

A descrição de alguns processos químicos, como interações intermoleculares, exige um melhoramento na função de base por meio da inclusão de funções de polarização, por exemplo, adicionando funções do tipo “d” sobre os átomos da primeira linha (Li-F) e funções do tipo “p” sobre o

hidrogênio. Estas operações permitem a expansão da distribuição da função de base fora das posições nucleares (HEHRE et al., 1986).

É importante ainda considerar, que para descrever sistemas com densidade de cargas afastadas dos núcleos como ânions e estados excitados, é necessária a inclusão de outro tipo de função de base contendo pequenos valores para os expoentes dos orbitais. Estas funções variam suavemente com a distância r , e são, portanto, denominadas funções difusas. Na família dos conjuntos de base de Pople, a presença de funções difusas é indicada pelo sinal de “+” no nome do conjunto de base. O sinal “++” indica a inclusão de funções difusas s para os átomos de hidrogênio e funções difusas do tipo s e p para átomos diferentes do hidrogênio (SZABO; OSTLUND, 1996).

2.8 Modelo contínuo polarizável

Um dos grandes desafios de se modelar reações químicas em meio aquoso é a inclusão do efeito de solvatação. Computacionalmente existem duas maneiras de se representar o meio solvente. O modelo chamado explícito, onde as moléculas do solvente estão presentes formando o meio onde está a molécula do soluto. Ou modelo contínuo, onde as moléculas do solvente são substituídas por um meio com a mesma constante dielétrica do solvente escolhido, mas sem apresentar a estrutura molecular explicitamente.

O modelo contínuo se caracteriza pela ausência das moléculas do solvente. Nesse modelo, a estrutura molecular do solvente é substituída pela constante dielétrica do solvente onde se deseja realizar o estudo.

Para melhor visualização de como é feita a substituição da estrutura molecular do solvente pela constante dielétrica, pode-se imaginar o solvente como uma “gelatina” com a constante dielétrica do solvente em questão. Assim

surge uma questão: Como inserir o soluto na “gelatina”? A inserção é feita em uma cavidade criada na “gelatina” (NORONHA, 2010).

Assim nesse modelo é necessário considerar a energia necessária para gerar a cavidade no meio em que o soluto será inserido. Esquemáticamente o procedimento para o cálculo da energia de solvatação, no modelo contínuo é:

- a) Cria-se o meio.
- b) Faz-se a cavidade.
- c) Insere-se o soluto.

A energia total pode ser decomposta, dentro do modelo contínuo, em suas contribuições eletrostáticas, de cavidade e de dispersão-repulsão:

$$E_{\text{continuum}} = E_{\text{eletrostática}} + E_{\text{cavidade}} + E_{\text{Disp-Rep}}$$

(18)

REFERÊNCIAS

- AMARANTE JÚNIOR, O. P. et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 589-593, jul./ago. 2002.
- ANDERSON, K. S. et al. Observation by C-13 nmr of the epsp synthase tetrahedral intermediate bound to the enzyme active-site. **Biochemistry**, New York, v. 29, n. 6, p. 1460-1465, 1990.
- ANDERSON, K. S. et al. Isolation and structural elucidation of the tetrahedral intermediate in the EPSP synthase enzymatic pathway. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 110, n. 19, p. 6577-6579, 1995.
- 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, n. 19, p. 7395-7406, 1988.
- ARNAUD, L. et al. Physiological behavior of two tobacco lines expressing EPSP synthase resistant to glyphosate. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 62, n. 1, p. 27-39, Mar. 1998.
- BARJA, B. C.; HERSZAGE, J.; AFONSO, M. S. Iron(III)-phosphonate complexes. **Polyhedron**, New York, v. 20, n. 15/16, p. 1821-1830, June 2001.
- BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry: 3., the role of exact exchange. **Journal of Chemical Physics**, Ithaca, v. 98, n. 7, p. 5648-5652, July 1993.
- BERMAN, H. M. et al. The protein data bank. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 28, n. 2, p. 235-242, Apr. 2000.
- BERNARDS, M. L. et al. Glyphosate interaction with manganese in tank mixtures and its effect on glyphosate absorption and translocation. **Weed Science**, Champaign, v. 53, n. 6, p. 787-794, Nov./Dec. 2005.
- BILLING, G. D.; MIKKELSEN, V. **Introduction to molecular dynamics and chemical kinetics**. New York: Wiley, 1996. 100 p.
- BIZUIK, M. et al. Occurrence and determination of organic pollutants in tap and surface waters of the Gdansk district. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 733, n. 2, p. 171-183, Apr. 1996.

BONDINEL, W. E. et al. Mechanism of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthetase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 246, n. 20, p. 61-91, 1971.

BROOKS, B. R. et al. Charmm: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. **Journal of Computational Chemistry**, Malden, v. 4, n. 2, p. 187-217, Sept. 1983.

CAETANO, M. S. et al. Analysis of wild-type and Gly96Ala mutant EPSP synthase structures via in silico docking with inhibitors and molecular dynamics simulation. **Current Bioactive Compounds**, Sharjah, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2009.

CARVALHO, I. et al. Introdução a modelagem molecular de fármacos no curso experimental de química farmacêutica. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 428-438, maio/jun. 2003.

COSTA, E. B. da. **Aplicação da química quântica ao estudo de um grupo de moléculas antihistamínicas H₃**. 2010. 86 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

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, nov./dez. 2005.

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, June 1995.

ESCHENBURG, S. et al. How the mutation glycine96 to alanine confers glyphosate insensitivity to 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. **Planta**, Berlin, v. 216, n. 1, p. 129-135, Jan. 2002.

_____. 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 of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 49, p. 49215-49222, Dec. 2003.

FERMI, E. Eine Statistische begründung zur bestimmung einiger eigenschaften des atoms und ihre anwendungen auf die theorie des periodischen systems der elemente. **Zeitschrift für Physik**, Berlin, v. 48, p. 73-79, 1928.

FERREIRA, D. E. C. **Estudo teórico de modelos biomiméticos para a hidrólise de ésteres fosfóricos**. 2011. 154 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

FISCHER, R. S. et al. Comparative action of glyphosate as a trigger of energy drain in eubacteria. **Journal Bacteriology**, Oxford, v. 168, n. 3, p. 1147-1154, Dec. 1986.

FITZPATRICK, D. Evolution and chaos in property rights systems: the third world tragedy of contested access. **Yale Law Journal**, New Haven, v. 115, n. 5, p. 996-1048, Mar. 2006.

FRANÇA, T. C. C. **Modelagem molecular da serina hidroximetiltransferase de *Plasmodium Falciparum*: modelos tridimensionais e proposta de potenciais inibidores seletivos**. 2004. 232 p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2004.

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

FUKUI, K. The path of chemical reactions: the IRC approach. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 14, n. 12, p. 363-364, Dec. 1981.

FUNKE, T. et al. Differential inhibition of class I and class II 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases by tetrahedral reaction intermediate analogues. **Biochemistry**, New York, v. 46, n. 46, p. 13344-13351, Nov. 2007.

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

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. et al. **Environmental fates and impacts of major forest use pesticides**. Washington: USDA, 1984. 168 p.

GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. Ecotoxicological risk assessment for roundup herbicide. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 167, n. 1, p. 35-120, 2000.

GONÇALVES, A. S. **Estudo da reativação da acetilcolinesterase humana inibida pelo organofosforado tabun através de métodos híbridos clássicos quanto-mecânicos**. 2009. 207 p. Tese (Doutorado em Biofísica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

GUNSTEREN, W. F. van; BERENDSEN, H. J. C. **Groningen molecular simulation (GROMOS): library manual**, biosmos. Netherlands: Groningen, 1987. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp984217f>>. Acesso em: 10 set. 2010.

HAGLER, A. T.; HULER, E.; LIFSON, S. Energy functions for peptides and proteins: I., derivation of a consistent force field including the hydrogen bond from amide crystal. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 96, n. 17, p. 5319-5327, Aug. 1974.

HALL, G. J.; HART, C. A.; JONES, C. A. Plants as sources of cations antagonistic to glyphosate activity. **Pest Management Science**, Sussex, v. 56, n. 4, p. 351-358, Apr. 2000.

HEHRE, W. J. et al. **Ab initio molecular orbital theory**. New York: J. Wiley, 1986. 576 p.

HETHERINGTON, P. R. et al. Absorption and efflux of glyphosate by cell suspensions. **Journal and Experimental Botany**, Elmsford, v. 49, n. 320, p. 527-533, Mar. 1998.

HIGGINS, D.; TAYLOR, W. **Bioinformatics sequence, structure and databanks**. Oxford: Oxford University, 2001. 269 p.

HOHENBERG, P.; KOHN, W. Inhomogeneous electron gas. **Physical Review B**, New York, v. 136, p. 864, 1964.

IWATA, Y. et al. Conformational analysis and docking study of potent factor XIII a inhibitors having a cyclopropenone ring. **Journal of Molecular Graphics & Modelling**, New York, v. 18, n. 6, p. 591-599, Dec. 2000.

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

JORGENSEN, W. L.; TIRADO-RIVES, J. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 110, n. 6, p. 1657-1666, June 1988.

KARPLUS, M.; PETSKO, G. A. Molecular dynamics simulations in biology. **Nature**, London, v. 347, n. 6294, p. 631-639, Oct. 1990.

KIRKPATRICK, S.; GELATT, C. D.; VECCI, M. P. Optimization by simulated annealing. **Science**, New York, v. 220, n. 4598, p. 671-680, 1983.

KNOWLES, W. S. et al. 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, Dec. 1993.

KOCH, W.; HOLTHAUSEN, M. C. **Chemist's guide to density functional theory**. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. 300 p.

KOHN, W.; SHAM, L. J. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. **Physical Review**, New York, v. 140, n. 4A, p. A1133-A1138, 1965.

LEE, C.; YANG, W.; PARR, R. G. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron-density. **Physical Review B**, New York, v. 37, n. 2, p. 785-789, 1988.

LEE, J. J. et al. Steric course of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthetase and anthranilate synthetase reactions. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 106, n. 11, p. 3367-3368, Jan. 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**, New York, v. 105, n. 3, p. 349-352, June 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, n. 28, p. 7329-7337, July 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, n. 4, p. 1653-1654, Feb. 1990.

LEVINE, I. N. **Quantum chemistry**. 4th ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall International, 1991. 629 p.

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 of Plant Science**, Amsterdam, v. 160, n. 2, p. 217-227, Apr. 1999.

MING, A. N. et al. 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, n. 42, p. 12759-12767, Sept. 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, n. 4, p. 699-708, Dec. 1994.

MIZYED, S. et al. Identification of the catalytic residues of AroA (Enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase) using partitioning analysis. **Biochemistry**, New York, v. 42, n. 23, p. 6986-6995, June 2003.

MONQUERO, P. A. et al. 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.

NAMBA, A. M.; SILVA, V. B. da; SILVA, C. H. T. P. da. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, Marília, v. 33, n. 4, p. 13-24, out./dez. 2008.

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.

NORONHA, A. L. O. **Estudo teórico de sistemas de coordenação contendo vanádio (IV)/ vanádio (V)/ácido acetoidroxâmico, alumínio/citrato e compostos de inclusão entre espirolactona e β -ciclodextrina**. 2010. 113 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

PARR, R. G.; YANG, W. **Density-functional theory of atoms and molecules**. New York: Oxford University, 1989. 333 p.

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

PRIESTMAN, M. A. et al. 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Staphylococcus aureus* is insensitive to glyphosate. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 579, n. 25, p. 728-732, Oct. 2005.

PRIMEL, E. G. et al. 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, n. 4, p. 605-609, jul./ago. 2005.

RAMALHO, T. C. et al. Construction and assessment of reaction models of class I EPSP synthase: molecular docking and density functional theoretical calculations. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, New York, v. 27, n. 2, p. 195-208, Oct. 2009.

RAMSTEDT, M. et al. Thermodynamic and spectroscopic studies of cadmium(II)-N-(phosphonomethyl)glycine (PMG) complexes. **Inorganica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 357, n. 4, p. 1185-1192, Mar. 2004.

REAM, J. E. et al. Purification and properties of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from dark-grown seedlings of sorghum-bicolor. **Plant Physiology**, Washington, v. 87, n. 1, p. 232-238, May 1998.

SCHONBRUNN, E. et al. 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, n. 4, p. 343-351, Apr. 2002.

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, n. 1, p. 2-8, June 1997.

SILVEIRA, R. L. V. de A. Fitotoxicidade de glifosato em *Eucalyptus*. **Addubare**, Piracicaba, ano 2, n. 9, p. 4-7, out./dez. 2003.

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, n. 1, p. 113-120, Feb. 2008.

STEINRUCKEN, H. C.; AMRHEIN, N. 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of klebsiella-pneumoniae: 1., purification and properties. **European Journal Biochemistry**, Berlin, v. 143, n. 2, p. 341-349, 1984.

SZABO, A.; OSTLUND, N. S. **Modern quantum chemistry**: introduction to advanced electronic structure theory. New York: Dover, 1996. 480 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

THOMAS, L. H. Wave mechanical treatment of the fermi gas. **Proceedings of the Cambridge Philosophical Society**, Cambridge, v. 23, p. 542-544, 1927.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M. H. *MolDock*: a new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, v. 49, n. 11, p. 3315-3332, June 2006.

TUCKERMAN, M. E.; MARTYNA, G. J. Understanding modern molecular dynamics: techniques and applications. **Journal of Physical Chemistry B**, Washington, v. 104, n. 2, p. 159-178, Jan. 2000.

TUFFI-SANTOS, L. D. et al. 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.

_____. Crescimento do eucalipto sob efeito da deriva de glyphosate. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 1, p. 133-137, 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. Melissa Soares Caetano; Elaine Fontes Ferreira da Cunha; Teodorico de Castro Ramalho. **Compostos inibidores da EPSP sintase como ingredientes ativos de herbicidas**. BR n. PI 0801904-5A2, 15 maio 2008.

VELLINI, E. D. et al. Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. **Pest Management Science**, Sussex, v. 64, n. 4, p. 489-496, Apr. 2008.

VOET, C. et al. Molecular design of GM-CSF antagonist peptides. **Arthritis and Rheumatism**, Atlanta, v. 38, n. 9, p. 720-720, Sept. 1995.

WEINER, S. J. et al. All atom force field for simulations of proteins and nucleic acids. **Journal of Computational Chemistry**, Malden, v. 7, n. 2, p. 230-252, Apr. 1986.

CAPÍTULO 2

**UNDERSTANDING THE INACTIVATION PROCESS OF
ORGANOPHOSPHATE HERBICIDES: A DFT STUDY OF
GLYPHOSATE METALLIC COMPLEXES WITH Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} ,
 Cu^{2+} , Co^{3+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} AND Al^{3+}**

Melissa S. Caetano, Teodorico C. Ramalho, Douglas F. Botrel, Elaine F. F. da
Cunha, Walclee C. Mello.

Department of Chemistry, Federal University of Lavras, CEP 37200-000 Lavras,
Minas Gerais, Brazil.

O Capítulo 2 foi aceito no Periódico científico: International Journal of Quantum
Chemistry

1 ABSTRACT

Glyphosate is the active component of one of the top-selling herbicides, which is also a potent EPSP synthase inhibitor. The herbicide is absorbed by living tissue and translocated via the phloem, to plant roots and rhizomes. When applied directly into the soil it has low activity, due to the high adsorption by soil constituents. Understanding the specific interactions between metals in the soil and glyphosate is the main step in understanding the low activity of the herbicide when applied directly into the ground rather than pulverized. We can observe that there is a stability order for both tetrahedral and octahedral complexes between glyphosate and metals: Zn>Cu>Co>Fe>Cr>Al>Ca>Mg.

Keywords: glyphosate, complexes, theoretical calculations.

2 INTRODUCTION

Glyphosate [(*N*-phosphonomethyl)glycine], which is the active ingredient of the weed control agent Roundup, is a nonselective, broad spectrum herbicide that effectively controls nearly all of the world's most problematic weeds (Franz et al., 1996; Sikorski & Gruys, 1997). In various types of cultivation, this herbicide is usually pulverized and absorbed into the plant, being transported throughout the plant, acting in various enzyme systems, inhibiting amino acid metabolisms (Amarante Junior et al., 2002).

It is also well-known that the glyphosate inhibits EPSP synthase (5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase) in a reversible reaction, which is competitive versus PEP and uncompetitive versus S3P (Sikorski & Gruys, 1997; Boocock & Coggins, 1983). The EPSP synthase enzyme catalyzes the transfer of the enolpyruvyl moiety of phosphoenolpyruvate (PEP) to the 5-hydroxyl of shikimate-3-phosphate (S3P) to produce enolpyruvyl shikimate-3-phosphate and

inorganic phosphate (Fig.1). In fact, EPSP is an important branch-point intermediate for the synthesis of aromatic amino acids (phenylalanine, tyrosine, and tryptophan) (Berman et al., 2000).

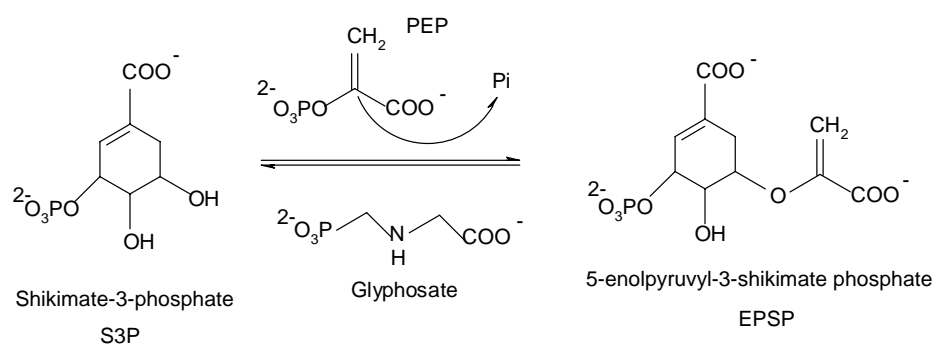


FIGURE 1: Reaction catalyzed by EPSP synthase enzyme.

The relatively low toxicity can be attributed to the biochemical mode of action of glyphosate in a metabolic pathway in plants (called shikimic acid mechanism) (Amarante Junior et al., 2002).

Plants treated with glyphosate die slowly in a few days. The half life for hydrolysis is more than 35 days (Galli & Montezuma, 2005) and, due to transport of the active ingredient throughout the system, no part of the plant survives (Amarante Junior et al., 2002).

When applied directly on the soil, glyphosate shows low activity due to microbial degradation by non-phytotoxic (CO_2 , PO_4^{-3} and NH_3) and the high adsorption by soil constituents (Ramstedt et al., 2004). The inactivation process of this type of herbicide is associated to the phosphonate group $\text{R-PO}(\text{OH})_2$ of the compound having the capacity of forming strong complexes with metal. All adsorption, photodegradation and biodegradation processes of phosphonates are modified by the presence of metal ions due to the formation of soluble and insoluble complexes (Barja et al., 2001; Coutinho & Mazo, 2005). Besides the phosphonate group, the herbicide has two other functional groups (amino and

carboxylate) that can coordinate strongly with metal ions, especially with the transition from near-neutral pH where the phosphonate and carboxylate groups are deprotonated. Glyphosate shows as one of the most capable metallic ion coordinators among the current herbicides (Coutinho & Mazo, 2005; Subramaniam & Hoggard, 1988).

For instance, foliar absorption is widely reduced when glyphosate is applied in solution with calcium, iron, magnesium, manganese and zinc (Bernards et al., 2005). However, calcium chloride solution increases the absorption of glyphosate in corn and soybeans (Hetherington et al., 1998) and adding iron and manganese increases the translocation of glyphosate solution from the root to the leaves of wheat (Bernards et al., 2005; Nilsson, 1985). However, some of the negative effects of divalent and trivalent cations in glyphosate foliar absorption are reduced when glyphosate is applied in solution with ammonium sulfate (Hall et al., 2000). In this line, the complexation step with metal ions present in soil modulates the glyphosate action. In spite of their great importance for agriculture, theoretical or experimental studies addressing the glyphosate bioavailability are scarce.

A deep understanding of this phenomenon requires the use of theoretical calculations. Calculations involving coordination compounds are, however, complicated by a variety of possible geometries and by different metal oxidation states (Hoops et al., 1991). The use of *ab initio*, Hartree–Fock calculations (Sponer & Hobza, 1997), or of techniques adjusted with the relativistic pseudopotentials used to describe complexes between metals and amino acids are limited by the complexity of the system to be studied. DFT methods have been increasingly applied to the study of the interaction of metals with biomolecules (Burda et al., 1996; Comba & Remenyi, 2003). This approach is interesting because it includes the effect of electronic correlations and allows for the calculation of larger systems (Carloni & Andreoni, 1996).

Thus, the goal of this paper is to use DFT techniques and molecular modeling methods in order to evaluate the structural, thermodynamic and electronic effects that govern the complexation between glyphosate and some metals in order to rationalize the inactivation process of the organophosphate herbicides in the soil.

3 METHODOLOGY

3.1 QM Calculations

Initially, we carried out a systematic conformational analysis by successively rotating all single bonds of the ligands by 308 increments. Each conformer was first fully optimized using PM3 (Armitage et al., 1976) and then using DFT (Jackson et al., 2002). We used the algorithm conjugate gradient and quasi-Newton-Raphson for geometry optimization until a gradient of 10^{-4} kcal mol⁻¹ Å⁻¹ was obtained. The final geometries were obtained using DFT and the Becke-Perdew perturbative model with the numerical polarization basis sets DN* (Becke, 1988; Perdew, 1986). Here, the structures were optimized until a gradient of 10^{-8} kcal mol⁻¹ Å⁻¹ was obtained, and submitted to the analysis with the density functional B3LYP using the basis set 6-311++G** (El-Taher & Hilal, 2001). Concerning the choice of the basis set, the performance of 6-311++G** was found to be acceptable in initial test calculations, consistent with previous experience (La Porta et al., 2011; La Porta et al, 2010). Smaller basis sets were less satisfactory, and larger ones were more expensive without offering much higher accuracy. All geometric parameters for the metallic complexes studied were allowed to move during the optimization process. Furthermore, a force constant calculation was made to verify if the optimized structures were indeed local minima (no imaginary frequencies) or transition states (imaginary frequency) (Neto et al., 1992). The solvent effect was evaluated using the Polarized Continuum Model (IEF-PCM) (Cossi et al., 1998), initially proposed

by Miertus and Tomasi (Barone et al., 1998). Here, the solute cavity may be specified as any set of overlapping spheres. By representing the atoms as spheres, a more realistic cavity shape is produced for extended molecules, in contrast to other solvation models (Cho et al., 2000). The thermodynamic calculations shown in Table 1 were obtained using the GAUSSIAN03 (Frisch, 2001) and GAMESS (Schmidt et al., 1993) programs (Fig. 2 and Eq. (1)). For all the species studied, we have checked S^2 values to evaluate whether spin contamination can influence the quality of the results. In all cases we have found that the calculated values differ from $S(S+1)$ by less than 10%.

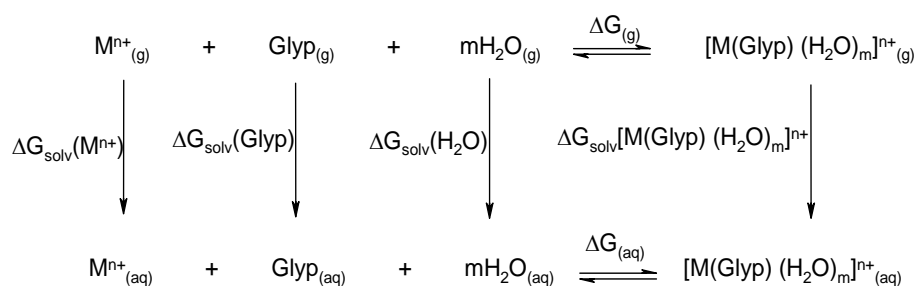


FIGURE 2. Thermodynamic cycle.

$$\begin{aligned}
 \Delta G_{aq} &= \Delta G_{solv}[M(Glyp)(H_2O)_m]^{n+} \\
 &\quad - [\Delta G_{solv}(M)^{n+} + \Delta G_{solv}(Glyp) + \Delta G_{vap}(H_2O)] + \Delta G_g
 \end{aligned}
 \tag{1}$$

3.2 Docking calculation procedures

Crystal coordinates of the EPSP synthase, cofactor (S3P), glyphosate and the crystallographic water molecules were taken from the Protein Data Bank (PDB codes: 1G6S) (Schonbrunn et al., 2001). The EPSP synthase is complexed with glyphosate, and S3P. The 1G6S system was chosen because the glyphosate

crystallographic structure is similar to other inhibitors in the data set used in this study.

Three-dimensional (3D) structures of each complex (Fig. 3) were based on the bioactive conformation of glyphosate co-crystallized with the EPSP synthase enzyme.

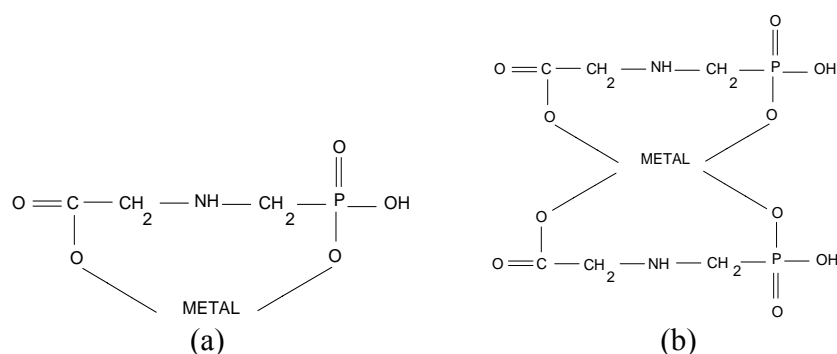


FIGURE 3. Structures of complexes formed by (a) one molecule of glyphosate and metal and (b) two molecules of glyphosate and metal.

The compounds were docked into the EPSP synthase binding sites using the Molegro Virtual Docker 2006 (Thomsen & Christensen, 2006), a program for predicting the most likely conformation of how a ligand will bind to a macromolecule. Only ligand molecules are considered flexible during the docking simulation. Thus, a candidate solution is encoded by an array of real-valued numbers representing ligand position, orientation, and conformation as cartesian coordinates for the ligand translation, four variables specifying the ligand orientation (encoded as a rotation vector and a rotation angle), and one angle for each flexible torsion angle in the ligand (Molegro ApS). The MolDock scoring function (MolDock Score) used by Molegro Virtual Docker program is derived from the PLP (Piecewise Linear Potential), a simplified potential whose parameters are fit to protein ligand structures and binding data scoring functions (da Cunha et al., 2008; Gehlhaar et al., 1995) and further extended in

GEMDOCK (Generic Evolutionary Method for molecular DOCK) with a new hydrogen bonding term and new charge schemes. The docking scoring function, Score, is defined by the following energy terms:

$$E_{score} = E_{inter} + E_{intra} \quad (2)$$

where E_{inter} is the ligand-protein interaction energy:

$$E_{inter} = \sum_{i \in \text{ligante}} \sum_{j \in \text{proteína}} \left[E_{PLP}(r_{ij}) + 332.0 \frac{q_i q_j}{4r_{ij}^2} \right] \quad (3)$$

The E_{PLP} term is a “piecewise linear potential” using two different sets of parameters: one set for approximating the steric (van der Waals) term between atoms, and another stronger potential for hydrogen bonds. The second term describes the electrostatic interactions between charged atoms. It is a coulomb potential with a distance-dependent dielectric constant given by: $D(r) = 4r$. The numerical value of 332.0 fixes the units of the electrostatic energy to kilocalories per mole (Molegro ApS).

$$E_{intra} = \sum_{i \in \text{ligante}} \sum_{j \in \text{ligante}} E_{PLP}(r_{ij}) + \sum_{\text{ligações flexíveis}} A[1 - \cos(m \cdot \theta - \theta_0)] + E_{penalizada} \quad (4)$$

The first term (double summation) is between all atom pairs in the ligand excluding atom pairs which are connected by two bonds. The second term is a torsional energy term, where θ is the torsional angle of the bond. The average of the torsional energy bond contribution is used if several torsions could be

determined. The last term, E_{clash} , assigns a penalty of 1000 if the distance between two heavy atoms (more than two bonds apart) is less than 2.0 Å, punishing infeasible ligand conformations (Molegro ApS). Summarizing, these functions are used to automatically superimpose a flexible molecule onto a rigid template molecule. The docking search algorithm used in Molegro Virtual Docker is based on interactive optimization techniques inspired by darwinian evolution theory (evolutionary algorithms, EA). A population of individuals (candidate solutions) is exposed to competitive selection that weeds out poor solutions. Recombination and mutation are used to generate new solutions (Thomsen & Christensen, 2006; Gehlhaar et al., 1995).

The MolDock docking algorithm is based on a new hybrid search algorithm, called guided differential evolution. The guided differential evolution algorithm combines the differential evolution optimization technique with a cavity prediction algorithm during the search process, which allows for a fast and accurate identification of potential binding modes (poses).

4 RESULTS AND DISCUSSION

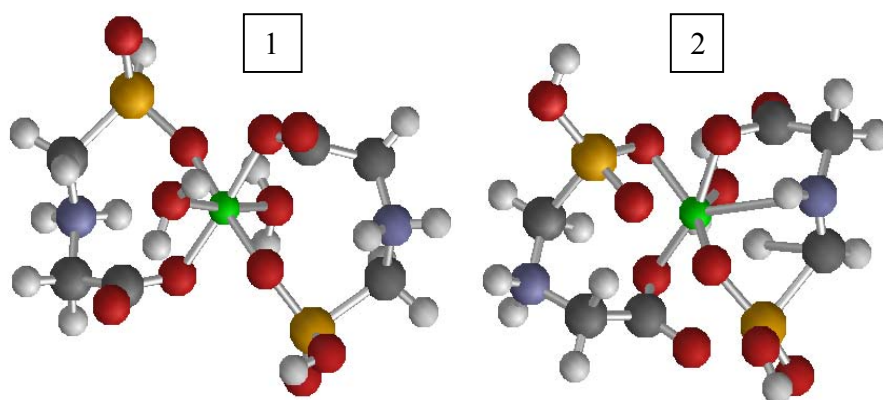
4.1 Structural aspects of the complexes

Glyphosate, like other aminophosphonic acids, acts as a chelating agent and forms stable complexes with divalent and trivalent metallic cations (Subramaniam & Hoggard, 1988; Motekaitis & Martell, 1985). The glyphosate interaction with the soil influences the herbicide's environmental impact, potential toxicity, and degradation (Eberbach, 1998; Barret & McBride, 2005; Zaranyika & Nyandoro, 1993; Rueppel et al., 1977). These facts combined with the increased use of glyphosate makes this kind study an important research area for environmental chemistry.

We have then calculated the free energy of complexation between glyphosate and some divalent and trivalent metals in the octahedral and tetrahedral coordination environments. For the calculations, we have used two set ups: (i) glyphosate-metal 2:1 (two molecules of glyphosate and one metallic ion) and (ii) glyphosate-metal 1:1 (one molecule of glyphosate to one atom of metallic ion). In other words, four conditions were tested for the octahedral coordination (Fig.4) and two for the tetrahedral coordination (Fig.5) between glyphosate and metal. The oxygen (red) in the phosphate and carboxylate group are always coordinated to the central metal. It is important to mention, however, that the nitrogen atom of the amino group of the glyphosate molecule may be or may not be protonated according to pH of the environment in which it is. Therefore the amino group may participate or not, in coordination with the metal. In our calculation strategy, we have used DFT techniques. Nevertheless, despite the recent improvements in DFT, there are still difficulties in using DFT to properly describe intermolecular interactions, especially van der Waals forces (dispersion) and charge transfer excitations due to lack of exact Hartree–Fock exchange in some functionals (Prytz & Flage-Larsen, 2009; Ramalho & Taft, 2005). Currently, the development of new DFT methods designed to overcome this problem, by alterations to the functional or by the inclusion of additive terms is a very important research topic. Particularly, the hybrid functionals, such as the B3LYP functional used in this work, yields unsatisfactory atomization energies. For instance, for metals, the error is almost larger than 25%, and for transition and noble metals, it may increase to 40% (Paier et al., 2007; Paier et al., 2006). Probably, a larger fraction of the error is related to the LYP correlation functional, because the LYP correlation functional significantly underestimates the correlation energy of the homogeneous electron gas (Paier et al., 2006). On the other hand, for large gap systems, with well-localized

electrons, the agreement with experiment and conventional functionals is reasonable (Santiago et al., 2010).

The solvent effect was evaluated using IEF-PCM methodology. Actually, as already noted by Tomasi et al. (Tomasi et al., 1999), the evaluation of electronic charges could be a delicate point in PCM because the presence of fractions of the solute charge outside the cavity can affect the result in a quite sensitive way. In recent years, the integral equation formalism (IEF) method was introduced to solve the electrostatic solvation problem at the quantum mechanical level with aid of apparent surface charges (ASC) (Cammi et al., 1997). IEF uses a new formalism for this problem, which is based on integral operators, and it manages to deal with the same footing linear isotropic solvent models, as well as anisotropic liquid crystals and ionic solutions (Tomasi et al., 1999).



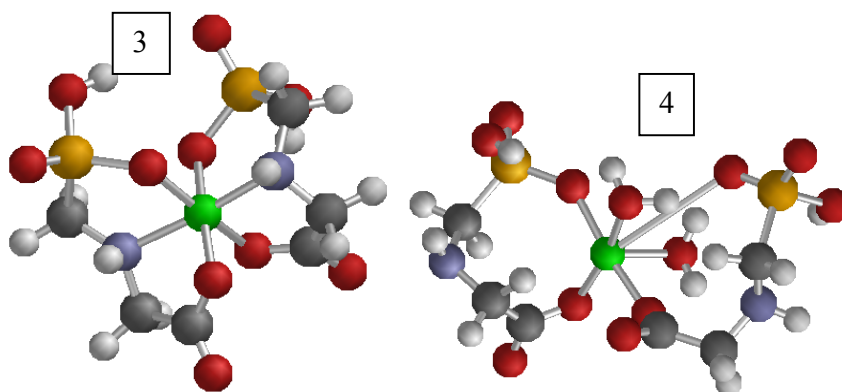


FIGURE 4. Complexation forms with two molecules of glyphosate and the metal (green) in octahedral environment: 1. Two molecules of glyphosate with the protonated amino group (blue), binding the two hydrogen atoms (white) ($-\text{NH}_2^+$). 2. Complexation in which one glyphosate molecule has the protonated amino group ($-\text{NH}_2^+$) and the other glyphosate molecule has the amino group performing coordination with the metal. 3. Two glyphosate molecules where the amino group is coordinating with the metal. 4. Two glyphosate molecules with the non-protonated amino group performing only three bonds ($-\text{NH}$). Water molecules were used to complete the valence of the metal

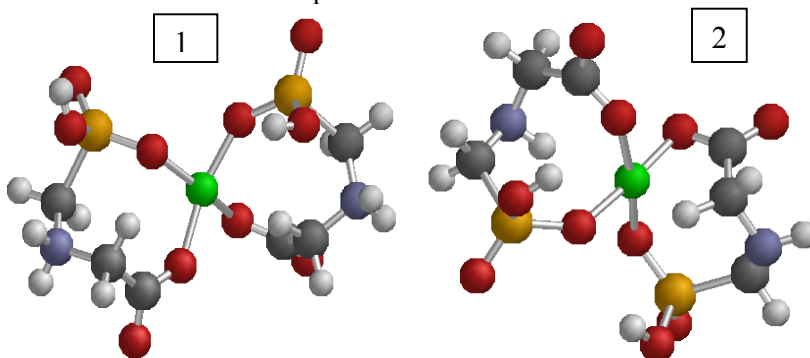


FIGURE 5. Forms of complexation of two glyphosate molecules and the metal (pink) in tetrahedral environment: 1. Two glyphosate molecules with the protonated amino group (blue), binding the two hydrogen atoms (white) ($-\text{NH}_2^+$). 2. Two glyphosate molecules with the non-protonated amino group performing only three bonds ($-\text{NH}$).

Table 1 shows the distances between oxygen atoms and the studied different metals which are bonded to the formation of the complex. These distances varied very little within the tetrahedral and octahedral geometries and glyphosate-metal 1:1 and 2:1 ratios. The values in Table 1 are an average of all the distances obtained as a result of theoretical calculations.

TABLE 1. Bond length values (Å) between the oxygen atom from glyphosate and the studied metals.

Ion	Zn ²⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cu ²⁺	Al ³⁺	Co ³⁺	Fe ³⁺	Cr ³⁺
O-Metal	1.973	2.508	2.419	1.867	1.812	1.872	1.895	1.725

The longest bond lengths in Table 1 were obtained for the Ca²⁺ and Mg²⁺ cations when bonded to the oxygen atom of the glyphosate molecule. Al³⁺ as well as Mg²⁺ and Ca²⁺ are not transition metals and therefore do not have electrons in “d” orbital. Al³⁺ cation reveals a significantly shorter bond distance, 0.696 Å, compared to the distance found for alkali metals. This difference is possibly due to the fact that the Al presents a +3 charge, while Ca and Mg, have +2 charge.

For the transition metals, the shortest binding distance value was obtained for Cr³⁺, whose ionic radius is the shortest of the studied cation series. The same rationalization can be invoked for the cation Zn²⁺, which is the largest ionic radius in the studied series and shows also the longest bond length between the transition metal and oxygen atom of glyphosate. The difference in bond lengths between Zn²⁺ and Cr³⁺ is 0.248 Å. Among the other transition metals Cu²⁺, Co³⁺ and Fe³⁺, the differences in distance were very small, the largest difference was found between the oxygen bonds with Cu²⁺ and Fe³⁺ atoms, a difference of 0.028 Å.

4.2 Thermodynamic stability of the system glyphosate-metal 1:1

The following tables show the free energy values for the studied system glyphosate-metal 1:1, in octahedral (Table 2) and tetrahedral (Table 3) coordination environment. Water molecules were used in order to occupy the vacant position when necessary.

TABLE 2. Relative free energy values (kcal mol^{-1}) for the complexes between one glyphosate molecule and some metals in soil in the octahedral environment.

Ion	Glyphosate (-NH-)	Glyphosate (-NH₂⁺-)	Glyphosate NH⁺ coordinating with the metal
Zn²⁺	0.05	0.00	9.64
Ca²⁺	117.00	116.99	126.62
Mg²⁺	149.51	149.44	159.10
Cu²⁺	14.78	14.73	24.36
Al³⁺	144.36	144.31	153.95
Co³⁺	41.20	41.19	50.65
Fe³⁺	53.39	53.32	62.99
Cr³⁺	80.40	80.37	85.23

In octahedral geometry, the energy difference between the free and coordinated amino group with the metal ion is $9.59 \text{ kcal mol}^{-1}$ for the Zn^{2+} complexes. The energy difference is slightly higher when compared to a situation where the amino group is bonded to the hydrogen atom, $9.64 \text{ kcal mol}^{-1}$. From Table 2, it can then be observed that the chemical bond between the cation and the amino group of the glyphosate molecule is less favorable.

Cu^{2+} ion was the second most stable metallic complex. A review of the literature shows several studies of the complexation between Cu ion and glyphosate due to the importance of this coordination compound (Coutinho & Mazo, 2005; Lee, 1999). The ion concentration in the soil and water increases with the use of fungicides, fertilizers, inadequate disposal of sewage and other wastes that contain this metal (Sheals et al., 2001). It is well-known that low concentrations of Cu^{2+} are essential for organisms and at higher concentrations it becomes toxic to plants (Lee, 1999), its immobilization in soil is also extremely important. In the octahedral environment, the energy difference between the complexes formed with Cu and Zn is $14.73 \text{ kcal mol}^{-1}$. It should be kept in mind that the glyphosate molecule is not protonated, but is bonded to the metal only by oxygens of the phosphate and carboxylate groups. Another possibility is to investigate the reaction complexation with the protonated nitrogen atom turning the glyphosate to a tridentate ligand. The difference in kca/mol between Cu and Zn is almost the same as the previous, $14.72 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Among the trivalent cations, the least stable was Al^{3+} . By looking at the octahedral geometry, in which there is no protonation of the amino group nor a chemical bond with the metal, the energy difference is $103.16 \text{ kcal mol}^{-1}$ between the most and least stable complexes formed with trivalent atoms, Co^{3+} and Al^{3+} , respectively.

TABLE 3. Relative free energy values (kcal mol^{-1}) for the complexes between one glyphosate molecule and some metals in soil in the tetrahedral environment.

Ion	Glyphosate (-NH-)	Glyphosate (-NH₂⁺-)
Zn²⁺	0.00	0.06
Ca²⁺	224.84	224.81
Mg²⁺	228.18	228.16
Cu²⁺	14.73	14.76
Al³⁺	224.71	224.72
Co³⁺	41.24	41.19
Fe³⁺	53.35	53.36
Cr³⁺	80.37	80.38

Turning now to the complexes in both tetrahedral and octahedral environments (Table 2 and 3), the results show that glyphosate-Zn complex was the most stable in all proposed situations. The stability of this complex is important; according to Coutinho & Mazo (2005), an aqueous solution containing Zn cation and glyphosate can result in the formation of an insoluble salt that is not absorbed by plants, but it may reduce the bioavailability of metal and herbicides in the environment.

For the system glyphosate-metal 1:1, the thermodynamic stability order is $\text{Zn} > \text{Cu} > \text{Co} > \text{Fe} > \text{Cr} > \text{Al} > \text{Ca} > \text{Mg}$. In the tetrahedral environment, for the glyphosate molecules without protonation, a difference of $228.18 \text{ kcal mol}^{-1}$ is obtained between the most stable complex, glyphosate-Zn, and least stable one, glyphosate-Mg. Nevertheless in the octahedral environment, an energy difference of $149.46 \text{ kcal mol}^{-1}$ between the complexes formed with the cations Zn^{2+} and Mg^{2+} is obtained. The smallest energy difference was obtained between

the complexes glyphosate-Co and glyphosate-Fe, 12.11 kcal mol⁻¹ in the tetrahedral environment without protonation of the amino group. Other complexes that showed similar energy values for formation were glyphosate-Cu and glyphosate-Co with an energy difference of 26.51 kcal mol⁻¹, as well as glyphosate-Fe and glyphosate-Cr: 27.02 kcal mol⁻¹.

4.3 Thermodynamic stability of the system glyphosate-metal 2:1

It is well-known that the formation of glyphosate-metal 2:1 complex is possible (Subramaniam & Hoggard, 1988). Thus, in order to investigate this possibility, we have performed thermodynamic stability calculations for this scenario.

From the Gibbs free energy values reported in Table 4, it can be noted that the complex formed with the divalent cation Zn²⁺ is the most stable complex. Glyphosate-Mg complex showed the highest Gibbs free energy value and thus is the least stable complex studied in this scenario.

TABLE 4. Relative free energy values (kcal mol⁻¹) for the 2:1 glyphosate-metal system in the octahedral environment.

Ion	Glyphosate (-NH-)	Glyphosate (-NH ₂ ⁺ -)	1 Glyphosate (-NH ₂ ⁺ -) and 1 glyphosate (NH ⁺) coordinating with the metal	2 glyphosates NH ⁺ coordinating with the metal
Zn ²⁺	9.67	0.00	9.66	19.29
Ca ²⁺	126.64	91.53	121.73	136.09
Mg ²⁺	159.12	149.45	159.12	168.75
Cu ²⁺	24.39	24.33	29.18	33.98
Al ³⁺	153.96	144.30	153.96	153.97
Co ³⁺	50.81	50.75	55.60	55.60
Fe ³⁺	53.38	53.33	58.17	62.99
Cr ³⁺	75.64	85.17	85.22	94.84

By analyzing the free energy values available, we can compare the three most stable metallic complexes formed: Zn^{2+} , Cu^{2+} e Co^{3+} . Glyphosate-Zn is $14.72 \text{ kcal mol}^{-1}$ more stable than glyphosate-Cu, which is $26.42 \text{ kcal mol}^{-1}$ more stable than glyphosate-Co.

TABLE 5. Relative free energy values (kcal mol^{-1}) for the 2:1 glyphosate-metal system in the tetrahedral environment.

Ion	Glyphosate (-NH-)	Glyphosate (-NH ₂ ⁺ -)
Zn ²⁺	36.29	0.00
Ca ²⁺	93.88	93.66
Mg ²⁺	96.37	96.30
Cu ²⁺	51.92	49.32
Al ³⁺	93.85	84.42
Co ³⁺	62.18	62.14
Fe ³⁺	66.91	66.86
Cr ³⁺	75.38	75.34

It can therefore be noted that in both octahedral and tetrahedral environments (Tables 4 and 5), with the exception of Ca^{2+} and Mg^{2+} , the complexes formed with the divalent cation are more stable than those formed with the trivalent cations.

In the scenario with the free amino group in the octahedral environment, the difference in free energy of complexation with Ca^{2+} and Mg^{2+} is $32.48 \text{ kcal mol}^{-1}$ and the free energy difference between the glyphosate-Zn (most stable among the divalent cations) and glyphosate-Co (most stable among the trivalent cations) is $41.14 \text{ kcal mol}^{-1}$.

By comparison, in the tetrahedral environment with the free amino group (no protonation), the complexes formed with the divalent cations Cu^{2+} and Ca^{2+} show a difference of $41.96 \text{ kcal mol}^{-1}$. Regarding the stability of the studied complexes between some trivalent cations and glyphosate, Table 5 describes the theoretical data obtained. The smallest energy difference ($4.73 \text{ kcal mol}^{-1}$) is found by analyzing the metallic complexes with Co^{3+} and Fe^{3+} , this difference increases to $8.47 \text{ kcal mol}^{-1}$ when compared to Fe^{3+} and Cr^{3+} . As expected, the largest energy difference of $31.67 \text{ kcal mol}^{-1}$ comes from Co^{3+} and Al^{3+} , the most and least stable glyphosate complexes formed with trivalent cations, respectively.

The results presented in Table 4 and 5 for the complexes 2:1 are in line with those found in Table 2 and 3 for the complexes formed with only one molecule of glyphosate coordinating with the metal. Thus, the stability order of the complex formation in aqueous environment is $\text{Zn} > \text{Cu} > \text{Co} > \text{Fe} > \text{Cr} > \text{Al} > \text{Ca} > \text{Mg}$.

Our data suggest that the coordination between the metallic center and the amino group is less favorable likely due to steric hindrance. A higher energy value ($9.62 \text{ kcal mol}^{-1}$) for the Zn^{2+} complex is observed in the structure with the coordination of the amino group in relation to the structure with the free amino group.

Turning now to our findings, a small energy difference is observed between the Co^{3+} complexes in both octahedral and tetrahedral geometries. From a theoretical point of view, this metallic complex with glyphosate can occur in solution in both coordination environments simultaneously.

Most Fe^{3+} and Cu^{2+} complexes with organophosphate herbicides are also octahedral, and the complex with $d9$ configuration can generate the Jahn-Teller distortion, i.e., distortion of the octahedral complex. That observation is in very good agreement with experimental studies (Daniele et al, 1997).

In order to rationalize the greatest stability of metallic complexes formed with the Zn^{2+} and Cu^{2+} ions independent of the coordination environment (octahedral or tetrahedral environment) or glyphosate:metal ratio (1:1 or 2:1), we need to consider the the Pearson's Hard and Soft acid-base principle. For a ligand, the stability of the complexes with di-positive metal follows the order: $Cu^{2+} < Zn^{2+}$. Furthermore, the hardness-softness factor should be considered: softer species favor ligands S, N and O. The chelate effect could also take place, because glyphosate has the carboxyl group, a fact that favors divalent cations such as Zn^{2+} and Cu^{2+} which have a hardness similar to oxygen (Pearson, 1968).

An experimental study from Parr & Pearson (Parr & Pearson, 1983) relates the hardness (η) of several chemical species and the experimental η values corroborate our current theoretical calculations. Acids like Mg^{2+} and Fe^{3+} , hard acids, were assigned higher η values, $Fe = 13.1$ and $Mg = 32.5$, while the soft acids showed lower η values, which occurs for Cu^{2+} and Zn^{2+} . Since the oxygen atom is considered an intermediate soft base, the Pearson's Hard and Soft Acid-Base Principle could in principle rationalize qualitatively the greater stability of complexes formed with Cu^{2+} and Zn^{2+} compared to the lesser stability of the Mg complex.

In order to evaluate the biological implications, we have performed docking studies of the metallic complexes of glyphosate with the enzyme EPSP synthase.

4.4 Docking of the complexes into the binding site on the enzyme

The glyphosate complexes were docked in the active site of the enzyme EPSP synthase. All reasonable binding orientations for complexes were investigated. During the analysis using MVD (Thomsen & Christensen, 2006), the final structure was accepted or rejected based on energy and similarity criteria. To our knowledge, among the current force fields applied to study

metallic complexes, due to parametrization, the Molegro force field is one of the most indicated (Heberle & de Azevedo Jr, 2011).

Turning to theoretical data, among the complexes formed with only one molecule of glyphosate in the octahedral environment, according to Table 6, the Cu^{2+} complex shows the best interaction with the enzyme, interaction energy of $-132.72 \text{ kcal mol}^{-1}$, followed by the Co complex with an interaction energy of $-118.92 \text{ kcal mol}^{-1}$.

TABLE 6. Amino acid residues of active site of EPSP synthase that bind to the complexes and the number of these hydrogen bonds and intermolecular electrostatic energies (kcal mol^{-1}).

	Metal	Residues	Number of Hydrogen Bonds	Intermolecular Energy
Complexes 1:1 Glyphosate: metal	Zn	Lys340	2	-103.12
		Glu341	2	
		Lys411	1	
		Gly96	1	
		Arg124	4	
		Arg100	1	
		Ser169	1	
		Gln171	1	
	Cu	Lys340	1	-132.72
		Glu341	2	
Lys411		1		
Gly96		1		
Arg124		6		
Arg100		3		
Ser169	1			
Gln171	3			
Thr97	1			
Asn94	1			
		Glu341	2	
		Lys411	1	
		Arg124	6	

Octahedral environment	Co	Arg100	1	-118.92
		Gln171	2	
		Thr97	2	
		Asn94	1	
	Fe	Lys340	1	-112.71
		Glu341	2	
		Lys411	1	
		Gly96	2	
		Arg124	7	
		Arg100	2	
Gln171		3		
Thr97		2		
Asn94		1		
Al	Glu341	1	-111.02	
	Gly96	1		
	Gln171	2		
	Thr97	1		
	Tyr200	1		
	Asp313	2		
	Lys22	3		
	Complexes 1:1 Glyphosate: metal	Zn		Lys340
Glu341			2	
Lys411			1	
Gly96			2	
Arg124			2	
Gln171			3	
Lys22			3	
Ser23			1	
Cu		Lys340	1	-92.34
		Glu341	2	
	Lys411	1		
	Gly96	2		
	Arg124	2		
	Gln171	3		
	Thr97	1		
Lys22	1			
	Glu341	2		
	Lys411	1		

Tetrahedral environment	Co	Gly96 Arg124 Arg100 Gln171 Thr97 Asn94	2 8 2 3 1 1	-92.83
	Al	Glu341 Gly96 Arg124 Gln171 Thr97 Lys22 Ser23	2 2 1 4 1 3 1	-92.07
Complexes 2:1 Glyphosate: metal	Cu	Lys340 Glu341 Lys411 Gly96 Arg124 Ser169 Gln171 Tyr200 Asp313 Asn336 Ser170	2 1 1 1 3 1 3 1 1 1 2	-120.39
	Co	Lys340 Gly96 Arg124 Arg100 Ser169 Gln171 Tyr97 Lys22 Ser170	2 1 1 1 1 3 1 2 1	-144.28
Octahedral environment	Fe	Glu341 Arg124 Gln171 Asp313 Lys22	1 2 6 2 5	-165.61

		Ser170	1			
		Ser23	3			
	Al	Lys340	1	-124.19		
		Glu341	2			
		Arg124	1			
		Gln171	5			
		Tyr200	1			
		Lys22	4			
		Ser170	1			
		Ser23	3			
Complexes 2:1 Glyphosate: metal	Zn	Lys340	1		-131.47	
		Glu341	1			
		Lys411	1			
		Gly96	1			
		Arg124	2			
		Gln171	3			
		Lys22	1			
		Ser170	1			
		Arg344	1			
		Ser23	2			
		Cu	Lys340	2		-137.64
			Glu341	2		
Gly96	1					
Arg124	2					
Ser169	2					
Gln171	4					
Tyr200	1					
Lys22	3					
Asn336	1					
Ser170	1					
Arg386	1					
Tetrahedral	Co		Lys340	1	-112.59	
		Glu341	2			
		Lys411	1			
		Gly96	1			
		Arg124	3			
		Ser169	2			
		Gln171	6			

environment		Lys22	2	
		Ser170	3	
		Arg344	1	
	Fe	Lys340	2	-156.11
		Glu341	2	
		Gly96	1	
		Arg124	3	
		Arg100	3	
		Ser169	1	
		Gln171	6	
		Thr97	1	
		Lys22	1	
	Al	Lys340	1	
		Glu341	3	
		Lys411	1	
		Gly96	1	
		Gln171	2	
		Thr97	1	
		Lys22	4	
		Ser23	4	
		Arg386	1	
		Asp49	1	
		Ser244	1	
		Arg27	1	

Taking into account the interactions of these complexes with the active site of the enzyme, the Cu^{2+} complex has interactions with essentially the same amino acid residues of the Fe^{3+} complex, but in different quantities and intensities.

Even for the 1:1 complexes in a tetrahedral environment, the interaction energy values are very close to glyphosate-Cu, glyphosate-Co and glyphosate-Al complexes. The largest difference is between glyphosate-Co and glyphosate-Al, about $0.76 \text{ kcal mol}^{-1}$ and the smallest difference is between glyphosate-Cu and glyphosate-Al, about $0.27 \text{ kcal mol}^{-1}$. Turning to glyphosate-Cu and glyphosate-Co complexes, the observed difference is only of $0.49 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Comparing the interactions between glyphosate-Cu and glyphosate-Co complexes with the amino acid residues, we can notice that the glyphosate-Co binds to Arg100 and Asn94 aminoacid residues, which do not interact with glyphosate-Cu complex. Interestingly, the glyphosate-Cu and glyphosate-Al complexes bind to the same amino acid residue Lys22. In addition to Lys22, glyphosate-Al binds to Ser23.

Despite the Zn-glyphosate being one of the most thermodynamically stable complexes formed in solution, from our docking results, it would interact less intensely with the enzyme active site when compared to other complexes studied.

According to Table 6, the results for the 2:1 complexes in the octahedral environment indicate that the Fe^{3+} ion forms the most stable complex, followed by the complex formed with the Co^{3+} ion with a difference of $21.33 \text{ kcal mol}^{-1}$ between these two complexes. The complexes formed with copper and aluminum ions have closer energy values. The interaction energy difference between Fe-glyphosate and Cu-glyphosate complexes, the most and least stable complex respectively is of $45.22 \text{ kcal mol}^{-1}$.

In the active site of the enzyme, the complexes with iron and aluminum ions are stabilized by a hydrogen bond with similar amino acid residues, the differences occur only when the complex with the iron ion binds to Asp313. In contrast to the complex with an aluminum ion, which binds to Lys340 and Tyr200. Comparing the complexes with copper and cobalt ions, they have some differences in the binding mode, for instance, the complex with the cobalt ion binding to Arg100, Thr97 and Lys22, while the complex with the copper ion binds to Lys411, Glu341, Tyr200, Asp313 and Asn336. The complexes with copper and cobalt ions are the only octahedral complexes 2:1 that bind to amino acid residues Gly96 and Ser169.

The interaction energy values for complex 2:1 with iron ion and enzyme in the octahedral environment was the lowest energy found. Once in the tetrahedral environment, the complexes 2:1, glyphosate-Cu and glyphosate-Zn have close interaction energy values, with a difference of 6.17 kcal mol⁻¹, the glyphosate-Cu complex being the most stable. The glyphosate-Co and glyphosate-Al have closer interaction energy values, 3.08 kcal mol⁻¹ of difference, but these last two complexes mentioned are less stable than the first two complexes.

Surprisingly, the glyphosate-Fe complex still remains as the most stable complex with a significant difference in energy for the complexes formed with other metallic ions like Zn, Cu, Co and Al.

Glyphosate-Cu and glyphosate-Zn are similar in terms of interaction energy values as well as those amino acids that bind to stabilize in the EPSP synthase. However, a deeper analysis reveals that only glyphosate-Cu binds the Ser169, Tyr200, Asn336 and Arg386 in contrast to glyphosate-Zn, which binds to Lys411, Arg344, Ser23. This similarity also occurs between the glyphosate-Co and glyphosate-Al complexes, but only glyphosate-Co binds to Ser169, Ser170, Arg124 and Arg344; glyphosate-Al binds only to Thr97, Arg386 and Ser23. Glyphosate-Al is the only complex to bind to three different amino acid residues, Asp49, Ser244 and Arg27. Glyphosate-Fe only binds to Arg100 from the tetrahedral.

In a previous study (Caetano et al, 2009), we observed that two hydrogen bonds between glyphosate and the amino acid residue Lys22 mimic a chelate, which address the conformation of dihedral angle of the atoms C4-N3-C2-C1. For the glyphosate-metal 1:1 complexes, few have presented hydrogen bonding with the amino acid residue Lys22, unlike glyphosate-metal 2:1 complexes, since all these complexes bind to the amino acid residue Lys22 as glyphosate, which leads us to believe that these dihedral angles are similar to

glyphosate and so they have better interaction energy values with the enzyme compared to 1:1 complexes. Figure 6 shows the comparison of the superposition of the 1:1 complex and glyphosate and superposition of the 2:1 complex and glyphosate molecule.

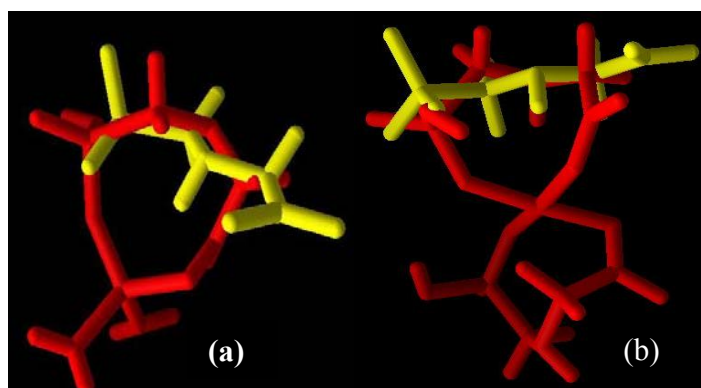


FIGURE 6. (a) Superposition of the 1:1 complex with glyphosate and (b) superposition of the 2:1 complex with glyphosate molecule. In the figure, the glyphosate is the structure in yellow and complex is the structure in red.

The 2:1 complex formed with the iron ion in the octahedral environment, which showed better stabilization in the active site of EPSP synthase, was the complex that displays the largest number of interactions with the amino acid residue Lys22.

Also in this previous study (Caetano et al., 2009), observations were made regarding the interaction of glyphosate and analogs in the mutant Gly96Ala EPSP synthase, which is insensitive to glyphosate by the substitution of amino acid residue glycine 96 to alanine within the active site. Most of the proposed complexes interact with this amino acid residue Gly96, we can therefore assume that this substitution in the mutant enzyme also has some effect on the complexes, i.e., the enzyme would be insensitive to them as it is to glyphosate.

In the present docking study, it was possible to observe that among the various studied metal ions for complexation with glyphosate, none of them interact with any amino acid residues of the active site of the enzyme, the main sources of interaction are the oxygen atoms of carboxylate and phosphate group and the nitrogen atom of glyphosate molecule. The amino acid residue Gln171 seems to be of great importance for stabilization of the complexes at the active site of the enzyme EPSP synthase, since it interacts with all these studied complexes through several hydrogen bonds, except for the glyphosate-Zn 1:1 complex in the octahedral environment, which binds only once, Gln171. The complex that has more hydrogen bonds with Gln171 residue is the glyphosate-Fe 2:1 complex in the octahedral environment. This complex is also one that had the lowest interaction energy, or better stabilized in the active site of the enzyme compared to all other under study.

5 CONCLUSIONS

In this work, we have studied the complexation stability between glyphosate and some divalent and trivalent metals. From our results, we have noted that complexes formed with divalent cations Zn^{2+} and Cu^{2+} are more stable than those formed with trivalent cations. Among the divalent cations studied there is a stability order from $Zn > Cu > Ca > Mg$ and for trivalent cations $Co > Fe > Cr > Al$.

Furthermore, according to our theoretical calculations, the coordination of the metal with the nitrogen of the amino group of the glyphosate is not favorable, because this was the situation that presented the highest Gibbs free energy values.

The interactions between complexes and amino acid residues were analyzed through docking studies. The zinc metal, despite being one that forms the more stable complex when in contact with glyphosate, would interact less

intensely with the enzyme active site. The complex 2:1 formed with the iron ion showed better stabilization in the active site of EPSP synthase, perhaps due to the fact that this complex has the highest number of interactions with the amino acid residue Lys22, which lead us to believe that the dihedral angle is similar to glyphosate. Furthermore, it also has more hydrogen bonds with residue Gln171, which seems of great importance for stabilization of the complexes in the enzyme. Thus we strongly feel that this study could be helpful in understanding the stability of the complexes formed between glyphosate and some metals in the soil and to rationalize the inactivation of glyphosate molecule mainly in soil rich in Zn^{2+} and Cu^{2+} metals.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the Brazilian agencies CAPES, CNPq and FAPEMIG for funding part of this work. T.C.R. and E.F.F.C. wish also to thank CNPq for the fellowship.

6 REFERENCES

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.

ARMITAGE, I.M.; PAJER, R.T.; SCHOOTUITERKAMP, A.J.M. et al. Cd-113 fourier-transform nuclear magnetic-resonance of cadmium (II) carbonic-anhydrases and cadmium (II) alkaline-phosphatase. **Journal of the american chemical society**, v.98, n.18, p.5710-5712, 1976.

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

BARONE, V.; COSSI, M.; TOMASI, J. Geometry optimization of molecular structures in solution by the polarizable continuum model. **Journal of computational chemistry**, v.19, n.4, p.404-417, 1998.

BARRETT, K.A.; MCBRIDE, M.B. Oxidative degradation of glyphosate and aminomethylphosphonate by manganese oxide. **Environmental Science & Technology**, v.39, n.23, p.9223-9228, 2005.

BECKE, A.D. Density-Functional exchange-energy approximation with correct asymptotic-behavior. **Physical Review**, v.38, n.6, p.3098-3100, 1988

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.

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.

BURDA, J.V.; SPONER, J.; HOBZA, P. Ab Initio study of the interaction of guanine and adenine with various mono- and bivalent metal cations (Li⁺, Na⁺, K⁺, Rb⁺, Cs⁺; Cu⁺, Ag⁺, Au⁺; Mg²⁺, Ca²⁺, Sr²⁺, Ba²⁺; Zn²⁺, Cd²⁺, and Hg²⁺). **Journal of Physical Chemistry**, v.100, n.17, p.7250-7255, 1996.

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.

CAMMI, R.; COSSI, M.; MENNUCCI, B.; TOMASI, J. **Theoretical Aspects of Biochemical Reactivity**, Khuer Academic Publishing, France, 1997.

CARLONI, P.; ANDREONI, W. Platinum-modified nucleobase pairs in the solid state: A theoretical study. **Journal of Physical Chemistry**, v.100, n.45, p.17797-17800, 1996.

CHO, S.G.; CHO, J.R.; PARK, B.S.; et al. Solvent effects on the relative stability of 4-nitro-1H-imidazole and 5-nitro-1H-imidazole. Ab initio and density functional theory calculations. **Journal of Molecular Structure-Theochem**, v.532, p.279-286, 2000.

COMBA, P; REMENYI, R. Inorganic and bioinorganic molecular mechanics modeling - the problem of the force field parameterization. **Coordination Chemistry Reviews**, v.238, p.9-20, 2003.

COSSI, M.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; et al. Ab initio study of ionic solutions by a polarizable continuum dielectric model. **Chemical Physics Letters**, v.286, n.3-4, p.253-260, 1998.

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.

Da CUNHA, E.F.F.; RAMALHO, T.C.; REYNOLDS, R.C. Binding mode analysis of 2,4-diamino-5-methyl-5-deaza-6-substituted pteridines with *Mycobacterium tuberculosis* and human dihydrofolate reductases. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, v.25, n.4, p.377-385, 2008.

DANIELE, P.G.; DeSTEFANO, C.; PRENESTI, E.; et al. Copper(II) complexes of N-(phosphonomethyl)glycine in aqueous solution: a thermodynamic and spectrophotometric study. **Talanta**, v.45, n.2, p.425-431, 1997.

EBERBACH, P. Applying non-steady-state compartmental analysis to investigate the simultaneous degradation of soluble and sorbed glyphosate (N-(phosphonomethyl)glycine) in four soils. **Pesticide Science**, v.52, n.3, p.229-240, 1998.

EL-TAHER, S.; HILAL, R.H.; ALBRIGHT, T.A. An ab initio study of the structures and energetics of the planar ground and 90 degrees-twisted excited states of substituted ethylenes. **International Journal of Quantum Chemistry**, v.82, n.5, p.242-254, 2001.

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

FRISCH, M.J. et al. Gaussian 03, Revision C.02. **Arch Microbiol**, v.137, p.121-129, 1994.

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

GEHLHAAR, D.K.; VERKHIVKER, G.M.; REJTO, P.A.; et al. Molecular recognition of the inhibitor AG-1343 by HIV-1 Protease – Conformationally flexible docking by evolutionary programming. **Chemistry & Biology**, v.2, n.5, p.317-324, 1995.

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.

HEBERLE, G.; De AZEVEDO, W.F.Jr. Bio-Inspired Algorithms Applied to Molecular Docking Simulations. **Current Medicinal Chemistry**, v.18, n.9, p.1339-1352, 2011.

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.

HOOPS, S.C.; ANDERSON, K.W.; MERZ, K.M. Force-field design for metalloproteins. **Journal of the American Chemical Society**, v.113, n.22, p.8262-8270, 1991.

JACKSON, T.A.; XIE, J.; YIKILMAZ, E.; et al. Spectroscopic and computational studies on iron and manganese superoxide dismutases: Nature of the chemical events associated with active-site pKs. **Journal of the American Chemical Society**, v.124, n.36, p.10833-10845, 2002.

LEE, J.D. **Química Inorgânica Não Tão Concisa**, 5 ed., São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1999.

LA PORTA, F.A.; SANTIAGO, R.T.; RAMALHO, T.C.; et al. The Role of the Frontier Orbitals in Acid-Base Chemistry of Organic Amines Probed by Ab Initio and Chemometric Techniques. **International Journal of Quantum Chemistry**, v.110, n.11, p.2015-2023, 2010.

LA PORTA, F.A.; RAMALHO, T.C.; SANTIAGO, R.T.; et al. Orbital Signatures as a Descriptor of Regioselectivity and Chemical Reactivity: The Role of the Frontier Orbitals on 1,3-Dipolar Cycloadditions. **Journal of Physical Chemistry A**, v.115, n.5, p.824-833, 2011.

MOTEKAITIS, R.J.; MARTELL, A.E. Metal chelate formation by N-phosphomethylglycine and related ligands. **Journal of Coordination Chemistry**, v.14, n.2, p.139-149, 1985.

NETO, J.D.D.; ZERNER, M.C.; DE ALENCASTRO, R.B. A possible mechanism of molecular recognition for the reverse-transcriptase of HIV-1. **International Journal of Quantum Chemistry**, v.19, p.225-253, 1992.

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.

PAIER, J.; MARSMAN, M.; HUMMER, K.; et al. Screened hybrid density functionals applied to solids. **Journal of Chemical Physics**, v.124, n.15, 2006.

PAIER, J.; MARSMAN, M.; KRESSE, G. Why does the B3LYP hybrid functional fail for metals? **Journal of Chemical Physics**, v.127, n.2, 2007.

PARR, R.G.; PEARSON, R.G. Absolute Hardness- companion parameter to absolute electronegativity. **Journal of the American Society**, v.105, n.26, p.7512-7516, 1983.

PEARSON, R.G. Hard and Soft acids and bases HSAB.1. Fundamental Principles. **Journal of Chemical Education**, v.45, n.9, p.581, 1968

PERDEW, J.P. Density-functional approximation for the correlation-energy of the inhomogeneous electron-gas. **Physical Review B**, v.33, n.12, p.8822-8824, 1986.

PRYTZ, O.; FLAGE-LARSEN, E. The influence of exact exchange corrections in van der Waals layered narrow bandgap black phosphorus. **Journal of Physics-Condensed Matter**, v.22, n.1, 2010.

RAMALHO, T.C.; TAFT, C.A. Thermal and solvent effects on the NMR and UV parameters of some bioreductive drugs. **Journal of Chemical Physics**, v.123, n.5, 2005.

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.

RUEPPEL, M.L.; BRIGHTWELL, B.B.; SCHAEFER, J.; et al. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.25, n.3, p.517-528, 1977.

SANTIAGO, R.T.; LA PORTA, F.A.; ROCHA, M.V.J.; et al. Description of the Acid/Base behavior of organic phosphines using ab initio and chemometric approaches. **Letters in organic chemistry**, v.7, n.7, p.552-556, 2010.

SCHMIDT, M.W.; BALDRIDGE, K.K.; BOATZ, J.A.; et al. General atomic and molecular electronic-structure system. **Journal of computational chemistry**, v.14, n.11, p.1347-1363, 1993.

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.

SHEALS, J.; PERSSON, P.; HEDMAN, B. IR and EXAFS spectroscopic studies of glyphosate protonation and copper (II) complexes of glyphosate in aqueous solution. **Inorganic chemistry**, v.40, n.17, p.4302-4309, 2001.

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.

SPONER, J.; HOBZA, P. MP2 and CCSD (T) study on hydrogen bonding, aromatic stacking and nonaromatic stacking. **Chemical Physics Letters**, v.267, n.3-4, p.263-270, 1997.

SUBRAMANIAM, V.; HOGGARD, P.E. Metal-complexes of glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.36, p.1326-1329, 1988.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M.H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal Medical Chemistry**, v.49, p.3315-3321, 2006.

TOMASI, J.; MENNUCCI, B.; CANCES, E. The IEF version of the PCM solvation method: an overview of a new method addressed to study molecular solutes at the QM ab initio level. **Journal of molecular structure-Theochem**, v.464, n.1-3, p.211-226, 1999.

WANG, P.; ZHANG, Y.L.; GLASER, R.; et al. The effects of the 1st-row and 2nd-row substituents on the structures and energies of PH₄X phosphoranes- an ab initio study. **Journal of the American Chemical Society**, v.113, n.1, p.55-64, 1991.

ZARANYIKA, M.F.; NYANDORO, M.G. Degradation of glyphosate in the aquatic environment- an enzymatic kinetic-model that takes into account microbial-degradation of both free and colloidal (or sediment) particle adsorbed glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.41, n.5, p.838-842, 1993.

CAPÍTULO 3

CONSTRUCTION AND ASSESSMENT OF REACTION MODELS OF CLASS I EPSP SYNTHASE: PART I AND II.

PART I: Teodorico C. Ramalho, Melissa S. Caetano, Elaine F. F. da Cunha,
Thais C. S. Souza, Marcus V. J. Rocha

PART II: Melissa S. Caetano, Teodorico C. Ramalho, Matheus P. Freitas, Elaine
F. F. da Cunha, Walclee C. Mello.

Department of Chemistry, Federal University of Lavras, CEP 37200-000 Lavras,
Minas Gerais, Brazil.

O Capítulo 3 é composição de dois trabalhos:
A parte I foi publicada no Periódico científico: *Journal of Biomolecular
Structure & Dynamics*, Vol.27, 195-208, 2009.
A parte II foi submetida ao mesmo periódico científico em 2011.

1 ABSTRACT

Although the proposed mechanisms in the literature are reasonable, there are still many questions about the EPSP synthase mechanism that are difficult to answer by experimental means alone. EPSP synthase is a key enzyme in the shikimic acid pathway, which is found only in plants and some microorganisms and is also molecular target of glyphosate, active component of one of the top-selling herbicides. In the study of reaction mechanism of EPSP synthase, in addition to inorganic phosphate and EPSP products, after long times at equilibrium, it was also shown that a side product is formed, the EPSP ketal. In this line, studies using molecular modeling techniques and DFT methods were performed to investigate the interaction of glyphosate and its analogs with the wild type enzyme and Gly96Ala mutant EPSP synthase. Furthermore, we investigated the reaction mechanism of formation of EPSP and the corresponding ketal. Our findings indicate some key amino acid residues in the EPSP synthase mechanism and a possible route for the formation of the EPSP ketal.

Keywords: EPSP synthase; Glyphosate; EPSP ketal; QM/MM calculations.

2 INTRODUCTION

The investigation of the interactions of a chemical reaction and elucidation of the molecular mechanisms involved in the actions of the compounds can be understood by the integration of fundamental knowledge of biochemistry, organic chemistry and theoretical chemistry (Carvalho et al., 2003). The enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase (EPSP synthase) has been the subject of numerous studies since it functions as the biological target for the commercially successful herbicide glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine] (Sammons et al., 1995; Franz, 1985; Amrhein et al.,

1980), which is the active ingredient of the weed control agent Roundup (Funke et al, 2006; Alibhai & Stallings, 2001; Franz et al, 1997). This herbicide belongs to chemical group derived from glycine, classified as non-selective (Galli & Montezuma, 2005).

EPSP synthase catalyzes the transfer of the enolpyruvyl moiety of phosphoenolpyruvate (PEP) to the 5-hydroxyl of shikimate-3-phosphate (S3P) to produce enolpyruvyl shikimate-3-phosphate (EPSP) and inorganic phosphate (Figure 1). This reaction forms the sixth step in the shikimate pathway, which is absent from mammals but essential for the synthesis of aromatic amino acids (phenylalanine, tyrosine, and tryptophan) and almost all other aromatic compounds in bacteria, higher plants, algae and fungi (Eschenburg et al., 2002; Bentley 1990; Roberts et al. 1998). The binding of substrates to EPSP synthase has been shown to have a preferred order with S3P binding first followed by PEP (Anderson, 2005).

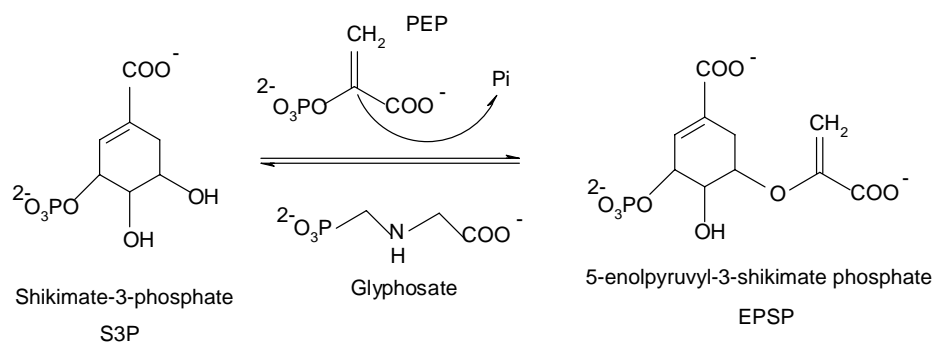


FIGURE 1: Reaction catalyzed by EPSP synthase enzyme.

It is well-known that the glyphosate inhibits this enzyme in a reversible reaction, which is competitive versus PEP and uncompetitive versus S3P (Funke et al, 2006; Steinrucken & Amrhein, 1980; Steinrucken & Amrhein, 1984; Boocock & Coggins, 1983). No other classes of commercial herbicides are known which inhibit EPSP synthase or other enzymes in this important pathway

(Sikorski & Gruys, 1997). Glyphosate appears to occupy the binding site of the second substrate of EPSP synthase, phosphoenolpyruvate- PEP, mimicking an intermediate state of the ternary enzyme- substrates complex (Schonbrunn et al, 2001). While some modification of the PEP structure is tolerated, even minor structural changes in the glyphosate skeleton lead to a significant loss in inhibitor potency and reduced herbicidal activity. Only two closely related analogs, N-hydroxyglyphosate (1) and N-aminoglyphosate (2), exhibit inhibition properties nearly comparable to glyphosate (3) (Figure 2). (Sikorski & Gruys, 1997).

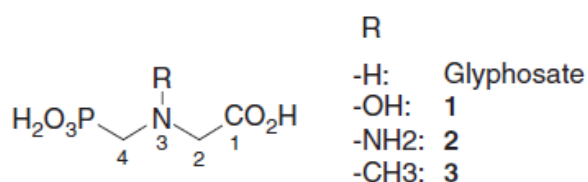


FIGURE 2. Chemical structure of glyphosate and its analogs.

One of the first glyphosate-insensitive enzymes reported was a Gly96Ala mutant of EPSP synthase from *Klebsiella pneumoniae*. The mutant enzyme is insensitive to glyphosate with unaltered affinity for its first substrate, shikimate-3-phosphate (S3P), but displays a 30-fold lower affinity for its second substrate, phosphoenolpyruvate (PEP) (Funke et al, 2006; Sost, 1990). The mode of action of glyphosate on EPSP synthase has been debated over the past two decades. The elucidation of the active site of EPSP synthase and especially of the binding pattern of glyphosate provides a valuable roadmap for engineering new compounds. It is worth mentioning that in spite of great importance, the EPSP synthase reaction mechanism is unknown yet, furthermore, surprisingly little detailed computational work on subject has appeared. Certainly, the

understanding of the catalytic mechanism of this enzyme will facilitate the development of new herbicides.

Sprinson's original suggestion that the transfer of a carboxyvinyl group from phosphoenolpyruvate (PEP) to shikimate 3-phosphate (S3P) to form 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate (EPSP) proceeds via an addition-elimination mechanism. That hypothesis was confirmed by Anderson and co-workers at Monsanto by isolating the tetrahedral intermediate (THI) from the enzyme (Anderson et al, 1990).

On the other hand, Ming and co-authors suggest two pathways may be followed in the formation and decomposition of the THI, resulting in various possibilities for the detailed stereochemical mechanism of the overall transformation. In the first step, the proton may be added to either the *Re* or *Si* face of the PEP double bond. In the second step, the 5-hydroxyl of S3P may add *syn* or *anti* to this hydrogen. In addition, Schonbrunn and co-workers with the proposed position of PEP, perceive Glu341 could act as proton donor for the methylene group of PEP, proton addition would then proceed stereospecifically from the 2-*si* face of PEP. One carboxyl oxygen of Glu341 could stabilize the incipient PEP oxocarbenium ion, as it would be in sub-van-der-waals distance to the carbocation. Finally, Mizyed provided evidence for one amino acid residue, Lys22, acting as the general acid catalyst of THI breakdown in both the forward and the reverse reactions, while Glu341 acts as the general base. Thus, in the addition step of the overall forward reaction, Lys22, would act as general base catalyst to deprotonate S3P 5-OH while Glu341 would act as general acid to protonate the PEP.

Although the proposed mechanisms are reasonable, there are still many questions about the catalysis that are difficult to answer by experimental means alone.

EPSP ketal species, shown below, could be isolated after long-term incubations with enzyme and substrates (Leo et al., 1990). When this compound was originally isolated, it was proposed to be a possible enzyme intermediate. However, a detailed kinetic analysis revealed that the rate of formation of the EPSP ketal was a million-fold slower than catalysis and therefore did not meet the criteria of a kinetically competent species. In the experiments described above using solution NMR to observe the tetrahedral intermediate on the enzyme at internal equilibrium with substrates and products, the EPSP ketal was formed over longer times as a breakdown product of the tetrahedral intermediate (Anderson, 2005; Anderson et al., 1990).

Understanding the formation of EPSP ketal is a key to have a complete definition of the EPSP synthase reaction mechanism (Leo et al., 1990).

Thus, the main goal of this paper is to use molecular mechanics based methods, involving docking studies, molecular dynamics simulation in aqueous environment and DFT calculations, to study the binding orientations, predict binding affinities and to elucidate the reaction mechanism involving EPSP synthase.

3 METHODS

3.1 Ligands data set

A data set of glyphosate and analogs (Figure 2) from published results (Sikorski & Gruys, 1997; Knowles et al., 1993) was utilized for our docking studies.

3.2 System relaxation strategy

Crystal coordinates of the EPSP synthase, cofactor (S3P), glyphosate and the crystallographic water molecules were taken from the Protein Data Bank

(PDB codes:1G6S and 1MI4) (Eschenburg et al, 2002). In order to relax these crystallographic systems, all hydrogen atoms were explicitly included in the system. Atomic coordinates were then minimized by the protocol described by da Cunha et al. (2008) These steps were necessary to remove bad contacts or internals in the initial rigid structure, to reduce distortion risks and to lead to an optimized starting point for the subsequent docking calculations (Josa et al., 2008; da Cunha et al., 2004). The minimizations were carried out by the conjugate gradient algorithm until the maximum derivative was less than $0.05 \text{ kJ mol}^{-1}\text{Å}^{-1}$. Resultant conformations were submitted to the PM3tn semi-empirical molecular orbital method from the Gaussian 03 package (Frisch et al., 1994).

3.3 Docking calculation procedures

Crystal coordinates of EPSP synthase enzyme, the cofactor, inhibitor, and the crystallographic water molecules were taken from the Brookhaven Protein Data Bank (PDB code: 1G6S and 1MI4) (Eschenburg et al., 2002). The EPSP synthase is complexed with glyphosate, and S3P. The 1G6S and 1MI4 systems were chosen because the glyphosate crystallographic structure is similar to other inhibitors in the data set used in this study. Three-dimensional (3D) structures of each of inhibitor (Figure 2) were based on the bioactive conformation of glyphosate co-crystallized with EPSP synthase.

The compounds were docked into the EPSP synthase binding sites using the Molegro Virtual Docker 2006 (Thomsen & Christensen, 2006), a program for predicting the most likely conformation of how a ligand will bind to a macromolecule. Only ligand molecules are considered flexible during the docking simulation. Thus, a candidate solution is encoded by an array of real-valued numbers representing ligand position, orientation, and conformation as Cartesian coordinates for the ligand translation, four variables specifying the

ligand orientation (encoded as a rotation vector and a rotation angle), and one angle for each flexible torsion angle in the ligand (Molegro ApS).

The MolDock scoring function (MolDock Score) used by Molegro Virtual Docker program is derived from the PLP (Piecewise Linear Potential), a simplified potential whose parameters are fit to protein-ligand structures and binding data scoring functions (Thomsen & Christensen, 2006) and further extended in GEMDOCK (Generic Evolutionary Method for molecular DOCK) with a new hydrogen bonding term and new charge schemes. The docking scoring function, E_{score} , is defined by the following energy terms:

$$E_{score} = E_{inter} + E_{intra} \quad (1)$$

where E_{inter} is the ligand-protein interaction energy:

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

The E_{PLP} term is a “piecewise linear potential” using two different sets of parameters: one set for approximating the steric (van der Waals) term between atoms, and another stronger potential for hydrogen bonds. The second term describes the electrostatic interactions between charged atoms. It is a Coulomb potential with a distance-dependent dielectric constant given by: $D(r) = 4r$. The numerical value of 332.0 fixes the units of the electrostatic energy to kilocalories per mole (Molegro ApS).

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

The first term (double summation) is between all atom pairs in the ligand excluding atom pairs which are connected by two bonds. The second term is a torsional energy term, where θ is the torsional angle of the bond. The average of the torsional energy bond contribution is used if several torsions could be determined. The last term, E_{clash} , assigns a penalty of 1000 if the distance between two heavy atoms (more than two bonds apart) is less than 2.0 Å, punishing impracticable ligand conformations (Molegro ApS). Summarizing, these functions are used to automatically superimpose a flexible molecule onto a rigid template molecule. The docking search algorithm used in Molegro Virtual Docker is based on interactive optimization techniques inspired by Darwinian evolution theory (evolutionary algorithms, EA). A population of individuals (candidate solutions) is exposed to competitive selection that weeds out poor solutions. Recombination and mutation are used to generate new solutions (da Cunha et al., 2008; Gehlhaar et al., 1995).

The MolDock docking algorithm is based on a new hybrid search algorithm, called guided differential evolution. The guided differential evolution algorithm combines the differential evolution optimization technique with a cavity prediction algorithm during the search process, which allows for a fast and accurate identification of potential binding modes (poses).

3.4 Molecular dynamics simulation

The best-fit complexed structures of the inhibitors docked into the EPSP synthase active site of wild-type and Gly96Ala EPSP synthase enzymes were selected and molecular dynamics was performed. This procedure was employed in order to incorporate the protein flexibility and solvent effect, because in the docking strategy only ligand molecules are considered flexible during the docking simulation. Thus, the EPSPs-inhibitor complexes resulting from the docking calculation were solvated with five shells of water molecules.

Then, in order to avoid abrupt conformational changes, the system was equilibrated, observing an equilibration phase during 0.1ns. Production dynamics simulations were carried out for 3.0ns with atomic coordinates saved every 0.01ns. The MD simulation was carried out using Gromacs software (Spoel et al., 2005).

3.5 Density functional studies

In this work, mixed quantum and molecular mechanics (QM/MM) combined with docking and Molecular Dynamics techniques were performed to determine the preferred route for both the first and second step of the transformation catalyzed by EPSP synthase. On the technical side, we have applied a new procedure combining docking technique, MD simulation and DFT calculations at the QM/MM interface for enzymatic mechanism. Actually, to our knowledge, similar theoretical strategy has been previously employed just to describe spectroscopy properties of molecules in solution (Ramalho et al., 2008).

The QM calculations were carried out in the Spartan Pro (Schonbrunn et al., 2001) and Gaussian 03 (Frisch et al., 1994) packages. The QM region, which consists of Asp313, Lys22, Glu341, Lys83 and Arg386 neighboring peptide bonds, link atoms, crystallographic water molecules, cofactor, inhibitor, has a total of 87 atoms. The initial coordinates for the heavy atoms of Asp313, Lys22, Glu341, Lys83 and Arg386, neighboring peptide bonds, the water molecules were taken from the crystal structure.

It is worth mentioning that the classical MD part of QM/MM approach is used only to generate an appropriate structure of the liquid. Another important point is that all statistical information is obtained before running the QM stage.

All the transition states, intermediates and precursors involved were calculated. Each conformer was fully optimized at both semi-empirical PM3tm and DFT levels (Sost, 1990) with conjugate gradient and quasi-Newton-Raphson

algorithms. The final geometries were obtained with the density functional Becke's three-parameter exchange functional and the gradient-corrected functional of Lee, Yang and Paar (B3LYP) using the basis set 6-311G** (da Cunha et al., 2008). Furthermore, after each optimization, a force constant calculation was performed to verify whether the optimized structures were indeed local minima (no imaginary frequencies) or transition states (one imaginary frequency) (Gehlhaar et al., 1995). The solvent effect was evaluated with utilization of polarized continuum model (PCM) solvation calculations, initially proposed by Barone and Tomasi (1998), using the functional B3LYP and basis set 6-311G**. Herein the solute cavity may be specified as any set of overlapping spheres. By representing the atoms as spheres, a more realistic cavity shape is produced for extended molecules, in contrast to another model of solvation (Ramalho et al., 2008; Cho et al., 2000).

4 RESULTS AND DISCUSSION

4.1 Part I

4.1.1 Docking of the compounds into the binding site of the wild-type enzyme

The active glyphosate analogs were docked in the active site of the wild-type and mutant Gly96Ala enzyme. All reasonable binding orientations for glyphosate and analogs were investigated. Following a search of the conformational space of different glyphosate orientations performed using Molegro Virtual Docker (MVD), the low-energy interaction modes were chosen for further minimization.

The replacement of Gly96 for Ala in wild-type EPSP synthase has an effect in the cavity of the active site. The methyl group of Ala is oriented toward one oxygen of the phosphate group. The effect of this orientation is to reduce the

free volume of the cavity in the active site, where the ligand will come. We could freely interpret this tightening as a selectivity process for orientation that glyphosate and analogs could take before interaction and stabilization into the cavity. The initial position and conformation of the ligand in the active site of wild-type and mutant enzyme were taken from crystal coordinates with PDB code 1G6S and 1MI4, respectively. During the analysis using MVD (da Cunha et al., 2008), the final structure was accepted or rejected based on energy and similarity criteria to structures found before.

After that procedure, the molecular dynamics were performed and the best-fit complexed structures of glyphosate and analogs docking into the EPSP synthase active site of wild-type and mutant Gly96Ala enzyme were selected. From the 3ns molecular dynamics simulations performed for glyphosate and analogs with each enzyme (wild-type and mutant Gly96Ala), the binding modes with the lowest docked energies were selected. The favorable orientation for the glyphosate complex in the wild-type EPSP synthase involves eleven hydrogen bonds. Two hydrogen bonds with the amino acid residue Lys22 and three hydrogen bonds with S3P can be observed mimicking a chelate, which address the conformation of dihedral angle of among the atoms C4-N3-C2-C1. It is also interesting to note that glyphosate forms a dihedral angle 10.55° .

The analog **1** forms hydrogen bonds with the same amino acid residues, except the residue Arg-100, however with different distances and energy values. This analog forms two hydrogen bond with Lys22 and four hydrogen bond with S3P leading to a dihedral angle among the atoms C4-N3-C2-C1 of 171.03° . Analog **2** forms fifteen hydrogen bonds with EPSP synthase, one hydrogen bond more than glyphosate. This analog forms six hydrogen bonds with S3P, getting a dihedral angle of 23.49° . The amine group interacts with the amino acid residues Asp313, Glu341 and S3P.

Analog **3** forms sixteen hydrogen bonds with the wild-type enzyme, two interactions more than glyphosate. The hydroxyl group interacts with the amino acid residues Asp313, Glu341, Arg344 and S3P. The analog **3** forms six hydrogen bonds with S3P getting a dihedral angle of 173.09°.

The predicted binding free energies of the EPSP synthase inhibitors and the corresponding experimental values are listed in Table I. This rather good correlation demonstrates that the binding conformations and binding models of the EPSP synthase inhibitors are reasonable. Based on the binding free energies and their correlation with the inhibitory activities, we can give a more quantitative explanation to the structure–activity relationship of the inhibitory mechanism for these inhibitors.

As observed for wild-type enzyme, there is a good agreement between the theoretical binding free energies of the EPSP synthase inhibitors and the experimental data (Table 1).

TABLE 1. Energy values for glyphosate and analogs in the active site of wild-type enzyme.

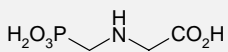
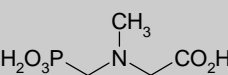
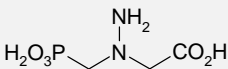
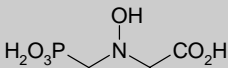
Compound	Structure	k_i (<i>microM</i>)	ΔE (kcal mol^{-1})
Glyphosate		0,16	-115.46
1		78,0	-102.46
2		0,61	-109.87
3		2,2	-108.70

Figure 3 shows the superposition of glyphosate and its analogs docked into the active site of wild-type EPSP synthase. From this picture, we can note clearly that conformation of the glyphosate into the active site due to the molecular docking is distinct from the conformation of its analogs.

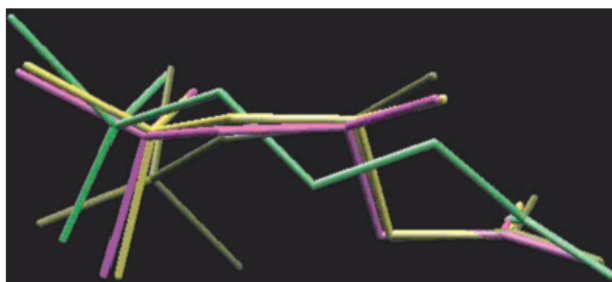
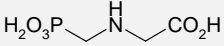
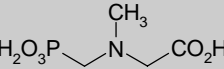
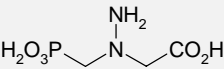
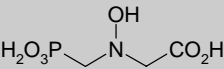


FIGURE 3. Molecular superposition of glyphosate (green) and its analogs 1 (yellow), 2 (pink) and 3 (brown) into the wild-type EPSP synthase.

4.1.2 Mutant Gly96Ala binding site

Those studies have been carried out to try to understand the forms of interaction of glyphosate and its analogs with wild-type and Gly96Ala enzymes of EPSP synthase. For instance, the replacement of glycine96 for alanine in the wild-type EPSP synthase leads to EPSP synthase resistance to the glyphosate (Eschenburg et al., 2002). The hydrogen bonds and intermolecular energies between the drugs and the mutant Gly96Ala EPSP synthase were estimated to make sure the amino acid residue alanine interfere in active site of enzyme (Table 2).

TABLE 2. Energy values for glyphosate and analogs in the active site of Gly96Ala mutant enzyme.

Compound	Structure	ΔE (kcal mol ⁻¹)
Glyphosate		-100.88
1		-96.43
2		-97.05
3		-98.04

From Table 2, large differences were observed for the binding free energies between the wild-type and the Gly96Ala mutant. In general, the results with the ligand- Gly96Ala complex show larger ΔG values (structure with the less favorable binding free energy) than the complex-wild type EPSP synthase.

For instance, we noted, for glyphosate, a difference of -14.58 kcal mol⁻¹ on the binding free energy (ΔG) between the wild-type and the mutant enzyme (see Table 2). This result is very good agreement with recent experimental findings (Schonbrunn et al., 2001).

The analog **1** forms two hydrogen bonds with Lys22 and five hydrogen bonds with S3P leading to a dihedral angle among the atoms C4-N3-C2-C1 of 52.83°. Analog **2** forms fifteen hydrogen bonds with EPSP synthase, three more than glyphosate. This analog forms six hydrogen bond with S3P, leading to dihedral angle of 178.52°. The amine group interacts with the amino acid residues Asp313, Lys22, and S3P. Analog **3** forms sixteen hydrogen bonds with

the mutant enzyme, two interactions more than glyphosate. The hydroxyl group interacts with the amino acid residues Asp313, Arg344, Arg344, and S3P. The analog **3** forms six hydrogen bonds with S3P leading to a dihedral angle among C4-N3-C2-C1 of 176.57°.

Figure 4 shows the superposition of glyphosate and its analogs docked into the active site of mutant EPSP synthase. It is easy to observe that conformation of the glyphosate into the active site from the molecular docking is distinct from the conformation of its analogs in both enzymes (wild-type and mutant).

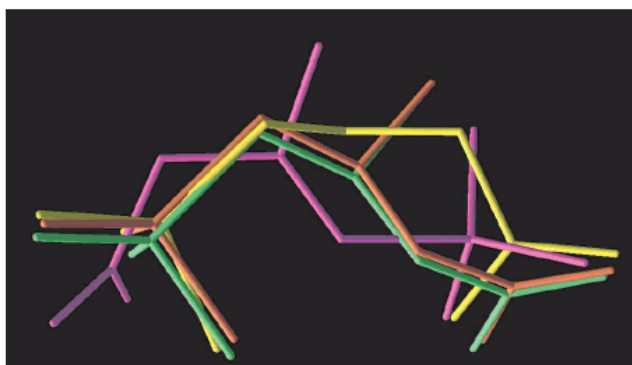


FIGURE 4. Superposition of glyphosate (yellow) and its analogs 1 (pink), 2 (green) and 3 (orange) into the mutant EPSP synthase.

The best conformation of glyphosate in the active site wild-type enzyme is very similar the conformation of the natural substrate (PEP) of the EPSP synthase. With the substitution of the amino acid residue glycine 96 for alanine in the wild type enzyme to form the mutant enzyme, we observed that the dihedral angle of the glyphosate changed from 101.22° to 10.55°, going from wild type EPSP synthase to mutant enzyme. This could, in principle, justify the resistance of Gly96Ala EPSP synthase observed experimentally.

ΔG values of -97.05 and -98.04 kcal mol⁻¹ were obtained for the compounds **2** and **3**, respectively. A deeper analysis indicates that the

compounds **2** and **3** interact better with wild-type than with the Gly96Ala EPSP synthase.

We observed a change in the dihedral angle among the atoms C4-N3-C2-C1 (Figure 2) for both compounds in the conformation obtained from the MVD program for the mutant enzyme when compared with wild type enzyme. This is an expected result, because the structural difference between glyphosate and compounds **2** and **3** is just one amine, hydroxyl group, respectively.

Because of the structural similarity between glyphosate and analogs, they exhibited unlike inhibitory activity. The introduction of a methyl, hydroxyl or amine group reduced the activity significantly of both wild type and mutant Gly96Ala EPSP synthase. The largest conformational change between those enzymes is located at regions close to carboxylate group of the inhibitor. Thus a closer examination showed that hindrance in the EPSP synthase active site increases considerably from wild-type to mutant enzyme. Therefore the amino acid residues closer to carboxyle group of inhibitor show the largest structural change in the mutant enzyme disfavoring the molecular interaction between Gly96Ala EPSP synthase and inhibitor leading to decrease the ΔG values (Tables 1 and 2).

4.1.3 Reaction mechanism study

It is well-known that EPSP is an important branch-point intermediate for the synthesis of aromatic amino acids (phenylalanine, tyrosine and tryptophan). However, its reaction mechanism had not been elucidated so far. In addition, it should be kept in mind, the importance of taking into account the dynamics effects on both the reaction mechanism and ligand orientation. Thus, we have employed a theoretical methodology used to relax the system and introducing the solvent effect. This computational procedure has been previously employed on similar systems successfully (da Cunha et al., 2004).

The amino acids residues that take part in the reaction to form EPSP in the addition-elimination mechanism aren't known so far (Figure 5). Thus, our aim is to use some biological information in combination with molecular modeling methods to elucidate this important fact. Therefore, intended to elucidate the mechanism of this reaction to project new and more potent EPSP synthase inhibitors.

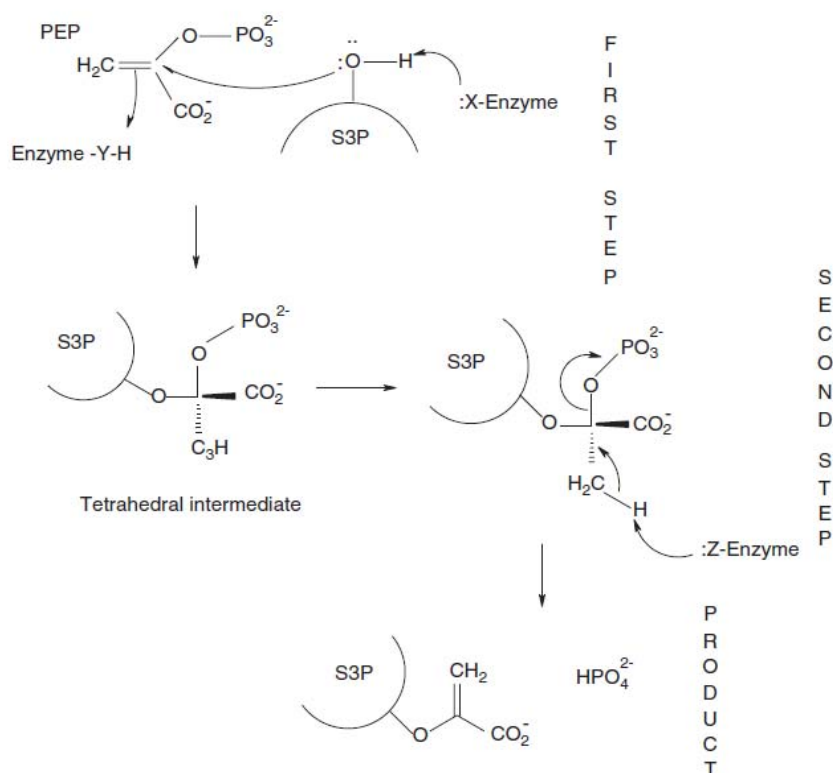


FIGURE 5. Reaction mechanism of EPSP.

We are quite aware of the limitations of the semi-empirical (SM) method, but as show in other publications (Ramalho et al., 2007), at least for small sized systems, the SM methods do not introduce any changes in the

mechanism but only in the energetic of the reactions (Schultz et al., 1984). Therefore, the mechanism of the reaction was studied via *ab initio* calculations in order to get more accuracy energies.

In a DFT calculation of the type reported here, there is a primary consideration: the choice of the basis set and the form of the exchange-correlation functionals. For carbon and oxygen, we have used a large all electron 6-311++G** (Gehlhaar et al., 1995) basis set. From our calculation, a good agreement between the calculated and experimental geometries for the ligands was observed. After the optimization of the selected conformers, a force constant calculation was carried out to assure that the structures reported in Table 3 are all transition states.

TABLE 3. Activation energy (ΔE in kcal.mol⁻¹) of the transition states for the first step of the transformation

Proposed	Donor/Acceptor	ΔE (kcal mol ⁻¹)	$\Delta\Delta E^{\#}$ (kcal mol ⁻¹)
First step			
I.1 This work	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 This work	Glu-341/ Arg-386	+55.67	+15.67
Second step			
II.1	Asp-313	+ 47.79	+33.23
II.2	Glu-341	+14.56	0.00

According to our calculation, the first step of the reaction has the highest energy barrier (Figure 6). This means that the formation of the THI is the limiting step of reaction.

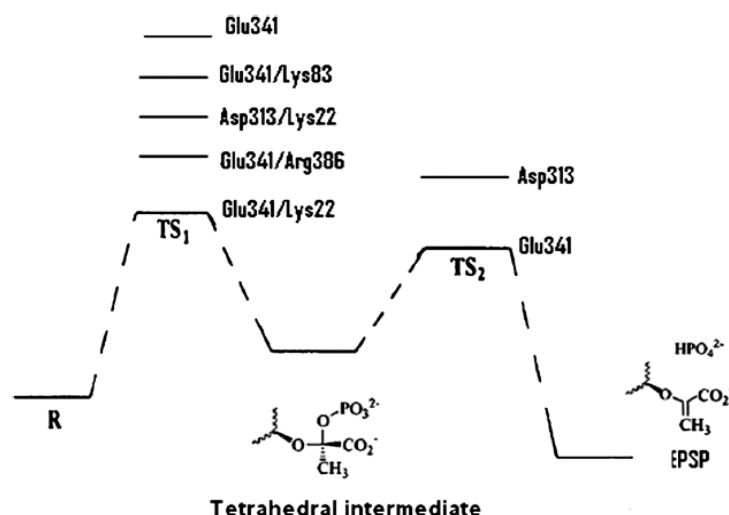


FIGURE 6. The first and second step of the chemical reaction.

We have employed theoretical calculations to obtain the relative chemical stability of the complexes intermediates and transition states into the active site wild-type EPSP synthase. From our calculations, it is clear that Asp313/Lys22 is less stable than Glu341/Lys22 about $+18.18 \text{ kcal mol}^{-1}$. Then, our results reveal that, Glu341 and Lys 22 are the donor and acceptor proton amino acid residues, respectively that take part in the first step of the reaction to form THI. The carboxyl oxygen of Glu341 stabilizes the incipient transition state TS1 better than the carboxyl oxygen of Asp313. Ongoing from Glu341/Lys22 to Asp313/Lys22 and Glu341/Arg386 the concomitant changes in the $\Delta\Delta E^\ddagger$ for TS1 is $+18.18$ and $+15.67 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectively. Thus, our theoretical results put in evidence that the Lys22 acts preferentially as a base catalyst to deprotonate S3P 5-OH while Glu341 acts as acid to protonate PEP in

the reaction site. The activation energy of Glu341 acting as general base is too high, about +101.14 kcal mol⁻¹.

From the docking results, we can note that the amino acid residue Arg386 is in the active site close to S3P, consequently, it could also act a base catalyst to deprotonate S3P 5-OH. In order to investigate that possibility for acid/base catalyst, we perform some calculations with Arg386 acting as base to deprotonate S3P 5-OH and Glu341 acting as acid. Interestingly, the energy difference for TS1 between Glu341/Lys22 and Glu341/Arg386 is about +15.67 kcal mol⁻¹.

Furthermore, it is also important to notice that the carbocation formation is completely unfavorable at the first step of reaction, because there is not charge stabilization in the active site of the wild-type EPSP synthase. In fact, the transition state that leads to carbocation formation has too high activation energy.

Notably, without the Asp313 in the active site, the enolpyruvyl transfer reaction is halted after formation of the tetrahedral adduct of the substrates (Eschenburg et al., 2003). In line with that, Asp313 cannot be the acid for the initial protonation of the target PEP as suggested in other works. From experimental conclusion, the nucleophilic attack toward PEP still proceeds if Asp313 is replaced by Ala, because the tetrahedral intermediates form in the mutant enzymes (Funke et al., 2007). This certainly reinforces our theoretical data for the first step of the reaction, because the tetrahedral intermediates form in the mutant enzymes Asp313Ala.

The second step (Figure 5) also has one transition state defined as TS2. Transition state 2 is involved in the transformation of the tetrahedral intermediate (THI), via proton abstraction, into the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSP). From our calculations (Table 3) when Enzyme-Z: is Glu341 there is a lower energy of activation when compared to Asp313 about +33.23

kcal mol⁻¹. Then, Glu341 is the acceptor proton amino acid residue that takes part in the second step of reaction to form EPSP.

From the structure of a fluorinated tetrahedral intermediate analog bound to C115A-MurA, it was concluded that the configuration of the native tetrahedral C-2 of PEP should be 2S in MurA and AroA37. Our theoretical structures corroborate this proposal. The presence of the tetrahedral intermediates in the structures of D305A-MurA and D313A-AroA clearly demonstrates that the nucleophilic attack toward PEP is due to Glu341 present in the active site.

Thus, we could conclude that our theoretical results are quite consistent since the Glu341 was deprotonated in the first step of reaction, acting like a donor proton to S3P, therefore, being skilful to receive a proton in the second step of reaction of EPSP synthase.

4.2 Part II

In addition to inorganic phosphate and EPSP products, after long times at internal equilibrium, the side product EPSP ketal was found to be formed in the reaction mechanism of EPSP synthase (Figure 7) (Anderson et al., 1990; Anderson & Johnson, 1990). The EPSP ketal is considered a side product formed at a rate a million-fold slower than catalysis (Anderson et al., 1990). Thus, our goal in this work was also to help in understanding the stability of this side product when compared to the main products and propose a possible mechanism for its formation.

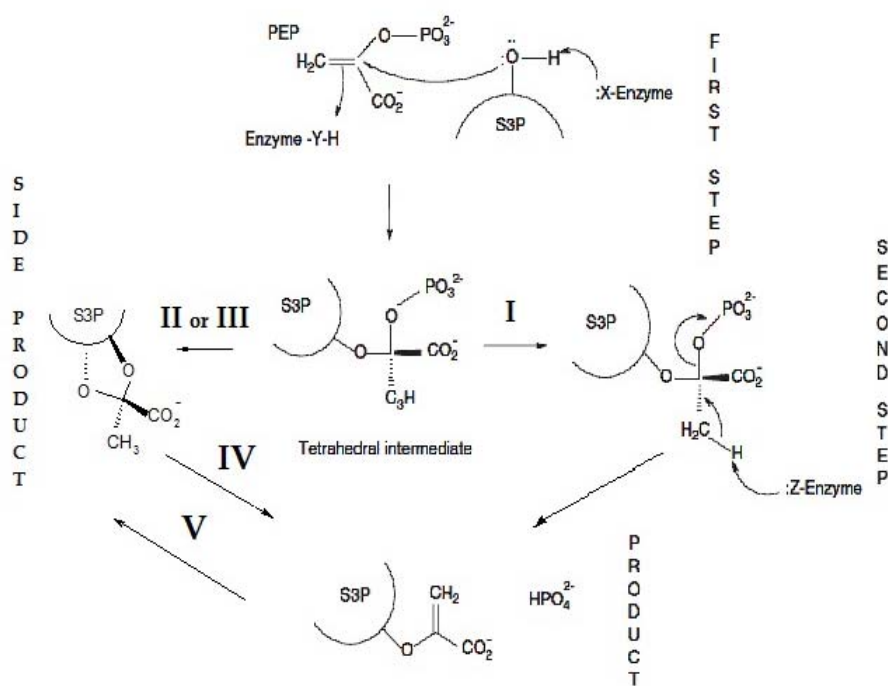


FIGURE 7. Reaction mechanism of EPSP synthase. Route I is representing the direct path. Route II or III is representing the indirect path, the formation of EPSP ketal.

Calculations indicate that the formation of 5-enolpyruvylshikimate3-phosphate (EPSP) and inorganic phosphate products via proton abstraction by the participation of an amino acid residue of the enzyme active site is preferred, after the formation of the tetrahedral intermediate, which was proposed in our previous study to be via Glu341 (Ramalho et al., 2009) (route I). Moreover, it can be seen from Table 4, the formation of EPSP ketal (side product), with an energy gap value higher than the preferred route (direct path) of the reaction mechanism.

TABLE 4. Activation energy ($\Delta\Delta E^\ddagger$ (kcal mol⁻¹)) of the transition states for the routes of formation of EPSP ketal and EPSP.

Route	$\Delta\Delta E^\ddagger$
I	0.00
II	+12.59
III	+20.77
IV	+2.92
V	+24.37

Two routes were proposed to form the side product EPSP ketal, one of them (route II) happens from an attack of the oxygen lone pair in the phosphate group to the hydroxyl hydrogen bonded to the tetrahedral intermediate, which can be seen in Figure 8, leaving subsequently the phosphate and then forming the EPSP ketal.

Another proposal is the oxonium route (route III), which was divided into three stages and took in the last step the participation of a Lewis base acting as a proton acceptor. In this study, the phosphate group is eliminated in the second step of transformation; the reaction is also described in Figure 8.

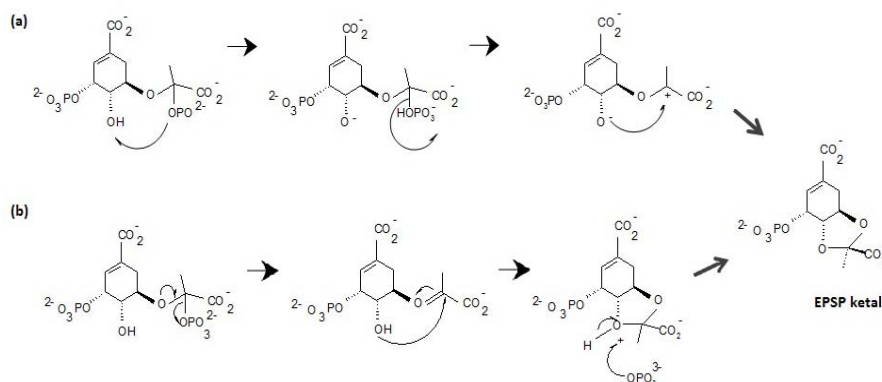


FIGURE 8. Two proposed routes to form EPSP ketal. (a) Oxonium route (III); (b) route (II) begins with the attack of an oxygen lone pair of the phosphate group.

From our results, route II shows the lowest energy value for the formation of EPSP ketal. This route has a difference of ca. $12.59 \text{ kcal mol}^{-1}$ compared to route I. Route III can also be compared to the most stable, route I, with an energy difference of ca. $20.77 \text{ kcal mol}^{-1}$.

There is a difference in the energy value of $8.18 \text{ kcal mol}^{-1}$ between the two proposed routes II and III for the formation of EPSP ketal, being route II the most favorable one.

It should be kept in mind that once the EPSP ketal is formed, its transformation to the main product EPSP could also occur. Herein, we denominated that reaction pathway as route IV. This is an alternative way to obtain EPSP from the shikimate route (Ramalho et al., 2009). In order to investigate the possibility of transformation of EPSP ketal in EPSP, we have performed theoretical calculations to obtain the thermodynamic and kinetic parameters for the route IV, whose energy values are available in Table 4. In route IV, the formation of the EPSP occurs by participation of an amino acid residue of the active site of the enzyme that would act as proton donor. Based on

previous studies, we have chosen Glu341 (Ramalho et al., 2009). The mechanism would start again with the oxygen lone pair of the hydroxyl group attacking the hydrogen of the proton donor amino acid residue, leading to the formation of a tertiary carbocation, which promotes the formation of the product EPSP (Figure 9). In this context, our calculation reveals that EPSP ketal can be formed from the route II, and this compound could still react forming the EPSP. Thus, our findings can, in principle, be used to rationalize some experimental data.

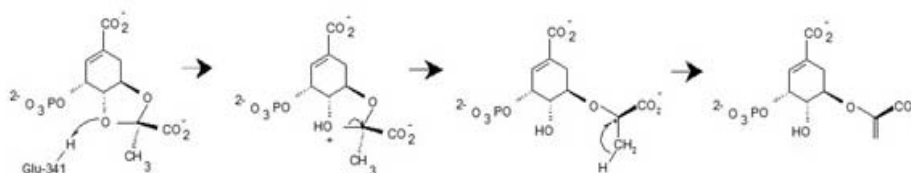


FIGURE 9. Route IV: Reaction mechanism for the transformation of the EPSP ketal in EPSP.

Figure 10 shows a summary of the results obtained for direct and indirect pathways of the reaction mechanism of EPSP synthase.

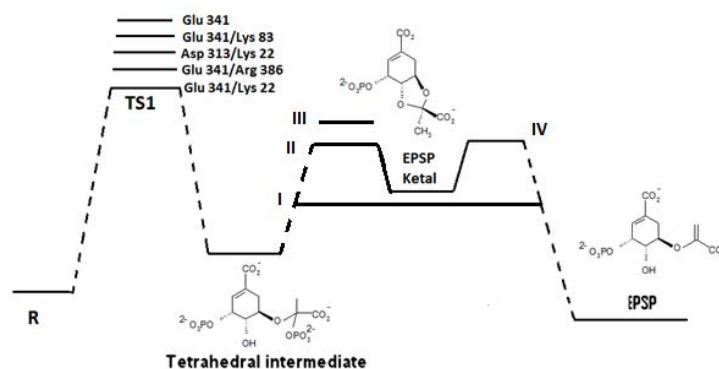


FIGURE 10. Routes and steps for the chemical transformations.

Some authors speculate the possibility of the formation of EPSP ketal from EPSP. The results of Jakeman et al. (1998) show that under equilibrium conditions both EPSP and EPSP ketal can be present at the same time. Furthermore, they establish that the EPSP ketal forms ultimately at the expense of both PEP and EPSP. Lewis et al. (1999) adds that the formation of the ketal from EPSP may involve the formation of a protonated vinylic species; alternatively, another pathway may involve the attack of the hydroxyl toward the tetrahedral center of the intermediate.

We investigate through theoretical calculations the possibility of formation of the side product EPSP ketal from EPSP (route V), the main product of the reaction. The reaction mechanism used to obtain the theoretical values for the route V again makes use of Glu341 as a proton donor. A proton from Glu341 is added to the double bond according to Figure 11, giving rise to a carbocation with subsequent cyclization to give the EPSP ketal.

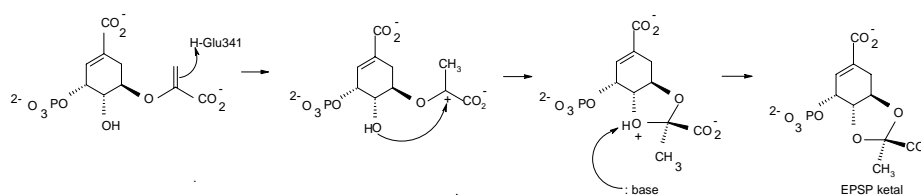


FIGURE 11. Route V: Reaction mechanism for the transformation of EPSP in EPSP ketal.

Based on our theoretical data, which are available in Table 2, the formation of EPSP ketal is more probable when it occurs from the tetrahedral intermediate, route II. The ketal formed from EPSP, route V, is ca. 11.78 kcal mol⁻¹ more energetic than when formed from the tetrahedral intermediate. It would also be possible to mention that the side product EPSP ketal forming the main product EPSP (rote IV) is energetically more favorable than vice versa, as proposed by other authors (Jakeman et al., 1998; Lewis et al., 1999).

5 CONCLUSIONS

In this work, we analyzed the way of the interaction between glyphosate and three analogs and the EPSP synthase enzyme through molecular dynamics, docking and DFT studies. The relationship between our theoretical results and the experimental inhibitory activities, (k_i values) from the EPSP synthase was satisfactory. The decrease of the docking energy values of glyphosate in the mutant EPSP synthase in respect to wild type enzyme show clearly that glyphosate interacts much more in the wild type than in the mutant enzyme structure, which is in good agreement with Eschenburg et al. (2002).

The glyphosate has lower binding energy than its analogs in the wild type EPSP synthase, this is probably due to conformational flexibility. Nevertheless our theoretical findings indicate opportunities opened by the differences found for the interactions of compounds **1**, **2**, and **3** with both wild-type and mutant enzymes. For instance, structural modifications at position 4 (Figure 2) could lead to an increase of biological activity because this would probably lead to higher interaction energy values.

From the mechanism study, it can be observed that the amino acid residues that take part in the first step of reaction to form EPSP in the addition-elimination mechanism might be the Lys22 acting preferentially as a base catalyst to deprotonate S3P 5-OH, while Glu341 act as acid to protonate PEP in the reaction site. At the second step of the transformation, Glu341 is responsible by proton withdrawing in the tetrahedral intermediate, resulting in the formation of the 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate (EPSP).

The EPSP ketal was confirmed as a side product in the reaction of EPSP synthase, and in accordance with our theoretical calculations, it is formed preferably through route II. It should be kept in mind that once formed, the EPSP ketal may also react to form EPSP through route IV.

Our calculations estimate that the formation of EPSP from EPSP Ketal is not energetically favorable through route V, as proposed by other authors (Jakeman et al., 1998; Lewis et al., 1999).

Finally, it is worth mentioning that the use of appropriate theoretical methods involving QM/MM techniques for the reaction mechanism calculation and molecular docking can be helpful in understanding the molecular interactions and the structural factors responsible for the selectivity of EPSP inhibitors. For the QM part, the DFT method is adequate to quantify the differences in behavior for the mechanistic proposals in large systems. The understanding of the formation of EPSP ketal is also a key point to design new and more selective herbicide compounds, EPSPs inhibitors.

Acknowledgments

We thank the Brazilian agencies FAPEMIG, CAPES and CNPq for funding part of this work.

6 REFERENCES

ALIBHAI, M.F.; STALLINGS, W.C. Closing down on glyphosate inhibition - with a new structure for drug discovery. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, n.6, p.2944-2946, 2001.

AMRHEIN, N.; DEUS, B.; GEHRKE, P. and STEINRUCKEN, H.C. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. 2. Interference of glyphosate with chorismate formation in vivo and in vitro. **Plant Physiol**, v.66, p.830-834, 1980.

ANDERSON, K.S. Detection of novel enzyme intermediates in PEP-utilizing enzymes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.433, n.1, p.47-58, 2005.

ANDERSON, K.S.; JOHNSON, K.A. Kinetic competence of the 5-enolpyruylshikimate-3-phosphate synthase tetrahedral intermediate. **Journal of Biological Chemistry**, v.265, n.10, p.5567-5572, 1990.

ANDERSON, K.S.; SAMMONS, R.D.; LEO, G.C.; SIKORSKI, J.A. Observation by C-13 NMR of the EPSP synthase tetrahedral intermediate bound to the enzyme active-site. **Biochemistry**, v.29, p.1460-1465, 1990.

BARONE, V.; COSSI, M. and TOMASI, J. Geometry optimization of molecular structures in solution by the polarizable continuum model. **Journal of Computational Chemistry**, v.19, n.4, p.404-417, 1998.

BENTLEY, R. The shikimate pathway-A metabolic tree with many branches. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.25, n.5, p.307-384, 1990.

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.

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.

CHO, S.G.; CHO, J.R.; PARK, B.S.; PARK, G. Solvent effects on the relative stability of 4-nitro-1H-imidazole and 5-nitro-1H-imidazole. Ab initio and density functional theory calculations. **Jornal of Molecular Structure (Theochem)**, n.532, p.279-286, 2000.

Da CUNHA, E.F.F.; De ALENCASTRO, R.B.; RAMALHO, T.C. Theoretical study of adiabatic and vertical electron affinity of radiosensitizers in solution Part 2: Analogues of tirapazamine. **Journal of Theoretical & Computational Chemistry**, v.3, n.1, p.1-13, 2004.

Da CUNHA, E.F.F.; RAMALHO, T.C.; REYNOLDS, R.C. Binding mode analysis of 2,4-diamino-5-methyl-5-deaza-6-substituted pteridines with Mycobacterium tuberculosis and human dihydrofolate reductases. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, v.25, n.4, p.377-385, 2008.

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**, 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.

FRANZ, J.E. **The Herbicide Glyphosate**. Butterworth: Boston, 1985, 1-17p.

FRANZ, J.E.; MAO, M.K. and SIKORSKI, J.A. **American Chemical Society**, monograph 189. Oxford University Press, New York, 1997.

FRISCH, M.J. et al. Gaussian 03, Revision C.02. **Arch Microbiol**, v.137, p.121-129, 1994.

FUNKE, T.; HAN, H.; HEALY-FRIED, M.L.; et al. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. **Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America**, v.103, n.35, p.13010-13015, 2006.

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.
GEHLHAAR, D.K.; VERKHIVKER, G.M.; REJTO, P.A.; et al. Molecular recognition of the inhibitor AG-1343 by HIV-1 Protease – Conformationally flexible docking by evolutionary programming. **Chemistry & Biology**, v.2, n.5, p.317-324, 1995.

JAKEMAN, D.L.; MITCHELL, D.J.; SHUTTLEWORTH, W.A.; et al. On the mechanism of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. **Biochemistry**, v.37, n.35, p.12012-12019, 1998.

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.

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.

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.

LEWIS, J.; JOHNSON, K.A.; ANDERSON, K.S. The catalytic mechanism of EPSP synthase revisited. **Biochemistry**, v.38, n.22, p.7372-7379, 1999.

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.

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.

RAMALHO, T.C.; CAETANO, M.S.; Da CUNHA, E.F.F.; et al. Construction and Assessment of Reaction Models of Class I EPSP Synthase: Molecular Docking and Density Functional Theoretical Calculations. **Journal of Biomolecular Structure & Dynamics**, v.27, n.2, p.195-207, 2009.

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.

RAMALHO, T.C.; Da CUNHA, E.F.F.; PEIXOTO, F.C.; et al. Computational NMR investigation of radiosensitizer in solution. **Journal of Theoretical & Computational Chemistry**, v.7, n.1, p.37-52, 2008.

ROBERTS, F.; ROBERTS, C.W.; JOHNSON, J.J.; et al. Evidence for the shikimate pathway in apicomplexan parasites. **Nature**, v.393, n.6687, p.801-805, 1998.

SAMMONS RD; GRUYS KJ; ANDERSON KS; et al. Reevaluating glyphosate as a transition-state inhibitor of EPSP synthase-identification of an EPSP synthase-center-dot-EPSP-center-dot-glyphosate ternary complex. **Biochemistry**, v.34, n. 19, p.6433-6440, 1995.

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**, v.98, n.4, p.1376-1386, 2001.A.

SHULTZ, A.; SOST, D.; AMRHEIN, N. Insensitivity of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase confers resistance to this herbicide in strain of *Aerobacter aerogenes*. **Archives Microbiology**, n.137, p.121-123, 1984.

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.

SOST, D.; AMRHEIN, N. Substitution of Gly-96 to Ala in the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of *Klebsiella-Pneumoniae* results in a greatly reduced affinity for the herbicide glyphosate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.282, n.2, p.433-436, 1990.

SPOEL, D. van der; LINDAHL, E.; HESS, B.; GROENHOF, G.; MARK, A.E.; BERENDSEN, H.J.C. GROMACS: fast, flexible and free. **Journal of Compounds Chemistry**, v.26, p.1701-1718, 2005.

STEINRUCKEN, H.C.; AMRHEIN, N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimic-acid 3-phosphate synthase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.94, n.4, p.1207-1212, 1980.

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.

THOMSEN, R.; CHRISTENSEN, M.H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. **Journal Medical Chemistry**, v.49, p.3315-3321, 2006.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho estudou a estabilidade de complexação entre glifosato e alguns metais divalentes e trivalentes presentes no solo. Nós notamos que complexos formados com cátions divalentes como zinco e cobre são mais estáveis que aqueles formados com cátions trivalentes. A ordem de estabilidade encontrada para os complexos foi Zn > Cu > Co > Fe > Cr > Al > Ca > Mg. A coordenação do metal com o nitrogênio do grupo amino do glifosato não é favorável.

As interações entre complexos e resíduos de aminoácidos foram analisadas através de estudos de docking. O metal zinco, apesar de ser o que forma o complexo mais estável quando em contato com o glifosato, não é o que interage mais intensamente com o sítio ativo da enzima. O complexo formado com o íon ferro mostrou melhor estabilização no sítio ativo da EPSP sintase, talvez devido ao fato de que este complexo tenha o mais alto número de interações com Lis22, o que nos leva a acreditar que seu ângulo diedro seja similar ao do glifosato. Além disso, este complexo faz também o maior número de ligações hidrogênio com o Gln171, o que parece ser de grande importância para estabilização dos complexos na enzima.

Neste trabalho, foi também analisado o modo de interação entre o glifosato e análogos com as enzimas EPSP sintase da *E. Coli*, nativa e mutante Gli96Ala. O glifosato tem uma interação melhor que os análogos na EPSP sintase, que é provavelmente devido a sua flexibilidade conformacional. Foi possível observar que o glifosato interage muito mais com a enzima nativa do que com a enzima mutante, o que está em concordância com resultados experimentais.

Encontramos que para a primeira etapa da reação da EPSP sintase o resíduo Glu341, provavelmente, atua como doador e o resíduo Lis22 atua como acceptor do próton. Para a segunda etapa da reação enzimática o resíduo Glu341

desprotonado na primeira etapa da reação provavelmente atua como resíduo de aminoácido aceptor do próton.

O EPSP cetal foi confirmado como produto secundário na reação e foi apontada uma possível rota para sua formação (rota II, Capítulo 3). Uma vez formado, o EPSP cetal pode reagir para formar o EPSP. Nossos cálculos estimam que a formação do EPSP a partir do EPSP cetal, não é energeticamente favorável.

Assim, nós acreditamos que este estudo possa ser útil no entendimento da estabilidade dos complexos formados entre o glifosato e alguns metais e no auxílio a elucidação do mecanismo de reação da enzima EPSP sintase e obtenção do 5-enolpiruvilchiquimato-3-fostato (EPSP).