



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



**DOCKING DE HERBICIDAS NA GLUTATIONA TRANSFERASE
TAU4-4 DE SOJA (*Glycine Max*)**

JOSIANE ENEVINA MENDES

São Carlos
2011

Josiane Enevina Mendes

**DOCKING DE HERBICIDAS NA GLUTATIONA TRANSFERASE
TAU4-4 DE SOJA (*Glycine Max*)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
da Universidade Federal de São Carlos para a
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Bolsa CAPES

Orientadores: Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector
Prof. Dr. Euclides Matheucci Junior

São Carlos
2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M538dh

Mendes, Josiane Enevina.

Docking de herbicidas na glutathione transferase tau4-4 de soja (*Glycine max*) / Josiane Enevina Mendes. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

104 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Biotecnologia. 2. Modelagem molecular. 3. Desintoxicação metabólica. I. Título.

CDD: 660.6 (20^a)

Josiane Enevina Mendes


Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 30/03/2011

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector (Orientador)
(DQ/UFSCar)



Prof. Dr. Carlos Alberto de Simone
(Universidade Federal de Alagoas-UFAL)



Prof. Dr. Gilberto Moraes
DGE/UFSCar

Dedicatória

*Dedico esta dissertação aos meus pais, **Josias Mendes Costa e Geralda Leite Mendes**, por todo amor, carinho e dedicação e por contribuírem para a realização desse sonho.*

Agradecimentos

Primeiramente a Deus pelo dom da vida, por ter me dado forças nos momentos de desânimo, de saudade da família e por me conceder a graça de concluir este sonho.

Aos meus pais por serem meus exemplos de vida, por acreditarem sempre em mim, me incentivarem e me amarem acima de tudo.

Aos meus irmãos, Lidiane e Diedson, pelos momentos de carinho, alegria, pelo apoio e por estarem sempre ao meu lado.

Ao querido prof. Dr. Julio Zukerman Schpector pela confiança, oportunidade, orientação, ensinamentos e amizade.

Ao prof. Euclides Matheucci Junior pela oportunidade, pela orientação e pela amizade.

Á querida prof^a. Dr^a. Ignez Caracelli pela amizade, pela co-orientação e pela generosidade.

Ao prof. Fernando M. A. Moreira pela amizade e pelo apoio durante este curso.

Ao meu namorado Fernando pela amizade, companheirismo, por me incentivar a lutar pelos meus sonhos e objetivos e por estar ao meu lado em todos os momentos.

Á minha madrinha Elza Barbosa pela amizade, por todo amor e carinho.

Á querida amiga Claudia Pastega pela amizade, paciência e pelo apoio durante o curso.

Aos meus queridos amigos do LaCreMM e BioMat: André, Denis, Felix, Josiane, Luis Nelson, Lucas, Natália, Paulo, Stella e Sergio Ricardo.

Aos meus queridos amigos de Rondonópolis: Albert, Célia, Luciane e João Acássio.

Aos meus queridos amigos de São Carlos: Ana Lúcia, Beatriz, Erika, Luisa, Marcelo e Mariana.

Á todos os professores e funcionários da PPG- Biotecnologia da UFSCar .

Á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

MENDES, J. E. **Docking de herbicidas na glutathione transferase TAU4-4 de soja (*Glycine Max*)**. 2011. 104f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

RESUMO

Este estudo, baseado em docking molecular, descreve a busca das conformações mais favoráveis para a formação dos complexos alvo-ligante com herbicidas utilizados no cultivo de soja e uma enzima envolvida no processo de desintoxicação, e baseado nestes resultados são propostas algumas diretrizes para o desenvolvimento de novos compostos. A proteína estudada foi a glutathione transferase Tau de soja, a *GmGSTU4-4*. Foram estudados 14 herbicidas: diclofope, fluazifope, cletodim, clomazona, diquate, paraquate, atrazina, diurom, bentazona, acifluorofem, fomesafem, sulfentrazone, clorimurrom e glifosato. A escolha dos herbicidas se baseou na lista daqueles que são utilizados na cultura da soja e estão registrados no Ministério da Agricultura e Abastecimento do Brasil. Foram obtidos os complexos *GmGSTU4-4*-herbicidas. O sítio de ligação analisado por visualização molecular mostra uma forma quase cilíndrica, aberta e exposta ao solvente e composto de dois sítios G e H. No sítio G foram observadas três moléculas de água que participam de interações moleculares com vários dos herbicidas estudados o que sugere que novos compostos poderiam ser desenvolvidos observando a necessidade da presença de grupos químicos capazes de interagir com a água, tanto como doadores como aceptores de ligações de hidrogênio. Os herbicidas maiores podem ocupar os sítio G e H e parecem ser mais promissores na atividade de desintoxicação.

Palavras-chave: Docking, Modelagem Molecular, herbicidas, glutathione transferase Tau.

MENDES, J. E. **Docking de herbicidas na glutathione transferase TAU4-4 de soja (*Glycine Max*)**. 2011. 104f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

ABSTRACT

This study, based on molecular docking, describes the search for the most favorable conformations when complexes between herbicides, used in soybean cultivation, and an enzyme involved in the detoxification process are formed and based on these results some guidelines for the developing of new compounds are proposed. The glutathione transferase Tau, *GmGSTU4-4*, from soybean was the target protein, and diclofop, fluazifop, Clethodim, clomazone, diquat, paraquat, atrazine, diuron, bentazone, acifluorofem, fomesafem, sulfentrazone, glyphosate and clorimurom, the 14 herbicides studied. These last ones were chosen based on the list of those that are used in soybean crops and are registered with the Ministry of Agriculture and Supply of Brasil. For all of them the *GmGSTU4-4*-herbicide complexes were obtained. The protein binding site, analyzed by molecular visualization, presents an almost cylindrical shape, open and exposed to the solvent and is composed of two sites G and H. Three water molecules were observed in the G-site in that participate in molecular interactions with several of the studied herbicides, This finding suggests that new compounds that could, and should, be developed need to have in their structure chemical groups capable of interacting with the water, both as donors and acceptors of hydrogen bonds. Another interesting finding was that the largest herbicides may occupy both the G and H sites, and seem to be most promising in the activity of detoxification.

Keywords: Docking, Molecular Modeling, herbicides, glutathione transferase Tau.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

a.C.	Antes de Cristo
ACCase	Acetil coenzima A carboxilase
AG	Algoritmo genético
ALS	Acetolactato sintase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CSD	Cambridge Structural Database
DDT	1,1,1-tricloro-2,2-bis-(p-clorofenil) etano
DHAR	Deidroascorbato redutase
DS Visualizer 2.5	Discovery Studio Visualizer 2.5.5.
DNA	Ácido desoxirribonucléico
hGSH	Homoglutationa - γ -glutamil-cisteinil- β -alanina
E.C.	Enzyme Class
EPSPS	Enol-piruvil-shiquimato-fosfato sintase
FSI	Fotossistema I
FSII	Fotossistema II
GOLD 4.1.1	Genetic Optimization for Ligand Docking
GSH	Tripeptídeo glutationa
GST	Glutationa transferase
kDa	kiloDalton
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
IPP	Isopentyl pirophosphato isomerase
PDB	Protein Data Bank
NBD-Cl	7-cloro-4-nitrobenzeno-2-oxa-1,3-diazol
Nb-GSH (GTB)	<i>S</i> -(<i>p</i> -nitrobenzil)-glutationa
PDB	Protein Data Bank
PROTOX	Protoporfirinogenio oxidase
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
USA	United States of America

LISTA DE AMINOÁCIDOS

Glu, E	Ácido glutâmico
Arg, R	Arginina
Cys, C	Cisteína
Phe, F	Fenilalanina
Gly, G	Glicina
Ile, I	Isoleucina
Leu, L	Leucina
Lys, K	Lisina
Pro, P	Prolina
Ser, S	Serina
Tyr, Y	Tirosina
Trp, W	Triptofano

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1 – Introdução

Figura 1. 1 Produção de soja - Brasil e principais estados produtores - 1998 a 2000, 2001 a 2003 e 2004 a 2006 (Adaptado de IBGE, 2006).	23
Figura 1. 2 Árvore filogenética que ilustra a diversidade das GST e as relações entre as classes (Adaptado de DIXON et al., 2002b).	26
Figura 1. 3 A cadeia comum da superfamília GST, em verde (Adaptado de BOARD et al., 2000).	29
Figura 1. 4 Desintoxicação de xenobióticos e metabolismo de endógenos através de GST nas plantas (Adaptado de DIXON et al., 1998).	34
Figura 1. 5 Mecanismo de ação dos herbicidas (Adaptado de GAZZIERO et al., 2000).	35
Figura 1. 6 Classificação dos Herbicidas em função do mecanismo de ação (Adaptado de GAZZIERO et al., 2000).	36
Figura 1. 7 Fórmula estrutural do herbicida Diclofop (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).	37
Figura 1. 8 Fórmula estrutural do herbicida Fluazifop (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).	37
Figura 1. 9 Fórmula estrutural do herbicida Cletodim (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).	38
Figura 1. 10 Fórmula estrutural do herbicida Clomazona (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).	39
Figura 1. 11 Fórmula estrutural do herbicida Diquate (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).	40
Figura 1. 12 Fórmula estrutural do herbicida Paraquate (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).	40
Figura 1. 13 Fórmula estrutural do herbicida Atrazina (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).	41
Figura 1. 14 Fórmula estrutural do herbicida Diuron (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).	42
Figura 1. 15 Fórmula estrutural do herbicida Bentazona (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).	42
Figura 1. 16 Fórmula estrutural do herbicida Acifluorfen (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).	43
Figura 1. 17 Fórmula estrutural do herbicida Fomesafen (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).	44
Figura 1. 18 Fórmula estrutural do herbicida Sulfentrazone (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).	45
Figura 1. 19 Fórmula estrutural do herbicida Clorimuron (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).	45
Figura 1. 20 Fórmula estrutural do herbicida glifosato (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).	46
Figura 1. 21 Docking molecular. Formação do complexo receptor-ligante.	47
Figura 1. 22 Representação esquemática de um AG básico (Adaptado de MIRANDA, 2000).	48

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

- Figura 2. 1** Fluxograma das etapas de execução do estudo de docking. 50
- Figura 2. 2** Estrutura tridimensional da glutatona transferase (2vo4) complexada com o inibidor *S*-(*p*-nitrobenzil)-glutaciona (Nb-GSH) – (GTB) no sítio ativo. 51
- Figura 2. 3** Estrutura tridimensional do clorimuirom (Código CSD: YOCVOC) que foi utilizada para modelagem dos ligantes, com exceção do diquate, paraquate e atrazina. 52
- Figura 2. 4** Estruturas dos ligantes após modelagem, com exceção do diquate, paraquate e atrazina, utilizados nos cálculos de docking. 53
- Figura 2. 5** Redocking ou validação da metodologia. Observa-se primeiro o complexo extraído do PDB, depois separa-se o receptor GST e o ligante GTB. Finalmente o complexo obtido com os cálculos de docking, simmilar ao complexo cristalográfico. 54

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

- Figura 3. 1**Ligante *S*-(*p*-nitrobenzil)-glutaciona (Nb-GSH) - (GTB) utilizado na validação dos parâmetros escolhidos para os cálculos de docking. 55
- Figura 3. 2** Resultados da validação dos cálculos de docking com o ligante flexível. Em *stick*, e em dourado, a molécula *S*-(*p*-nitrobenzil)-glutaciona (Nb-GSH) - (GTB) cristalográfica obtida no PDB, em *ball and stick*, e em cinza, o resultado do redocking. 56
- Figura 3. 3** Interações entre o inibidor *S*-(*p*-nitrobenzil)-glutaciona (Nb-GSH) - (GTB) e a glutatona transferase. Os nomes dos aminoácidos estão representados em cores conforme o sítio característico de ligação; em vermelho o sítio H e em verde o sítio G. Também estão representadas as moléculas de água (W1, W2 e W3). Para facilitar a visualização, são mostrados apenas alguns dos átomos de H. 56
- Figura 3. 4** Sítio ativo da enzima glutatona transferase mostrando a cavidade rasa de forma aproximadamente cilíndrica onde se deposita o ligante GTB. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3. 58
- Figura 3. 5** GSH no sítio ativo da enzima glutatona transferase. Nem todos os aminoácidos que interagem são apresentados para facilitar a visualização. 59
- Figura 3. 6** Orientação do composto (**R**) - diclofope na *GmGSTU4-4*. Figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de águas representadas como W1, W2 e W3. Em tracejado preto as ligações de H com as moléculas de água W1 e W3. 61
- Figura 3. 7** Orientação do enantiômero do composto (**S**) - Diclofope no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3. Em tracejado preto a ligação de H com a molécula de água W2. 62
- Figura 3. 8** Orientação do composto (**R**) - Fluazifope no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3. Em tracejado preto as ligações de H com a molécula de água W2. 63

- Figura 3. 9** Orientação do enantiômero do composto (S) - Fluazifope no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3. Em tracejado preto as ligações de H com a molécula de água W2. 64
- Figura 3. 10** Orientação do composto Cletodim no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3. 65
- Figura 3. 11** Orientação do composto Clomazona, no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3. 66
- Figura 3. 12** Orientação do composto Diquate no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3. 66
- Figura 3. 13** Orientação do composto Paraquate no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3. 67
- Figura 3. 14** Orientação do composto Atrazina no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3. 68
- Figura 3. 15** Orientação do composto 8 - Diurom no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3. Em tracejado preto a ligação de H com a molécula de água W3. 69
- Figura 3. 16** Orientação do composto 9 - Bentazona no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3. 70
- Figura 3. 17** Orientação do composto Acifluorfem no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3. Em tracejado preto a ligação de H com a molécula de água W1. 71
- Figura 3. 18** Orientação do composto 11 - Fomesafem no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3. Em tracejado preto as ligações de H com as moléculas de água W1 e W3. 72
- Figura 3. 19** Orientação do composto Sulfentrazona no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3. 73
- Figura 3. 20** Orientação do composto 13 - Clorimuron no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3. Em tracejado preto a ligação de H com a molécula de água W3. 74
- Figura 3. 21** Orientação do composto 14 - Glifosato no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3. Em tracejado preto a ligação de H com a molécula de água W1. 75

Figura 3. 22 Herbicidas com comportamento diferente dos ligantes GSH e GTB.	77
Figura 3. 23 Sobreposição do ligante Fluazifope, enantiômero R (verde) e enantiômero S (azul).	77
Figura 3. 24 Sobreposição do ligante Diclofope, enantiômero R (cinza) e enantiômero S (azul).	78

Apêndice do Capítulo – 3

Figura 3 A1.a Algumas interações entre a molécula (R) - diclofope no sítio de ligação da glutaciona <i>GmGSTU4-4</i> .	89
Figura 3 A1.b Algumas das ligações do Composto (S) - Diclofope complexado com a <i>GmGSTU4-4</i> .	90
Figura 3 A2.a (R) - Fluazifope no sítio <i>GmGSTU4-4</i> . São apresentadas algumas interações do composto 2 em linha tracejada preta.	91
Figura 3 A2.b (S) - Fluazifope no sítio <i>GmGSTU4-4</i> . São representadas algumas interações do composto 2 em linha tracejada preta e também algumas interações com a molécula de água W2.	92
Figura 3. A.3 Algumas interações do composto Cletodim com os resíduos da <i>GmGSTU4-4</i> em linha tracejada preta.	93
Figura 3. A.4 Composto Clomazona complexado com a <i>GmGSTU4-4</i> . Algumas interações do composto com os resíduos da enzima em linha tracejada preta. O centróide está representado em verde mostrando a interação C-H... π entre o composto e o resíduo Leu216.	94
Figura 3. A.5 Ligante Diquate e as interações com os resíduos da <i>GmGSTU4-4</i> em linha tracejada preta.	95
Figura 3. A.6 Paraquate e algumas interações com os resíduos da <i>GmGSTU4-4</i> em linha tracejada preta.	96
Figura 3. A.7 Composto Atrazina complexado com a <i>GmGSTU4-4</i> . Algumas interações do composto com os resíduos da enzima em linha tracejada preta.	97
Figura 3. A.8 Composto Diurom complexado com a <i>GmGSTU4-4</i> . Algumas interações do composto com os resíduos da enzima e com a molécula de água W3 em linha tracejada preta.	98
Figura 3. A.9 Composto Bentazona complexado com a <i>GmGSTU4-4</i> . Algumas interações do composto com os resíduos da enzima tracejada preta.	99
Figura 3. A.10 Composto Acifluorfem complexado com a <i>GmGSTU4-4</i> . Algumas interações do composto com os resíduos da enzima e a molécula de água W1 em linha tracejada preta. Em verde os centróides mostrando uma interação π ... π entre o anel da Phe15 e o anel do ligante.	100
Figura 3. A.11 Composto Fomesafem complexado com a <i>GmGSTU4-4</i> . Algumas interações do composto com os resíduos da enzima e com as moléculas de água W1 e W3 em linha tracejada preta.	101
Figura 3. A.12 Composto Sulfentrazone complexado com a <i>GmGSTU4-4</i> . Algumas interações do composto 12 com os resíduos da enzima em linha tracejada preta.	102
Figura 3. A.13 Composto Clorimurrom complexado com a <i>GmGSTU4-4</i> . Algumas interações do composto 13 com os resíduos da enzima e a água W3 em linha tracejada preta.	103
Figura 3. A.14 Composto Glifosato complexado com a <i>GmGSTU4-4</i> . Algumas interações do composto 14 com os resíduos da enzima em linha tracejada preta.	104

LISTA DE TABELAS

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

Tabela 3. 1 Interações entre o inibidor S-(p-nitrobenzil)-glutaciona (Nb-GSH) - (GTB) e a glutaciona transferase destacando as regiões do sítio G (em verde) e do sítio H (em rosa)	57
Tabela 3. 2 Valores de escore (kcal/mol) dos compostos 1 a 14 em complexo com a <i>GmGSTU4-4</i>	60
Tabela 3. Interações dos herbicidas com os resíduos de aminoácido <i>GmGSTU4-4</i>	76

Apêndice do Capítulo 3 – Resultados e Discussão

Tabela 3 A.1.a Principais interações entre os resíduos de <i>GmGSTU4-4</i> e os átomos da orientação selecionada do composto (R) - Diclofope	89
Tabela 3 A.1.b Principais interações entre os resíduos de <i>GmGSTU4-4</i> e os átomos da orientação selecionada do composto (S) - Diclofope	90
Tabela 3 A.2.a Principais interações entre os resíduos de <i>GmGSTU4-4</i> e os átomos da orientação selecionada do (R) -Fluazifope	91
Tabela 3 A.2.b Principais interações entre os resíduos de <i>GmGSTU4-4</i> e os átomos da orientação selecionada do enatiômero composto (S) - Fluazifope	92
Tabela 3 A.3 Principais interações entre <i>GmGSTU4-4</i> e os átomos da orientação selecionada do composto Cletodim	93
Tabela 3 A.4 Principais interações entre os resíduos de <i>GmGSTU4-4</i> e os átomos da orientação selecionada do composto Clomazona	94
Tabela 3 A.5 Principais interações entre os resíduos de <i>GmGSTU4-4</i> e os átomos da orientação selecionada do composto Diquate	95
Tabela 3 A.6 Principais interações entre os resíduos de <i>GmGSTU4-4</i> e os átomos da orientação selecionada do composto Paraquate	96
Tabela 3 A.7 Principais interações entre os resíduos de <i>GmGSTU4-4</i> e os átomos da orientação selecionada do composto atrazina	97
Tabela 3 A.8 Principais interações entre os resíduos de <i>GmGSTU4-4</i> e os átomos da orientação selecionada do composto Diurom	98
Tabela 3 A.9 Principais interações entre os resíduos de <i>GmGSTU4-4</i> e os átomos da orientação selecionada do composto Bentazona	99
Tabela 3 A.10 Principais interações entre os resíduos de <i>GmGSTU4-4</i> e os átomos da orientação selecionada do composto Acifluorfem	100
Tabela 3 A.11 Principais interações entre os resíduos de <i>GmGSTU4-4</i> e os átomos da orientação selecionada do composto Fomesafem	101
Tabela 3 A.12 Principais interações entre os resíduos de <i>GmGSTU4-4</i> e os átomos da orientação selecionada do composto Sulfentrazona	102
Tabela 3 A.13 Principais interações entre os resíduos de <i>GmGSTU4-4</i> e os átomos da orientação selecionada do composto Clorimurom	103
Tabela 3 A.14 Principais interações entre os resíduos de <i>GmGSTU4-4</i> e os átomos da orientação selecionada do composto Glifosato	104

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	20
1.1 INTRODUÇÃO.....	21
1.2 A enzima glutaciona transferase.....	22
1.2.1 Origem e evolução da cultura da soja (<i>Glycine max</i>).....	22
1.2.2 A superfamília das glutacionas transferases.....	24
1.2.3 Classes da Glutaciona Transferase	25
1.2.4 Glutaciona transferase de plantas.....	29
1.2.5 Tolerância a herbicidas	31
1.2.5.1 O metabolismo de herbicidas nas plantas.....	33
1.2.6 Utilizações dos herbicidas	34
1.2.6.1 Diclofope (C ₁₅ H ₁₂ Cl ₂ O ₄).....	36
1.2.6.2 Fluazifope (C ₁₅ H ₁₂ F ₃ NO ₄).....	37
1.2.6.3 Cletodim (C ₁₇ H ₂₆ ClNO ₃ S)	38
1.2.6.4 Clomazona (C ₁₂ H ₁₄ ClNO ₂).....	38
1.2.6.5 Diquate (C ₁₂ H ₁₂ N ₂).....	39
1.2.6.6 Paraquate (C ₁₂ H ₁₄ N ₂)	40
1.2.6.7 Atrazina (C ₈ H ₁₄ ClN ₅)	41
1.2.6.8 Diurom (C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O).....	41
1.2.6.9 Bentazona (C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₃ S)	42
1.2.6.10 Acifluorfem (C ₁₄ H ₇ ClF ₃ NO ₅).....	43
1.2.6.11 Fomesafem (C ₁₅ H ₁₀ ClF ₃ N ₂ O ₆ S).....	43
1.2.6.12 Sulfentrazona (C ₁₁ H ₁₀ Cl ₂ F ₂ N ₄ O ₃ S)	44
1.2.6.13 Clorimurom (C ₁₃ H ₁₁ ClN ₄ O ₆ S).....	45
1.2.6.14 Glifosato (C ₃ H ₈ NO ₅ P).....	46

1.3 Docking molecular	46
1.3.1 Algoritmo genético (AG) e o programa GOLD	47
1.4 Objetivos	49
1.4.1 Objetivo geral	49
1.4.2 Objetivos específicos	49
2 MATERIAIS E MÉTODOS	50
2.1 Obtenção da estrutura tridimensional da Glutathione Transferase	51
2.2 Modelagem molecular dos herbicidas	52
2.3 Redocking ou validação da metodologia	53
2.4 Realização dos cálculos de docking	54
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
3.1 Ligantes cristalográficos e a enzima Glutathione Transferase	55
3.1.a Ligante S-(p-nitrobenzil)-glutathione (GTB) e Redocking	55
3.1.b Ligante glutathione GSH	58
3.2 Estudos de docking dos compostos (herbicidas)	59
3.2.1.a Composto 1 (R) - Diclofop	61
3.2.1.b Composto 1 (S) - Diclofop	61
3.2.2.a Composto 2 – Fluazifop(R)	62
3.2.2.b Composto 2 (S) -Fluazifop	63
3.2.3 Composto 3 - Cletodim	64
3.2.4 Composto 4 - Clomazona	65
3.2.5 Composto 5 - Diquate	66
3.2.6 Composto 6 - Paraquate	67
3.2.7 Composto 7 - Atrazina	67
3.2.8 Composto 8 - Diuron	68

3.2.9 Composto 9 - Bentazona	69
3.2.10 Composto 10 - Acifluorfem	70
3.2.11 Composto 11 - Fomesafem	71
3.2.12 Composto 12 - Sulfentrazone	72
3.2.13 Composto 13 - Clorimurrom	73
3.2.14 Composto 14 - Glifosato	74
3.3 Considerações e comparações sobre o posicionamento dos ligantes	75
4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	79
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
APÊNDICE DO CAPÍTULO 3	89

Apresentação

Este trabalho apresenta o estudo da formação de complexos entre herbicidas e a enzima glutathione transferase da classe Tau, GSTU4-4, de soja, que atua na metabolização de xenobióticos.

Os ligantes estudados foram os herbicidas diclofope, fluazifope, cletodim, clomazona, diquate, paraquate, atrazina, diurom, bentazona, acifluorofem, fomesafem, sulfentrazone, clorimurrom e glifosato que são utilizados na cultura da soja e estão registrados no Ministério da Agricultura e Abastecimento.

Estudos de docking e intenso trabalho de visualização molecular foram realizados para avaliar a interação dos herbicidas com a enzima.

O Capítulo 1 apresenta uma introdução ao problema, uma descrição da enzima, mostrando sua forma de atuar e a importância de aminoácidos que participam das interações tanto do ponto de vista bioquímico como da evolução. Também há uma descrição dos ligantes. Ao final é apresentada uma breve descrição da simulação computacional por docking molecular. O Capítulo 2 contempla os materiais e métodos, onde há uma descrição dos receptores, dos ligantes estudados, e do método de simulação, o docking molecular, e a importância da visualização molecular para a avaliação das interações moleculares. No Capítulo 3, são apresentados e discutidos os resultados dos cálculos e análises de docking, com ênfase na avaliação de modo de ligação dos compostos a enzima. Este capítulo contém um apêndice onde estão organizadas as tabelas de interações e figuras dos complexos resultantes da análise auxiliada por visualização molecular. Optou-se por adotar os apêndices devido ao grande número de informações (número de complexos analisados e interações intermoleculares gerados). No Capítulo 4, são apresentadas as conclusões e perspectivas do trabalho e no Capítulo 5, as referências.

Capítulo 1 – Introdução

1 INTRODUÇÃO

A soja produzida no Brasil tornou-se uma das culturas com maior lucratividade na agricultura nacional. Devido sua facilidade de adaptação ao clima e a topografia, essa cultura de difundiu por quase todos os estados brasileiros, sendo produzida desde as regiões subtropicais até o cerrado. A cada nova safra essa cultura também incorpora novas tecnologias que permitem ampliar a produtividade e proporcionar novos aproveitamentos ao grão (VENCATO et al., 2005).

A busca por maior produtividade esbarra na interferência das plantas daninhas, as quais tendem aumentar o custo de produção devido ser necessário a utilização de herbicidas para o controle das mesmas (RODRIGUES e PITELLI, 1994). No entanto, os herbicidas também podem provocar danos nas plantas cultivadas, geralmente devido ao emprego de doses excessivas, uso de herbicidas não adequados, sobreposição de faixas de aplicação, aplicações não uniformes ou uso de equipamentos mal regulados. Além disso, a cultura pode ser afetada por resíduos de herbicidas aplicados na cultura anterior, cujos efeitos são mais frequentes em solos leves, com baixo teor de matéria orgânica, e quando as condições climáticas anteriores foram de períodos secos prolongados (ROMAN, 2000).

Para inativar os efeitos tóxicos de herbicidas as plantas possuem diferentes sistemas de defesa (BOR, ÖZDEMIR, TÜRKAN, 2003), permitindo a elas adaptarem-se para minimizar os danos, que podem ocorrer pela ação dos herbicidas (RADETSKI, COTELLE, FÉRAD, 2000). As glutionas transferases (GST) são consideradas parte de uma rota coordenada de desintoxicação de compostos exógenos e nas plantas são responsáveis pelo metabolismo de um amplo número de herbicidas comercialmente importantes (EDWARDS e DIXON, 2000).

Na soja, o tripeptídeo glutationa (GSH) é substituído pela homoglutationa (γ -glutamil-cisteinil- β -alanina, hGSH), sendo assim, é possível que diversos herbicidas sejam metabolizados nessa espécie (BREAUX, PANTANELLA, SANDERS, 1987). Devido ocorrer rápida conjugação dos herbicidas, a hGSH protege as plantas de soja da intoxicação e permite que esses compostos sejam usados no controle seletivo de plantas daninhas nessa cultura (OWEN, 2000).

Apesar de sua importância no metabolismo de herbicidas, relativamente pouco se tem estudado sobre as GST atuantes no metabolismo desses compostos xenobióticos (xenos = estranho) em plantas de soja (ANDREWS et al., 2005). Sendo assim, devido à importância da soja para a agricultura e economia brasileira, há necessidade de se realizar estudos sistemáticos relacionados à desintoxicação de herbicidas via as enzimas GST.

1.1 A enzima glutathione transferase

1.1.1 Origem e evolução da cultura da soja (*Glycine max*)

A soja pertence à ordem Rosaceae, da família Leguminosae ou Fabaceae, do gênero *Glycine* e da espécie *Glycine max* (APARICIO et al., 2008). A soja tem sido utilizada em países asiáticos por muitos séculos para preparar uma grande variedade de alimentos (BURTON, 1997).

Na década de 70 o pesquisador Hymowitz, baseado em evidências históricas e geográficas, concluiu que a soja foi domesticada cerca de 2.000 a.C. nas regiões norte e central da China (BURTON, 1997). Com o avanço da domesticação da soja, essa cultura foi levada para outras regiões devido ao aumento da sua importância na alimentação humana e nas transações comerciais entre os povos orientais (BONETTI, 1977).

No continente europeu a soja foi introduzida em 1712 por um botânico alemão, Engelbert Kaempfer. Posteriormente, Carl von Linné, deu o nome genético a soja, *Glycine Max* (APARICIO et al., 2008). No entanto, devido ao clima e as condições do solo, a produção de soja tem sido limitada na Europa (EMBRAPA SOJA, 2004).

Na América a soja foi introduzida em 1765 por Samuel Bowen nas colônias americanas (HYMOWITZ e HARLAN, 1983), sendo que nos USA a soja foi considerada uma promissora planta forrageira e produtora de grãos, porém o seu cultivo somente foi recomendado em 1880, quando foi reconhecido seu potencial agrônomico. A soja começou a ser explorada comercialmente somente no século XX. Em 1930, ocorreu a grande expansão como cultura produtora de grãos (BONETTI, 1977).

No Brasil, a soja foi introduzida pelo professor da Escola de Agronomia da Bahia Gustavo Dutra no ano de 1882. Em 1892 a soja foi cultivada pela primeira vez no Instituto Agrônomico de Campinas (IAC), contudo os melhores resultados começaram a surgir com os imigrantes japoneses em 1908 e, posteriormente, em 1923 quando Henrique Lobbe introduziu

cerca de 50 variedades trazidas dos USA, desse modo, as pesquisas com essa planta se intensificaram (MIYASAKA e MEDINA, 1981) e mais de 80% do volume produzido na época ainda se concentrava nos estados da Região Sul do Brasil.

Nas décadas de 80 e 90 a região centro-oeste do Brasil foi tomada por essa cultura, assim como ocorreu na região sul. Em 1970, apenas 2% da produção nacional de soja era colhida no centro-oeste. Em 1980, esse percentual passou para 20%, em 1990 já era superior a 40% e em 2003 em torno dos 60%, ocupando assim maior espaço no cenário agrícola a cada safra. Essa transformação promoveu o Estado do Mato Grosso à líder nacional de produção e de produtividade de soja (Figura 1.1) (EMBRAPA SOJA, 2004).

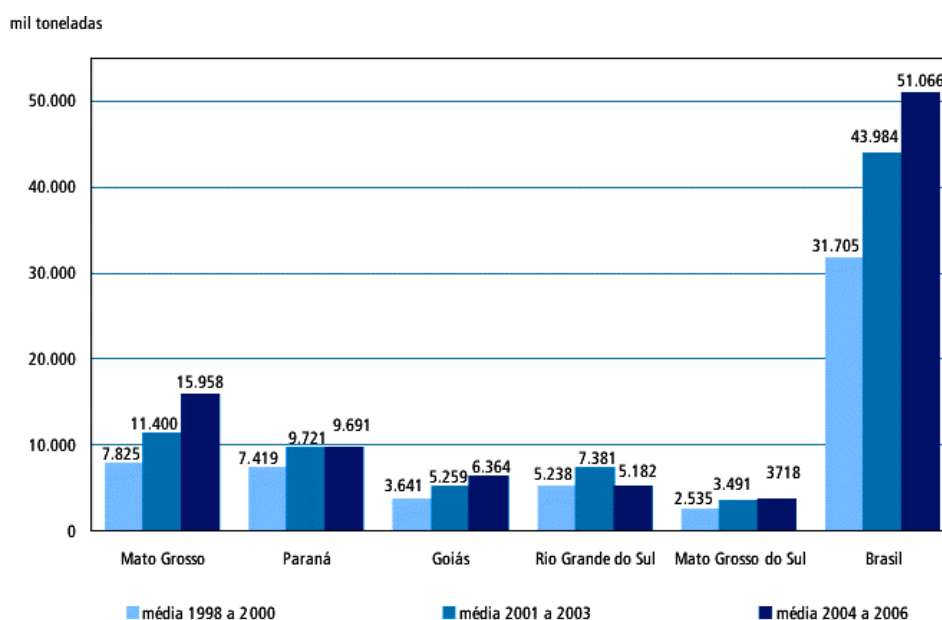


Figura 1.1 Produção de soja - Brasil e principais estados produtores - 1998 a 2000, 2001 a 2003 e 2004 a 2006 (Adaptado de IBGE, 2006).

Recentemente, a soja também vem ganhando destaque como fonte alternativa de combustível, mesmo apresentando um dos menores teores de óleo, juntamente com o algodão (19% e 15%, respectivamente), ainda assim essas duas culturas serão as principais fornecedoras do óleo necessário para a produção do biodiesel clássico e do H-bio. O H-bio é um novo processo de produção de óleo diesel desenvolvido pela Petrobras. Consiste em misturar óleo vegetal ao óleo mineral nas refinarias, obtendo-se assim um diesel de melhor qualidade. O processo inclui a adição de hidrogênio na composição do combustível, o que reduz drasticamente o teor de enxofre que será emitido no meio ambiente (REETZ et al., 2006).

Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo com aproximadamente 23 milhões de hectares de área plantada e 65 milhões de toneladas de grãos colhidos. Nossa produção nacional perde apenas para os Estados Unidos, o maior produtor de soja do mundo com 91 milhões de toneladas colhidas na safra 2009/10 (USDA, 2010). Desse modo, com esses números apresentados acima podemos constatar que a importância econômica e social da soja é indiscutível tanto no mercado nacional como no internacional.

1.1.2 A superfamília das glutathionas transferases

No presente trabalho, a enzima selecionada para o estudo foi a glutathion transferase por sua habilidade de inativar compostos tóxicos, como herbicidas, inseticidas e outras drogas sintéticas (MARRS, 1996).

As glutathionas transferases (GST, E.C. 2.5.1.18, anteriormente chamadas de glutathionas-S-transferases) (AXARLI et al., 2009a) fazem parte de uma superfamília de proteínas catalíticas, que estão distribuídas em uma extensa diversidade de organismos aeróbicos, desde bactérias até humanos (FROVA, 2003). As GSTs são solúveis, hidrofóbicas, predominantemente citossólicas, com peso molecular de cerca de 50 kDa, constituída de heterodímeros ou homodímeros com subunidades de 26 kDa e possuem um ponto isoeletrico entre 4 e 5 (DIXON, COLE, EDWARDS, 1999; SOMMER E BÖGER, 1999). Cada subunidade da estrutura dimérica apresenta um sítio ativo com cinética independente (DANIELSON e MANNERVIK, 1985).

As GST possuem dois sítios de ligação e são eles: o sítio de ligação, denominado sítio G, específico para o tripeptídeo GSH e o sítio adjacente, sítio H. A GSH é um tripeptídeo constituído por três aminoácidos: ácido glutâmico, cisteína e glicina. O sítio G possui uma alta especificidade, está localizado mais próximo ao N-terminal da proteína, e apresenta uma sequência conservada de aminoácidos. Devido à alta especificidade deste sítio apenas a GSH e moléculas estruturalmente relacionadas servem como substrato. Já o sítio de ligação H, um bolso hidrofóbico, é mais amplo e localiza-se mais próximo ao C-terminal (MARRS, 1996). Geralmente, é nessa região que se ligam os xenobióticos, por exemplo, os herbicidas, ou compostos tóxicos endógenos (H₂O₂) (NEUEFEIND et al., 1997a; REINEMER et al., 1996).

Em geral, todas as estruturas das GST são formadas por dois domínios, a região N-terminal composta por três α -hélices e quatro fitas β e a região C-terminal composta somente por α -hélices (geralmente de quatro a cinco hélices) (FAVALORO et al., 1998).

A conjugação da GSH pela GST aumenta outras solubilizações e facilita as transformações metabólicas de forma que são rapidamente excretados (HAYES, FLANAGAN, JOWSEY, 2005). Sendo assim, as GST têm papel importante na desintoxicação de compostos xenobióticos e também protegem contra o estresse oxidativo (AXARLI, RIGDEN, LABROU, 2004; DIXON et al., 2008).

As GST são encontradas em todos os organismos aeróbicos. Em humanos e em outros mamíferos foram identificados 20 diferentes genes de GST (HAYES, FLANAGAN, JOWSEY, 2005), 60 diferentes genes em plantas (McGONIGLE et al., 2000; WAGNER et al., 2002; FROVA, 2003; SORANZO et al., 2004), 15 em bactérias (VUILLEUMIER e PAGNI, 2002) e mais de 10 diferentes genes em insetos (RANSON, COLLINS, HEMINGWAY, 1998).

As enzimas GST foram descobertas em 1961, através de estudos realizados em animais onde mostraram-se importantes no metabolismo de desintoxicação de drogas (BOOTH, BOYLAND, SIMS, 1961; COMBES e STAKELUM, 1961). A presença dessas enzimas em plantas foi detectada na década de 70, quando a atividade das GST de milho, mostrou ser responsável pela conjugação da glutationa (GSH) com o herbicida atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-esopropilamino-s-triazina); fator este que protege a planta dos efeitos nocivos do herbicida (FREAR e SWANSON, 1970). A desintoxicação da atrazina pela enzima GST é uma resposta primária no processo de desintoxicação de herbicidas pelas plantas (SHIMABUKURO, SWANSON, WALSH, 1970). Todavia, em distintos organismos, outras funções das GST já foram descritas, tais como: a tolerância ao estresse oxidativo (KAMPRANIS et al., 2000), aos inseticidas (RANSON, PRAPANTHADARA, HEMINGWAY, 1997), transporte de produtos secundários tóxicos (MUELLER et al., 2000), sinalização da célula durante as respostas ao estresse (LOYALL et al., 2000) e fenômenos de resistência envolvendo agentes de quimioterapia contra o câncer (McLELLAN e WOLF, 1999; TEW, 1994).

1.1.3 Classes da Glutathione Transferase

Ao longo dos últimos 30 anos um grande número de GST foram purificadas e classificadas por suas características bioquímicas e imunológicas (Figura 1.2) (WILCE e PARKER, 1994). Então, tendo como base vários critérios, incluindo a similaridade de sequência nucleotídeos/aminoácidos, estrutura física dos genes (número e posição de íntrons)

e propriedades imunorreativas, as GST foram agrupadas em numerosas classes. Algumas estão presentes em diversos táxons enquanto outras são consideradas organismo-específico (FROVA, 2006).

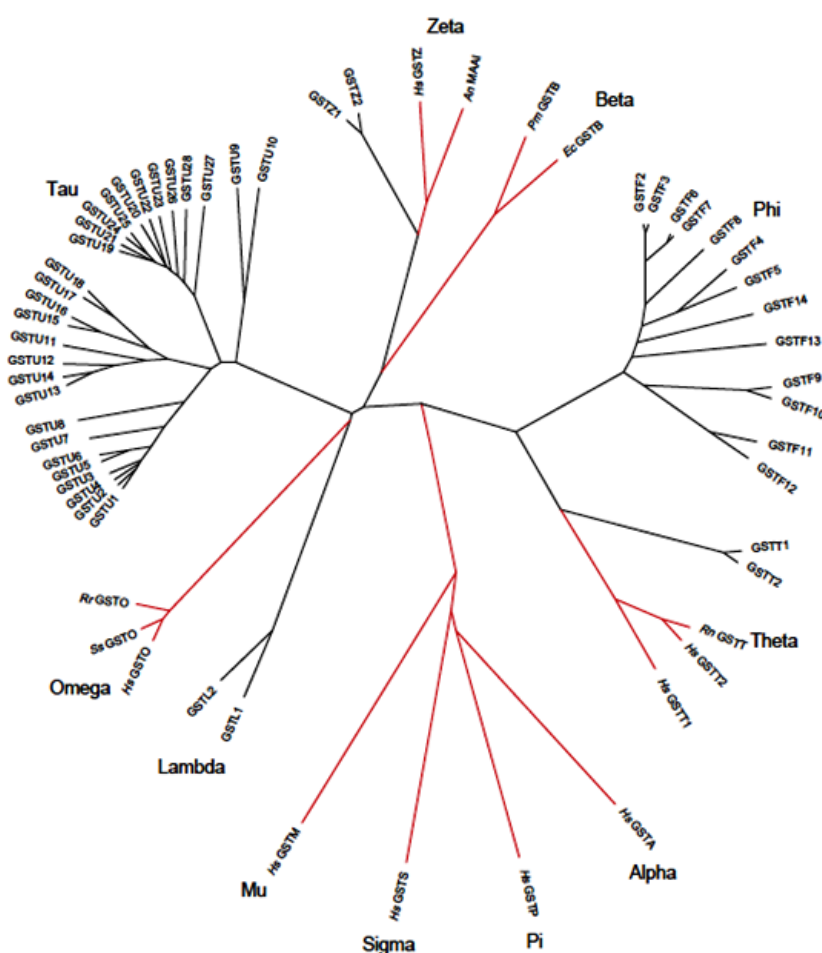


Figura 1.2 Árvore filogenética que ilustra a diversidade das GST e as relações entre as classes (Adaptado de DIXON, LAPHORN, EDWARDS, 2002b).

A superfamília da GST é subdividida em classes, e atualmente são reconhecidas sete classes em mamíferos, sendo Alpha, Mu, Pi específicas e Sigma, Theta, Zeta e Omega, que também são consideradas comuns a outros táxons. Nas plantas são encontradas seis classes, sendo Lambda, Phi, Tau e DHAR (deidroascorbato redutase) consideradas específicas e Theta e Zeta comuns em outros táxons. Em insetos foram reconhecidas cinco classes, Delta (específica), Sigma, Theta, Zeta e Omega. Em bactérias, a classe específica é a Beta, e a classe Theta é considerada comum em relação a outros táxons (FROVA, 2006).

Nos mamíferos, a tirosina (Tyr) é o resíduo que é conservado no sítio ativo nas classes Alpha, Mu e Pi, já nas plantas o resíduo de aminoácido que é conservado é a serina (Ser), nas

classes Phi, Tau, Theta e Zeta. Esses aminoácidos conservados estão relacionados à conjugação do tripeptídeo glutationa (DIRR, REINEMER, HUBER, 1994).

A seguir serão descritas as principais características funcionais e estruturais das classes de GST.

As classes Alpha, Mu, Pi apresentam algumas semelhanças entre si (Figura 1.3), elas possuem um total de 26 resíduos conservados e uma identidade de sequência variável: Mu-Alpha de 20%, Mu-Pi de 30%, e Pi-Alfa de 32% (DIRR, REINEMER, HUBER, 1994; SHEEHAN et al., 2001). É possível verificar essa semelhança nas estruturas das enzimas principalmente no domínio N-terminal. A interação entre as subunidades do dímero é hidrofóbica e ocorre entre o domínio N-terminal de uma subunidade com o domínio C-terminal da outra subunidade (ARMSTRONG, 1997). Devido a presença de um resíduo aromático (Phe52 na classe Alpha, Phe56 na classe Mu e Tyr49 na classe Pi) é possível ocorrer essa interação hidrofóbica (SINNING et al, 1993).

Essas classes apresentam a tirosina (Tyr7) como resíduo responsável pela catálise da enzima, formando assim uma ligação de hidrogênio com a Cys da GSH. Porém, embora a região N-terminal seja bem conservada nas classes Alpha, Mu, Pi, o mesmo não ocorre na região C-terminal (DIRR, REINEMER, HUBER, 1994; SINNING et al., 1993). Essas três classes apresentam também algumas diferenças entre si, tais como: na classe Mu há presença de um “loop μ ” no domínio N-terminal entre a segunda folha β (beta-2) e a segunda α hélice (alfa-2) (JI et al., 1995), fator este que resulta numa cavidade mais profunda do que a encontrada na classe Pi da GST (WILCE e PARKER, 1994).

Na classe Alpha (Figura 1.3) no domínio C-terminal há presença de uma α -hélice extra, resultando assim num sítio hidrofóbico menor e mais estreito, quando comparado com o sítio das classes Mu e Pi (SINNING et al, 1993). A classe Alpha também possui uma atividade semelhante às das enzimas glutatônicas peroxidases (BOARD et al., 1997), que são responsáveis pela remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS), mais especificamente catalisam a reação do H_2O_2 em $2H_2O$ (SHEEHAN et al., 2001); apresentando também uma afinidade pelo substrato 7-cloro-4-nitrobenzeno-2-oxa-1,3-diazol (NBD-Cl) (BOARD, 2000). A classe Mu (Figura 1.3) tem afinidade pelo substrato CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno). A classe Pi, apresenta atividade de conjugação com a GSH, atividade de isomerase e contribui para a defesa do organismo contra o estresse oxidativo (SHEEHAN et al., 2001).

A classe Sigma (Figura 1.3) está presente em diversos organismos, tais como: no filo *Madibulata* (*Drosophila melanogaster*), no filo *Mollusca* (*Ommastrephes sloani*) e no filo

Platyhelminthes (*Schistosoma haematobium*) (TOMAREV, CHUNG, PIATIGORSKY, 1995). Essa classe apresenta características próprias, principalmente com relação à interface do dímero da GST (JI et al., 1995). Além disso, ela apresenta a GSH como cofator em suas reações e está relacionada ao mecanismo da prostaglandina-sintase (JOHNSON et al., 2003).

A classe Theta (Figura 1.3) está presente em mamíferos e plantas (*Arabidopsis*), apresentando uma serina (Ser12) ao invés de uma tirosina na região N-terminal, que é considerado um resíduo essencial para a catálise (BOARD et al., 1995; REINEMER et al., 1996; ROSSJOHN et al., 1998; WILCE et al., 1995). Esta classe apresenta especificidade única pelo substrato, pois ela não possui atividade com o CDNB, que é o substrato universal das GST (SHEEHAN et al., 2001). Nos seres humanos são identificados dois homodímeros distintos da classe Theta (GST T1-1 e GST T2-2) e essas duas subunidades apresentam cerca de 50% de similaridade de sequência de aminoácidos (PEMBLE et al., 1994; SCHRODER et al., 1996).

A classe Delta (Figura 1.3) é específica de insetos e está relacionada à resistência de inseticidas. Ela é responsável pela desintoxicação desses produtos, pois em muitos insetos a desidrocloração é catalisada pela GST, portanto, esse é o principal mecanismo responsável pela resistência do inseticida organoclorado 1,1,1-tricloro-2,2-bis-(p-clorofenil) etano (DDT sua sigla em inglês). Já a desintoxicação de inseticidas organofosforados ocorre através da conjugação com a GSH (SHEEHAN et al., 2001).

A classe Omega (Figura 1.3) é encontrada em diversas espécies de mamíferos. Em humanos essa classe (GSTO 1-1) é expressa na maioria dos tecidos e apresenta uma atividade tiol-transferase dependente da glutatona, além disso, ela catalisa a redução do dehidroascorbato. Essa classe possui uma extensão N-terminal diferente das GST, pois no sítio ativo há presença de uma cisteína (Cys) ao invés da tirosina (Tyr) ou serina (Ser) que estão presentes nas demais classes (BOARD et al., 2000).

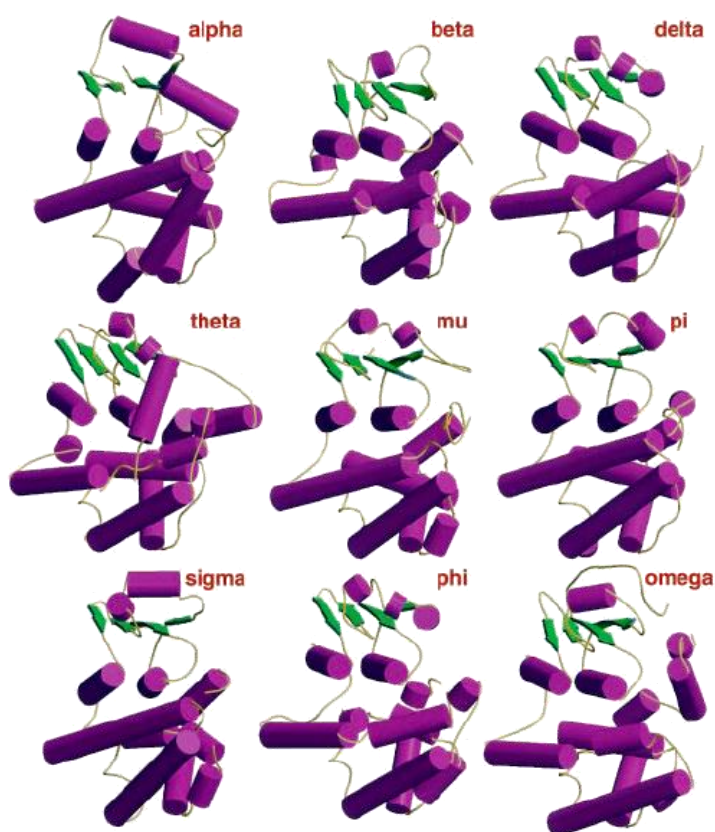


Figura 1.3 A cadeia comum da superfamília GST, em verde (Adaptado de BOARD et al., 2000).

1.1.4 Glutationa transferase de plantas

As GST têm sido caracterizadas na maioria das espécies de culturas e têm sido intensamente estudadas devido à sua importância na capacidade de conferir tolerância a herbicidas, uma forma de desintoxicação. Essas enzimas desempenham um papel importante na resposta celular de auxinas (fitohormônios que funcionam como reguladores do crescimento vegetal) e durante o metabolismo normal da planta, na produção de produtos secundários como antocianinas e o ácido cinâmico (AXARLI et al., 2009a) na estabilização de flavonóides (MARRS, 1996), além de atuarem como peroxidases na redução de hidroperóxidos a monohidroxi-álcool durante estresse oxidativo e no catabolismo de tirosina (DIXON, LAPHORN, EDWARDS, 2002b)

A primeira classificação das GST de plantas foi realizada em 1997 pelo pesquisador Frans Droog, posteriormente, essa classificação foi atualizada baseando-se na organização estrutural e sequência do gene (número e posição do íntron), similaridade da sequência de aminoácidos e conservação de resíduos específicos da proteína (EDWARDS, DIXON, WALBOT, 2000).

Sendo assim, as GST de plantas são agrupadas nas classes: Phi (GSTF), Tau (GSTU), Theta (GSTT), Zeta (GSTZ), Lambda (GSTL) e dehidroascorbato redutase (DHAR). A identidade de sequência entre as classes é, via de regra, menor que 30% e dentro das classes maior que 30% (DIXON, LAPTHORN, EDWARDS, 2002b).

De acordo com Thom et al. (2002) as GST de diferentes classes são capazes de desintoxicar pesticidas em diversas espécies. No entanto, a expressão das classes de GST presentes nas plantas é muito variável dependendo do tecido e das condições ambientais nas quais as plantas estão submetidas (SORANZO et al., 2004).

As GST da classe Tau são extremamente importantes, pois estão envolvidas na seletividade aos herbicidas (THOM et al., 2002), na sinalização intracelular e nas respostas hormonais (citocininas e auxinas) (EDWARDS, DIXON, WALBOT, 2000). Esta classe é a mais expressa nas culturas de soja e trigo, sendo responsável pela desintoxicação dos herbicidas, principalmente dos grupos químicos difenil-éteres e ariloxifenoxipropionatos (DIXON et al., 2003). Já os herbicidas dos grupos químicos cloroacetamida, ariloxifenoxipropionatos e sulfoniluréia são desintoxicados rapidamente através da conjugação com o tripeptídeo GSH (THOM et al., 2002).

A classe Phi está relacionada principalmente na desintoxicação de herbicidas (DIXON, LAPTHORN, EDWARDS, 2002b), e é predominante nas plantas de milho, representando mais do que 1% da proteína solúvel total (COLE, 1994), com a função fundamental de metabolizar os herbicidas dos grupos químicos cloroacetanilida, cloro-s-triazina e tiocarbamatos (EDWARDS e DIXON, 2000).

Ambas as classes, Phi e Tau, estão envolvidas na deposição do pigmento antocianina no vacúolo celular (MUELLER et al., 2000). A classe Phi possui 4 isoformas conhecidas e são elas: *GST-I* (*GSTF1*), *GST-II* (*GSTF2*), *GST-III* (*GSTF3*) e *GST-IV* (*GSTF4*). As isoformas *GST-I* e *GST-III* são expressas constitutivamente, já as *GST-II* e *GST-IV* são induzidas por herbicidas *safeners* (NEUEFEIND et al., 1997b).

Os herbicidas *safeners* são compostos químicos que aumentam a seletividade entre os cultivares e as plantas daninhas, e a fitotoxicidade dos herbicidas para as culturas podem ser significativamente reduzidas com a utilização dos *safeners*. As bases bioquímicas da atuação dos *safeners* referem-se a sua habilidade de acelerar a desintoxicação metabólica dos herbicidas a partir de plantas tratadas (GATZ, 1997).

A classe Zeta está envolvida no catabolismo da tirosina através de uma atividade similar à maleilacetoacetato isomerase (DIXON, DAVIS, EDWARDS, 2002a), apresentando também atividade semelhante a glutationala peroxidase (BOARD et al., 1997).

1.1.5 Tolerância a herbicidas

Os herbicidas são a classe de produtos químicos mais utilizados na agricultura, correspondendo a mais de 60% de todos os pesticidas aplicados e comercializados no mundo. Estes compostos afetam rotas bioquímicas que não existem nos animais, como fotossíntese, biossíntese de aminoácidos essenciais e biossíntese da clorofila, porém, o uso desses produtos pode gerar efeitos tóxicos em organismos não alvos, tais como os animais (mamíferos) (SHANER, 2003).

Os herbicidas além de prejudicar os animais, também podem alterar o metabolismo das plantas, pois eles possuem ação fitorreguladora que afeta o desenvolvimento e a diferenciação de compostos em geral, incluindo o processo de fotossíntese, a formação de carboidratos, lipídeos, aminoácidos e a biossíntese de constituintes celulares (SHANER, 2003).

Diversos herbicidas seletivos têm sido desenvolvidos para controlar plantas daninhas, consideradas indesejáveis nas culturas. Então, herbicidas seletivos são aqueles capazes de eliminar várias espécies de plantas daninhas, porém não causam injúrias ou danos significativos nas plantas de interesse econômico (HOLT, POWLES, HOLTUM, 1993). Além disso, a seletividade dos herbicidas é atribuída às diferenças na absorção e no método de aplicação (HOLT et al., 1995).

Evidências fisiológicas e genéticas indicam que a seletividade dos herbicidas em plantas está relacionada com a habilidade da espécie e/ou a capacidade do genótipo em metabolizar e assim desintoxicar tais produtos (MARRS, 1996). Contudo, o uso excessivo do mesmo princípio ativo, mecanismo e modo de ação podem ocasionar a resistência ao herbicida (OWEN e ZELAYA, 2005).

Nas plantas existem diversas enzimas que apresentam capacidade de metabolizar diversos xenobióticos, entre eles os herbicidas, o que proporciona as plantas um mecanismo de desintoxicação (MANNERVIK e DANIELSON, 1988). Dentre as enzimas, as mais conhecidas e estudadas são as glutationalas transferases, que produzem conjugados solúveis em água destes xenobióticos (WILCE e PARKER, 1994; KREUZ, TOMMASINI, MARTINOIA,

1996). Nas plantas resistentes a certos herbicidas isto é devido a um mecanismo de desintoxicação que compreende a formação de um conjugado GSH-herbicida (EDWARDS et al., 2005).

Em diversas culturas como, milho (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), soja (*Glycine max*), *Arabidopsis thaliana*, sorgo (*Sorghum bicolor*), cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), entre outras, já foram identificadas as GST responsáveis pela desintoxicação direta de herbicidas (ÖZTETIK, 2008).

Alguns genótipos de milho e sorgo são reconhecidamente tolerantes aos herbicidas dos grupos químicos triazina e cloroacetanilida devido apresentarem altos níveis de GST, que catalisam a conjugação atrazina-GSH e cloroacetanilida-GSH, resultando assim em compostos solúveis em água. Já a cultura da soja quando testada com o herbicida acifluorfem (Blazer[®]) mostrou ter uma rápida conjugação acifluorfem-GSH quando comparada com plantas daninhas (MARRS, 1996).

Em plantas de tabaco geneticamente modificadas com o gene *GSTF1* de milho demonstraram maior tolerância ao herbicida Alacloro (Boxer[®]), quando comparadas com plantas não modificadas geneticamente. Desse modo, atualmente essas plantas transgênicas são usadas como ferramentas biotecnológicas na fitorremediação de solos agrícolas contaminados com herbicidas (KARAVANGELI et al., 2005).

Segundo Uotila, Gullner, Kömives (1995) nas plantas de milho, trigo e ervilha tratadas com herbicida glifosato (Roundup[®]) há indicação de formação de complexo glifosato-GSH, o que reduz significativamente a toxicidade desse herbicida. Além disso, esses autores sugerem que o glifosato também estimula a síntese desta enzima.

Já as culturas de algodão, amendoim, ervilha e soja são tolerantes ao herbicida fluorodifen, pois também formam um complexo fluorodifem-GSH que reduz os efeitos tóxicos desse herbicida na planta (MARRS, 1996).

As GST não estão igualmente distribuídas nas espécies de plantas, portanto, as espécies com maiores níveis de atividade da enzima irão suportar a exposição a herbicidas, já aquelas com menores níveis não irão sobreviver. Sendo assim, a tolerância das plantas aos herbicidas depende da captação, translocação e metabolização dos compostos pelas enzimas desintoxicantes (ZHU et al., 2009).

1.1.5.1 O metabolismo de herbicidas nas plantas

As GST são em sua maioria enzimas de desintoxicação e foram descobertas por sua capacidade de metabolizar uma grande variedade de compostos exógenos tóxicos (xenobióticos) pela conjugação com a GSH. As GST já foram encontradas em numerosos processos celulares que apesar da aparente diversidade, têm em comum uma função básica: o reconhecimento e transporte de uma ampla gama de compostos eletrofílicos reativos, independente se o composto é de origem exógena (xenobiótico) ou de origem endógena (MARRS, 1996). As GST produzidas pelos organismos formam uma matriz de defesa contra compostos tóxicos, sendo essencial para a sobrevivência (SWAIN, 1977; ISHIKAWA, 1992; SANDERMANN, 1992). As plantas não têm sistema de excreção assim sendo os compostos conjugados pela glutathione ou são sequestrados no vacúolo ou são transferidos para o apoplasto, processo denominado de "excreção de armazenamento" (MARRS, 1996).

Os mecanismos de desintoxicação de xenobióticos em plantas podem ser separados em processos sequenciais; a transformação química seguida da compartimentalização. Estes por sua vez podem ser divididos em três fases: I - reações de ativação (também chamada de transformação); II - conjugação e III - compartimentalização interna e estocagem (MARRS, 1996).

Na fase I ocorre o processo de hidrólise (catalisado por esterases e amidases) e oxidação (catalisada pelo citocromo P-450). Na fase II ocorre a desativação de xenobióticos ou a ligação covalente de metabólitos ativados na fase I a moléculas hidrofílicas endógenas, tais como glicose, malonato ou glutathione resultando em compostos atóxicos ou menos tóxicos. A fase II pode ter a participação da GST. Na fase III os conjugados inativos hidrossolúveis formados na fase II, são exportados do citossol através de proteínas de membrana, as quais iniciam a compartimentalização extracelular (apoplasto) e/ou o estoque no vacúolo (conjugados solúveis) ou na parede celular (conjugados insolúveis) (KREUZ TOMMASINI, MARTINOIA, 1996).

É importante salientar que estas enzimas de desintoxicação são muito versáteis no reconhecimento de substratos. Nas plantas, elas também desempenham funções definidas no metabolismo secundário e, assim, reconhecem e transportam os substratos naturais e xenobióticos (SANDERMANN, 1992).

Devido às GST possuírem alta solubilidade em água, grande abundância nas células e suas propriedades de ligação, essas enzimas estão implicadas no transporte e armazenamento intracelular de ampla faixa de ligantes hidrofóbicos estruturalmente diferentes, tais como:

hormônios, flavonóides e xenobióticos (AXARLI RIGDEN, LABROU, 2004; DIXON et al., 2008).

Desse modo, todas as funções de desintoxicação de xenobióticos e o metabolismo de endógenos através de GST nas plantas, mencionados acima, estão resumidos na Figura 1.4.

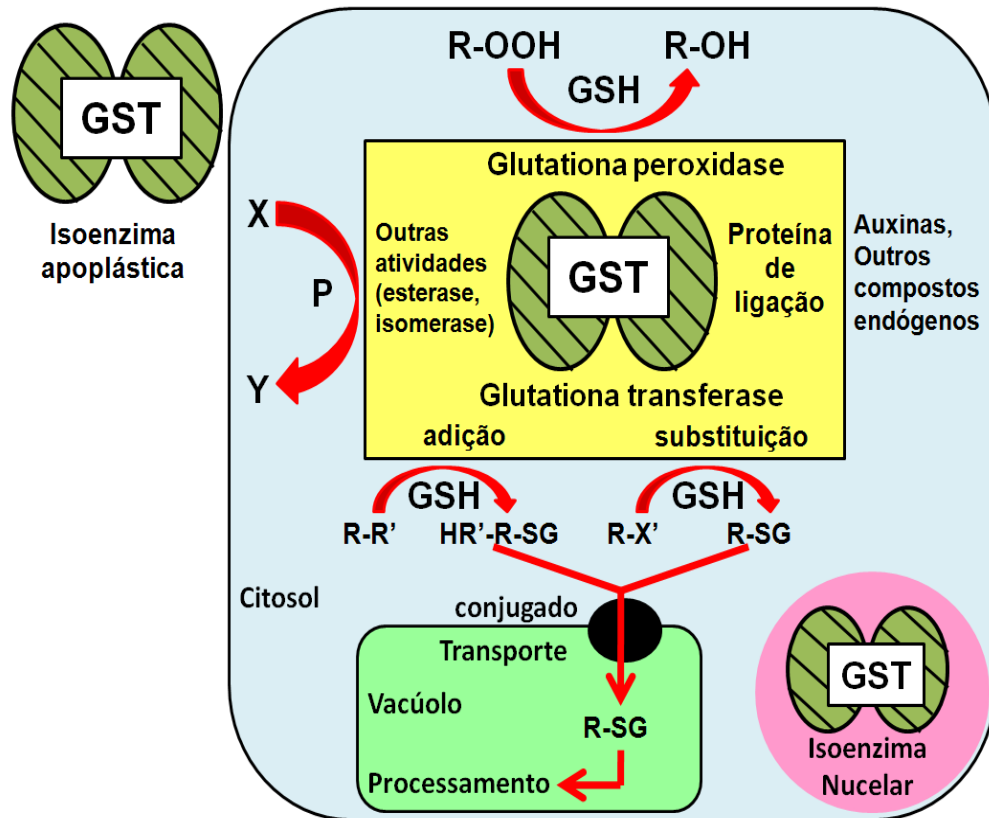


Figura 1.2 Desintoxicação de xenobióticos e metabolismo de endógenos através de GST nas plantas (Adaptado de DIXON et al., 1998).

1.1.6 Utilização dos herbicidas

Herbicidas são substâncias químicas amplamente utilizadas na agricultura no manejo de plantas daninhas, inibindo ou interrompendo significativamente o crescimento e o desenvolvimento da planta. Os herbicidas podem oferecer uma relação custo-benefício interessantes no controle de plantas daninhas com um mínimo de trabalho. Entretanto, o seu uso de forma inadequada pode causar injúrias nas culturas comerciais, danos ao meio ambiente e representam uma ameaça para o aplicador e outras pessoas expostas a eles.

Os herbicidas são classificados de acordo com seu mecanismo de ação, (PETERSON et al., 2001). Este se refere ao primeiro processo bioquímico ou enzimático que é afetado pelo herbicida, já que um mesmo produto pode apresentar mais de um mecanismo de ação.

Gazziero et al. (2000) adaptaram tabelas que originalmente utilizavam os grupos químicos funcionais para classificação, e as novas tabelas agrupam os compostos pelo mecanismo de ação. Os herbicidas incluídos no mesmo retângulo (Figuras 1.5 e 1.6) possuem comportamentos semelhantes, ainda que possam pertencer a diferentes grupos químicos.

ACCase	Herbicidas inibidores da enzima acetil-coenzima-A carboxilase.
ALS	Herbicidas inibidores da enzima acetolactato sintase.
AUXINA	Mimetizadores de auxina.
CAROTENO	Herbicidas inibidores da síntese do caroteno.
DIVISÃO CELULAR	Herbicidas inibidores da divisão celular.
EPSPS	Herbicidas inibidores da enzima enol-piruvil-shiquimato-fosfato-sintase.
FOTOSSÍNTESE	Herbicidas inibidores da fotossíntese (FSI e FSII).
GLUTAMINA	Herbicidas inibidores da enzima glutamina sintetase.
PROTOX	Herbicidas inibidores da enzima protoporfirinogenio oxidase.

Figura 1.5 Mecanismo de ação dos herbicidas (Adaptado de GAZZIERO et al., 2000).

ACCase		FOTOSSISTEMA (FS)				PROTOX
CAROTENO		FS I	FS II			
Dichlofop	Clomazone	Diquat Paraquat	Ametryne Atrazine Cyanazine Prometrine Simazine Metribuzin Hexazinone	Diuron Linuron Propanil	Bentazon loxynil	Acifluorfen Fomesafen Lactofen Oxyfluorfen Flumioxazin Flumiclorac Oxadiazon Sulfentrazone Carfentrazone
Fenoxaprop	Isoxaflutole					
Fluazifop	Norflurazon					
Haloxyfop						
Propaquizafop						
Quizalofop						
Butroxydim						
Clethodim						
Sethoxydim						
Tepraloxymim						

ALS	EPSPS	DIVISÃO CELULAR		AUXINA	
		Raiz	Parte Aérea		
Chlorimuron	Imazapic	Oryzalin Pendimethalim Trifluralin Thiazopyr	Molinate Thiobencarb	Acetochlor Alachlor Dimethenamid Metolachlor	2,4-D Dicamba Fluroxypyr Picloran Triclopyr Quinclorac
Halosulfuron	Imazamox				
Metsulfuron	Imazapyr				
Nicosulfuron	Imazaquin				
Oxasulfuron	Imazethapyr				
Pyrazosulfuron	Cloransulan				
Bispyribac	Diclosulam				
Azinsulfuron	Flumetsulam				
Pyriithiobac	Flazasulfuron				

Figura 1.3 Classificação dos Herbicidas em função do mecanismo de ação (Adaptado de GAZZIERO et al., 2000).

A seguir serão descritas, sucintamente, as principais características dos herbicidas que foram estudados nesse trabalho.

1.1.6.1 Diclofope (C₁₅H₁₂Cl₂O₄)

Diclofope - Iloxan[®] CE (Figura 1.7) é um herbicida de pós-emergência seletivo para o controle de plantas daninhas gramíneas encontradas em diversas culturas tais como: cebola, feijão, soja e trigo. Herbicidas pós-emergentes são os utilizados após a emergência da cultura e das plantas daninhas. (ANVISA, 2010; BAYER CROPSCIENCE, 2010).

Esse herbicida é do grupo químico ariloxifenoxipropionato e é inibidor da acetil coenzima A carboxilase (ACCase), bloqueando a síntese de lipídeos (COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).

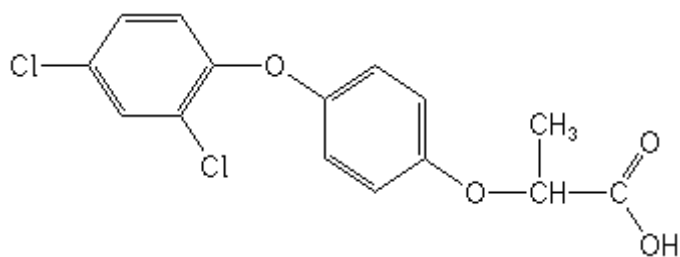


Figura 1.7 Fórmula estrutural do herbicida Diclofope (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).

1.1.6.2 Fluazifope ($C_{15}H_{12}F_3NO_4$)

O Fluazifope – Fusilade[®] 250 EW (Figura 1.8) é um herbicida que pertence ao grupo químico ariloxifenoxipropionato (ANVISA, 2010), e age inibindo a enzima ACCase, bloqueando a síntese de lipídeos (COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).

É um herbicida graminicida de pós-emergência, possui ação sistêmica e é altamente seletivo para a cultura de soja e outras dicotiledôneas. O fluazifope apresenta elevada absorção foliar e baixa absorção radicular, dependendo da dose empregada. Esse herbicida inibe o crescimento e causa amarelecimento dos meristemas e das folhas jovens. As plantas sensíveis morrem em uma a três semanas (SYNGENTA, 2010b; EMBRAPA, 2006).

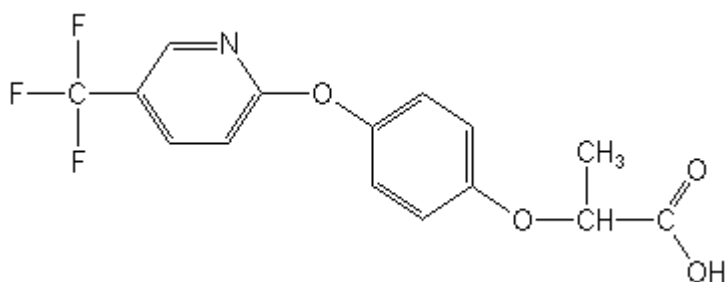


Figura 1.8 Fórmula estrutural do herbicida Fluazifope (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).

1.1.6.3 Cletodim (C₁₇H₂₆ClNO₃S)

O herbicida Cletodim - Select[®] 240 EC (Figura 1.9) pertence ao grupo químico oxima ciclohexanodiona (ANVISA, 2010), e age inibindo a enzima ACCase, bloqueando a síntese de lipídeos (ARYSTA LIFESCIENCE, 2010; EMBRAPA, 2006).

É um herbicida graminicida, sistêmico, altamente seletivo, utilizado em pós-emergência nas culturas de: algodão, alho, batata, café, cebola, cenoura, feijão, fumo, soja, mandioca e melancia (ANVISA, 2010).

Esse herbicida deve ser aplicado em gramíneas anuais no estágio de 4 folhas até 4 perfilhos e no caso de gramíneas perenes no estágio de 20 a 40 cm. As doses maiores devem ser utilizadas para controlar as plantas daninhas em estágio de crescimento maior. Para que ocorra um controle satisfatório é necessário observar as condições de umidade do solo, temperatura média entre 20 – 35°C e boa umidade do ar (acima de 60%). Em períodos de seca prolongada recomenda-se não aplicar o produto (ARYSTA LIFESCIENCE, 2010).

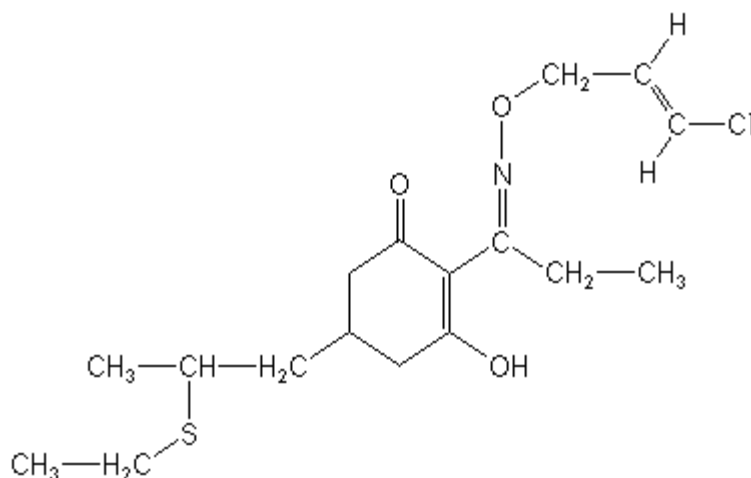


Figura 1.9 Fórmula estrutural do herbicida Cletodim (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).

1.1.6.4 Clomazona (C₁₂H₁₄ClNO₂)

O herbicida Clomazona - Gamit[®] 360 CS (Figura 1.10) pertence ao grupo químico Isoxazolidinona (ANVISA, 2010; FMC, 2010b), e age inibindo a síntese de caroteno (EMBRAPA, 2006). A inibição da enzima IPP (Isopentyl Pirophosphato Isomerase) é o local

provável de ação. Outras alterações provocadas por esses produtos são: redução da síntese protéica, perda de proplastídeos e degradação dos ribossomos 70S (ABERNATLY, 1994).

É um herbicida recomendado à cultura de soja para controlar, em pré-emergência, gramíneas anuais e perenes e algumas folhas largas como: beldroega (*Portulacca oleracea* L.), guanxuma (*Sida spinosa*) e trapoeraba (*Commelina benghalensis*). Os herbicidas para uso em pré-emergência são os aplicados ao solo antes da emergência das plantas daninhas. Esse herbicida é absorvido pelos meristemas apicais, raízes e colo da planta, translocando-se via xilema (EMBRAPA, 2006).

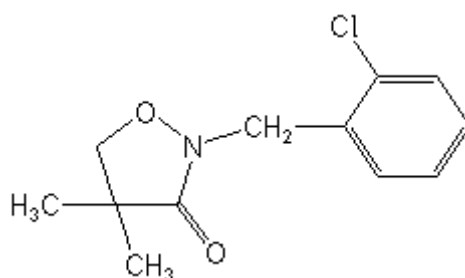


Figura 1.10 Fórmula estrutural do herbicida Clomazona (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).

1.1.6.5 Diquate (C₁₂H₁₂N₂)

O herbicida Diquate – Reglone[®] (Figura 1.11) pertence ao grupo químico Bipyridílio (ANVISA, 2010; SYNGENTA, 2010d), e age inibindo a síntese do fotossistema I (FSI) (COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010). É um herbicida não seletivo, aplicação em pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de: beterraba, café, cebola, citros, feijão e pêssego; e dessecante nas culturas de: arroz, batata, feijão e soja (ANVISA, 2010).

No entanto, quando utilizado como herbicida, o Diquate deve ser aplicado nas fases iniciais de crescimento da planta infestante (5-15 cm), podendo ser reaplicado se houver reinfestação. Na dessecação das culturas de batata, feijão e soja, somente uma aplicação é necessária e deve-se observar o intervalo de segurança (SYNGENTA, 2010d).

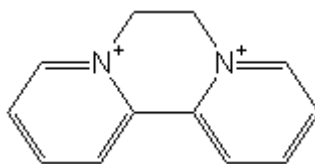


Figura 1.11 Fórmula estrutural do herbicida Diquate (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).

1.1.6.6 Paraquate ($C_{12}H_{14}N_2$)

O herbicida Paraquate - Gramoxone[®] 200 (Figura 1.12) pertence ao grupo químico Bipyridílio (ANVISA, 2010; SYNGENTA, 2010c), e age inibindo a síntese do fotossistema I (FSI) (COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).

É um herbicida de contato não seletivo, utilizado na aplicação em pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de algodão, arroz, banana cacau, café, cana-de-açúcar, citros, feijão, milho, pastagens, seringueira, soja, sorgo, trigo, entre outras. É utilizado também como dessecante nas culturas de: algodão, arroz, batata, cana-de-açúcar, milho, soja e sorgo (ANVISA, 2010).

Contudo, esse herbicida não tem atividade residual no solo; plantas infestantes que emergirem após a aplicação não serão controladas. Já na dessecação de culturas deve-se aplicar o produto quando a cultura atingir a sua maturação fisiológica (SYNGENTA, 2010c).

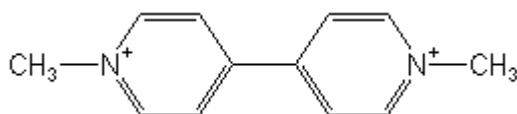


Figura 1.12 Fórmula estrutural do herbicida Paraquate (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).

1.1.6.7 Atrazina (C₈H₁₄ClN₅)

O herbicida Atrazina - Atrazina[®] 500 SC (Figura 1.13) pertence ao grupo químico Triazina (ANVISA, 2010, NORTOX, 2010a), e age inibindo a síntese de fotossistema II (FSII) (COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).

É um herbicida, apresentado sob a forma de suspensão concentrada com eficiência no controle da maioria das plantas daninhas anuais, tanto em aplicação de pré-emergência como em pós-emergência precoce. Esse é um herbicida indicado para as culturas de cana-de-açúcar, milho e sorgo (NORTOX, 2010a).

Todavia, caso a atrazina seja usada como herbicida em alguma dessas culturas citadas anteriormente, deve-se atentar para o aparecimento de injúrias nos tecidos da soja em sucessão (EMBRAPA, 2006).

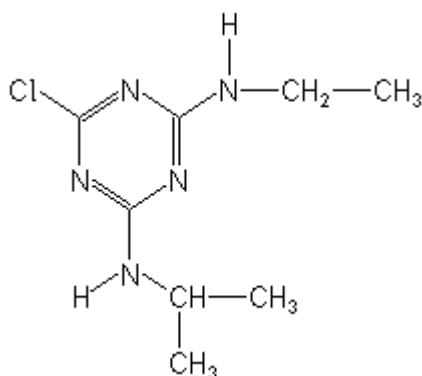


Figura 1.13 Fórmula estrutural do herbicida Atrazina (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).

1.1.6.8 Diurom (C₉H₁₀Cl₂N₂O)

O herbicida Diurom - Karmex[®] (Figura 1.14) pertence ao grupo químico uréia substituída (ANVISA, 2010), e age inibindo a síntese de fotossistema II (FSII) (COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010; DuPONT, 2010b).

Esse herbicida é usado na aplicação em pré e pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de abacaxi, algodão, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, seringueira e uva. Esse herbicida também é utilizado como dessecante da cultura de algodão e na aplicação

em pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de milho, soja e trigo (ANVISA, 2010).

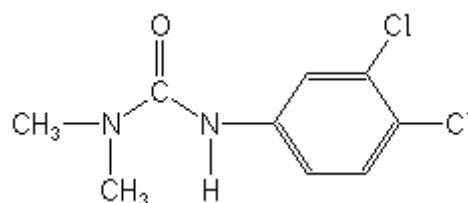


Figura 1.14 Fórmula estrutural do herbicida Diuron (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).

1.1.6.9 Bentazona ($C_{10}H_{12}N_2O_3S$)

O herbicida Bentazona - Basagran[®] 600 (Figura 1.15) pertence ao grupo químico Benzotiadiazinona (ANVISA, 2010), e age inibindo a síntese do fotossistema II (FSII) (BASF, 2010; COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010). É um herbicida recomendado para controlar folhas largas na cultura de soja. O mecanismo de ação é a inibição da fotossíntese através do bloqueio de fluxo de elétrons no FSII (AHRENS, 1994).

Esse herbicida é recomendado em pós-emergência inicial, deve ser aplicado em plantas daninhas com no máximo seis folhas. No entanto, é necessário evitar períodos de estiagem e umidade relativa do ar inferior a 60% (EMBRAPA, 2006). Devido à paralisação da biossíntese de carboidratos pode levar as plantas à morte, sendo elas particularmente sensíveis na fase inicial de desenvolvimento (BASF, 2010).

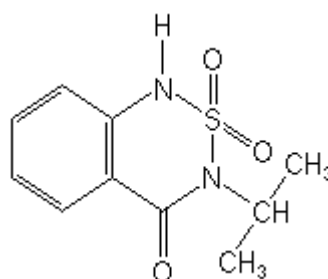


Figura 1.15 Fórmula estrutural do herbicida Bentazona (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).

1.1.6.10 Acifluorfem (C₁₄H₇ClF₃NO₅)

O herbicida Acifluorfem - Blazer[®] (Figura 1.16) pertence ao grupo químico difenil-éter (ANVISA, 2010), e age inibindo a síntese da enzima protoporfirinogênio oxidase (PROTOX) (COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).

É um herbicida utilizado para controlar em pós-emergência espécies de folhas largas, em estádios iniciais de desenvolvimento, nas culturas de soja e feijão (ANVISA, 2010). É recomendado em pós-emergência das invasoras, no estágio de duas a quatro folhas, com a cultura de soja apresentando mais de um trifólio. Requer duas horas sem ocorrência de chuva após a aplicação, para assegurar a absorção pelas plantas daninhas. O acifluorfem é absorvido rapidamente pelos caules e folhas de plantas jovens, no entanto, possui baixa ou nenhuma translocação. Em condições de baixa umidade a absorção é reduzida. Além disso, necessitam luz para apresentar máxima atividade, sendo que no escuro apresentam baixa ação (EMBRAPA, 2006).

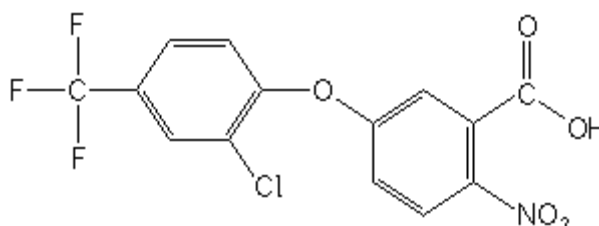


Figura 1.16 Fórmula estrutural do herbicida Acifluorfem (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).

1.1.6.11 Fomesafem (C₁₅H₁₀ClF₃N₂O₆S)

O Fomesafem - Flex[®] (Figura 1.17) é um herbicida que pertence ao grupo químico difenil-éter (ANVISA, 2010; SYNGENTA, 2010a), e age inibindo a síntese da enzima protoporfirinogênio oxidase (PROTOX) (COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).

Esse herbicida é seletivo, indicado para o controle de plantas infestantes de folhas largas das culturas de soja e feijão, em pós-emergência. Deve-se aplicar esse herbicida quando o solo estiver excessivamente seco e com baixa umidade relativa do ar, observando um intervalo mínimo de 150 dias entre a aplicação do produto e o plantio do milho ou sorgo (SYNGENTA, 2010a).

O Fomesafem é absorvido pelas folhas e pouco pelas raízes e é translocado via xilema. Os primeiros sintomas desse herbicida são manchas verde-escuras nas folhas, que progridem para necrose em um a dois dias. A cultura de soja metaboliza a molécula do fomesafem, porém pode ocorrer clorose das folhas após a aplicação desse herbicida, que desaparece aproximadamente 15 dias depois do tratamento (EMBRAPA, 2006).

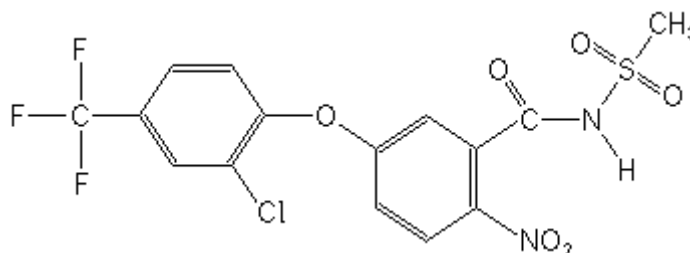


Figura 1.17 Fórmula estrutural do herbicida Fomesafem (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).

1.1.6.12 Sulfentrazone ($C_{11}H_{10}Cl_2F_2N_4O_3S$)

O Sulfentrazone - Boral[®] 500 SC (Figura 1.18) é um herbicida que pertence ao grupo químico Triazolona (ANVISA, 2010; FMC, 2010a), e age inibindo a síntese da enzima protoporfirinogenio oxidase (PROTOX) (COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).

É um herbicida usado na aplicação em pré-emergência das plantas daninhas nas culturas de abacaxi, café, cana-de-açúcar, citros, eucalipto, fumo e soja (ANVISA, 2010).

O Sulfentrazone é absorvido pelas raízes e é translocado pela planta em ausência de luz. Todavia, quando há incidência de luminosidade atua por contato. Esse princípio ativo é absorvido pelas plântulas em emergência e quando essas atingem a superfície do solo e recebem luz o produto é ativado, necrosando os tecidos. O sintoma provocado por esse herbicida é a rápida dessecação dos tecidos (EMBRAPA, 2006).

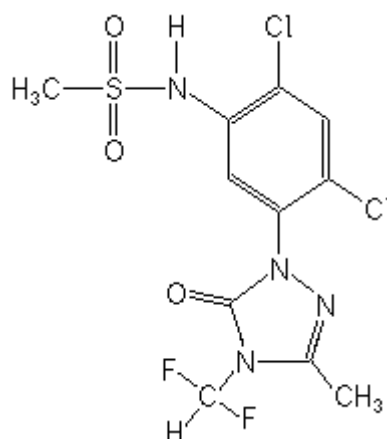


Figura 1.18 Fórmula estrutural do herbicida Sulfentrazone (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).

1.1.6.13 Clorimurom ($C_{13}H_{11}ClN_4O_6S$)

O Clorimurom - Classic[®] (Figura 1.19) é um herbicida que pertence ao grupo químico Sulfoniluréia (ANVISA, 2010, DuPONT, 2010a), e age inibindo a enzima acetolactato sintase (ALS) (COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).

É um herbicida seletivo, sistêmico, de ação pós-emergência indicado para o controle principalmente de plantas daninhas de folhas largas infestantes na cultura da soja (ANVISA, 2010).

O princípio ativo é absorvido pelas folhas e raízes das plantas daninhas e desta forma se transloca pelo xilema e floema com movimentação para toda a planta, ocasionando o amarelecimento e morte da gema apical e mais tarde de toda a planta daninha. A ação do produto é lenta, sendo que só se evidencia a morte total da planta no período de 7 a 21 dias (NORTOX, 2010b).

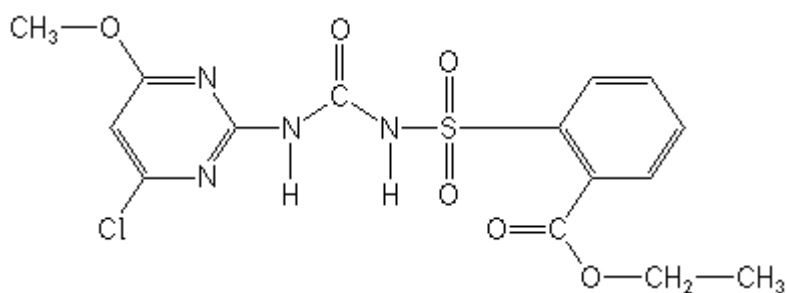


Figura 1.19 Fórmula estrutural do herbicida Clorimurom (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).

1.1.6.14 Glifosato (C₃H₈NO₅P)

O glifosato – Roundup[®] (Figura 1.20) é um herbicida que pertence ao grupo químico glicina substituída (ANVISA, 2010; MONSANTO, 2010), e age inibindo a síntese da enzima enol-piruvil-shiquimato-fosfato sintase (EPSPS) (COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010), bloqueando assim a rota de síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, precursores de produtos como lignina, flavonóides e ácidos benzóicos (EMBRAPA, 2006).

O glifosato é um herbicida usado amplamente na agricultura, sendo empregado para controlar plantas daninhas em diversas culturas. É usado em pós-emergência nas culturas de: algodão, arroz, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, coco, feijão, fumo, milho, pastagens, seringueira, soja, trigo e uva; e em pós-emergência das plantas infestantes de espécies florestais como eucalipto e pinus. Esse herbicida também pode ser usado como maturador de cana-de-açúcar e dessecante nas culturas de aveia, azevém e soja (ANVISA, 2010).

O princípio ativo desse herbicida é absorvido de forma lenta pela planta, por isso elas morrem lentamente, no intervalo de 7 a 14 dias após aplicação. A translocação é facilitada em condições de elevada intensidade luminosa. Os sintomas causados pelo glifosato são: o amarelecimento dos meristemas, que progride para necrose e morte em dias ou semanas (EMBRAPA, 2006).

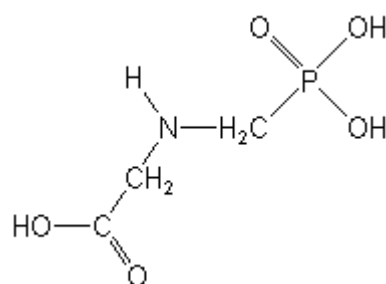


Figura 1.20 Fórmula estrutural do herbicida glifosato (Adaptado do COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES, 2010).

1.2 Docking Molecular

O docking molecular pode ser definido como a predição da estrutura de complexos receptor-ligante, com o melhor ajuste entre as duas moléculas no espaço tridimensional. Sendo assim, o receptor pode ser uma proteína, uma enzima, o DNA e o ligante uma molécula

que pode ser menor ou do mesmo tipo. Mais ainda, atualmente esse método é utilizado em várias áreas da pesquisa para estudos *in silico* (OLIVEIRA, CARACELLI e TRSIC, 2003; BROOIJMANS e KUNTZ, 2003; VERDONK et al., 2003; CARACELLI et al., 2010). O fluxograma abaixo resume o cálculo de docking (Figura 1.21).

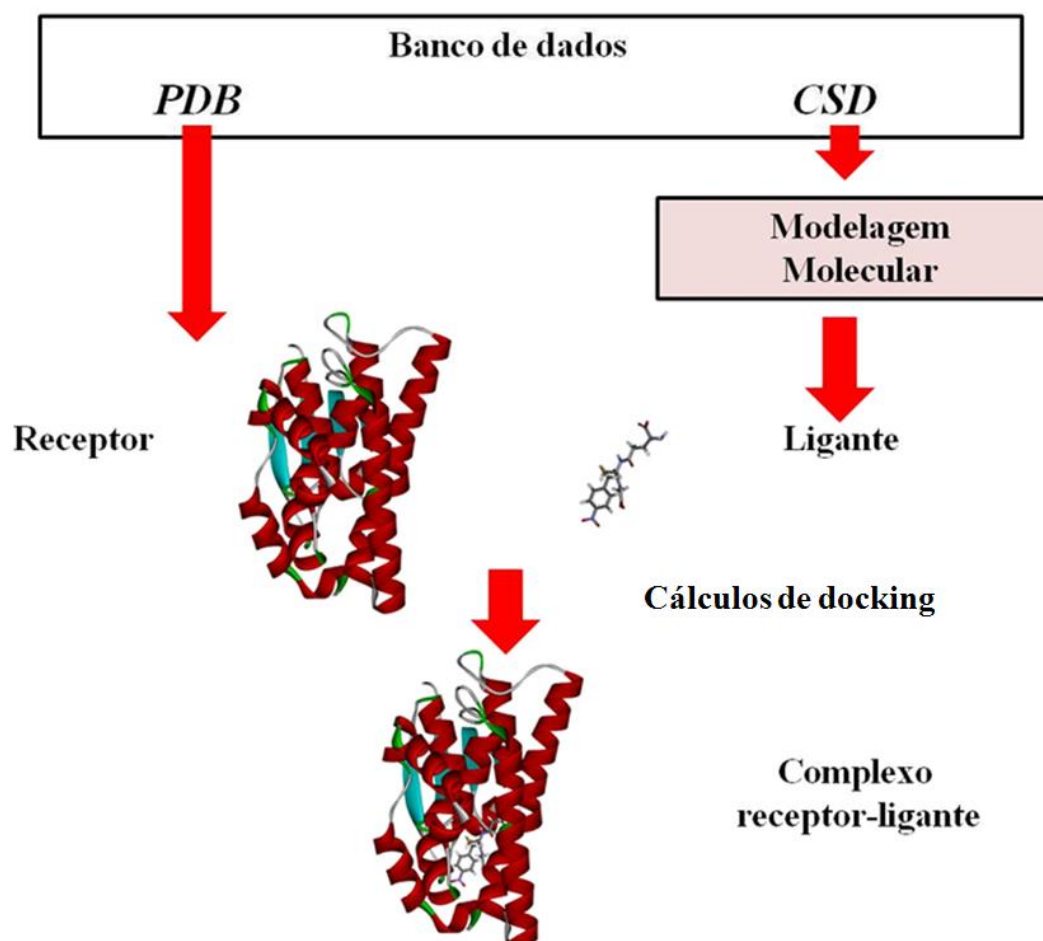


Figura 1.4 Docking molecular. Formação do complexo receptor-ligante.

1.2.1 Algoritmo genético (AG) e o programa GOLD

O algoritmo genético (AG) é um método estocástico (BROOIJMANS e KUNTZ, 2003) e tem sido utilizado como uma ferramenta de otimização. Observa-se que neste método é necessária a geração de uma população inicial. A essência de um AG é a evolução de uma população através de operações genéticas (mutações, *crossovers* e migrações) para obter uma população final que seja otimizada e adequada à situação pré-definida. Desse modo, os graus de liberdade são codificados em genes ou em sequência binária e a coleção de genes, ou de cromossomos, é atribuída a uma adequação com base em uma função escore (TAYLOR,

JEWsbury, Essex, 2002). A estrutura básica de um AG está representada no fluxograma na Figura 1.22.

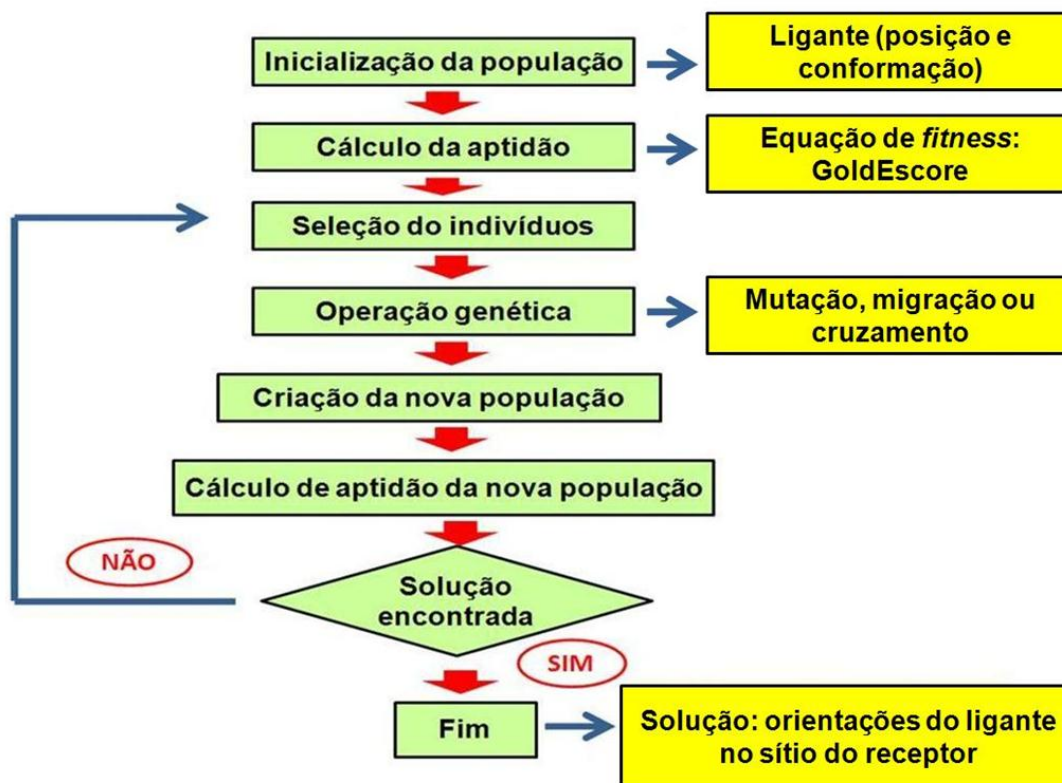


Figura 1.5 Representação esquemática de um AG básico (Adaptado de MIRANDA, 2000).

O programa utilizado neste trabalho para realizar os cálculos de docking foi o GOLD 4.1.1 (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*) que é um programa baseado em algoritmo genético. Este programa permite a flexibilização dos ligantes e flexibilização parcial da proteína (JONES, WILLETT, GLEN, 1995, JONES et al., 1997).

O programa GOLD utiliza três operadores genéticos: cruzamento, mutação e migração, na busca de uma população de possíveis soluções. As soluções são classificadas mediante uma função *Fitness* pré-definida. O programa GOLD apresenta algumas funções de ajuste. A função utilizada neste estudo foi a *GoldScore* que compreende quatro componentes (JONES, WILLETT, GLEN, 1995, JONES et al., 1997):

$$Score = S(hb_ext) + 1,3750S(vdw_ext) + S(hb_int) + S(vdw_int) \quad \text{onde,}$$

- $S(hb_ext)$: energia de ligação de hidrogênio entre o receptor e ligante no complexo;
- $S(vdw_ext)$: energia de van der Waals entre o receptor e ligante no complexo;

- S(hb_int): energia de ligação de hidrogênio intramolecular do ligante;
- S(vdw_int): energia de van der Waals no ligante (intramolecular).

O escore vdw_ext é multiplicado por um fator de 1,375 quando o escore total é calculado. Isto é uma correção empírica para induzir o contato hidrofóbico. O resultado total é multiplicado por -1. O campo de força (mecânica molecular) utilizado no programa GOLD é o *Tripes 5.2 Force Field* (CLARK, CRAMER III, OPDENBOSCH, 1989).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo geral:

- Estudar a formação de complexos da enzima glutathione transferase da classe Tau, GSTU4-4, de soja com diferentes herbicidas através da metodologia de docking, com o intuito de prever as características de um composto para poder ser desintoxicado pela enzima.

1.3.2 Objetivos específicos:

- Obter modelos tridimensionais enzima-ligantes;
- Analisar as interações enzima-ligantes e os sítios de ligação;
- Prever as características de como um composto pode ser desintoxicado pela enzima;
- Estudar e propor mecanismos de interação dos ligantes com a enzima e seus sítios característicos de ligação.

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Cristalografia, Estereodinâmica e Modelagem Molecular (LACrEEM), do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O estudo foi realizado por simulação computacional utilizando docking molecular e visualização molecular para estudar a formação de complexos de uma série de herbicidas com a enzima glutathione transferase (código PDB 2vo4) de soja (*GmGSTU4-4*).

As várias etapas envolvidas na execução dos cálculos de docking estão esquematizadas no fluxograma apresentado na Figura 2.1.

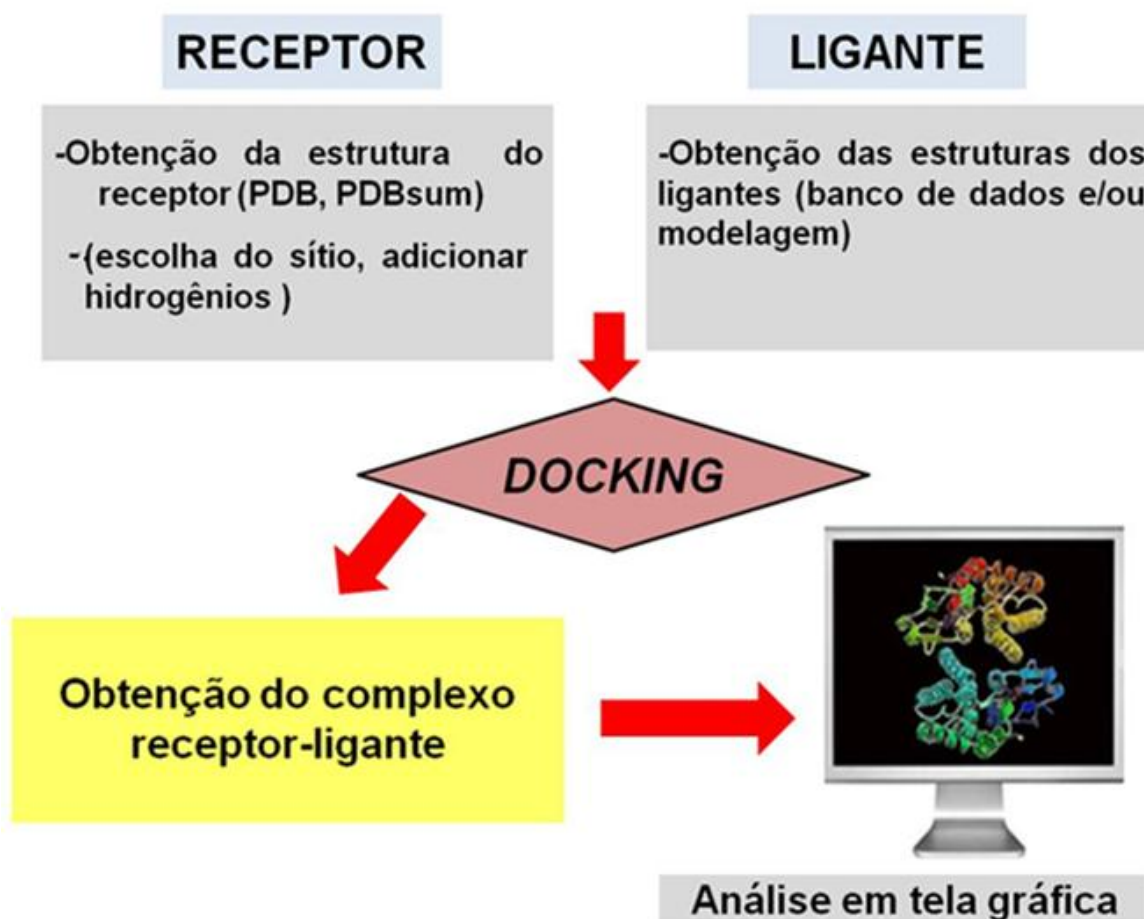


Figura 2.1 Fluxograma das etapas de execução do estudo de docking.

2.1 Obtenção da estrutura tridimensional da Glutathione Transferase

As coordenadas cristalográficas da glutathione transferase de soja (*GmGSTU4-4*), foram obtidas no bancos de dados públicos *Protein Data Bank (PDB)* e no *PDBSum*, com o código PDB 2vo4. Nestes bancos de dados é possível obter a estrutura tridimensional da proteína e outras informações sobre a mesma.

A estrutura tridimensional (Figura 2.2) foi determinada a 1.74 Å de resolução por difração de raio X. A proteína de soja *Glycine max*, possui 4.243 átomos, 479 moléculas de água, é homodímera e está complexada com o inibidor *S*-(*p*-nitrobenzil)-glutathione (Nb-GSH) – (GTB) (AXARLI et al., 2009a). O complexo cristalográfico é apresentado na Figura 2.2.

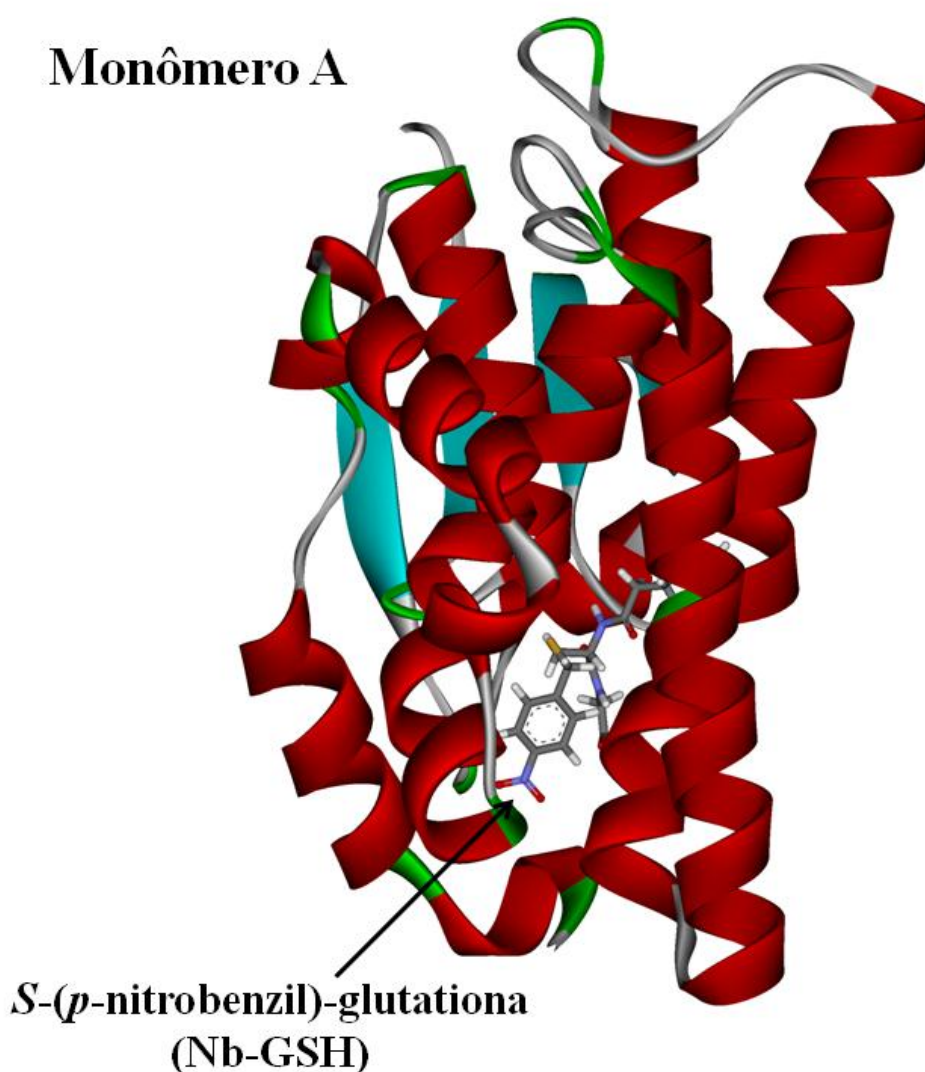


Figura 2.2 Estrutura tridimensional da glutathione transferase (2vo4) complexada com o inibidor *S*-(*p*-nitrobenzil)-glutathione (Nb-GSH) – GTB no sítio ativo.

2.2 Modelagem molecular dos herbicidas

Os ligantes estudados neste trabalho são herbicidas. As estruturas tridimensionais dos 14 ligantes estudados foram obtidas da seguinte forma:

(a) *por modelagem molecular*. Para obter os compostos dos quais não se tinha estrutura tridimensional, utilizou-se como base a estrutura tridimensional do clorimurom (Figura 2.3) obtida no *Cambridge Structural Database* (CSD) sob o código YOCVOC. Os demais compostos foram modelados com o programa de simulação e modelagem molecular *HyperChem 5.01*, e o mesmo foi utilizado para os cálculos de otimização com o método MM+, *Steepest Descent*, gradiente RMS de 0,01 kcal/(Å mol).

(b) *do Super Hapten Database*. O *Super Hapten* é um banco de dados público para pequenas moléculas do qual fazem parte estruturas de 7.257 haptenos (SUPER HAPTEN DATABASE, 2010). Os ligantes obtidos no *Super Hapten* foram: diquate, paraquate e atrazina.

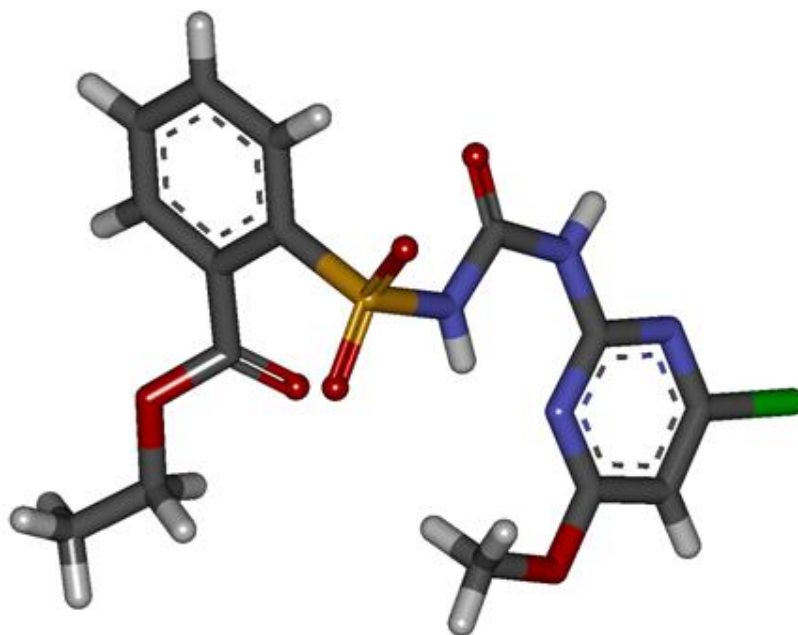


Figura 2.3 Estrutura tridimensional do clorimurom (Código CSD: YOCVOC) que foi utilizada para modelagem dos ligantes, com exceção do diquate, paraquate e atrazina.

As estruturas modeladas dos ligantes são apresentadas na Figura 2.4.

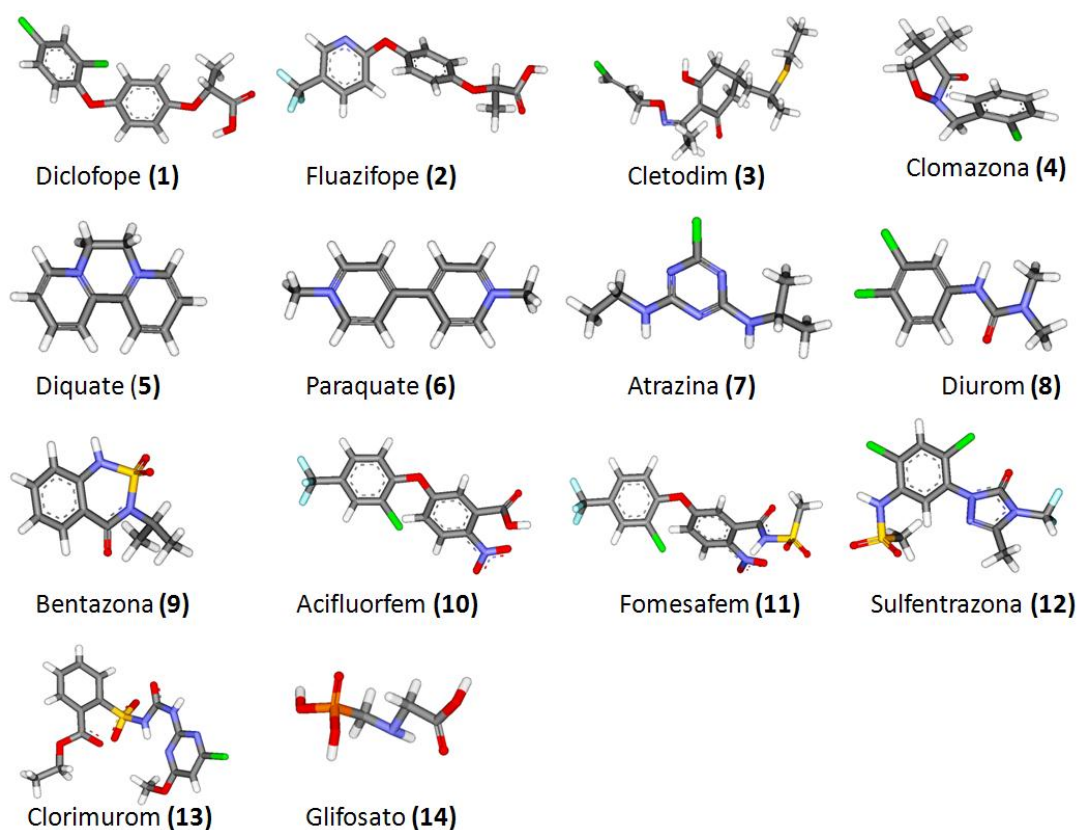


Figura 2.4 Estruturas dos ligantes após modelagem, com exceção do diquate, paraquate e atrazina, utilizados nos cálculos de docking.

2.3 Redocking ou validação da metodologia

Para realizar os cálculos de docking uma série de parâmetros devem ser escolhidos, entre eles o sítio de ligação e o raio R que será utilizado para incluir todos os aminoácidos importantes.

A reconstrução do complexo cristalográfico permite validar os cálculos de docking. Para isso a molécula ligante *S*-(*p*-nitrobenzil)-glutathiona (GTB) e o receptor GST foram separados do complexo cristalográfico inicial depositado no PDB e, em seguida, o complexo teórico foi reconstruído com o docking, procedimento denominado redocking (Figura 2.5). O procedimento foi realizado com sucesso como será demonstrado posteriormente. Sendo assim, estes parâmetros foram então utilizados para os cálculos de docking com os herbicidas.

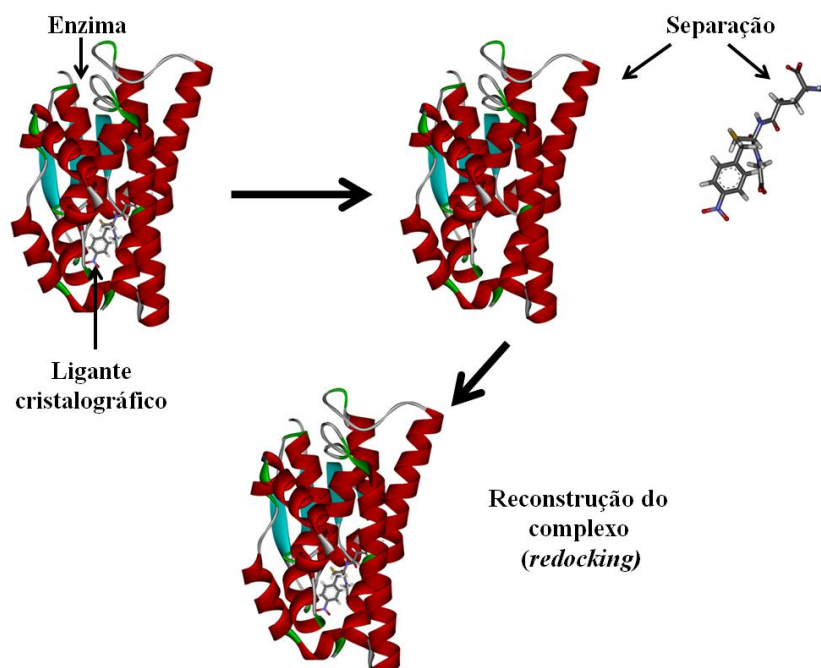


Figura 2.5 Redocking ou validação da metodologia. Observa-se primeiro o complexo extraído do PDB, depois separa-se o receptor GST e o ligante GTB. Finalmente o complexo obtido com os cálculos de docking, semelhante ao complexo cristalográfico.

2.4 Realização dos cálculos de docking

Após a seleção e definição do sítio de ligação por meio de visualização molecular, o sítio ativo da enzima *GmGSTU4-4* foi considerado o sítio receptor para os estudos de docking. Foi estabelecido um raio da esfera de estudos de 7 Å além da cavidade deixada pelo ligante original. Também foram adicionados os átomos de hidrogênio aos aminoácidos da enzima, já que o arquivo *PDB* não os tem, o que foi feito usando o programa GOLD 4.0.1. Foi avaliada a necessidade de remover as moléculas de água presentes no sítio ativo. Realizou-se uma análise e foram observadas interações com algumas moléculas de água, e três moléculas foram consideradas nos cálculos.

A função de escore utilizada nos cálculos foi a *GoldScore* do programa GOLD 4.0.1 (JONES, WILLET, GLEN, 1995; JONES et al., 1997). Todavia, se basear somente no valor do escore não é suficiente, sendo assim, foi realizada uma análise criteriosa, em tela gráfica, utilizando o programa *DS Visualizer 2.5*, das orientações obtidas em cada série de cálculos dos ligantes no sítio da *GmGSTU4-4*.

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ligantes cristalográficos e a enzima Glutathione Transferase

3.1.a. Ligante *S*-(*p*-nitrobenzil)-glutathione (GTB) e Redocking

A validação do cálculo de docking foi realizada utilizando-se as coordenadas do ligante cristalográfico *S*-(*p*-nitrobenzil)-glutathione (Nb-GSH) - (GTB), transformadas em coordenadas ortogonais absolutas para que ocorresse a perda de informação da sua posição original. O cálculo de docking foi realizado, tendo como receptor a enzima 2vo4 e como ligante a estrutura apresentada na Figura 3.1.

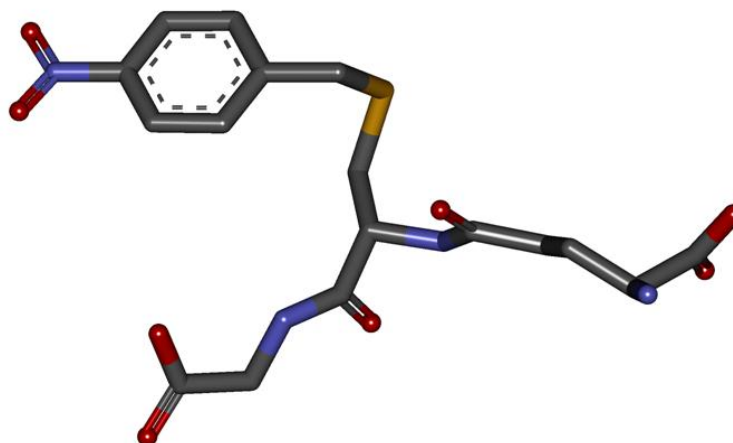


Figura 3.1 Ligante *S*-(*p*-nitrobenzil)-glutathione (Nb-GSH) - (GTB) utilizado na validação dos parâmetros escolhidos para os cálculos de docking.

Os resultados obtidos da simulação computacional do redocking do ligante cristalográfico foram comparados com os dados do PDB e mostraram excelente concordância com a estrutura cristalográfica original (Figura 3.2). O escore do redocking foi de $-88,8 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

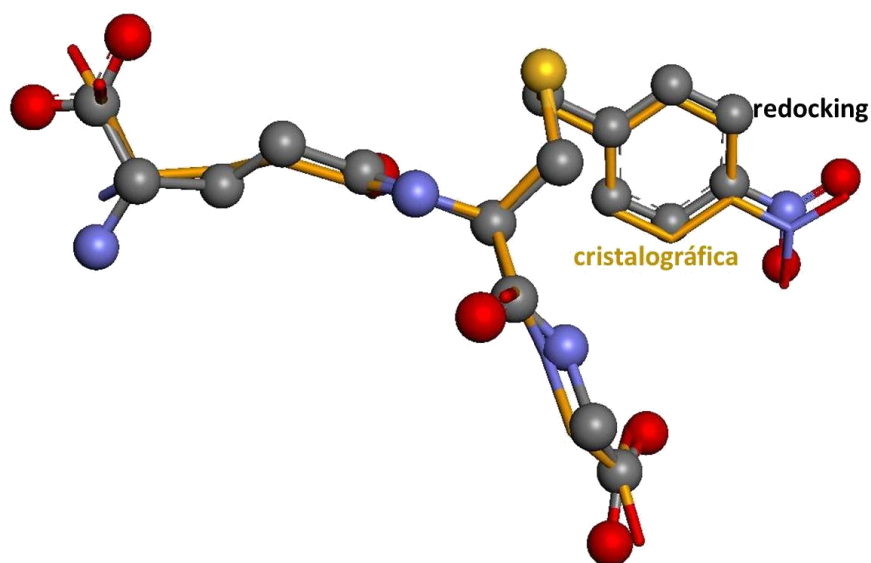


Figura 3.2 Resultados da validação dos cálculos de docking com o ligante flexível. Em *stick*, e em dourado, a molécula S-(*p*-nitrobenzil)-glutaciona (Nb-GSH) - (GTB) cristalográfica obtida no PDB, em *ball and stick*, e em cinza, o resultado do redocking.

Além disso, também foi realizada uma análise das interações que o ligante S-(*p*-nitrobenzil)-glutaciona (Nb-GSH) - (GTB) realiza com a glutaciona transferase (2vo4), as quais são mostradas na Figura 3.3 e Tabela 3.1.

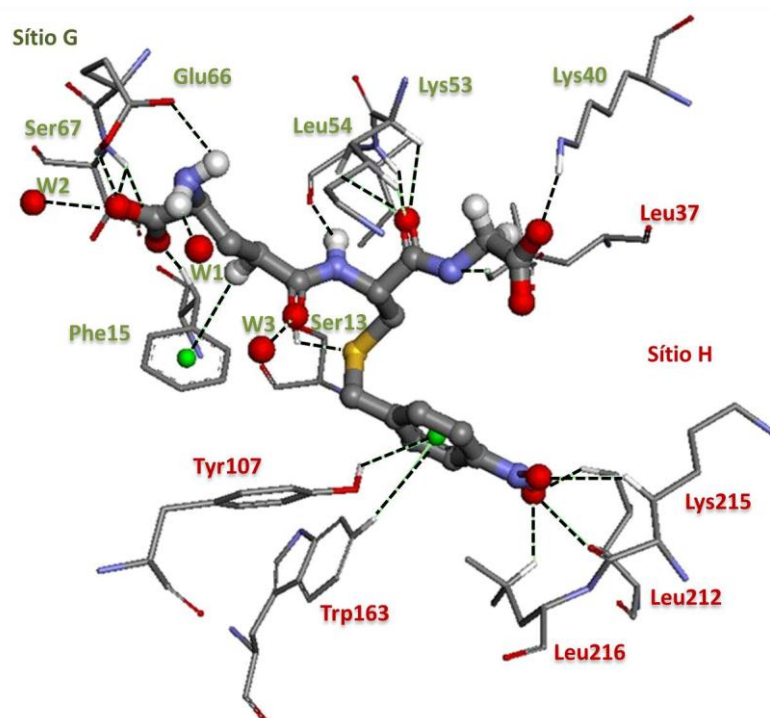


Figura 3.3 Interações entre o inibidor S-(*p*-nitrobenzil)-glutaciona (Nb-GSH) - (GTB) e a glutaciona transferase. Os nomes dos aminoácidos estão representados em cores conforme o sítio característico de ligação; em vermelho o sítio H e em verde o sítio G. Também estão representadas as moléculas de água (W1, W2 e W3). Para facilitar a visualização, são mostrados apenas alguns dos átomos de H.

Tabela 3.1 Interações entre o inibidor S-(p-nitrobenzil)-glutathione (Nb-GSH) - (GTB) e a glutathione transferase destacando as regiões do sítio G (em verde) e do sítio H (em rosa)

Interações	Distância (Å)	Átomo GTB	Átomo GST
O11-HB1:PHE15	2.15	O11	HB1
N3-HD11:LEU37	2.61	H5	O
HB1-CB:LYS53-O2	2.58	O2	HB1
HG2-CG:LYS53-O2	2.48	O2	HG2
HA-CA:LYS53-O2	2.37	O2	HA
O11-HN:SER67	2.60	O11	HN
O12-HN:SER67	2.59	O12	HN
O42-HB1:LEU212	2.64	O42	HD23
O42-HD23:LEU212	2.53	O42	HB1
O41-HB1:LYS215	2.69	O41	HB1
O42-HG:LEU216	2.36	O42	HG
Ligações de Hidrogênio			
SER13:HG – GTB:SG2	2.48	SG	HG
LYS40:H22 -GTB:O32	1.92	O32	H22
ILE54:O - GTB:H	1.90	HN2	O
ILE54:HN - GTB:O2	2.30	O2	HN
GLU66:HE1 - GTB:O12	1.98	OE2	HE1
GLU66:OE2 - GTB:H	2.18	HN1	OE2
W1-HOH-GTB:H	2.37	HN1	O
W2-HOH-GTB:O12	2.56	O12	O
W3-HOH-GTB:OE1	2.80	OE1	O
Centróide			
Ct-GTB – OH:TYR107	2.58		
Ct-GTB – HC:TRP163	3.50		
Ct-Phe15 – H:CG1	3.05		

Observou-se que o inibidor GTB se posiciona no sítio ativo, uma cavidade muito rasa e exposta ao solvente de forma aproximadamente cilíndrica (Figura 3.4). O sítio ativo é caracterizado pela presença de seis aminoácidos carregados positivamente (duas argininas e quatro lisinas) e um carregado negativamente (um ácido glutâmico) que se encontra em uma extremidade do cilindro, enquanto que os aminoácidos positivos ficam distribuídos ao longo da cavidade cilíndrica. Na extremidade negativa estão as moléculas de água que também interagem com o ligante GTB. O ligante GTB é um inibidor competitivo, análogo ao substrato GSH (AXARLI et al., 2009a), e ocupa o sítio G (discutido na Seção 1.2.2), interagindo com Ser13, Phe15, Lys40, Lys53, Ile54, Ser67, Glu66 e as moléculas de água W1, W2 e W3, e também o sítio H, fazendo interações com Tyr107, Trp163, Leu212, Lys215, Leu216.

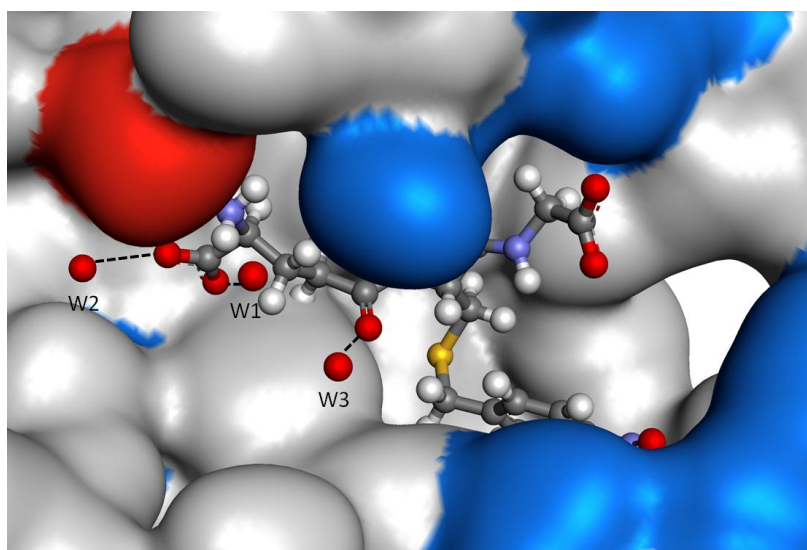


Figura 3.4 Sítio ativo da enzima glutathione transferase mostrando a cavidade rasa de forma aproximadamente cilíndrica onde se deposita o ligante GTB. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3.

3.1.b. Ligante glutathione GSH

O substrato glutathione se posiciona no sítio já descrito para o inibidor com diferenças significativas. No sítio G a interação ocorre com os aminoácidos Ser13, Phe15, Lys53, Ile54, Pro55, Glu66, Ser67 e também com as três moléculas de água W1, W2 e W3 próximas ao Glu66. No sítio H, a interação ocorre com a Tyr107. Observou-se que uma molécula de água interage com o SG do GSH, ao invés da Ser13, como ocorria com GTB (AXARLI et al, 2009b; código PDB 3fhs). Segundo Axarli e colaboradores, a Arg111 (que interage com GTB) e a Tyr107 são importantes para a ligação de substratos xenobióticos, pois estes dois aminoácidos estão na interface entre os sítios G e H. Diferente de GTB, GSH quase não ocupa o sítio H, como pode ser observado na Figura 3.5.

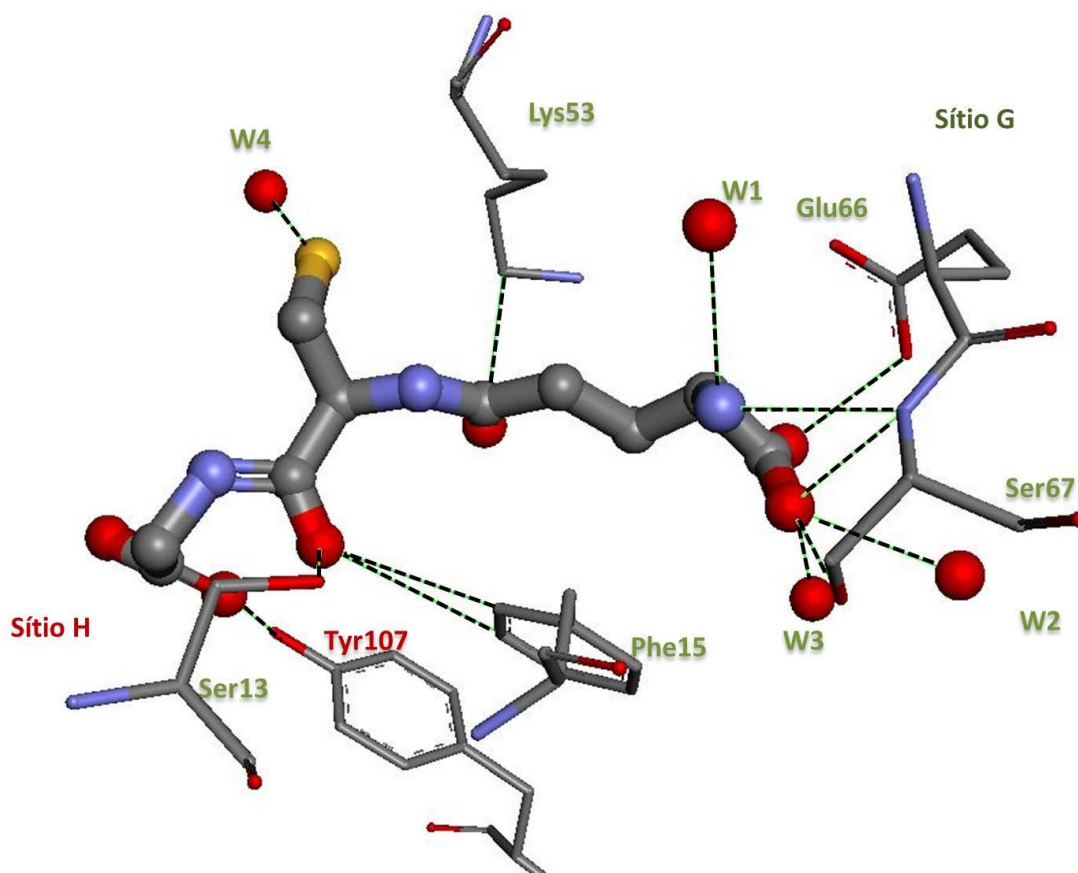
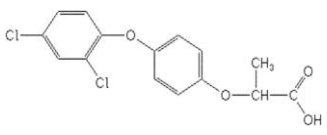
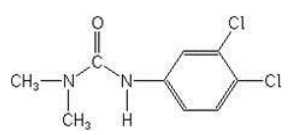
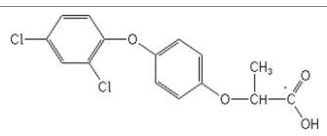
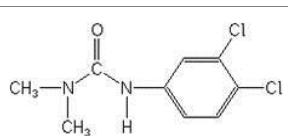
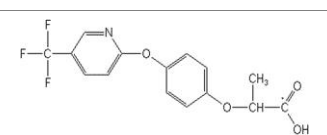
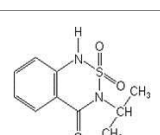
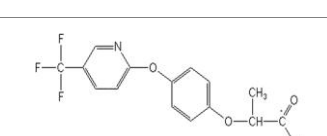
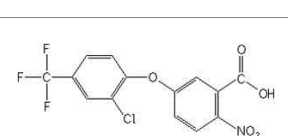
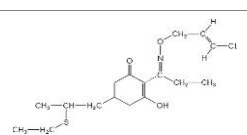
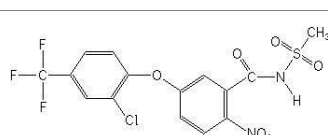
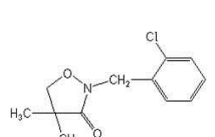
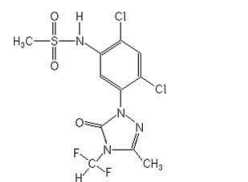
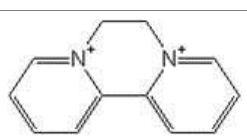
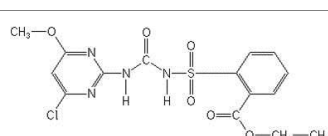
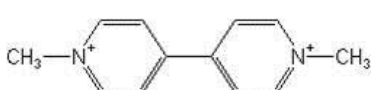
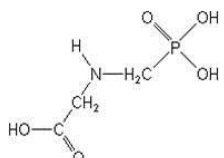


Figura 3.5 GSH no sítio ativo da enzima glutathione transferase. Nem todos os aminoácidos que interagem são apresentados para facilitar a visualização.

3. 2 Estudos de docking dos compostos (herbicidas)

Os cálculos de docking foram realizados e as soluções obtidas foram selecionadas e avaliadas por visualização molecular. Primeiro é feita uma análise do padrão de orientações, e feita uma seleção da pose (conformação e orientação do ligante) mais representativa do conjunto das soluções obtidas. Um resumo contendo os valores de escore obtidos dos cálculos de docking entre a enzima *GmGSTU4-4* e os herbicidas (1 a 14) são apresentados na Tabela 3.2. As figuras e tabelas contendo detalhes das interações são apresentadas no apêndice deste capítulo. É preciso salientar que no caso presente o valor de escore maior não está associado com melhor atividade, mas sim com um posicionamento diferente no sítio de ligação. Neste caso, pelo fato de as moléculas serem muito diferentes e de se posicionarem de forma diferente nos sítios G e H, o escore, resultado das interações, pode não ter significado nem valor comparativo como ocorre em outros casos (p.ex., Caracelli et al., 2010).

Tabela 3.2 Valores de escore (kcal/mol) dos compostos 1 a 14 em complexo com a *GmGSTU4-4*

composto	escore	composto	escore
 (1) diclofop-R	-52,65	 (7) atrazina	-42,97
 (1) diclofop-S	-45,60	 (8) diurom	-37,52
 (2) fluazifop-R	-49,95	 (9) bentazona	-37,63
 (2) fluazifop-S	-51,46	 (10) acifluorfen	-40,04
 (3) cletodim	-55,43	 (11) fomesafem	-56,00
 (4) clomazona	-37,52	 (12) sulfentrazone	-47,60
 (5) diquate	-34,36	 (13) clorimurom	-52,00
 (6) paraquate	-34,09	 (14) glifosato	-43,86

3. 2.1.a Composto 1 (R) - Diclofope

O escore da orientação escolhida foi de -52,65 kcal/mol (Figura 3.6). Foi observado que este composto se posiciona na cavidade próximo ao aminoácido carregado negativamente Glu66 e do aminoácido carregado positivamente Lys53. As moléculas de água W1, W2 e W3 estão localizadas próximas à extremidade negativa, e os átomos O2 e O4 realizam interações com a W1 e W3. Na outra extremidade do composto estão presentes os átomos de cloro C11 e C12, que interagem com os resíduos Leu212, Leu216, Ser13 e Trp153.

No apêndice, Tabela 3A.1.a e na Figura 3A.1.a, são apresentadas as interações mais relevantes do ligante com a proteína.

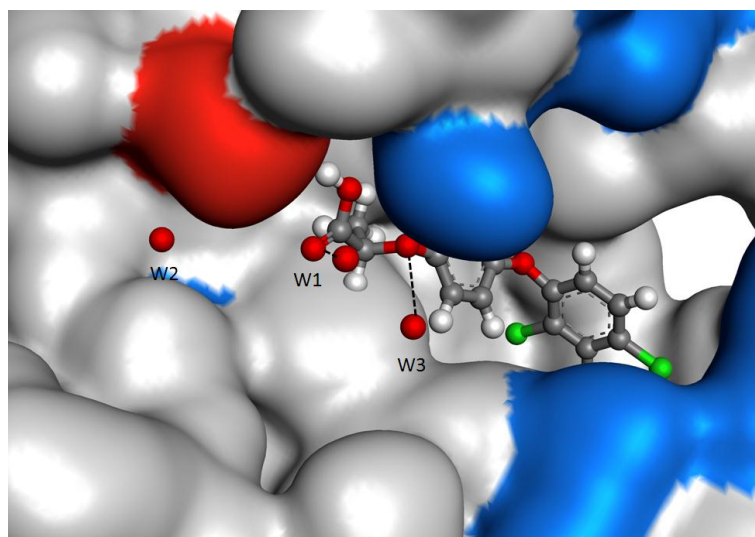


Figura 3.6 Orientação do composto (R) - diclofope na *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3. Em tracejado preto as ligações de H com as moléculas de água W1 e W3.

3. 2.1.b Composto (S) - Diclofope

Para o composto (S) - Diclofope, o escore da orientação escolhida foi de -45,60 kcal/mol, a qual é apresentada na Figura 3.7.

Observou-se que este composto se posiciona bem próximo ao aminoácido carregado negativamente Glu66 da cavidade cilíndrica. Diferente do seu enantiômero **R**, este composto não interage com o aminoácido carregado positivamente Lys53. As moléculas de água W1,

W2 e W3 estão localizadas próximas à extremidade positiva, e este composto realiza interações apenas com a W2 através do seu átomo de hidrogênio, H9. Na outra extremidade do composto estão presentes os átomos de cloro (Cl1 e Cl2), porém apenas o Cl1 interage com o aminoácido Trp153. Neste composto foram observadas duas interações com o aminoácido Ser67, o que não foi observado no composto (**R**) - Diclofope.

No apêndice, Tabela 3A.1.b e na Figura 3A.1.b, são apresentadas as interações mais relevantes do ligante com a proteína.

As distâncias entre os resíduos de *GmGSTU4-4* e os átomos da orientação selecionada do **1(S)** são diferentes das distâncias do composto **1(R)**, como pode ser observado na Tabela 3A.1.a e na Tabela 3A.1.b.

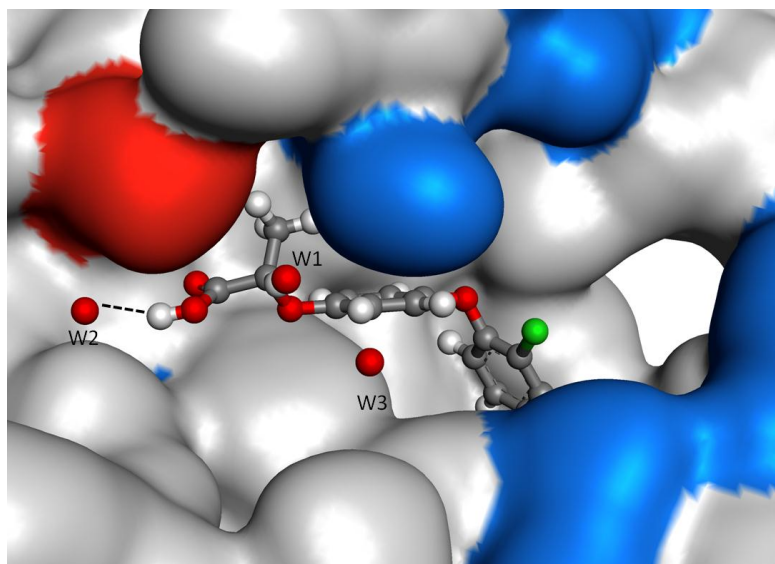


Figura 3.7 Orientação do enantiômero do composto (**S**) - Diclofope no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3. Em tracejado preto a ligação de H com a molécula de água W2.

3. 2.2.a Composto (**R**)-Fluazifope

O escore da orientação escolhida para o composto (**R**) - Fluazifope da qual foi realizada a análise das interações foi de -49,95 kcal/mol. A orientação escolhida pode ser visualizada na Figura 3.8. O composto (**R**) - Fluazifope se complexa na cavidade cilíndrica da *GmGSTU4-4* e seu grupo CF_3 interage com o aminoácido carregado negativamente Glu66. Esse grupo CF_3 também faz ligações de H com a Ser67 e com molécula de água W3. Os átomos de N e O1 do composto (**R**) - Fluazifope interagem com o aminoácido carregado

positivamente Lys53. Outras interações observadas do (**R**) - Fluazifope são com os resíduos: Ile54, Phe15, Ser13, Tyr107 e Trp163.

No apêndice, Tabela 3A.2.a e Figura 3A.2.a, são apresentadas as interações mais relevantes do ligante com a proteína.

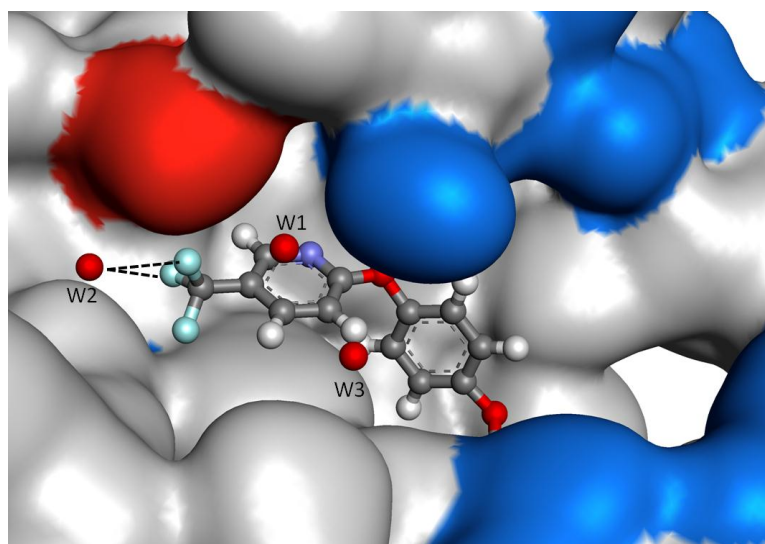


Figura 3.8 Orientação do composto (**R**) - Fluazifope no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3. Em tracejado preto as ligações de H com a molécula de água W2.

3. 2.2.b Composto (**S**) -Fluazifope

O escore da orientação escolhida para o composto (**S**) - Fluazifope da qual foi realizada a análise das interações foi de -51,46 kcal/mol (Figura 3.9). Os valores de escore do composto (**R**) - fluazifope e do seu enantiômero **S** foram muito próximos, -49,95 e -51,46 kcal/mol, respectivamente. Apesar das diferenças nos valores de escores os compostos apresentaram interações semelhantes. Observou-se que a que grupo CF_3 também interage com o aminoácido Ser67 e com a molécula de água W3. No entanto, não realiza interação com o aminoácido carregado negativamente (Glu66) e faz interação com o aminoácido Arg18 (carregado positivamente). Os átomos de N e O1 do composto **2** (**S**) também interagem com o aminoácido carregado positivamente (Lys 53). Outras interações observadas do (**R**) - Fluazifope são com os resíduos do N-terminal domínio: Ile54, Leu216, Ser13, Phe15, Pro55, Tyr107 e Trp163.

No apêndice, Tabela 3A.2.b e Figura 3A.2.b, são apresentadas as interações mais relevantes do ligante com a proteína.

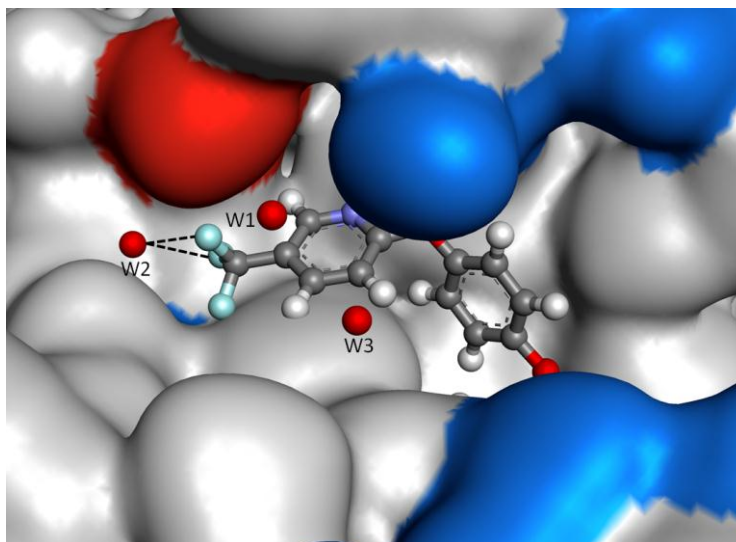


Figura 3.9 Orientação do enantiômero do composto (S)-Fluazifope no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3. Em tracejado preto as ligações de H com a molécula de água W2.

3. 2.3 Composto Cletodim

No composto **3** o escore da orientação escolhida para realizar as análises das interações foi de -55,43 kcal/mol. A orientação escolhida é visualizada na Figura 3.10.

O composto **3** se orienta no sítio da *GmGSTU4-4* e o átomo de cloro realiza interações com os resíduos Phe15, Pro55 e Ser67. Foram observadas interações do N1 e O1 com o aminoácido carregado positivamente Lys 53. Também foi observada interação com outro aminoácido carregado positivamente, a Arg111, através do átomo H15 do composto. Outras interações deste composto foram observadas nos aminoácidos: Ile54, Leu212, Ser13 e Tyr107. O composto **3** não interage com as moléculas de água que estão localizadas na entrada da cavidade cilíndrica.

No apêndice, Tabela 3A.3 e Figura 3A.3, são apresentadas as interações mais relevantes do ligante com a proteína.

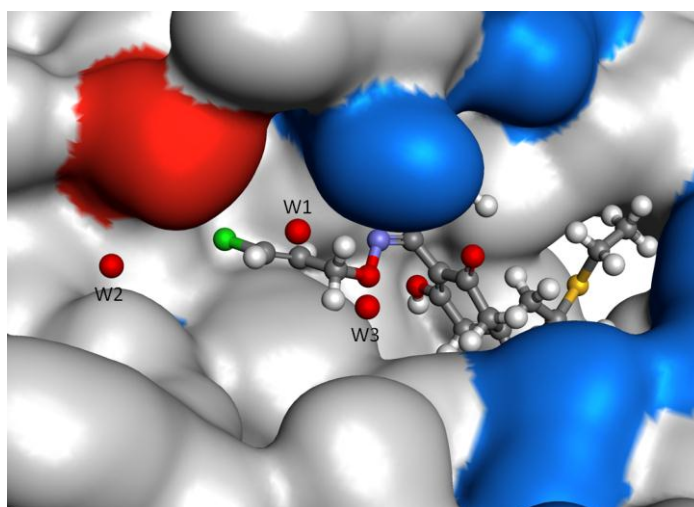


Figura 3.10 Orientação do composto Cletodim no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3.

3. 2.4 Composto Clomazona

No composto **4** o escore da orientação escolhida foi de -37,52 kcal/mol. A orientação escolhida do composto **4** é observada na Figura 3.11. Este composto está complexado ao sítio ativo da *GmGSTU4-4* devido as interações dos seus átomos com os aminoácidos: Ile54, leu216, Phe15, Ser13 e Trp163. Além disso, também foi observada uma interação C-H... π entre este composto e o aminoácido Leu216. O composto **4** não interage com as moléculas de água que estão localizadas na entrada da cavidade cilíndrica.

No apêndice, Tabela 3A.4 e Figura 3A.4, são apresentadas as interações mais relevantes do ligante com a proteína.

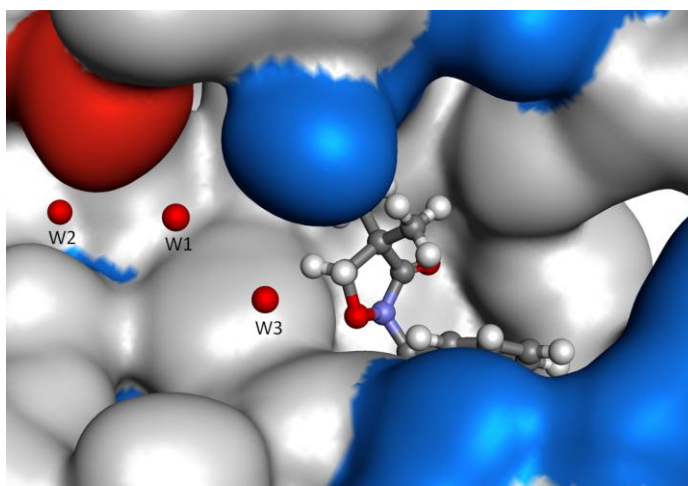


Figura 3.11 Orientação do composto Clomazona, no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3.

3. 2.5 Composto Diquate

No composto **5** o escore da orientação escolhida para realizar as análises das interações foi de -34,36 kcal/mol, este foi o menor valor de escore dentre os ligantes estudados neste trabalho. A orientação escolhida é visualizada na Figura 3.12.

Neste composto não foram observadas interações com as moléculas de água.

No apêndice, Tabela 3A.5 e Figura 3A.5, são apresentadas as interações mais relevantes do ligante com a proteína.

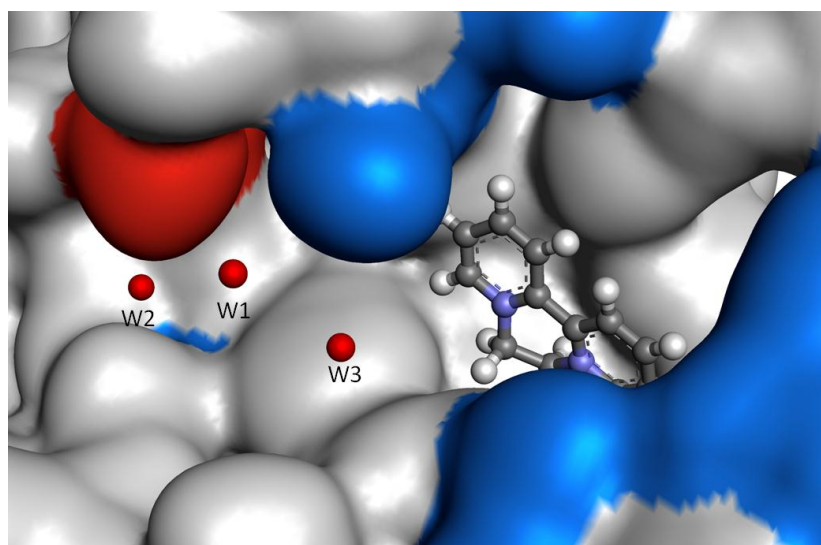


Figura 3.12 Orientação do composto Diquate no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3.

3. 2.6 Composto Paraquate

O composto **6** é o composto que realiza o menor número de interações com os aminoácidos do sítio ativo da *GmGSTU4-4*. No composto paraquate o escore da orientação escolhida foi de -34,09 kcal/mol (Figura 3.13). A interação observada foi com o resíduo Lys215 e uma interação N-H... π com o aminoácido Leu37.

No apêndice, Tabela 3A.6 e Figura 3A.6, são apresentadas as interações mais relevantes do ligante com a proteína.

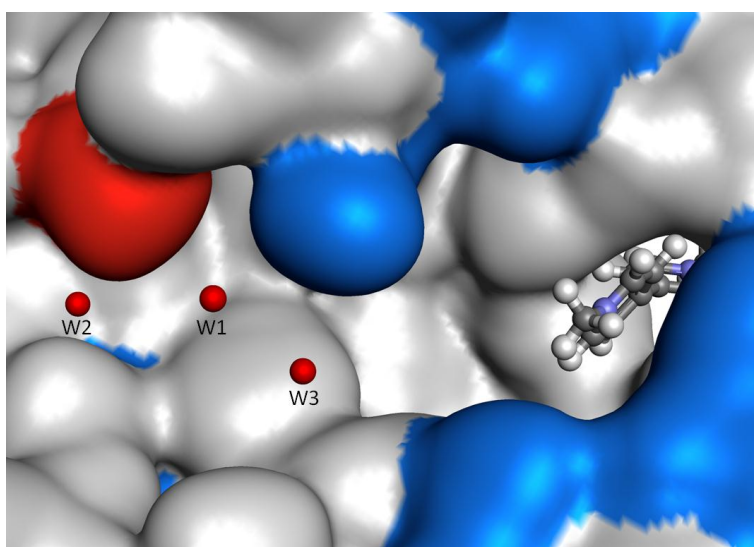


Figura 3.13 Orientação do composto Paraquate no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3.

3. 2.7 Composto Atrazina

No composto **7** o escore da orientação escolhida para realizar as análises das interações foi de -42,97 kcal/mol. A orientação escolhida é visualizada na Figura 3.14.

Foi observado que o composto atrazina se orienta no sítio da *GmGSTU4-4* através de uma interação C-H... π do átomo H7 com o resíduo de aminoácido Phe15. Neste composto também foram identificadas interações com o aminoácido carregado positivamente Lys53, através dos átomos de Cl e N do composto. Também foi observada uma ligação de H com o aminoácido Ser13. No átomo H7 do composto atrazina identificada uma interação C-H... π com aminoácido Phe15. Outras interações deste composto foram observadas nos aminoácidos: Leu37e Tyr107. No composto **7** não foram verificadas interações com as moléculas de água.

No apêndice, Tabela 3A.7 e Figura 3A.7, são apresentadas as interações mais relevantes do ligante com a proteína.

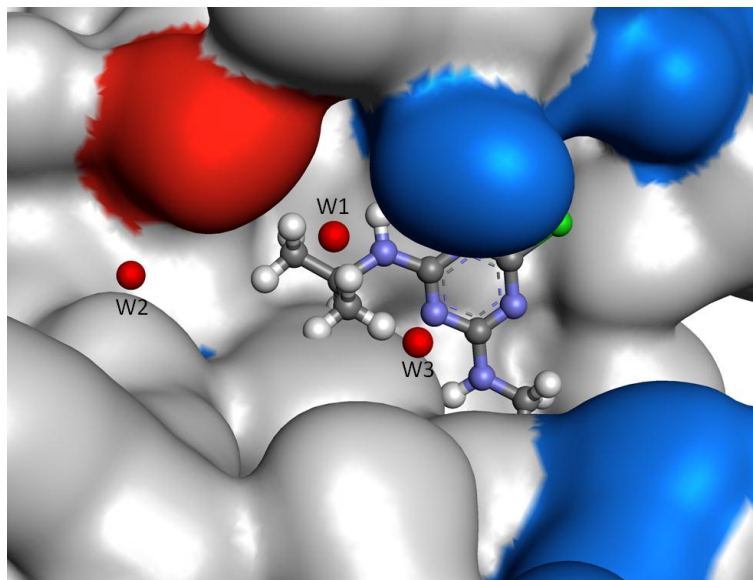


Figura 3.14 Orientação do composto Atrazina no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3.

3. 2.8 Composto Diurom

No composto **8** - diurom o escore da orientação escolhida para realização das análises de interações foi de -37,52 kcal/mol (Figura 3.15).

O composto **8** se complexa no sítio da *GmGSTU4-4* através das interações com os aminoácidos carregados positivamente Lys40 e Lys53. Assim como nos outros ligantes em que átomos de cloro estão presentes, este composto também faz interações do tipo C-H...Cl com alguns aminoácidos do sítio ativo da *GmGSTU4-4*. Foi observado, que a Lys40 interage de forma bifurcada com os dois cloros do composto **8**.

No composto diurom foi identificada uma interação com a molécula de água W3.

No apêndice, Tabela 3A.8 e Figura 3A.8, são apresentadas as interações mais relevantes do ligante com a proteína.

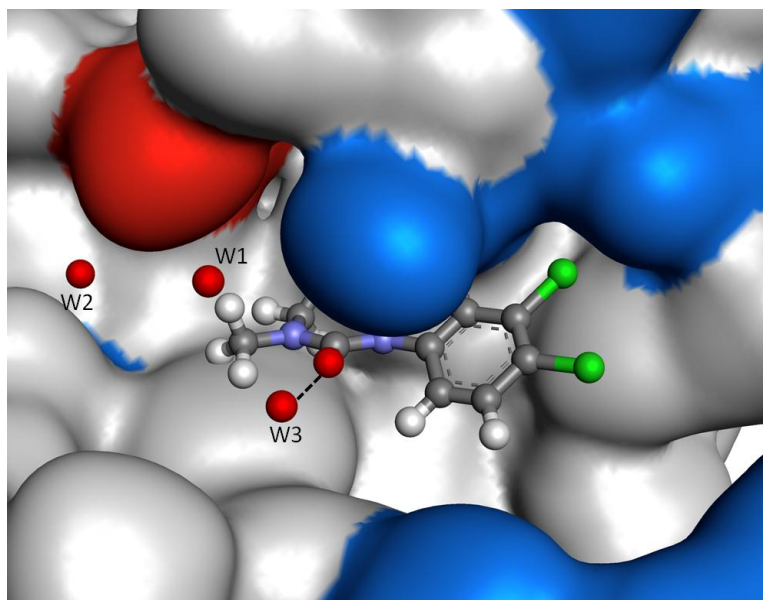


Figura 3.15 Orientação do composto **8** - Diurom no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3. Em tracejado preto a ligação de H com a molécula de água W3.

3. 2.9 Composto Bentazona

No composto **9** o escore da orientação escolhida para realizar as análises das interações foi de -37,63 kcal/mol (Figura 3.16).

Este composto realiza interações com poucos aminoácidos do sítio da *GmGSTU4-4*. São observadas interações de uma metila do grupo propila com o resíduo Ile54. Interações com o aminoácido Phe15 também foram observadas. Neste composto foi observada uma interação C-O... π do anel aromático com a Tyr107 .

No composto bentazona não foram observadas interações com as moléculas de água.

No apêndice, Tabela 3A.9 e Figura 3A.9, são apresentadas as interações mais relevantes do ligante com a proteína.

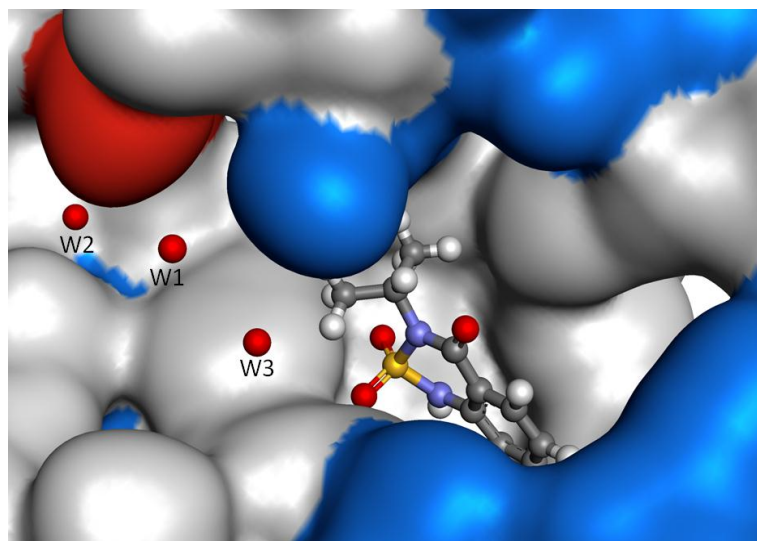


Figura 3.16 Orientação do composto **9** - Bentazona no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3.

3. 2.10 Composto Acifluorfem

No composto **10** o escore da orientação escolhida para realizar as análises das interações foi de -40,04 kcal/mol. A orientação escolhida é mostrada na Figura 3.17.

O composto acifluorfem se complexa na cavidade cilíndrica da *GmGSTU4-4* pelas interações realizadas com os aminoácidos Ile54, Leu216, Phe15, Pro55, Ser13 e Ser67. Foi observado que este composto interage com o aminoácido carregado negativamente Glu66 e com o aminoácido carregado positivamente Lys53. A presença de halogênios bem como do grupo carboxila e nitro faz com que o número e a qualidade das interações sejam interessantes. No entanto, este composto faz apenas uma interação com a molécula de água W1.

No apêndice, Tabela 3A.10 e Figura 3A.10, são apresentadas as interações mais relevantes do ligante com a proteína.

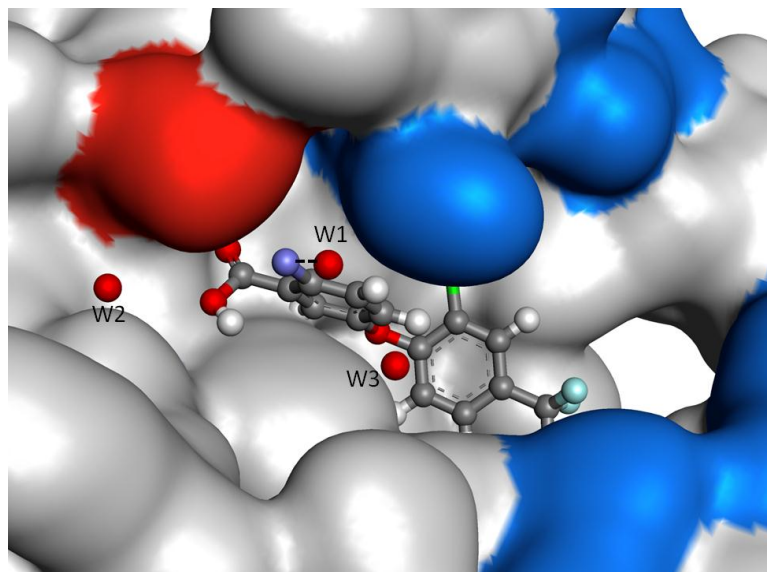


Figura 3.17 Orientação do composto Acifluorfen no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3. Em tracejado preto a ligação de H com a molécula de água W1.

3. 2.11 Composto Fomesafem

No composto **11** o escore da orientação escolhida para observação das interações foi de -56,00 kcal/mol (Figura 3.18).

O composto **11** se complexa na cavidade cilíndrica da *GmGSTU4-4* pelas interações realizadas com os aminoácidos Arg111, Ile54, Leu212, Leu216, Phe15, Ser13 e Tyr107. Foram observadas interações entre o composto fomesafem e o aminoácido carregado negativamente Glu66 e os aminoácidos carregados positivamente Lys53 e Lys215.

Este composto faz interações com duas moléculas de água, W1 e W3.

No apêndice, Tabela 3A.11 e Figura 3A.11, são apresentadas as interações mais relevantes do ligante com a proteína.

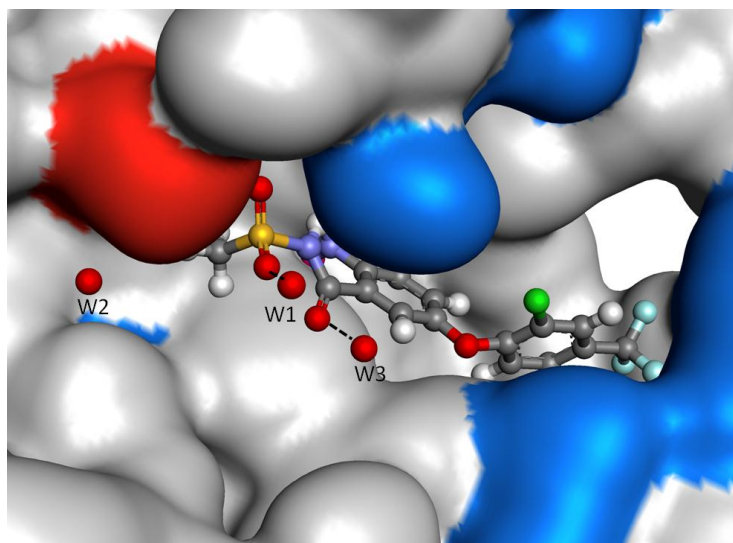


Figura 3.18 Orientação do composto **11** - Fomesafem no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3. Em tracejado preto as ligações de H com as moléculas de água W1 e W3.

3. 2.12 Composto Sulfentrazona

No composto **12** o escore da orientação escolhida para realizar as análises das interações foi de -47,60 kcal/mol. A orientação escolhida é visualizada na Figura 3.19. Após analisar as interações realizadas pelo composto **12** observou-se novamente que os átomos de cloro estão envolvidos em interações com alguns dos aminoácidos do sítio ativo da *GmGSTU4-4*, tais como: Leu212, leu216, Ser13, Trp163 e Tyr107. Outras interações do composto **12** foram observadas em outros aminoácidos: Ile54, Leu37e Lys215. Contudo, neste composto não foram verificadas interações com as moléculas de água.

No apêndice, Tabela 3A.12 e Figura 3A.12, são apresentadas as interações mais relevantes do ligante com a proteína.

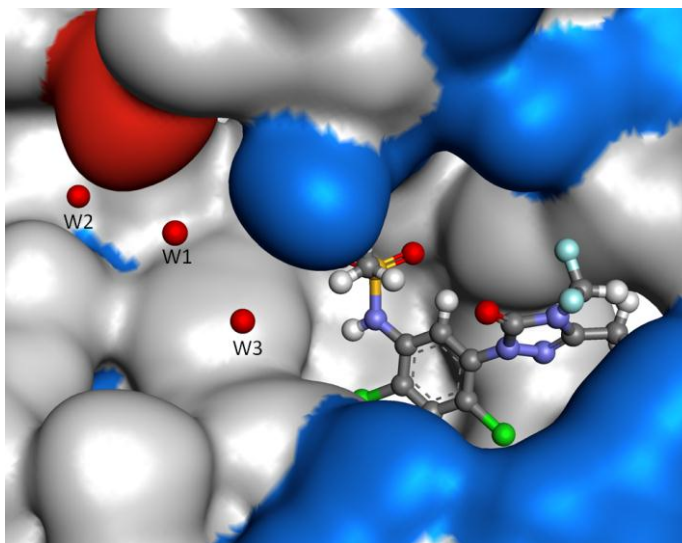


Figura 3.19 Orientação do composto Sulfentrazone no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3.

3. 2.13 Composto Clorimuron

No composto **13** o escore da orientação escolhida para realizar as análises das interações foi de -52,00 kcal/mol. A orientação escolhida é mostrada na Figura 3.20.

Este composto se complexa na cavidade cilíndrica da *GmGSTU4-4* através de interações com a Arg111, Ile54, Phe15, Pro55 e Ser67. Um dos nitrogênios do anel pirimidínico faz uma interação N... π com o anel fenila da Phe15. Este mesmo átomo de N do composto clorimuron também interage com a molécula de água W3.

No apêndice, Tabela 3A.13 e Figura 3A.13, são apresentadas as interações mais relevantes do ligante com a proteína.

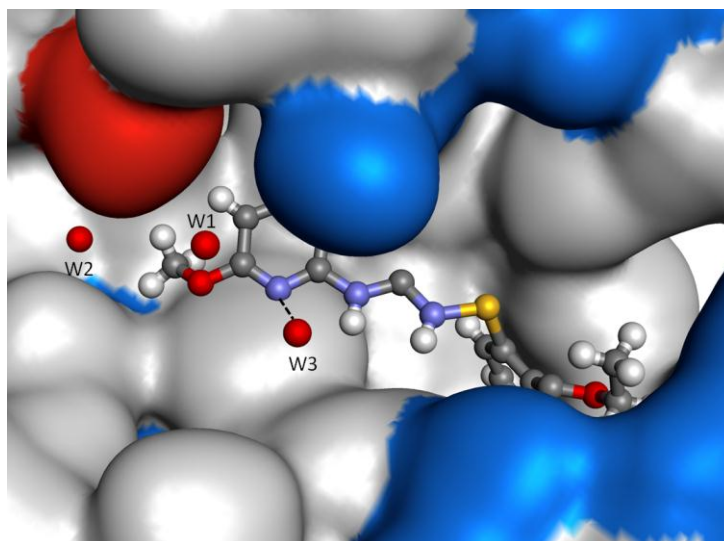


Figura 3.20 Orientação do composto **13** - Clorimuron no sítio ativo da GmGSTU4-4. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3. Em tracejado preto a ligação de H com a molécula de água W3.

3. 2.14 Composto Glifosato

No composto **14** o escore da orientação escolhida para realizar as análises das interações foi de $-43,86 \text{ kcal.mol}^{-1}$. A orientação escolhida é visualizada na Figura 3.21.

O composto glifosato se complexa na cavidade cilíndrica da *GmGSTU4-4* através de interações com os aminoácidos Ile54, Lys53, Phe15 e Ser67. Neste composto foram observadas duas ligações de H, uma com a Ile54 e outra com a molécula de água W1. Também se observou uma interação C-H... π com o átomo H3 do composto e o anel aromático da Phe15.

No apêndice, Tabela 3A.14 e Figura 3A.14, são apresentadas as interações mais relevantes do ligante com a proteína.

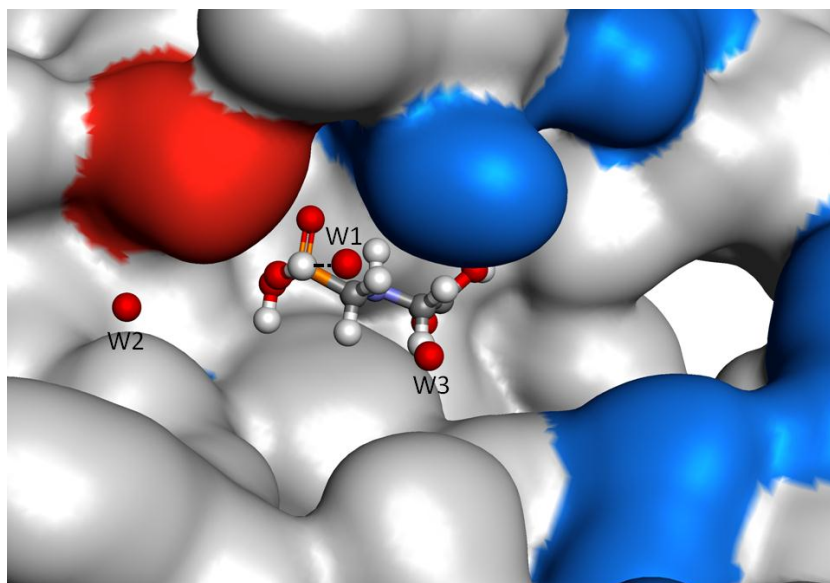


Figura 3.21 Orientação do composto **14** - Glifosato no sítio ativo da *GmGSTU4-4*. A figura em forma de superfície mostra em azul a região carregada positivamente e em vermelho a região carregada negativamente. Na entrada da cavidade estão as moléculas de água representadas como W1, W2 e W3. Em tracejado preto a ligação de H com a molécula de água W1.

3.3 Considerações e comparações sobre o posicionamento dos ligantes

Como mencionado anteriormente, o valor de escore para a maior parte dos ligantes aqui estudados, não serve por si só, para fazer uma avaliação da atividade dos mesmos.

Uma investigação por visualização molecular permitiu verificar que os compostos estudados não se comportam da mesma forma. Uma parte deles se posiciona na cavidade cilíndrica mais inserido no sítio G e outros no sítio H. Um resumo das interações é apresentado na Tabela 3.3. Nesta tabela aparecem os aminoácidos e moléculas de água W1, W2 e W3 do Sítio G e os aminoácidos do Sítio H, e também estão assinalados os que são carregados positivamente e o negativamente (azul e vermelho, respectivamente). Os ligantes das duas primeiras linhas da tabela são GTB, do complexo cristalográfico 2vo4, que é um análogo competitivo do substrato, e o próprio substrato GSH. Observa-se uma diferença significativa de comportamento, já que o inibidor GTB (possui um grupo nitrobenzil ligado à glutationa) ocupa tanto o sítio G como o sítio H (Tabela 3.3). O valor de escore de cerca de -90 kcal/mol é o resultado de todas estas interações. Já no caso do substrato GSH as interações ocorrem quase somente no sítio G, com uma interação com a Tyr107. Os ligantes Fomasafem, Cletodim, R-Diclofope, Clorimurom, S e R Fluazifope e Sulfentrazone ocupam os sítios G e

H. Os compostos Glifosato, Atrazina, Acifluorfem, por sua vez, se parecem mais ao substrato GSH, pois ocupam preferencialmente o Sítio G.

Tabela 3.3 Interações dos herbicidas com os resíduos de aminoácido GmGSTU4-4

Ligantes (Herbicidas)	Sítio G										Sítio H					Escore			
	S13	F15	R18	K40	K53	L54	E66	S67	W1	W2	W3	L37	Y107	L212	W163		L212	K215	L216
GTB (redocking)																			-88.97
GSH (cristalográfico)																			-68.78
Fomesafem																			-56.00
Cletodim																			-55.43
Diclofope (R)																			-52.65
Clorimurom																			-52.00
Fluazifope (S)																			-51.46
Fluazifope (R)																			-49.95
Sulfentrazone																			-47.60
Diclofope (S)																			-45.60
Glifosato																			-43.86
Atrazina																			-42.97
Acifluorfem																			-40,04
Bentazona																			-37.63
Diurum																			-37.52
Clomazona																			-37.52
Diquate																			-34.36
Paraquate																			-34.09

* Interações dos herbicidas com a enzima *GmGSTU4-4* avaliada por estudos de docking molecular. O sítio G da enzima é composto pelos aminoácidos (S13, F15, R18, K40, K53, L54, E66 e S67) e as moléculas de água W1, W2 e W3. As interações realizadas pelos ligantes neste sítio estão representadas em verde. O sítio H da enzima é composto pelos aminoácidos (L37, Y107, L212, W163, L212, K215 e L216). As interações realizadas pelos ligantes neste sítio estão representadas em rosa. Representados em azul os aminoácidos carregados positivamente (R18, K40, K53 e K215). Representado em vermelho o aminoácido carregado negativamente E66. Os valores de escore são apresentados em kcal/mol.

Esse resultado parece indicar que os ligantes mais extensos, podem ser mais específicos, por se ligarem no Sítio G, e ao mesmo tempo atuar no Sítio H, que é maior e mais hidrofóbico. Alguns destes ligantes realizam interações com a Tyr107, que segundo Axarli e colaboradores (2009a), está diretamente relacionada com a constante K_m (constante de Michaelis) da enzima.

Os cinco últimos compostos analisados Bentazona, Diuron, Clomazona, Diquate e Paraquate agrupados na Figura 3.22, são diferentes do inibidor GTB e do substrato GSH, pois fazem poucas interações nos dois sítios. Observando estes herbicidas percebe-se que são

menos extensos, o que pode torná-los menos específicos e menos eficientes se o alvo for a Glutathione Transferase.

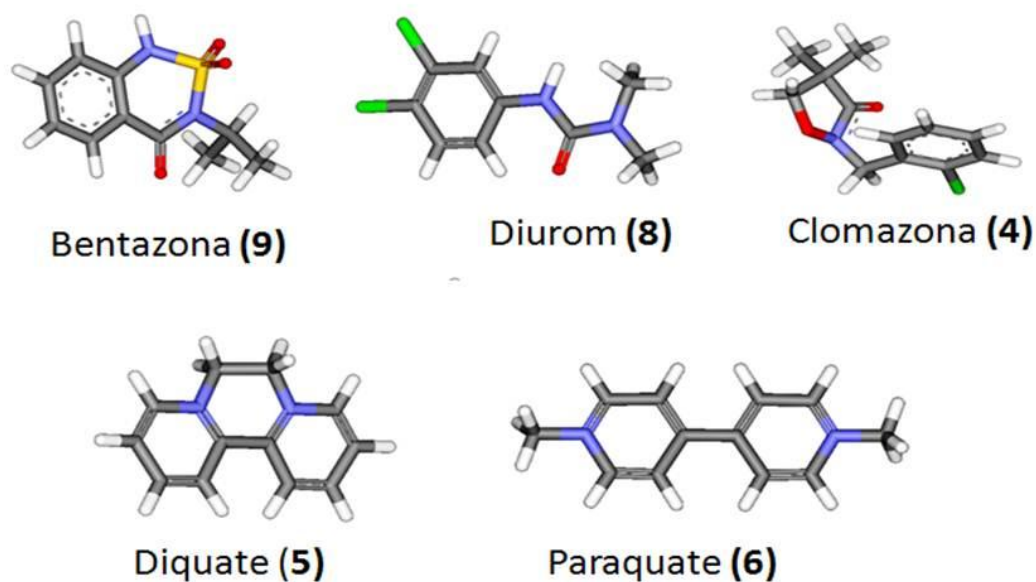


Figura 3.22 Herbicidas com comportamento diferente dos ligantes GSH e GTB.

Para os ligantes R e S Fluazifope observou-se um comportamento similar, ocupando os sítios G e H. A síntese dos compostos pode ser facilitada por não ser necessário separar os enantiômeros. Na Figura 3.23 observa-se boa sobreposição dos compostos.

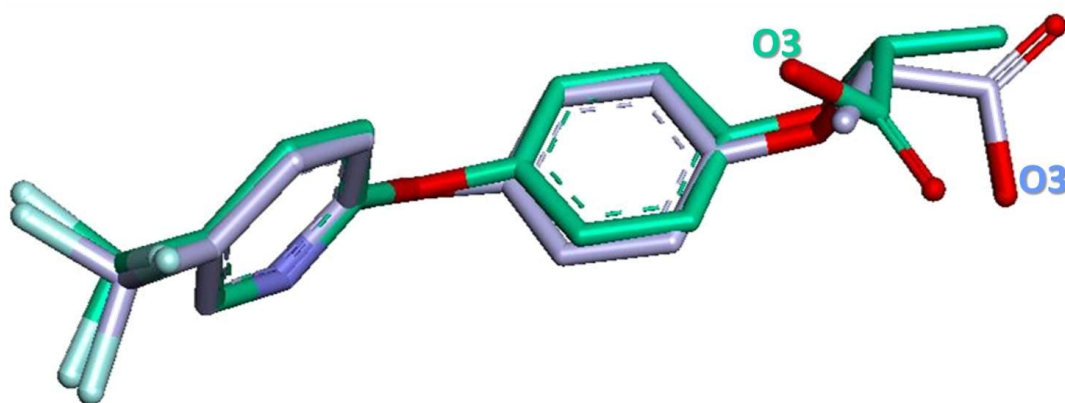


Figura 3.23 Sobreposição do ligante Fluazifope, enantiômero R (verde) e enantiômero S (azul).

No caso do herbicida Diclofope, o resultado foi diferente. Os estudos indicaram que o composto R pode ser mais promissor que o composto S. Na Figura 3.24 é apresentada a superposição das moléculas.

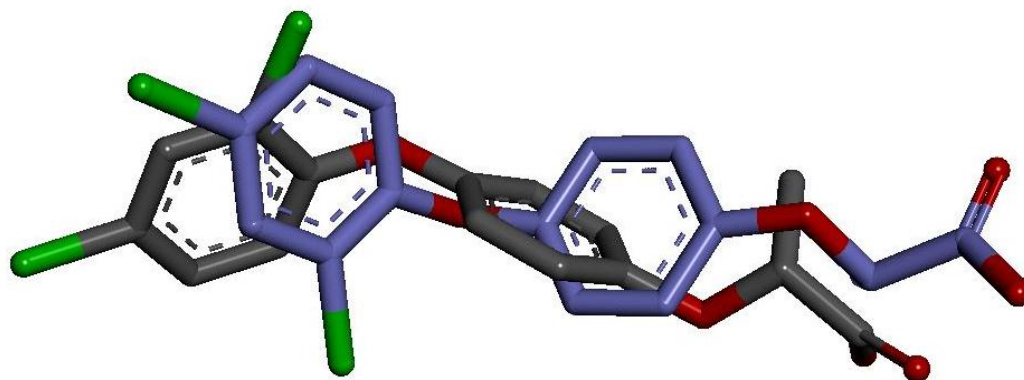


Figura 3.24 Sobreposição do ligante Diclofope, enantiômero R (cinza) e enantiômero S (azul).

O composto R, se aproxima mais do aminoácido Glu66 do que S, ou seja, ocupa mais o sítio G. Nesse caso, os nossos estudos indicaram que os dois não seriam equivalentes em termos de atividade, ou que os mecanismos de ação não seriam similares.

Capítulo 4 - Conclusões

4 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os estudos realizados permitiram obter complexos da enzima glutationa transferase da classe Tau, GSTU4-4, de soja com diferentes herbicidas, utilizando o docking.

Foram analisados o substrato e um inibidor cristalográfico, análogo do substrato, observando as interações que ocorrem entre a enzima e os ligantes. Isto permitiu conhecer os sítios G e H dentro da cavidade onde estas moléculas se posicionam.

Os dezesseis ligantes herbicidas selecionados e utilizados para os cálculos de docking tiveram suas estruturas tridimensionais obtidas de bancos de dados ou modeladas. Após estudos de visualização molecular dos complexos foi analisado quanto ao posicionamento no Sítio G e/ou H, similaridade com a posição do substrato ou com o inibidor cristalográfico.

Observou-se durante o estudo que ligantes mais extensos poderiam se posicionar ocupando os dois sítios, sendo mais específicos quando ocupam o sítio G, pois o sítio H é mais amplo. Os ligantes menores mostraram preferência pelo sítio H.

Durante todo o estudo, além dos aminoácidos, ficou evidente a necessidade de considerar as moléculas de água próximas ao aminoácido Glu66.

Os resultados do presente trabalho podem ser usados para o desenvolvimento de um futuro projeto de bioengenharia com GST para aumentar sua especificidade catalítica para certos herbicidas. Além disso, pode ajudar no desenvolvimento e formulação de herbicidas seletivos para o uso na agricultura.

Um ponto importante a ser destacado refere-se aos compostos Diclofope e Fluzifope que possuem um carbono assimétrico e, portanto dois enantiômeros, R e S. Para o herbicida Fluzifope os resultados do docking mostram que além de terem valores de escore muito similares às interações também são muito similares. Isto sugere que não é necessário investir em um processo de síntese enantioseletiva que é, normalmente, extremamente dispendiosa tanto em tempo como em custo. Assim, uma síntese racêmica seria suficiente. No caso do Diclofope, o resultado foi diferente, com uma preferência para o composto R.

As três moléculas de água do sítio G que participam de interações moleculares com vários dos herbicidas estudados mostram que o desenvolvimento de novos compostos deverá

levar em conta a importância de terem grupos químicos capazes de interagir com a água, que atua como doadora e aceptora de ligações de hidrogênio.

O desenvolvimento deste trabalho trouxe novas informações, mostrando a importância do tamanho do composto, da necessidade ou não de desenvolver processos de síntese enantioselectiva e de desenvolver compostos que possam interagir com a Tyr107 melhorando a eficiência catalítica da enzima e da importância de grupos que possam interagir com a água. Portanto, pode-se dizer que os estudos realizados podem ser a base para novos desenvolvimentos na indústria de herbicidas e para a agricultura.

Uma continuação deste trabalho deve envolver a realização de estudos de dinâmica molecular para acompanhar o processo de entrada das moléculas herbicidas no sítio ativo da enzima.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERNATLY, J. R. **Mode of action of pigment inhibitors**. In: HERBICIDE ACTION COURSE. Summary of lectures. West Lafayette: Purdue University, p. 285-296, 1994.
- AHRENS, W. H. (Ed.). **Herbicide handbook**. 7. ed. Champaign: Weed Science Society of America, 352 p., 1994.
- ANDREWS, C. J.; CUMMINS, I.; SKIPSEY, M.; GRUNDY, N. M.; JEPSON, I., TOWNSON, J., EDWARDS, R. Purification and characterization of a family of glutathione transferases with roles in herbicide detoxification in soybean (*Glycine max* L.); selective enhancement by herbicides and herbicide safeners. **Pestic. Biochem. Physiol.**, 82: p. 205-219, 2005.
- ANVISA. **Agrotóxicos e toxicologia: monografias de produtos agrotóxicos**. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm>>. Acesso em: 05 jan. 2010.
- APARICIO, M.; CUENCA, A. R.; SUÁREZ, V.; REVILLA, Z. **Nutr. Hosp.**, v. 23, n. 4, p. 305-312, 2008.
- ARYSTA LIFESCIENCE. **Select® 240 EC**. Disponível em: < <http://www.arystalifescience.com.br/globalsite/Default.aspx?tabid=86&produtoid=45>>. Acesso em: 15 fev. 2010.
- ARMSTRONG, R.N. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 10, p. 2-18, 1997.
- AXARLI, I. A., RIGDEN, D. J.; LABROU, N. E. Characterization of the ligandin site of maize glutathione S-transferase I. **Biochem. J.**, v. 382, p. 885–893, 2004.
- AXARLI, I.; DHAVALA, P.; PAPAGEORGIOU, A. C.; LABROU, N. E. Crystallographic and functional characterization of the fluorodifen - inducible glutathione transferase from *Glycine max* reveals an active site topography suited for diphenylether herbicides and a novel L-site. **J. Mol. Biol.**, v. 385, p. 984-1002, 2009a.
- AXARLI, I.; DHAVALA, P.; PAPAGEORGIOU, A.C.; LABROU, N.E. Crystal structure of *Glycine max* glutathione transferase in complex with glutathione: investigation of the mechanism operated by the tau class glutathione transferases, **Biochem. J.**, v. 422, p. 247-256, 2009b.
- BASF. **Basagran® 600**. Disponível em: < <http://www.agro.basf.com.br/UI/Produtos.aspx?CodProduto=9>>. Acesso em: 15 jan. 2010.
- BAYER CROPSCIENCE. **Iloxan® CE**. Disponível em: < <http://www.bayercropscience.com.br/site/nossosprodutos/protecaodecultivosebiotecnologia/DetalheDoProduto.fss?Produto=81>>. Acesso em: 15 jan. 2010.
- BOARD, P. G.; BAKER, R. T.; CHELVANAYAGAM, G.; JERMIIN, L. S. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. **Biochem. J.**, v. 328, p. 929-935, 1997.
- BOARD, P. G.; COGGAN, M.; CHELVANAYAGAM, G.; EASTEAL, S.; JERMIIN, L. S.; SCHULTE, G. K.; DANLEY, D. E.; HOTH, L. R.; GRIFFOR, M. C.; KAMATH, A. V.; ROSNER, M. H.; CHRUNYK, B. A.; PERREGAUX, D. E.; GABEL, C. A.; GEOGHEGAN, K. F.; PANDIT, J. Identification, Characterization, and Crystal Structure

- of the Omega Class Glutathione Transferases. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 32, p. 24798-24806, 2000.
- BOARD, P. G.; COGGAN, M.; WILCE, M. C. J.; PARKER, M. W. Evidence for an essential serine residue in the active site of the theta class glutathione transferases. **Biochem. J.**, v. 311, p. 247-250, 1995.
- BONETTI, L.P. **Distribuição da soja no mundo**. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. (Ed.). *A soja no Brasil*. Campinas: ITAL, p. 1-6, 1977.
- BOOTH, J.; BOYLAND, E.; SIMS, P. An enzyme from rat liver catalysing conjugation with glutathione. **Biochem. J.**, London, v. 79, n.3, p. 516-524, 1961.
- BOR, M.; ÖZDEMİR, F.; TÜRKAN, I. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. **Plant Sci.**, v.164, p. 77-84, 2003.
- BREAUX, E.J.; PANTANELLA, J.E.; SANDERS, E.F. Chloroacetanilide herbicide selectivity: analysis of glutathione and homoglutathione in tolerant, susceptible, and safened seedlings. **J. Agric. Food Chem.**, v.35, p. 474-478, 1987.
- BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I., D. Molecular recognition and docking algorithms. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v. 32, p. 335-373, 2003.
- BURTON, J. W. Soyabean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Field Crops Research*, v. 53, p. 171-186, 1997.
- CARACELLI, I., ZUKERMAN-SCHPECTOR, J., MAGANHI, S. H, STEFANI, H. A., GUADAGNIN, R., TIEKINK, E. R. T. 2-chlorovinyl tellurium dihalides, (p-tol)Te[C(H)=C(Cl)Ph]X₂ for X = Cl, Br and I: variable coordination environments, supramolecular structures and docking studies in cathepsin B. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, p. 2155 - 2163, 2010.
- CLARK, M.; CRAMER III, R., D.; OPDENBOSCH, N., V.. Validation of the general purpose Tripos 5.2 force field. **Journal of Computational Chemistry**, v. 10, p. 982-1012, 1989.
- COLE, D. Detoxification and activation of agrochemicals in plants. **Pest. Sci.**, v. 42, p. 209-222, 1994.
- COMBES, B.; STAKELUM, G. S. A liver enzyme that conjugates sulfobromophthalein sodium with glutathione. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v.40, n. 6, p. 981-988, 1961.
- COMPENDIUM OF PESTICIDE COMMON NAMES. **Index of common names**. Disponível em: < http://www.alanwood.net/pesticides/index_cn_frame.html>. Acesso em: 06 jan. 2010.
- CSD . **Cambridge Structural Database**. Disponível em: < <http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/csd/>>. Acesso em: 10 ago. 2009.
- DANIELSON, U. H.; MANNERVIK, B. Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat. **Biochem. J.**, v. 231, n. 2, p. 263-267, 1985.
- DIRR, H.; REINEMER, P.; HUBER, R. X-ray crystal structures of cytosolic glutathione S-transferases. Implications for protein architecture, substrate recognition and catalytic function. **Eur J. Biochem.**, v. 220, p. 645-661, 1994.

- DS Visualizer v2.5. Accelrys Software.** Disponível em: <
<http://download.accelrys.com/downloads/23f925d43a1b81213009e7bdd29b8b06/setupdsv25.exe>>. Acesso em: 10 out. 2009.
- DIXON, D. P.; COLE D. J.; EDWARDS R. Dimerisation of maize glutathione transferases in recombinant bacteria. **Plan.t Mol. Biol.**, v. 40, p. 997-1008, 1999.
- DIXON, D. P.; CUMMINS, L.; COLE, D. J.; EDWARDS, R. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. **Curr. Opin. In Plant Biol.**, v. 1, p. 258-266, 1998.
- DIXON, D. P., DAVIS, B.G., EDWARDS, E. Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. **J. Biol. Chem.**, v.277, p. 30859-30869, 2002a.
- DIXON, D. P.; LAPHORN, A.; EDWARDS, R. Plant glutathione transferases. **Genome Biol.**, v.3, p.1-10, 2002b.
- DIXON, D. P.; LAPHORN, A.; MADEISIS, P.; MUDD, E. A.; DAY, A.; EDWARDS, R. Binding and glutathione conjugation of porphyrinogens by plant glutathione transferases. **J. Biol. Chem.**, v.283, n. 29, p. 20268-20276, 2008.
- DIXON, D. P.; MCEWEN, A. G.; LAPHORN, A. J.; EDWARDS, R. Forced evolution of a herbicide detoxifying glutathione transferase. **J. Biol. Chem.** v. 278, p. 23930-23935, 2003.
- DROOG, F. Plant glutathione S-transferases, a tale of theta and tau. **J Plant Growth. Regul.**, v. 16, p. 95-107, 1997.
- DuPONT. **Classic®.** Disponível em: <
http://www2.dupont.com/DuPont_Crop_Protection/pt_BR/products/herbicida/classic.html
>. Acesso em: 10 jan. 2010a.
- DuPONT. **Karmex®.** Disponível em: <
http://www2.dupont.com/DuPont_Crop_Protection/pt_BR/products/herbicida/karmex.html
>. Acesso em: 10 jan. 2010b.
- EDWARDS, R.; DEL BUONO, D.; FORDHAM, M.; SKIPSEY, M.; BRAZIER, M.; DIXON, D. P.; CUMMINGS, I. Differential induction of glutathione transferases and glucosyltransferases in wheat, maize and Arabidopsis thaliana by herbicide safeners. **Z. Naturforsch. C.**, v. 60, p. 307-316, 2005.
- EDWARDS, R.; DIXON, D. P. **The role of glutathione transferases in herbicide metabolism.** In: COBB, A.H., KIRKWOOD, R.C. (Eds). Herbicides and their mechanisms of action. Sheffield: Sheffield Academic Press, p. 33-71, 2000.
- EDWARDS, R.; DIXON, D. P.; WALBOT, V. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and health. **Trends Plant Sci.**, v. 5, p. 193-198, 2000.
- EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de produção de soja região central do Brasil.** In: Sistemas de produção, 1, 2004. Disponível em:
<<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>>. Acesso em: 20 set. 2009.
- EMBRAPA TRIGO. **Documento online Nº 62: manejo e controle de plantas daninhas na cultura de soja,** 2006. Disponível em:
<http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do62.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2010.
- FAVALORO, B.; TAMBURRO, A.; ANGELUCCI, S.; DE LUCA, A.; MELINO, S.; DI ILIO, C.; ROTILIO, D. Molecular cloning, expression and site-directed mutagenesis of

- glutathione S-transferase from *Ochrobactrum antropi*. *Biochem. J.* v. 335, p. 573-579, 1998.
- FMC. **Boral® 500 SC**. Disponível em: <
<http://www.fmcagricola.com.br/news/detNoticia.php?idNoticia=4719&agrolink=0>>.
Acesso em: 15 fev. 2010a.
- FMC. **Gamit® 360 CS**. Disponível em: <
http://msds.fmc.com/msds/100000015406-MSDS_US-E.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2010b.
- FREAR, D. S.; SWANSON, H. R. Biosynthesis of S-(4-ethylamino-6-isopropylamino- 2-s-triazino) glutathione: partial purification and properties of a glutathione S-transferase from corn. *Phytochem.* Oxford, v. 9, p. 2123-2132, 1970.
- FROVA, C. The plant glutathione transferase gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. *Physiol. Plant.*, v. 119, p. 469-479, 2003.
- FROVA, C. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomol. Eng.*, v. 23, p. 149-169, 2006.
- GATZ, C. Chemical control of gene expression. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Mol. Biol.*, v.48, p.89-108, 1997.
- GAZZIERO, D. L. P.; PURÍSSIMO, C.; BRIGHENTI, A. M.; VOLL, E.; PRETE, C. E. C.; ADEGAS, F. S. **Resistência de plantas daninhas: tabela de classificação dos herbicidas**. Londrina: Embrapa Soja, 2000. 1 folder.
- HAYES, J.D.; FLANAGAN, J.U.; JOWSEY, I.R. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 45, p. 51-88. 2005.
- HOLT, D. C.; LAY, V. J.; CLARKE, E. D.; DINSMORE, A.; JEPSON, I.; BRIGHT, S. W. J.; GREENLAND, A. J. Characterization of the safener-induced glutathione S-transferase isoform II from maize. *Planta*, v. 196, n. 2, p. 295-302, 1995.
- HOLT, J. S.; POWLES, S. B.; HOLTUM, J. A. M. Mechanisms and agronomic aspects of herbicide resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* v. 44, p. 203-229, 1993.
- HYMOWITZ, T.; HARLAN, J. R. Introduction of soybeans to North America by Samuel Bowen in 1765. *Econ. Bot.*, v. 37, p. 371-379, 1983.
- HYMOWITZ, T., On the domestication of the soybean. *Econ. Bot.*, v. 24, p. 408-442, 1970.
- HyperChem® 5.01** Computational Chemistry, Waterloo, Ont. N2L 3X2, Canada, Hypercube Inc., 1996.
- IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em:
<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm>>.
Acesso em: 20 jan. 2010.
- ISHIKAWA, T. The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump. *Trends Biol. Sci.*, v. 17, p. 463-468, 1992.
- JI, X.; VON ROSENVINGE, E. C.; JOHNSON, W. W.; TOMAREV, S. I.; PIATIGORSKY, J.; ARMSTRONG, R. N.; GILLILAND, G. L. Three-dimensional structure, catalytic properties, and evolution of a sigma class glutathione transferase from squid, a progenitor of the lens S-crystallins of cephalopods. *Biochemistry*, v. 34, n. 16, p. 5317-5328, 1995.
- JOHNSON, K. A.; ANGELUCCI, F.; BELLELLI, A.; HERVÉ, M.; FONTAINE, J.; TSERNOGLOU, D.; CAPRON, A.; TROTTEIN, F.; BRUNORI, M. Crystal structure of

- the 28 kDa glutathione S-transferase from *Schistosoma haematobium*. **Biochemistry**, v. 42, n. 34, p. 10084-10094, 2003.
- JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R., C.. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. **J. Mol. Biol.**, v. 245, p. 43-53, 1995.
- JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R., C.; LEACH, A., R.; TAYLOR, R.. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **J. Mol. Biol.**, v. 267, 727-748, 1997.
- KAMPRANIS, S. C.; DAMIANOVA, R.; ATALLAH, M.; TOBY, G.; KONDI, G.; TSICHLIS, P. N. MAKRIS, A. M. A novel plant glutathione S-transferase/peroxidase suppresses Bax lethality in yeast. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 38, p. 29207-29216, 2000.
- KARAVANGELI, M.; LABROU, N. E.; CLONIS, Y.D.; TSAFTARIS, A. Development of transgenic tobacco plants overexpressing maize glutathione S-transferase I for chloroacetanilide herbicides phytoremediation. **Biomolecular Engineering**, v.22, p. 121-128, 2005.
- KREUZ, K.; TOMMASINI, R.; MARTINOIA, E. Old enzymes for a new job. Herbicide detoxification in plants. **Plant Physiol.**, v.111, n. 2, p. 349–353, 1996.
- LOYALL, L.; UCHIDA, K.; BRAUN, S.; FURUYA, M.; FROHNMEYER, H. glutathione and a UV light–induced glutathione s-transferase are involved in signaling to chalcone synthase in cell cultures. **Plant Cell**. v. 12, p. 1939-1950, 2000.
- MANNERVIK, B.; DANIELSON, U. H. Glutathione transferases-structure and catalytic activity. **CRC Crit. Rev. Biochem.**, v. 23, p. 283-337, 1988.
- MARRS, K.A. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, v.47, p.127–158, 1996.
- McGONIGLE, B.; KEELER, S. J.; LAU, S.-L. C., KOEPPE, M. K.; O'KEEFE, D. P. A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize. **Plant Physiol.**, v.124, p. 1105-1120, 2000.
- McLELLAN, L. I.; WOLF, C. R. Glutathione and glutathione-dependent enzymes in cancer drug resistance. **Drug Resist. Update**, v. 2, p. 153-164, 1999.
- MIRANDA, M.,N.. **Algoritmos Genéticos: Fundamentos e Aplicações**. Grupo de Teleinformática e Automação – UFRJ, 2000.
- MIYASAKA, S.; MEDINA, J. C. **A soja no Brasil**. São Paulo: ITAL, 174 p., 1981.
- MONSANTO. **Roundup®**. Disponível em:
<<http://www.monsanto.com.br/produtos/herbicidas/roundup/roundup.asp>>. Acesso em: 15 jan. 2010.
- MUELLER, L. A.; GOODMAN, C. D.; SILADY, R. A.; WALBOT, V. AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. **Plant Physiol.**, v. 123, p. 1561-1570, 2000.
- NEUEFEIND, T.; HUBER, R.; DASENBROCK, H.; PRADE, L.; BIESELER, B. Crystal structure of herbicide-detoxifying maize glutathione S-transferase-I in complex with lactoylglutathione: evidence for an induced-fit mechanism. **J. Mol. Biol.**, London, v. 274, n. 4, p. 446-453, 1997a.
- NEUEFEIND, T.; HUBER, R.; REINEMER, P.; KNÄBLEIN, J.; PRADE, L.; MANN, K.; BIESELER, B. Cloning, sequencing, crystallization and X-ray structure of glutathione S-

- transferase-III from *Zea mays* var. *mutin*: a leading enzyme in detoxification of maize herbicides. **J Mol Biol.**, v. 274, p. 577-587, 1997b.
- NORTOX. **Atrazina® 500 SC**. Disponível em: <http://www.nortox.com.br/imagens/produtos/atrazina_bula.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2010a.
- NORTOX. **Clorimuron Master®**. Disponível em: <http://www.nortox.com.br/imagens/produtos/clorimuron_ficha.pdf>. Acesso em: 15 fev. 2010b.
- OLIVEIRA, C.D.; CARACELLI, I.; TRSIC, M. A docking approach for the deposition of perylene derivatives on a water surface. **Mat. Chem. Phys.**, v. 80, p. 457-460, 2003.
- ÖZTETIK, E. A tale of plant glutathione S-transferases: since 1970. **Bot. Rev.**, v. 74, p. 419-437, 2008.
- OWEN, M. D. K.; ZELAYA, I. A. Herbicide-resistant crops and weed resistance to herbicides. **Pest. Manag. Sci.**, v. 61, p. 301-311, 2005.
- OWEN, W.J. Herbicide metabolism as a basis for selectivity. In: ROBERTS, T. (Ed). *Metabolism of agrochemicals in plants*. **Chichester: Wiley**, p. 211-258, 2000.
- PDB. **Protein Data Bank**. Disponível em: <<http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2VO4>>. Acesso em: 14 abr. 2009.
- PDBsum. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/GetPage.pl>>. Acesso em: 14 abr. 2009.
- PEMBLE, S. E.; SCHROEDER, K. R.; SPENCER, S. R.; MEYER, D. J.; HALLIER, E.; BOLT, H. M.; KETTERER, B.; TAYLOR, J. B. Human glutathione S-transferase Theta (GSTT1) - cDNA cloning and characterization of a genetic polymorphism. **Biochem. J.**, v. 300, p. 271-276, 1994.
- PETERSON, D. A.; THOMPSON, C. R.; REGEHR, D. L.; AL-KHATIB, K. Herbicide **Mode of Action**. Kansas State University. p.1-24, 2001.
- RADETSKI, C. M.; COTELLE, S.; FÉRARD, J. F. Classical and biochemical endpoints in the evaluation of phytotoxic effects caused by the herbicide trichloroacetate. **Environ. Exp. Bot.**, v. 44, p. 221-229, 2000.
- RANSON, H.; COLLINS, F.; HEMINGWAY, J. The role of alternative mRNA splicing in generating heterogeneity within the *Anopheles gambiae* class I glutathione S-transferase family. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA.** v. 95, p. 14284-14289, 1998.
- RANSON, H.; PRAPANTHADARA, L.; HEMINGWAY, J. Cloning and characterization of two glutathione S-transferase from a DDT – resistant strain of *Anopheles gambiae*. **Biochem. J.**, v. 324, p. 97-102, 1997.
- REETZ, E.; CORRÊA, S.; VENCATO, A.; ROSA, G. R.; RIGON, L.; BELING, R. **R. Anuário Brasileiro da Soja**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 136 p., 2006.
- REINEMER, P.; PRADE, L.; HOF, P.; NEUEFEIND, T.; HUBER, R.; ZETTL, R.; PALME, K.; SCHELL, J.; KOELLN, I.; BARTUNIK, H. D.; BIESELER, B. Three-dimensional structure of glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana* at 2.2 Å resolution:

- structural characterization of herbicide-conjugating plant glutathione S-transferases and a novel active site architecture. **J. Mol. Biol.**, v. 255, p. 289-309, 1996.
- RODRIGUES, B. N.; PITELLI, R. A. Quebra de dormência em sementes de *Commelina benghalensis*. **Planta Daninha**, v.12, p.106-110, 1994.
- ROMAN, E.S. **Estresses ocasionados por fitotoxicidade de herbicidas**. In: BONATO, E.R. (Ed). Estresses em soja. Passo Fundo: Embrapa Trigo, p.103-143, 2000.
- ROSSJOHN, J.; MCKINSTRY, W. J.; OAKLEY, A. J.; VERGER, D.; FLANAGAN, J.; CHELVANAYAGAM, G.; TAN, K. L.; BOARD, P. G.; PARKER, M. W. Human theta class glutathione transferase : the crystal structure reveals a sulfate-binding pocket within a buried active site. **Structure**, v. 6, n. 3, p. 309-322, 1998.
- SANDERMANN, H. Plant metabolism of xenobiotics. **Trends Biol., Sci.** v. 17, p. 82-84, 1992.
- SCHRODER, K. R.; HALLIER, E.; MEYER, D. J.; WIEBEL, F. A.; MULLER, A. M. F.; BOLT, H. M. Purification and characterization of a new glutathione S-transferase, class theta, from human erythrocytes. **Arch. Toxicol.**, v. 70, p. 559-566, 1996.
- SHANER, D. L. Herbicide safety relative to common targets in plants and mammals. **Pest Manag. Sci.**, v. 60, p. 17-24, 2003.
- SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V. M.; DOWD, C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochem. J.**, v.360, 1-16, 2001.
- SHIMABUKURO, R. H.; SWANSON, H. R.; WALSH, W. C. Glutathione conjugation: Atrazine detoxication mechanism in corn. **Plant Physiol.**, v. 46, p. 103-107, 1970.
- SINNING, I.; KLEYWEGT, G. J.; COWAN, S. W.; REINEMER, P.; DIRR, H. W.; HUBER, R.; GILLILAND, G. L.; ARMSTRONG, R. N.; JI, X.; BOARD, P. G.; OLIN, B.; MANNERVIK, B.; JONES, T. A. Structure determination and refinement of human alpha class glutathione transferase A1-1, and a comparison with the mu and pi class enzymes. **J. Mol. Biol.**, v. 232, p. 192-212, 1993.
- SOMMER, A.; BÖGER, P. Characterization of recombinant corn glutathione S-transferases isoforms I, II, III, and IV. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 63, p. 127-138, 1999.
- SORANZO, N.; SARI GORLA, M.; MIZZI, L.; DE TOMA, G.; FROVA, C. Organisation and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family. **Mol. Gen. Genomics**, v. 271, p. 511-521, 2004.
- SUPER HAPTEN DATABASE**. Disponível em: <
<http://bioinformatics.charite.de/superhaptent/>>. Acesso em: 15 fev. 2010.
- SWAIN, T.. Secondary compounds as protective agents. **Annu. Rev. Plant Physiol.**, v. 28, p. 479-501, 1977.
- SYNGENTA. **Flex®**. Disponível em: <
<http://www.servicos.syngenta.com.br/website/produtos-e-marcas/protecao-de-cultivos/produtos/produto/especificacaoestecnicas.aspx?ShowLink=0& IdProduto=47>>. Acesso em: 15 fev. 2010a.
- SYNGENTA. **Fusilade® 250 EW**. Disponível em: <
<http://www.servicos.syngenta.com.br/produtos/ProductDetails.aspx?idProduct=72>>. Acesso em: 15 fev. 2010b.

- SYNGENTA. **Gramoxone® 200**. Disponível em: <
<http://www.servicos.syngenta.com.br/produtos/ProductDetails.aspx?idProduct=230>>.
Acesso em: 15 fev. 2010c.
- SYNGENTA. **Reglone®**. Disponível em: <
<http://www.servicos.syngenta.com.br/produtos/ProductDetails.aspx?idProduct=233>>.
Acesso em: 15 fev. 2010d.
- TAYLOR, R. D.; JEWSBURY, P. J.; ESSEX, J. W. A review of protein–small molecule docking methods. **J. Comput. Aided. Mol. Des.**, 2002;16:151–166.
- TEW, K. D. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. **Cancer Research**, v. 54. p. 4313-4320, 1994.
- THOM, R.; CUMMINS, I.; DIXON, D. P.; EDWARDS, R.; COLE, D. J.; LAPHORN, A. J. Structure of a tau class glutathione S-transferase from wheat active in herbicide detoxification. **Biochemistry**, v. 41, v.22, p. 7008-7020, 2002.
- TOMAREV, S. I.; CHUNG, S.; PIATIGORSKY, J. Glutathione S-transferase and S-crystallins of cephalopods: evolution from active enzyme to lens-refractive proteins. **J. Mol. Evol.**, v. 41, p. 1048-1056, 1995.
- UOTILA, M.; GULLNER, G.; KÖMIVES, T. Induction of glutathione S-transferase activity and glutathione level in plants exposed to glyphosate. **Physiol. Plant.**, v. 93, p.689- 694, 1995.
- USDA. **World Agricultural Supply and Demand Estimates**. Disponível em: <
<http://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>>. Acesso em: 01 jun. 2010.
- VENCATO, A.; ROSA, G. R.; RIGON, L.; CORRÊA, S.; REETZ, E.; BELING, R. R.; SANTOS, C. **Anuário Brasileiro de Soja**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz. 136p. 2005.
- VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MURRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v.52, p.609-623, 2003.
- VUILLEUMIER, S.; PAGNI, M. The elusive roles of bacterial glutathione S transferases: new lessons from genomes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.58, p. 138-146, 2002.
- ZHU, J.; PATZOLDT, W. L.; RADWAN, O.; TRANEL, P. J.; CLOUGH, S. J. Effects of photosystem-II-interfering herbicides atrazine and bentazon on the soybean transcriptome. **The Plant Genome**, v. 2, p. 191-205, 2009.
- WAGNER, U.; EDWARDS, R.; DIXON, D. P.; MAUCH, F. Probing the diversity of the Arabidopsis glutathione S-transferase gene family. **Plant Mol. Biol.**, v. 49, p. 515-532, 2002.
- WILCE, M. C. J.; BOARD, P. G.; FEIL, S. C.; PARKER, M. W. Crystal structure of a theta-class glutathione transferase. **EMBO J.**, v. 14, p. 2133-2143, 1995.
- WILCE, M. C. J.; PARKER, M. W. Structure and function of glutathione S-transferases. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1205, p.1-18, 1994.

APÊNDICE DO CAPÍTULO 3

Este apêndice apresenta as tabelas de interações e as figuras com as principais interações dos compostos estudados.

Ligante 1: (R) - Diclofope

Tabela 3A1.a Principais interações entre os resíduos de *GmGSTU4-4* e os átomos da orientação selecionada do composto (R) - Diclofope

Átomos	Distância (Å)	Átomo 1	Átomo 2
Cl1 - LEU212:HD22	2.94	Cl1	HD22
Cl1 - LEU212:HD23	3.02	Cl1	HD23
Cl1 - LEU216:HG	2.42	Cl1	HG
Cl1 - LEU216:HD21	2.78	Cl1	HD21
Cl1 - LEU216:HD22	3.11	Cl1	HD22
O1 - LEU37:HD13	2.78	O1	HD13
O2 - LYS53:HD2	2.13	O2	HD2
H10 - ILE54:O	2.63	H10	O
H12 - ILE54:O	2.09	H12	O
Cl2 - SER13:HA	2.89	Cl2	HA
Cl2 - TRP163:HZ2	2.81	Cl2	HZ2
Ligações de Hidrogênio			
W1 - O4	2.62	O	O4
W3 - O2	3.09	O	O2
H9 - GLU66:OE2	2.34	H9	OE2

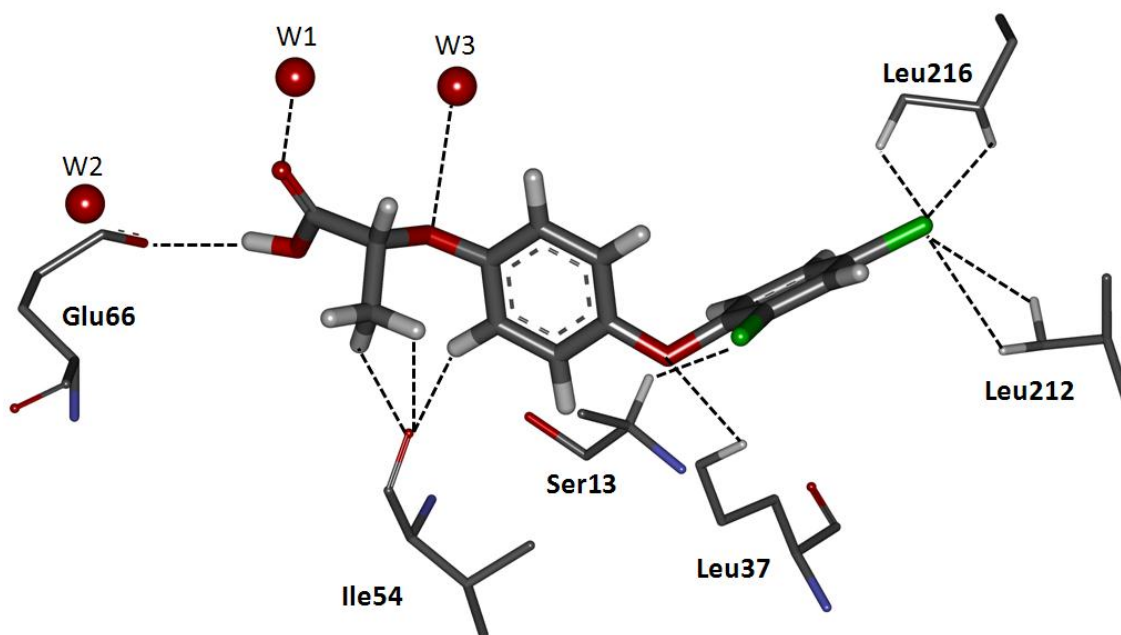
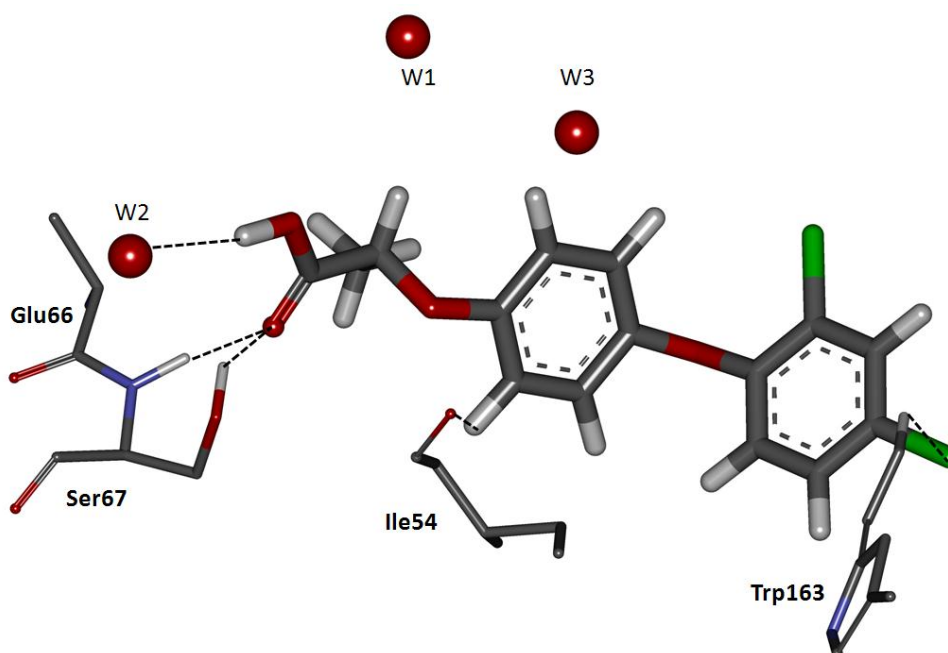


Figura 3A1.a Algumas interações entre a molécula (R) - diclofope no sítio de ligação da glutatona *GmGSTU4-4*.

Ligante 1: (S) - Diclofope**Tabela 3A1.b** Principais interações entre os resíduos de *GmGSTU4-4* e os átomos da orientação selecionada do composto (S) - Diclofope

Átomos	Distância (Å)	Átomo 1	Átomo 2
Cl1 - TRP163:HH2	2.47	Cl1	HH2
H6 - ILE54:O	2.21	H6	O

Ligações de Hidrogênio			
SER67:HN - O4	1.77	HN	O4
A:SER67:HG - O4	1.82	HG	O4
H9 - W2	2.20	H9	O

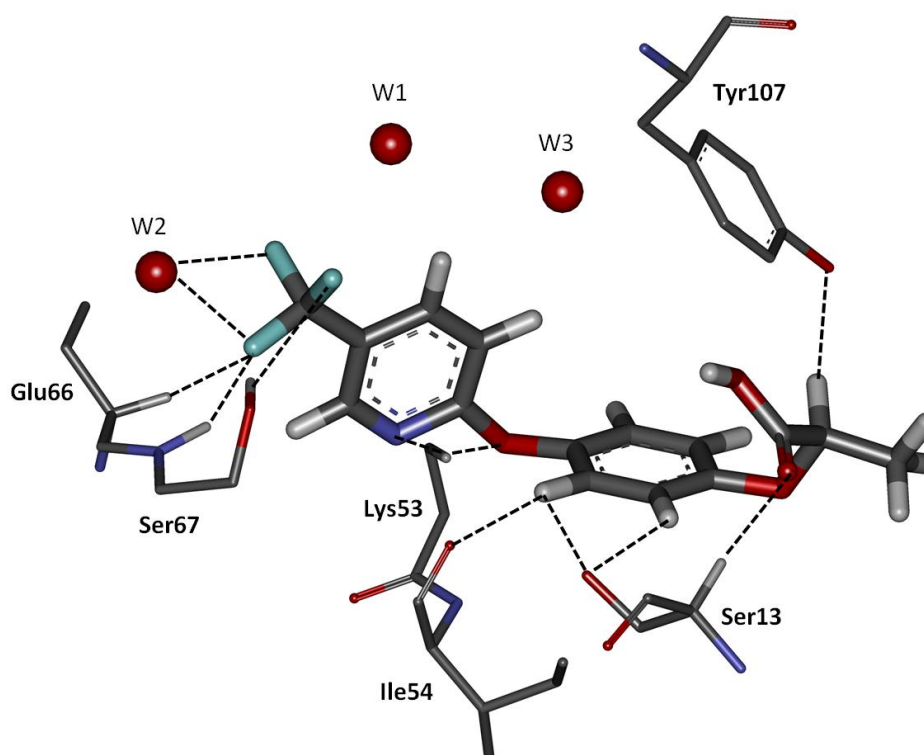
**Figura 3A1.b** Algumas das ligações do Composto (S) – Diclofope complexado com a *GmGSTU4-4*.

Ligante 2: (R) - Fluazifope**Tabela 3A2.a** Principais interações entre os resíduos de *GmGSTU4-4* e os átomos da orientação selecionada do (R) -Fluazifope

Átomos	Distância (Å)	Átomo 1	Átomo 2
H7 - A:SER13:OG	2.72	H7	OG
H7 - ILE54:O	2.70	H7	O
O1 - LYS53:HB2	2.05	O1	HB2
O1 - LYS53:HD2	2.53	O1	HD2
N - LYS53:HB2	2.79	N	HB2
H6 - SER13:OG	2.35	H6	OG
F2 - PHE15:HD1	2.45	F2	HD1
F2 - SER67:HG	2.55	F2	HG
F3 - GLU66:HA	2.97	F3	HA
O4 - SER13:HA	2.35	O4	HA
O4 - TRP163:HZ2	2.05	O4	HZ2
O3 - PHE15:HE2	2.88	O3	HE2
H8 - TYR107:OH	2.82	H8	OH

Ligações de Hidrogênio

F3 - SER67:HN	1.82	F3	HN
F3 - SER67:HG	1.37	F3	HG
W2 - F3	2.57	O	F3
W2 - F1	3.08	O	F1

**Figura 3A2.a** (R) - Fluazifope no sítio *GmGSTU4-4*. São apresentadas algumas interações do composto **2** em linha tracejada preta

Ligante 2: (S) - Fluazifope

Tabela 3A2.b Principais interações entre os resíduos de *GmGSTU4-4* e os átomos da orientação selecionada do enantiômero composto (S) - Fluazifope

Átomos	Distância (Å)	Átomo 1	Átomo 2
H7 - SER13:OG	2.84	H7	OG
H7 - ILE54:O	2.29	H7	O
O1 - LYS53:HB2	1.90	O1	HB2
O1 - LYS53:HD2	2.43	O1	HD2
N - LYS53:HB2	2.83	N	HB2
N - A:PRO55:HD1	2.58	N	HD1
H6 - SER13:OG	2.00	H6	OG
F3 - PHE15:HD1	2.32	F3	HD1
F3 - PHE15:HE1	2.81	F3	HE1
F3 - ARG18:HH12	2.98	F3	HH12
F3 - SER67:HG	2.58	F3	HG
O4 - TRP163:HH2	2.73	O4	HH2
O4 - LEU216:HD21	2.65	O4	HD21
O3 - TRP163:HZ2	2.62	O3	HZ2
H10 - TYR107:OH	2.63	H10	OH

Ligações de Hidrogênio

SER67:HN - F1	1.87	HN	F1
SER67:HG - F1	1.06	HG	F1
W2 - F1	2.64	O	F1

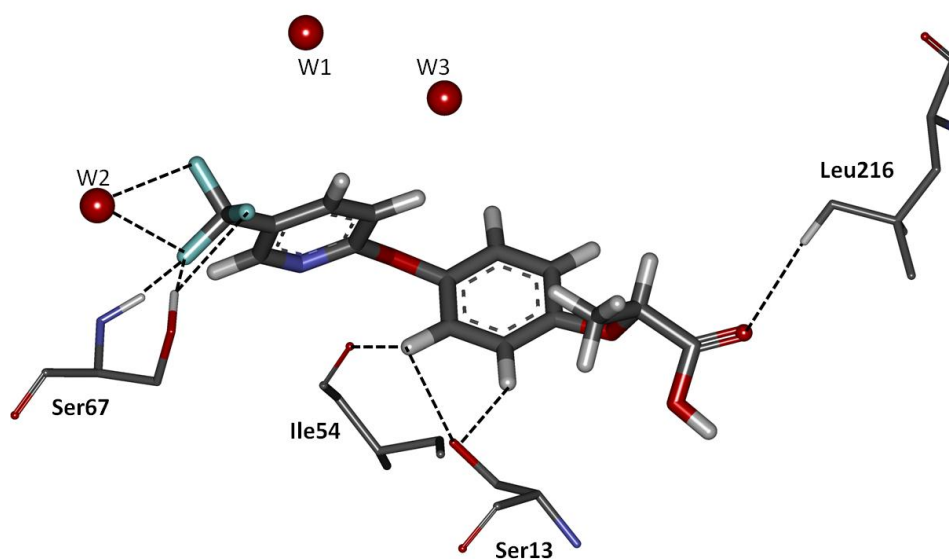


Figura 3A2.b (S) - Fluazifope no sítio *GmGSTU4-4*. São representadas algumas interações do composto 2 em linha tracejada preta e também algumas interações com as moléculas de água W2.

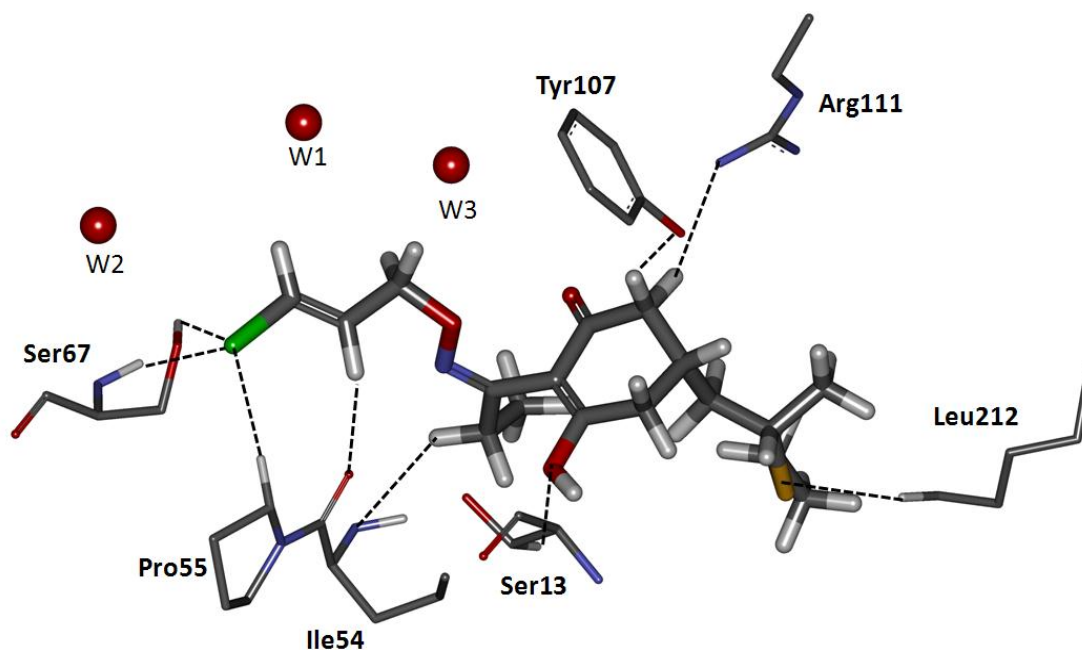
Ligante 3: Cletodim

Tabela 3A.3 Principais interações entre *GmGSTU4-4* e os átomos da orientação selecionada do composto Cletodim

Átomos	Distância (Å)	Átomo 1	Átomo 2
H14 - TYR107:OH	2.32	H14	OH
H15 - ARG111:NH1	2.97	H15	NH1
O1 - LYS53:HZ3	2.83	O1	HZ3
N1 - LYS53:HB2	2.99	N1	HB2
N1 - LYS53:HD2	2.71	N1	HD2
H5 - ILE54:N	2.67	H5	N
O3 - PHE15:HD2	2.79	O3	HD2
H11 - ILE54:O	2.59	H11	O
O2 - SER13:HB1	2.61	O2	HB1
O2 - ILE54:HD11	2.42	O2	HD11
S1 - LEU212:HD23	2.87	S1	HD23
Cl - PHE15:HB2	2.61	Cl	HB2
Cl - PRO55:HD1	2.57	Cl	HD1
Cl - SER67:HB2	2.95	Cl	HB2

Ligações de Hidrogênio

Cl - SER67:HN	2.16	Cl	HN
Cl - SER67:HG	2.42	Cl	HG

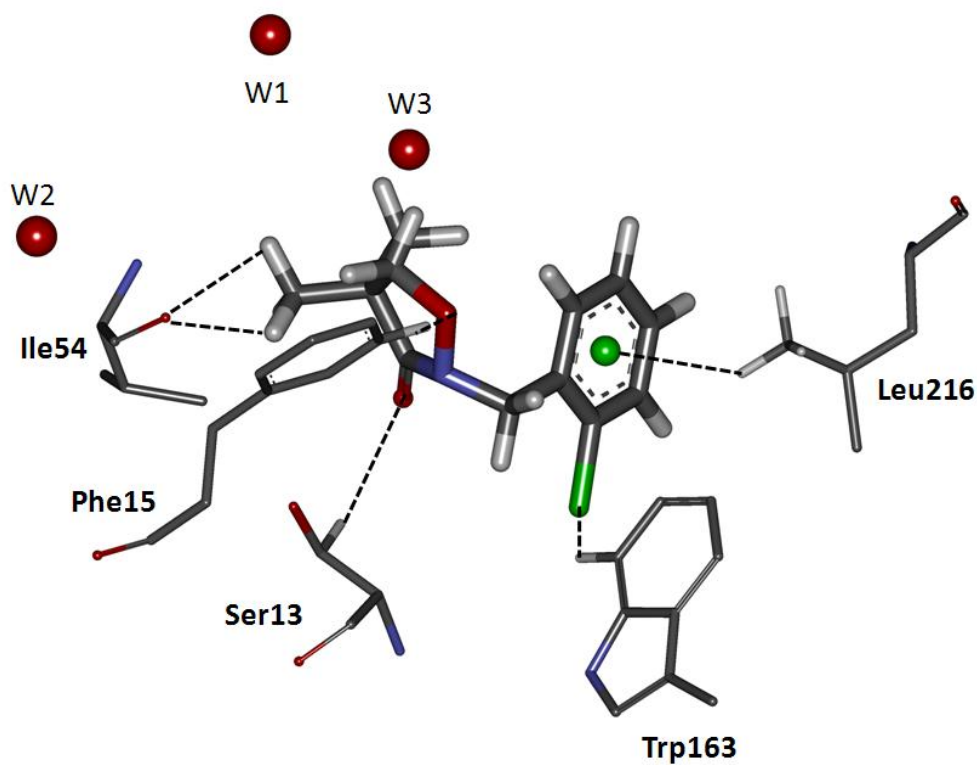
**Figura 3A.3** Algumas interações do composto Cletodim com os resíduos da *GmGSTU4-4* em linha tracejada preta.

Ligante 4: Clomazona

Tabela 3A.4 Principais interações entre os resíduos de *GmGSTU4-4* e os átomos da orientação selecionada do composto Clomazona

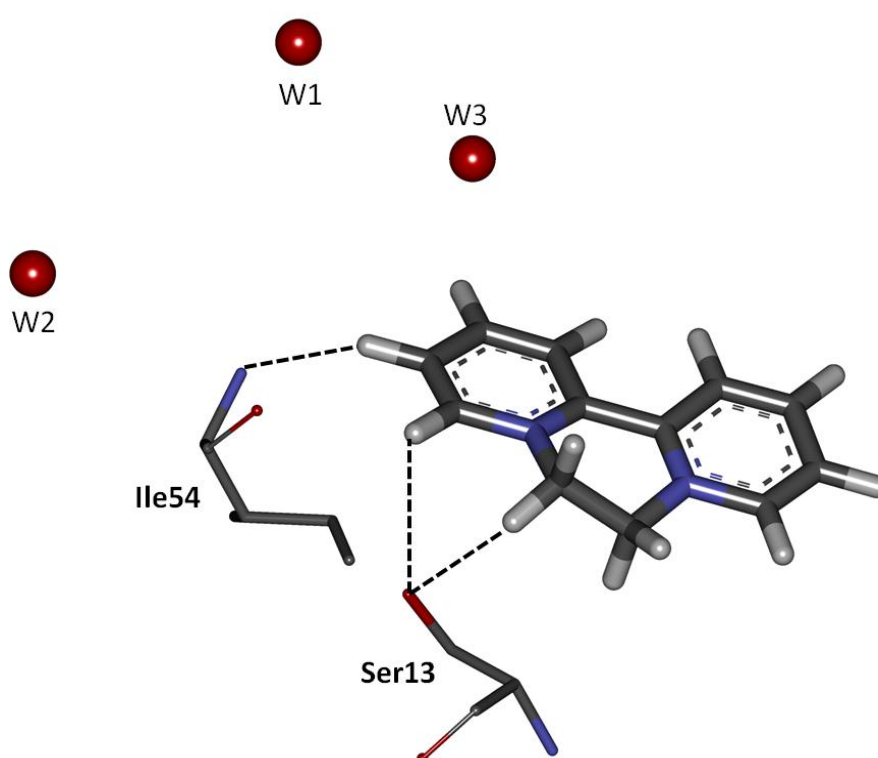
Átomos	Distância (Å)	Átomo 1	Átomo 2
H6 - TYR107:OH	2.45	H6	OH
Cl - TRP163:HZ2	2.56	Cl	HZ2
H5 - TYR107:OH	2.35	H5	OH
N - PHE15:HD2	2.85	N	HD2
O1 - PHE15:HD2	2.85	O1	HD2
O1 - PHE15:HE2	2.31	O1	HE2
H2 - ILE54:O	2.52	H2	O
H3 - ILE54:O	2.25	H3	O
H1 - ILE54:O	2.47	H1	O
O2 - SER13:HB1	2.78	O2	HB1
O2 - ILE54:HD11	2.78	O2	HD11

Centróide	
HD21 - Leu216/Ct	2.85

**Figura 3A.4** Composto Clomazona complexado com a *GmGSTU4-4*. Algumas interações do composto com os resíduos da enzima em linha tracejada preta. O centróide está representado em verde mostrando a interação C-H... π entre o composto e o resíduo Leu216.

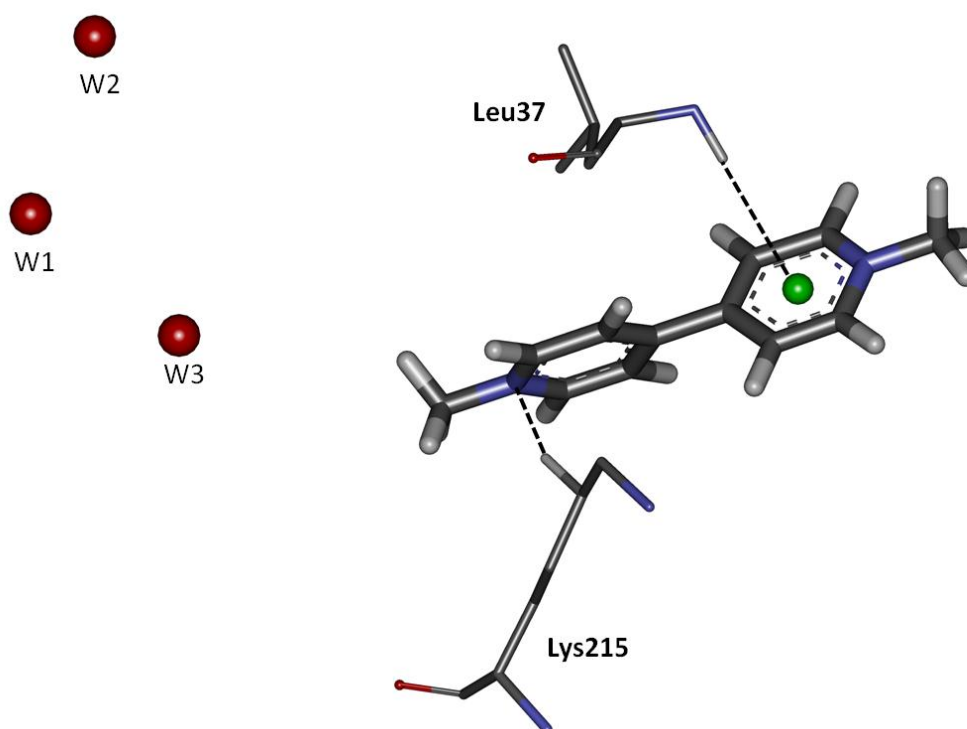
Ligante 5: Diquate**Tabela 3A.5** Principais interações entre os resíduos de *GmGSTU4-4* e os átomos da orientação selecionada do composto Diquate

Átomos	Distância (Å)	Átomo 1	Átomo 2
H9 - SER13:OG	2.22	H9	OG
H7 - SER13:OG	2.85	H7	OG
H6 - ILE54:O	2.24	H6	O

**Figura 3A.5** Ligante Diquate e as interações com os resíduos da *GmGSTU4-4* em linha tracejada preta.

Ligante 6: Paraquate**Tabela 3A.6** Principais interações entre os resíduos de *GmGSTU4-4* e os átomos da orientação selecionada do composto Paraquate

Átomos	Distância (Å)	Átomo 1	Átomo 2
N1 - LYS215:HD2	3.02	N1	HD2
Centróide			
HN1:LEU37 - Ct	2.89		

**Figura 3A.6** Composto Paraquate e algumas interações com os resíduos da *GmGSTU4-4* em linha tracejada preta.

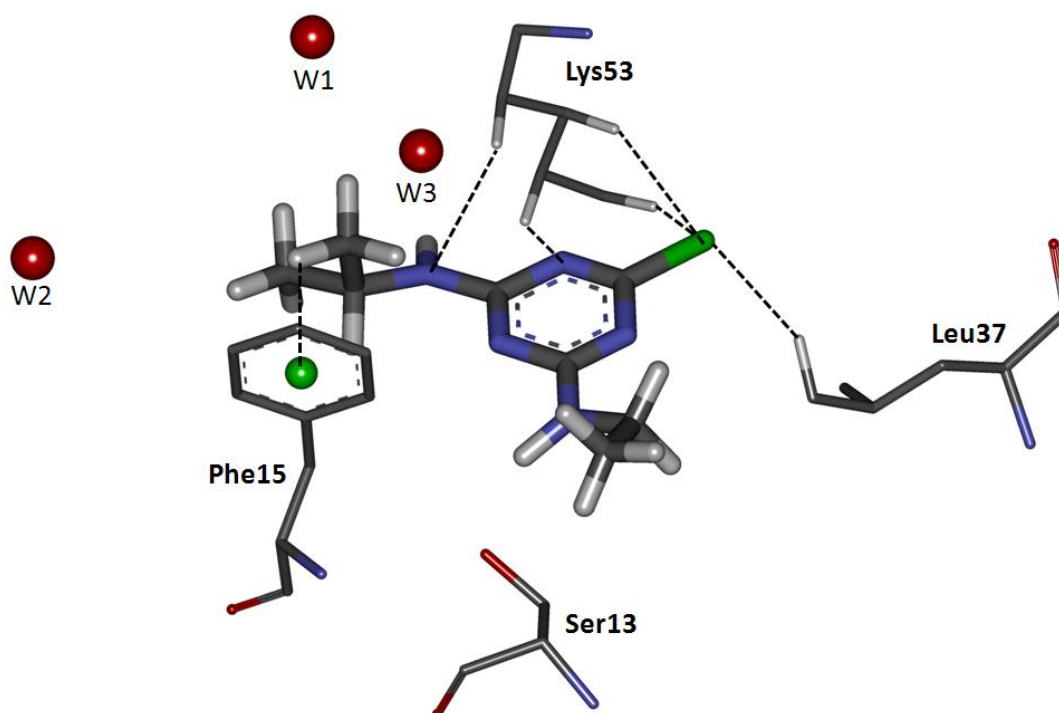
Ligante 7: Atrazina

Tabela 3A.7 Principais interações entre os resíduos de GmGSTU4-4 e os átomos da orientação selecionada do composto Atrazina

Átomos	Distância (Å)	Átomo 1	Átomo 2
N2 - LYS53:HB2	2.02	N2	HB2
N5 - LYS53:HD2	2.71	N5	HD2
N4 - PHE15:HD2	2.67	N4	HD2
Cl - :LEU37:HD12	2.53	Cl	HD12
Cl - LYS53:HA	2.92	Cl	HA
Cl - LYS53:HG1	2.74	Cl	HG1
H12 - TYR107:OH	2.69	H12	OH

Ligações de Hidrogênio			
H14 - SER13:OG	2.33	H14	OG

Centróide	
H7-Ct-PHE15	2.53

**Figura 3A.7** Composto Atrazina complexado com a *GmGSTU4-4*. Algumas interações do composto com os resíduos da enzima em linha tracejada preta.

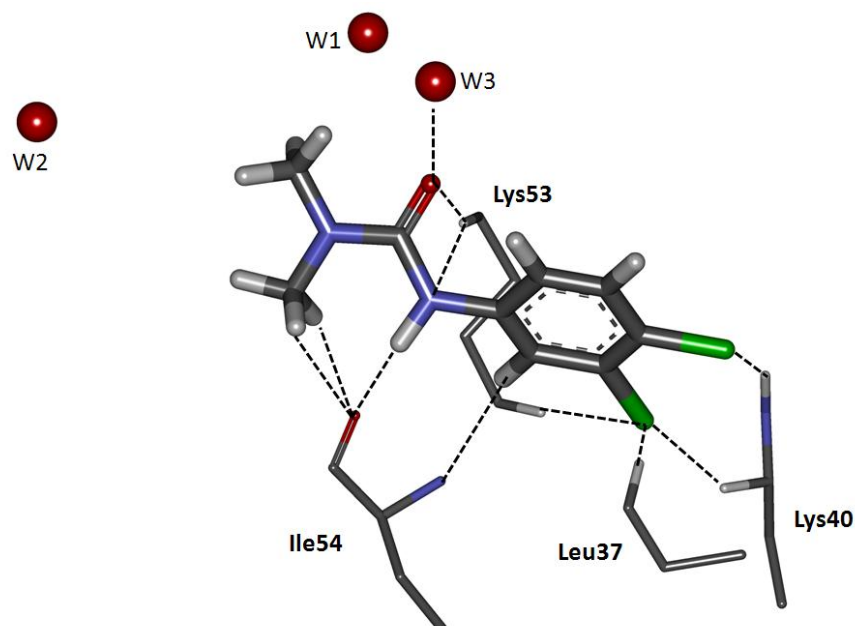
Ligante 8: Diurom

Tabela 1A.8 Principais interações entre os resíduos de *GmGSTU4-4* e os átomos da orientação selecionada do composto Diurom

Átomos	Distância (Å)	Átomo 1	Átomo 2
N2 - LYS53:HB2	2.77	N2	HB2
N2 - LYS53:HD2	2.58	N2	HD2
O1 - LYS53:HD2	2.47	O1	HD2
Cl1 - LEU37:HD12	2.62	Cl1	HD12
Cl1 - LEU37:HD23	2.51	Cl1	HD23
Cl1 - LYS40:HE1	2.44	Cl1	HE1
Cl1 - LYS40:HZ1	3.07	Cl1	HZ1
Cl1 - LYS53:HA	2.67	Cl1	HA
Cl2 - LEU37:HD12	2.86	Cl2	HD12
H9 - ILE54:N	2.66	H9	N
H4 - W3	2.55	H4	O
H1 - ILE54:O	2.47	H1	O
H2 - ILE54:O	2.20	H2	O

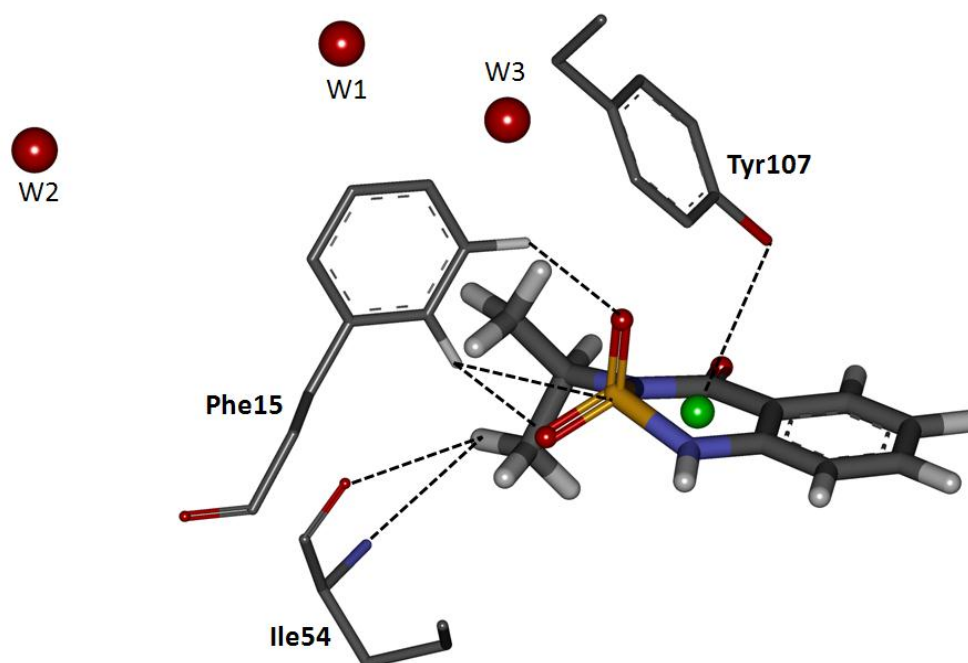
Ligações de Hidrogênio

W3 - O1	2.18	O	O1
H6 - ILE54:O	1.86	H6	O

**Figura 3A.8** Composto Diurom complexado com a *GmGSTU4-4*. Algumas interações do composto com os resíduos da enzima e com a molécula de água W3 em linha tracejada preta.

Ligante 9: Bentazona**Tabela 3A.9** Principais interações entre os resíduos de *GmGSTU4-4* e os átomos da orientação selecionada do composto Bentazona

Átomos	Distância (Å)	Átomo 1	Átomo 2
S - PHE15:HD2	2,96	S	HD2
O1 - PHE15:HD2	2,15	O1	HD2
O2 - PHE15:HE2	2,25	O2	HE2
H7 - ILE54:N	3,19	H7	N
H7 - ILE54:O	2,63	H7	O

**Figura 3A.9** Composto Bentazona complexado com a *GmGSTU4-4*. Algumas interações do composto com os resíduos da enzima em linha tracejada preta.

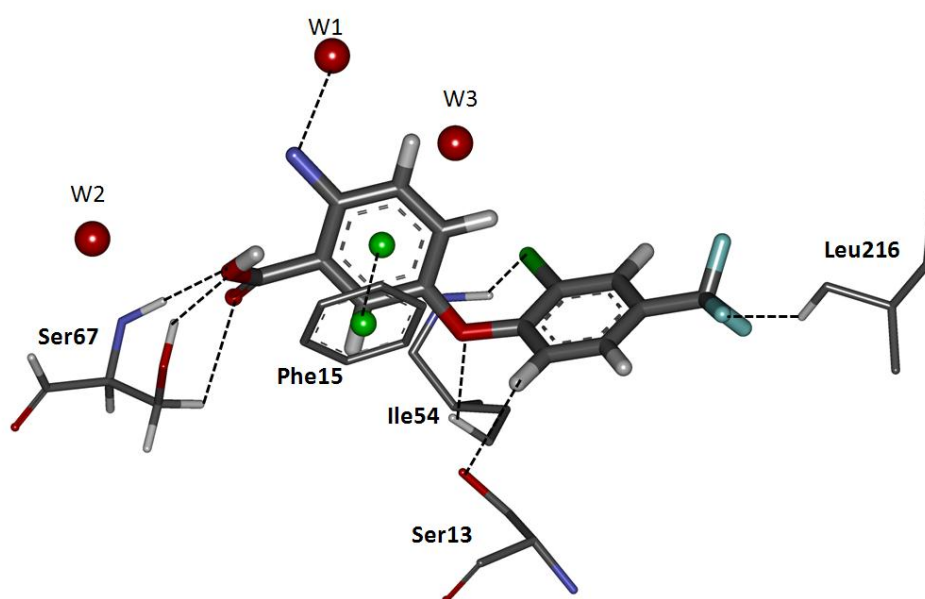
Ligante 10: Acifluorfem

Tabela 3A.10 Principais interações entre os resíduos de *GmGSTU4-4* e os átomos da orientação selecionada do composto Acifluorfem

Átomos	Distância (Å)	Átomo 1	Átomo 2
O1 - ILE54:HD13	2.79	O1	HD13
H5 - ILE54:O	2.47	H5	O
F1 - LEU216:HD21	2.84	F1	HD21
H6 - SER13:OG	2.63	H6	OG
Cl1 - LYS53:HB2	2.72	Cl1	HB2
Cl1 - LYS53:HG1	2.93	Cl1	HG1
Cl1 - ILE54:HN	2.63	Cl1	HN
Cl1 - ILE54:HG12	2.98	Cl1	HG12
O5 - PRO55:HD1	2.11	O5	HD1
O5 - GLU66:HA	2.52	O5	HA
O5 - SER67:HB2	2.73	O5	HB2
O4 - PHE15:HB2	2.87	O4	HB2
N1 - W1	2.90	N1	H2

Ligações de Hidrogênio			
SER67:HN - O5	1.67	HN	O5
SER67:HN - O4	2.36	HN	O4
SER67:HG - O4	1.71	HG	O4

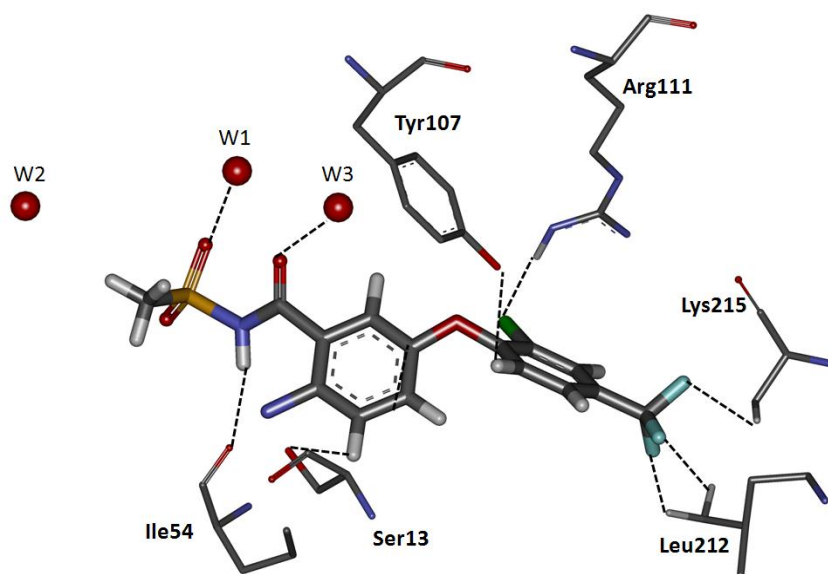
Centróide	
Ct...Ct	3.90

**Figura 3A.10** Composto Acifluorfem complexado com a *GmGSTU4-4*. Algumas interações do composto com os resíduos da enzima e a molécula de água W1 em linha tracejada preta. Em verde os centróides mostrando uma interação π ... π entre o anel da Phe15 e o anel do ligante.

Ligante 11: Fomesafem

Tabela 3A.11 Principais interações entre os resíduos de *GmGSTU4-4* e os átomos da orientação selecionada do composto Fomesafem

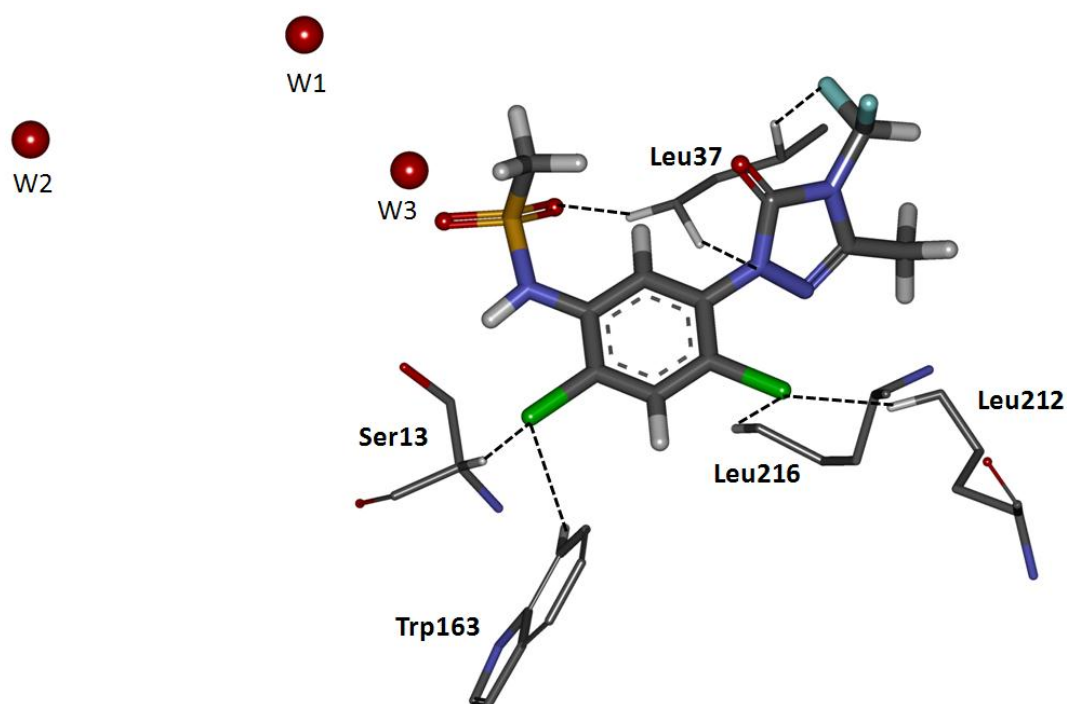
Átomos	Distância (Å)	Átomo 1	Átomo 2
H5 - SER13:OG	2.68	H5	OG
F1 - LYS215:HB1	2.33	F1	HB1
F1 - LYS215:HB2	2.12	F1	HB2
F1 - LEU216:HG	2.35	F1	HG
F3 - LEU212:HD22	2.12	F3	HD22
F3 - LEU212:HD23	2.79	F3	HD23
F3 - LYS215:HB2	2.63	F3	HB2
F2 - LEU212:HB2	2.28	F2	HB2
F2 - LEU212:HD22	2.23	F2	HD22
F2 - LEU212:HD23	2.05	F2	HD23
F2 - LEU216:HG	2.53	F2	HG
Cl - ARG111:HH12	2.93	Cl	HH12
O6 - PHE15:HE2	2.75	O6	HE2
N1 - LYS53:HD2	2.78	N1	HD2
N2 - PHE15:HB1	2.37	N2	HB1
N2 - PHE15:HD2	2.62	N2	HD2
N2 - ILE54:HD13	2.32	N2	HD13
H2 - TYR107:OH	2.67	H2	OH
Ligações de Hidrogênio			
H6 - ILE54:O	2.30	H6	O
W1 - O - O4	2.62	O	O4
W3 - O - O6	2.30	O	O6

**Figura 3A.11** Composto Fomesafem complexado com a *GmGSTU4-4*. Algumas interações do composto com os resíduos da enzima e com as águas W1 e W3 em linha tracejada preta.

Ligante 12: Sulfentrazona

Tabela 3A.12 Principais interações entre os resíduos de *GmGSTU4-4* e os átomos da orientação selecionada do composto Sulfentrazona

Átomos	Distância (Å)	Átomo 1	Átomo 2
Cl1 - SER13:HA	2.85	Cl1	HA
Cl1 - TYR107:HE1	2.87	Cl1	HE1
Cl1 - TRP163:HZ2	2.50	Cl1	HZ2
Cl2 - LEU212:HD23	2.79	Cl2	HD23
Cl2 - LEU216:HD21	2.79	Cl2	HD21
N2 - LEU37:HD13	2.75	N2	HD13
F1 - LYS215:HD2	2.98	F1	HD2
F2 - LEU37:HB2	2.09	F2	HB2
S - ILE54:HD11	3.10	S	HD11
H 3- SER13:OG	3.09	H3	OG
O2- LEU37:HD11	2.10	O2	HD11
O2 - ILE54:HD11	2.58	O2	HD11
O3 - ILE54:HD13	2.55	O3	HD13

**Figura 3A.12** Composto Sulfentrazona complexado com a *GmGSTU4-4*. Algumas interações do composto 12 com os resíduos da enzima em linha tracejada preta.

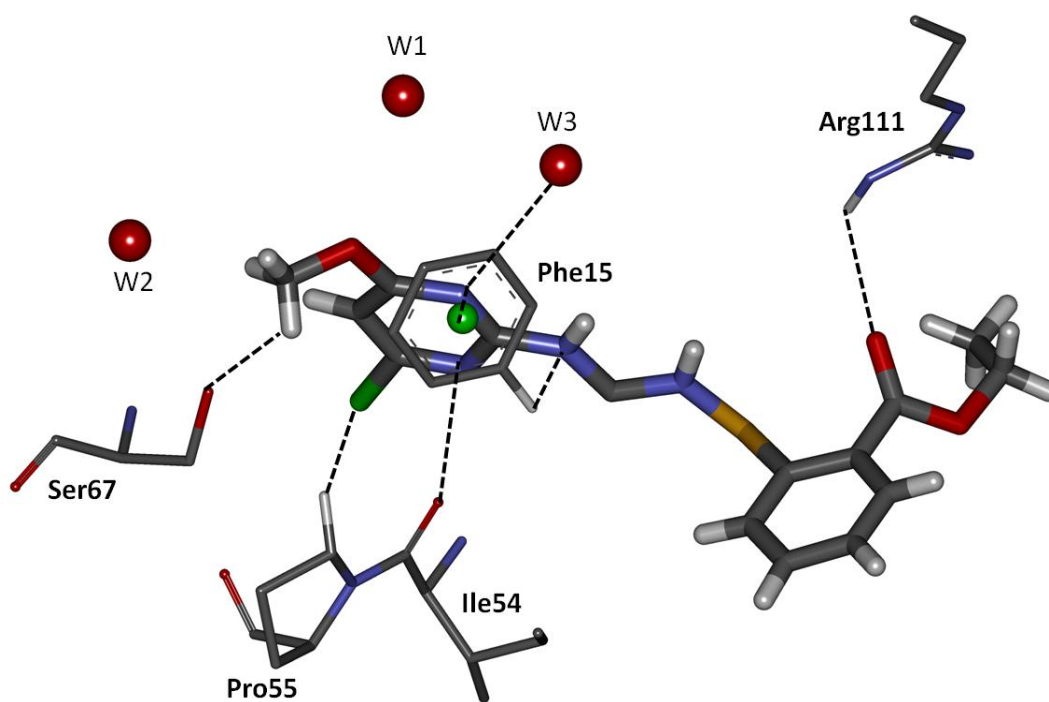
Ligante 13: Clorimuirom

Tabela 3A.13 Principais interações entre os resíduos de *GmGSTU4-4* e os átomos da orientação selecionada do composto Clorimuirom

Átomos	Distância (Å)	Átomo 1	Átomo 2
Cl1 - LYS53:HB1	2.47	Cl1	HB1
Cl1 - LYS53:HB2	2.15	Cl1	HB2
Cl1 - PRO55:HD1	3.09	Cl1	HD1
O1 - LEU216:HD21	2.82	O1	HD21
O2 - ARG111:HH12	2.61	O2	HH12
N2 - PHE15:HD2	2.48	N2	HD2
N4 - LYS53:HD2	2.55	N4	HD2
H16 - SER67:OG	2.38	H16	OG
H17 - ARG18:NH1	3.16	H17	NH1

Ligações de Hidrogênio			
N3 - W3	3.13	N3	O
N4 - ILE54:O	2.70	N4	O

Centróide	
N3-PHE15-Ct	2.72

**Figura 3A.13** Composto Clorimuirom complexado com a *GmGSTU4-4*. Algumas interações do composto 13 com os resíduos da enzima e a molécula de água W3 em linha tracejada preta.

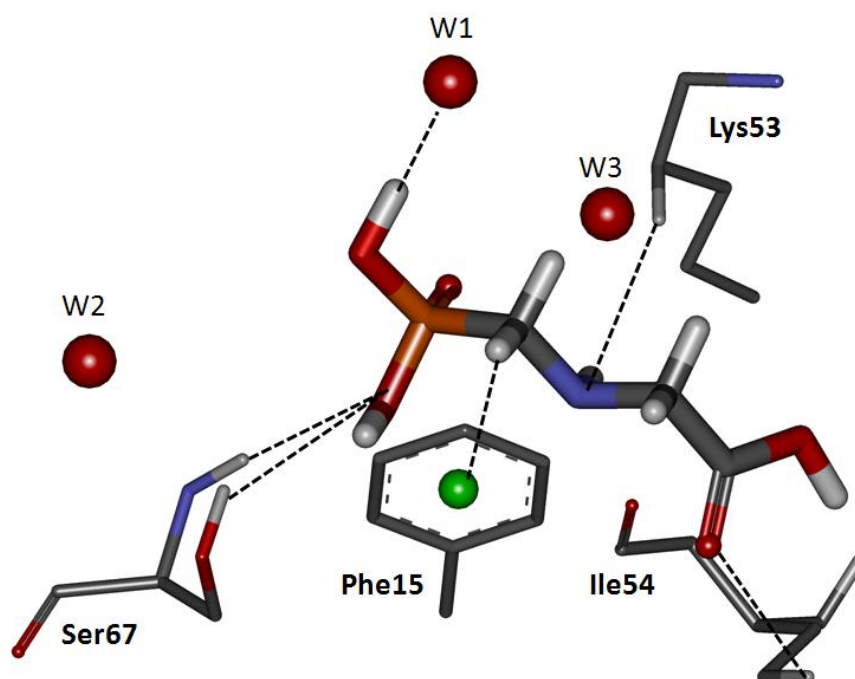
Ligante 14: Glifosato

Tabela 3A.14 Principais interações entre os resíduos de *GmGSTU4-4* e os átomos da orientação selecionada do composto Glifosato

Átomos	Distância (Å)	Átomo 1	Átomo 2
O3 - PHE15:HB2	2.76	O3	HB2
O3 - SER67:HN	2.61	O3	HN
O3 - SER67:HG	2.68	O3	HG
O1 - LYS53:HD1	2.85	O1	HD1
N1 - LYS53:HD2	2.97	N1	HD2
O4 - PHE15:HD2	2.64	O4	HD2
O4 - ILE54:HD11	2.79	O4	HD11
O4 - ILE54:HD13	2.45	O4	HD13

Ligações de Hidrogênio			
H1 - W1	1.98	H1	O
H5 - ILE54:O	2.36	H5	O

Centróide	
H3- PHE15-Ct	2.83

**Figura 3A.14** Composto Glifosato complexado com a *GmGSTU4-4*. Algumas interações do composto **14** com os resíduos da enzima em linha tracejada preta.