

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA - INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CARLA CRISTINA ALVES MENDES

ESTUDO TEÓRICO DA SELETIVIDADE E DO SOLVENTE EM UM  
NANOBIOSENSOR DE HERBICIDAS INIBIDORES DA ACETIL-COENZIMA A  
CARBOXILASE

UBERLÂNDIA  
2014

CARLA CRISTINA ALVES MENDES

ESTUDO TEÓRICO DA SELETIVIDADE E DO SOLVENTE EM UM  
NANOBIOSENSOR DE HERBICIDAS INIBIDORES DA ACETIL-COENZIMA A  
CARBOXILASE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia-MG, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo de Faria Franca

Uberlândia  
2014



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em  
Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia  
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 192/PPQUI.

DATA: 29/05/2014

DISCENTE: Carla Cristina Alves Mendes

MATRÍCULA: 11212QMI002

TÍTULO DO TRABALHO: Estudo teórico da seletividade e do efeito do solvente em um nanobiossensor enzimático para detecção de herbicidas inibidores da acetil-coenzima a carboxilase.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química


LINHA DE PESQUISA: Físico-Química de Macromoléculas e Colóides

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Controle molecular no desenvolvimento de nanobiossensores.

Às quatorze horas e trinta minutos do dia vinte e nove de maio do ano dois mil e quatorze, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Bloco 5I, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Odonório Abrahão Júnior, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Silvana Guilardi e Eduardo de Faria Franca, do Instituto de Química da UFU, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e Aprovou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será

ESTUDO TEÓRICO DA SELETIVIDADE E DO  
SOLVENTE EM UM NANOBIOSSENSOR DE  
HERBICIDAS INIBIDORES DA ACETIL-COENZIMA  
A CARBOXILASE

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 17 horas e 20 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

  
Prof. Dr. Odonório Abrahão Júnior

UFTM

  
Profª Dra. Silvana Guilardi

IQUFU

  
Orientador(a): Prof. Dr. Eduardo de Faria Franca – IQUFU

Universidade Federal de Uberlândia - Avenida João Naves de Ávila, nº 2121, Bairro Santa Mônica - 38.408-144 - Uberlândia - MG

+55 - 34 - 3239-4385

[cpqquimica@ufu.br](mailto:cpqquimica@ufu.br)

<http://www.cpqquimica.iq.ufu.br>

Aos meus pais Maria de Fátima e Carmelito pela  
força e apoio em todos os momentos de minha vida,  
ao meu irmão, aos meus familiares e amigos.

Agradeço ao professor Eduardo pela paciência e dedicação durante a orientação deste trabalho e pelos ensinamentos em uma área da Química na qual eu ainda não tinha conhecimentos. Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade da realização do curso. A todos do laboratório de Cristalografia e Química Computacional e aos professores pelos conhecimentos ensinados. Respeitosos agradecimentos à banca do exame de qualificação e à banca da defesa de dissertação de mestrado. À minha mãe pelo apoio nos momentos de dificuldades. Aos meus tios Valéria e José pelo apoio e incentivo.

*"Tudo que existe existe talvez porque outra coisa  
existe. Nada é, tudo coexiste: talvez assim seja  
certo."*

Fernando Pessoa

## Resumo

Os nanobiossensores constituem aparelhos de detecção que possuem como elemento de reconhecimento um material biológico. Um microscópio de força atômica (AFM) que possui sua ponta funcionalizada com a enzima acetil-coenzima A carboxilase (ACCase) se mostrou eficiente na detecção do herbicida diclofop se comparado com presença de atrazina na amostra analisada. A detecção é feita por medidas da força entre a ponta do AFM e a amostra estudada, que é originada da força de ligação do complexo enzima-herbicida. Pelas interações que ocorrem entre enzima e substrato serem específicas, a vantagem do nanobiossensor é sua seletividade e sensibilidade, que pode detectar concentrações que não seriam contabilizadas nos métodos convencionais de sensores e biossensores. Tendo em vista o uso do nanobiossensor com a ponta funcionalizada do AFM, este trabalho teve como objetivo, por meio do atracamento molecular, verificar teoricamente a seletividade do mesmo para duas classes específicas de herbicidas que são inibidores da ACCase: os ariloxifenoxipropionatos (fops) e as ciclohexanodionas (dims). Para isso foram feitos cálculos de atracamento molecular com 12 herbicidas, o qual avalia a melhor conformação de um substrato complexado à enzima e a energia livre de interação do complexo. Este estudo também propôs verificar o efeito que a presença da água causa na seletividade e sensibilidade da detecção fazendo para isso uma simulação por Dinâmica Molecular da enzima ACCase com posteriores cálculos de atracamento. Os resultados mostraram que as melhores energias de interação foram dos complexos formados com os herbicidas fops e dims, no entanto dois outros herbicidas, imazaquin e metsulfuron, apresentaram uma energia de ligação comparável aos inibidores específicos, devida principalmente à semelhança no tipo de interações intermoleculares, que incluíram ligação de hidrogênio com os resíduos ILE-1735 e ALA-1627, o que pode fazer com que esses dois herbicidas sejam interferentes na detecção. Quanto à presença do solvente foi possível verificar que as energias livres de interação nos complexos aumentaram, tornando-as mais desfavoráveis para os herbicidas inibidores específicos, o que pode afetar a sensibilidade da detecção. De forma geral, a seletividade não foi afetada, pois os fops e dims continuaram com valores de energia mais favoráveis, se comparados com os demais herbicidas.

Palavras-chave: acetil-coenzima A carboxilase, nanobiossensor, atracamento molecular, Dinâmica Molecular, herbicidas.

## Abstract

The nanobiosensors are devices of detection that have as recognition elements a biological material. This work is a proposal of the nanobiosensor to detect specific inhibitor herbicides acetyl co-enzyme A carboxylase (ACC), whose has effectively proved in detecting herbicide diclofop compared with the presence of atrazine in the sample to being analyzed. This nanobiosensor consists of an atomic force microscopy (AFM) that has its tip functionalized with the enzyme ACC; and the detection is performed by measures the force between the AFM tip and the sample studied, which is originated in interaction strength of the enzyme-herbicide. Due to these interactions, which occur between enzyme and substrate, the advantage of the nanobiosensor is its selectivity and sensitivity for detecting concentrations that would not be accounted for in conventional methods of sensors and biosensors. Given the use of nanobiosensor with functionalized AFM tip, this study aimed to verify the selectivity of it for two specific classes of herbicides that are inhibitors of ACCase: the aryloxyphenoxypropionates (fops) and cyclohexanediones (dims). For this, molecular docking calculations with 12 herbicides were made, and this methodology evaluated the best conformation of the complex enzyme-substrate and free energy of interaction. This study also proposed to verify the effect that the presence of water causes on the selectivity and sensitivity of detection, making necessary the use of Molecular Dynamics simulation of the ACC with subsequent docking calculations. The results show that the best interaction energies of the complexes were formed with the fops and dims herbicides, however two other herbicides, imazaquin and metsulfuron, showed a comparable binding energy of specific inhibitors, primarily due to the similarity in the type intermolecular interactions thought hydrogen bonding interactions with the ILE-1735 and ALA-1627, so these herbicides may interfere in detection for the nanobiosensor. The presence of water molecules increases the bind energy, making them more unfavorable for the specific inhibitors herbicides, which can slightly affect the sensitivity of detection. In general, the selectivity was not affected because the fops and dims continued with more favorable energy values when compared with other herbicides.

Key-words: acetyl co-enzyme A carboxylase, nanobiosensor, molecular docking, Molecular Dynamics, herbicides.



## Lista de Figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Componentes funcionais de um biossensor: a detecção do analito é feita pelo elemento de reconhecimento que gera um sinal A que é convertido pelo transdutor B e processado em C, que gera um sinal a ser analisado (CALIL; SILVA, 2011).....                  | 17 |
| Figura 2: Representação geral dos principais componentes de um microscópio de força atômica (Adaptado de VILATA-CLEMENTE; GLOYSTEIN, 2008).....   | 19 |
| Figura 3: Potencial eletrostático ( $-5k_B T/e$ até $+5k_B T/e$ ) da ACCase (Adaptado de FRANCA <i>et al.</i> , 2011).....  | 22 |
| Figura 4: Fórmula geral de um pesticida organofosforado (ZACHARIA, 2011).....   | 26 |
| Figura 5: Fórmula geral de um agrotóxico carbamato, $R^1$ é um grupo álcool, $R^2$ é um grupo metil e $R^3$ um hidrogênio (ZACHARIA, 2011).....   | 27 |
| Figura 6: Fórmula geral dos herbicidas do grupo dos ariloxifenoxipropionatos (GRIFFIN, 2012).....   | 29 |
| Figura 7: Fórmula geral dos herbicidas da classe das ciclohexanodionas (GRIFFIN, 2012).....   | 29 |
| Figura 8: Herbicidas fops e dims. Pode-se verificar no clefoxydim e clethodim os anéis da ciclohexanodionas e os grupos alquila (propil e etil) na porção oxima dos herbicidas. Entre os fops as regiões em comum: a hidroquinona substituída e o ácido propanoico..... | 30 |
| Figura 9: Estrutura da acetil-CoA.....  | 31 |
| Figura 10: Estrutura da biotina.....  | 32 |
| Figura 11: Esquema da translocação da biotina entre BC e CT (adaptado de TONG, 2013).....   | 33 |
| Figura 12: Esquema de um mapa de <i>grid</i> (Adaptado de MORRIS <i>et al.</i> , 2001).....   | 38 |
| Figura 13: Representação das interações intra e intermoleculares do receptor, proteína, e o ligante (Adaptado de MORRIS <i>et al.</i> , 2012).....  | 40 |
| Figura 14: Ângulo de uma ligação de hidrogênio ideal, atracamento receptor-ligante, não há ligação e hidrogênio quando o ângulo é $90^\circ$ ou menos (Adaptado de MORRIS <i>et al.</i> , 2001).....  | 41 |
| Figura 15: Algoritmo genético convencional (MAGALHÃES, 2006, p.60).....   | 42 |
| Figura 16: Termos dos potenciais ligados: (A) potencial de ligação, (B) potencial angular e (C) potencial torcional (Adaptado de MAGALHÃES, 2006).....  | 45 |
| Figura 17: Os 12 herbicidas que foram os inibidores da ACCase estudados.....  | 49 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 18: Caixa de grade de 56x56x126, localizado no sítio ativo da ACCase.....   | 54 |
| Figura 19: Herbicida clefoxydim de lítio (ânion) e alguns aminoácidos que o cercam no sítio ativo, adaptado para o formato 2D. O sombreado em azul indica regiões voltadas para o solvente e a linha tracejada em verde representa a ligação de hidrogênio (programa DS Visualizer 3.5, 2012).....   | 57 |
| Figura 20: Comprimento e ângulo da ligação de hidrogênio entre o herbicida clefoxydim de lítio (ânion) e o resíduo GLY-1998 da ACCase. Em cor azul: nitrogênio; em vermelho: oxigênio; em amarelo: enxofre; em ciano e preto: átomos de carbono; em branco: hidrogênio (programa VMD, HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).....  | 58 |
| Figura 21: Herbicida clefoxydim (protonado) e alguns aminoácidos que o cercam no sítio ativo, adaptado para o formato 2D (programa DS Visualizer 3.5, 2012).....   | 59 |
| Figura 22: Comprimento da ligação de hidrogênio entre o átomo de cloro do herbicida clefoxydim (protonado) e o átomo de hidrogênio do resíduo GLY-1998. Em azul: átomos de nitrogênio; em vermelho: átomos de oxigênio; em amarelo: enxofre; em verde: cloro; branco: hidrogênio. Em preto e ciano: átomos de carbono (programa VMD, HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).....               | 59 |
| Figura 23: Herbicida clethodim e alguns aminoácidos que o cercam no sítio ativo, as setas em verde ilustram ligações de hidrogênio com os resíduos ILE-1735 e ALA-1627 (programa DS Visualizer 3.5, 2012).....   | 60 |
| Figura 24: Comprimento e ângulo das ligações de hidrogênio entre resíduos da ACCase e o herbicida clethodim. Cores: azul: nitrogênio; vermelho: oxigênio; amarelo: enxofre; preto e ciano: carbono; branco: hidrogênio; e em verde: cloro (programa VMD, HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).....   | 60 |
| Figura 25: Conformações sobrepostas dos herbicidas clefoxydim (átomos de carbono em preto) e clethodim (átomos de carbono em ciano) com os grupos alquilas voltados para os aminoácidos VAL-2001, SER-1708, LEU-1705, Val-2024 e ALA-1627. Demais cores: azul: nitrogênio; vermelho: oxigênio; amarelo: enxofre; branco: hidrogênio (programa VMD, HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996)..... | 62 |
| Figura 26: Quinta conformação do atracamento molecular, interações intermoleculares entre resíduos da ACCase e o anel ciclohexanodiona do clefoxydim protonado (programa DS Visualizer 3.5, 2012).....   | 62 |
| Figura 27: Herbicida clodinafop e alguns aminoácidos que o cercam no sítio ativo, as setas em verde ilustram ligações de hidrogênio com os resíduos ILE-1735 e ALA-1627, há também   |    |

|  |    |
|--|----|
| interação do tipo CH- $\pi$ entre o anel do resíduo TYR-1738 e um dos hidrogênios do anel da hidroquinona do herbicida, não mostrada na figura (programa DS Visualizer 3.5, 2012).....   | 63 |
| Figura 28: Comprimento e ângulo das ligações de hidrogênio entre resíduos da ACCase e o herbicida clodinafop Cores: azul: nitrogênio; vermelho: oxigênio; rosa: flúor; preto e ciano: carbono; branco: hidrogênio (programa VMD, HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).....                         | 63 |
| Figura 29: Interação do tipo CH- $\pi$ entre o anel do resíduo TYR-1738 e um dos hidrogênios do anel da hidroquinona do clodinafop. Em branco: átomos de hidrogênio; em vermelho átomos de oxigênio; em cinza átomos de carbono (programa DS Visualizer 3.5, 2012).....                        | 64 |
| Figura 30: Esquema de uma interação $\pi$ - $\pi$ , $R_{cen}$ é a distância entre os centros dos sistemas $\pi$ . $R_{clo}$ é a menor distância entre os átomos dos dois sistemas (Adaptado de MCGAUGHEY; GAGNÉ; RAPPÉ, 1998).....   | 65 |
| Figura 31: Herbicida clodinafop-propargil e resíduos que integram a formação do complexo, em laranja a interação $\pi$ - $\pi$ com o resíduo TYR-1738 (programa DS Visualizer 3.5, 2012)....   | 65 |
| Figura 32: Herbicida propaquizafop e alguns aminoácidos que o cercam no sítio ativo, a seta em verde ilustra ligação de hidrogênio com o resíduo GLY-1998 e com a ALA-1627, ao redor da porção carboxila observa-se os aminoácidos ILE-1735 e ALA-1627 (programa DS Visualizer 3.5, 2012)..... | 66 |
| Figura 33: Comprimento e ângulo das ligações de hidrogênio entre resíduos da ACCase e o herbicida propaquizafop. Cores: azul: nitrogênio; vermelho: oxigênio; verde: cloro; preto e ciano: átomos de carbono; e em branco: hidrogênio (programa VMD, HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).....     | 66 |
| Figura 34: Herbicida quizalofop, o traço em laranja indica interações do tipo $\pi$ - $\pi$ com o anel do resíduo TYR-1738 (programa DS Visualizer 3.5, 2012).....   | 67 |
| Figura 35: Comprimento e ângulo das ligações de hidrogênio entre resíduos da ACCase e o herbicida quizalofop. Cores: azul: nitrogênio; vermelho: oxigênio; preto e ciano: carbono; branco: hidrogênio; e em verde: cloro (programa VMD, HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).....                  | 67 |
| Figura 36: Interações $\pi$ - $\pi$ entre o herbicida propaquizafop e os resíduos PHE-1956 e TYR-1738. Em preto: átomos de carbono; em vermelho: átomos de oxigênio; em azul: átomos de nitrogênio, em verde: átomo de cloro (programa DS Visualizer 3.5, 2012).....                           | 69 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 37: Herbicida bispyribac de sódio e os resíduos do sítio ativo. A seta tracejada em verde representa a ligação de hidrogênio com o resíduo GLY-1734. (programa DS Visualizer 3.5, 2012).....  | 69 |
| Figura 38: Herbicida bispyribac protonado e os resíduos do sítio ativo. As setas em verde indicam interações por ligação de hidrogênio, regiões sombreadas de azul representam porções da molécula que ficam voltadas para o solvente (programa DS Visualizer 3.5, 2012).....  | 70 |
| Figura 39: Herbicida ethoxysulfuron e os resíduos do sítio ativo. As setas indicam interação por ligação de hidrogênio entre herbicidas e os resíduos da enzima (programa DS Visualizer 3.5, 2012).....  | 71 |
| Figura 40: Encaixes dos herbicidas ethoxysulfuron (átomos de carbono em ciano) e clefoxydim protonado (átomos de carbono em preto) no sítio ativo da ACCase. Demais cores: azul: átomos de nitrogênio; vermelho: átomos de oxigênio; amarelo: átomo de enxofre; verde: átomo de cloro (programa VMD, HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996)..... | 71 |
| Figura 41: Imazaquin e os resíduos do sítio ativo. As setas verdes indicam interações por ligação de hidrogênio (programa DS Visualizer 3.5, 2012).....  | 72 |
| Figura 42: Herbicida metsulfuron-metil e os resíduos do sítio ativo, as setas tracejadas em verde indicam ligações de hidrogênio (programa DS Visualizer 3.5, 2012).....   | 73 |
| Figura 43: Herbicida metsulfuron e os resíduos do sítio ativo, as setas tracejadas indicam ligações de hidrogênio (programa DS Visualizer 3.5, 2012).....  | 74 |
| Figura 44: Oxasulfuron e interações com os resíduos THR-1757, GLY-1998 e LEU-1756 da enzima ACCase. Em destaque a ligação de hidrogênio com a cadeia lateral da treonina: em branco: átomos de hidrogênio; em vermelho: átomos de oxigênio; em cinza átomos de carbono (programa DS Visualizer 3.5, 2012).....                             | 75 |
| Figura 45: Herbicida pyrithiobac de sódio e resíduos do sítio ativo da ACCase, ligação de hidrogênio entre a hidroxila e o resíduo ALA-1627 (programa DS Visualizer 3.5, 2012).....  | 76 |
| Figura 46: Herbicida pyrithiobac e resíduos do sítio ativo da ACCase, ligação de hidrogênio entre a hidroxila e o resíduo LEU-1756 (programa DS Visualizer 3.5, 2012). ....  | 76 |
| Figura 47: Glifosato e interações com resíduos do sítio ativo da ACCase com ligações de hidrogênio nos resíduos ILE-1735 e ALA-1627 (programa DS Visualizer 3.5, 2012).....  | 78 |
| Figura 48: Ilustração do complexo ACCase-glifosato obtido do atracamento molecular: (a) ACCase 0 ns; (b) ACCase 10 ns de simulação por dinâmica molecular (programa AutoDock 4.0).....   | 81 |
| Figura 49: Ilustração do complexo ACCase-clefoxydim: (a) ACCase 0 ns; (b) ACCase 10 ns   |    |

|   |    |
|---|----|
| de simulação por dinâmica molecular (programa AutoDock 4.0).....  | 81 |
| Figura 50: Representação da superfície molecular das cavidades das estruturas da ACCase: a) cavidade POC208 da estrutura 1UYR, b) cavidade POC215 da estrutura após 5 ns de dinâmica molecular e c) POC225 estrutura da cavidade após 10 ns de dinâmica molecular. Na representação da superfície molecular das três cavidades a cor verde representa átomos de carbono, a cor azul representa átomos de nitrogênio, a cor vermelha representa os oxigênios e a cor amarela os átomos de enxofre. Nas regiões circuladas em amarelo está o herbicida (programa PyMOL, Schrödinger LLC, 2009)..... | 83 |

### Lista de Tabelas

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Inibidores atracados na ACCase.....   | 49 |
| Tabela 2: Estimativas de energia de ligação para os complexos formados com a ACCase, código 1UYR.....   | 56 |
| Tabela 3: Estimativas de energia de ligação obtidas do atracamento molecular para a ACCase (código 1UYR) em 0 ns, 5 ns e 10 ns de dinâmica molecular..... | 79 |
| Tabela 4: Estimativas teóricas das constantes de inibição obtidas do atracamento molecular para a ACCase.....   | 80 |
| Tabela 5: Áreas e volumes das cavidades POC208, POC215 e POC225.....  | 82 |

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ABRASCO: Associação Brasileira de Saúde Coletiva

ACCase: acetil-coenzima A carboxilase

AChE: acetilcolinesterase

ADT: AutoDockTools

AFM: microscópio de força atômica, em inglês, *Atomic Force Microscope*

AFS: espectroscopia de força atômica, em inglês, *Atomic Force Spectroscopy*

ALA: alanina

ALS: acetolactato sintase

APTES: 3-aminopropiltrietoxissilano

ARG: arginina

ASN: asparagina

ASP: ácido aspártico

ATP: adenosina trifosfato

BC: biotina carboxilase

BCCP: proteína carreadora de carboxil-biotina, em inglês *biotin carboxyl carrier protein*

CASTp: *Computed Atlas of Surface proteins*

CT: transcarboxilase, em inglês, *carboxyltransferase*

CYS: cisteína

2,4-D: ácido 2,4-diclorofenoxiacético

DDT: diclorocifeniltricloroetano

dims: ciclohexanodionas

FAO: Órgão das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, em inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

fops: ariloxifenoxipropionatos

fs: femtossegundo ( $10^{-15}$  s)

GLN: glutamina

GLU: ácido glutâmico

GLY: glicina

HIS: histidina

ILE: isoleucina

L: ligante

LEU: leucina

LFS: força local (*local force*)

LYS: lisina

MCPA: ácido 4-cloro-2-metilfenoxiacético

MET: metionina

nm: nanômetro ( $10^{-9}$  m)

nN: nanonewton ( $10^{-9}$  N)

ns: nanossegundo ( $10^{-9}$  s)

P: proteína

PDB: Protein Data Bank

PHE: fenilalanina

PRO: prolina

SER: serina

STM: microscopia de tunelamento, em inglês, *Scanning Tunneling Microscopy*

THR: treonina

2, 4, 5-T: ácido 2,4,5-Triclorofenoxiacético

TRP: triptofano

TYR: tirosina

VAL: valina

WSSA: Sociedade Científica de Plantas Daninhas da América, em inglês, *Weed Science Society of America*

# Sumário

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Introdução e justificativa.....</b>  | <b>16</b> |
| <b>2. Objetivos.....</b>   | <b>24</b> |
| 2.1 <i>Objetivo geral.....</i>   | <i>24</i> |
| 2.2 <i>Objetivos específicos.....</i>  | <i>24</i> |
| <b>3. Fundamentos Teóricos.....</b>  | <b>25</b> |
| 3.1 <i>Agrotóxicos e herbicidas inibidores da ACCase.....</i>  | <i>25</i> |
| 3.2 <i>Acetil-Coenzima A Carboxilase (ACCase) .....</i>  | <i>31</i> |
| 3.3 <i>Atracamento Molecular.....</i>  | <i>37</i> |
| 3.4 <i>Dinâmica Molecular.....</i>   | <i>44</i> |
| <b>4. Metodologia.....</b>   | <b>49</b> |
| 4.1 <i>Atracamento Molecular.....</i>  | <i>49</i> |
| 4.2 <i>Dinâmica Molecular.....</i>   | <i>55</i> |
| <b>5. Resultados e Discussões.....</b>   | <b>56</b> |
| 5.1 <i>Cálculos de atracamento molecular e interações específicas na seletividade do nanobiossensor.....</i> | <i>56</i> |
| 5.2 <i>Efeito da água na seletividade do nanobiossensor.....</i>   | <i>79</i> |
| <b>6. Considerações Finais.....</b>  | <b>85</b> |
| <b>7. Trabalhos futuros.....</b>   | <b>88</b> |
| <b>8. Referências bibliográficas.....</b>  | <b>89</b> |



## 1. Introdução e Justificativa

O Brasil é o quinto maior país do mundo em extensão territorial, possui também a maior reserva de água doce disponível aos seres humanos, daí ser um dos maiores produtores e exportadores de produtos agrícolas. Sua extensão de terras utilizada em lavouras anuais e cultivos permanentes ocupa uma área de cerca de 68 milhões de hectares (BRASIL, 2012), sendo o maior exportador de cana de açúcar do mundo e maior produtor e exportador mundial de café e suco de laranja. O país também lidera o ranking de vendas externas de soja, nas formas de grãos, farelo e óleo, sendo estes os principais produtos geradores de divisas cambiais, e as projeções do Ministério da Agricultura para este cenário é de contínuo crescimento, com previsões de que até 2030 um terço dos produtos comercializados sejam brasileiros (BRASIL, 2013).

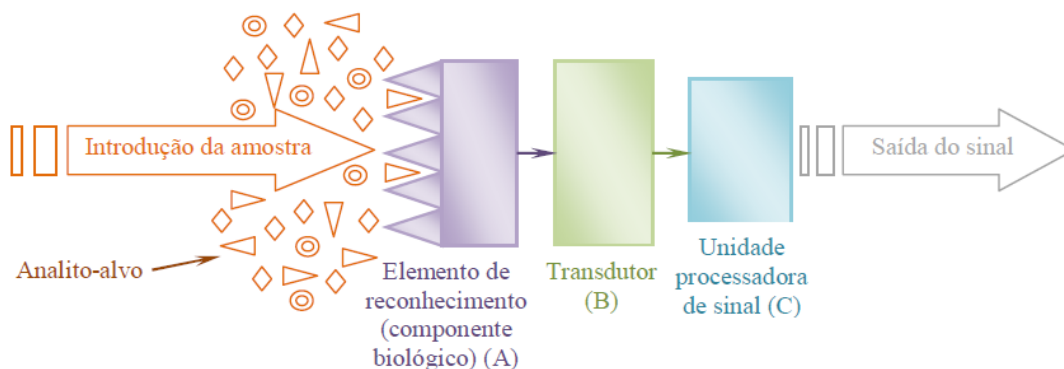
Desse modo, a agricultura tem enorme importância na economia brasileira, dados levantados mostram que de janeiro a outubro de 2012 o agronegócio respondeu por 40% do total de exportações, com uma receita no acumulado de US\$ 80,88 milhões, um superávit de US\$ 67,28 milhões, e na balança comercial contribuiu com um superávit de US\$ 17,37 milhões, pois que os demais produtos tiveram um déficit de US\$ 49,91 milhões. O complexo dos produtos de soja liderou as exportações do agronegócio com uma receita de US\$ 24,65 bilhões (FERREIRA, 2012). Essas cifras foram alcançadas principalmente porque a agricultura se transformou em um sistema de monocultura mecanizado no qual há o uso intensivo de agrotóxicos para fazer com que haja altos rendimentos nas áreas plantadas.

Esse uso intenso de agrotóxicos nas lavouras, dependendo de suas concentrações ou do período de tempo de exposição a alimentos contaminados podem causar riscos à saúde, como problemas neurológicos, câncer, malformação congênita, distúrbios endócrinos, entre outros. Levando-se estes problemas em consideração, a Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO) lançou um dossiê no congresso mundial de nutrição realizado em 2012 no Rio de Janeiro, *Word Nutrition Rio 2012*. Este informa que o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, sendo que 1/3 dos alimentos brasileiros são contaminados por estas substâncias (CARNEIRO *et al.*, 2012). Assim, com o crescimento do agronegócio há a necessidade de uma avaliação mais confiável na inspeção de resíduos de agrotóxicos que possam estar presentes nos produtos provenientes da agricultura e que serão destinados à exportação. Caso contrário, poderá haver a perda de mercados internacionais. Neste contexto, se faz necessário um método para analisar qualitativamente e quantitativamente diferentes

tipos de agrotóxicos utilizados nas culturas e nos alimentos e produtos provenientes das produções agrícolas.

Os agrotóxicos são definidos de acordo com a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) - Órgão das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura – como quaisquer substâncias ou misturas de substâncias utilizadas para prevenir, combater ou controlar quaisquer tipos de espécies indesejáveis de animais e plantas que possam causar danos a culturas agrícolas, seja durante o armazenamento ou processamentos dos produtos agrícolas; inclui-se também vetores de doenças que afligem humanos e animais (ZACHARIA, 2011).

Como práticas para identificação de resíduos de agrotóxicos (que são conhecidos também pelas denominações de pesticidas ou defensivos agrícolas) que possam estar presentes em produtos com origem agrícola há diferentes tipos de biossensores. Um biossensor, de acordo com Lee (2008), é um dispositivo que contém um elemento de bioreconhecimento juntamente com um transdutor que converte este reconhecimento em um sinal interpretável. O reconhecimento baseia-se em mecanismos bioquímicos ou biológicos e as respostas químicas e físicas que ocorrem devido à interação do elemento de reconhecimento e do analito depende da concentração do analito na amostra (BANICA, 2012). A Figura 1 esquematiza a configuração de um biossensor.



**Figura 1.** Componentes funcionais de um biossensor: a detecção do analito é feita pelo elemento de reconhecimento que gera um sinal A que é convertido pelo transdutor B e processado em C, que gera um sinal a ser analisado (CALIL; SILVA, 2011).

Como o sinal do biossensor precisa ser convertido pelo transdutor para haver interpretação dos sinais da interação, há diferentes tipos de transdutores. Dentre esses há os que se baseiam em respostas químicas e físicas; na química é feito um monitoramento apenas das concentrações de diferentes espécies químicas e dos sinais dos produtos resultantes da interação entre analito e elemento de reconhecimento. Os transdutores físicos estão voltados para traduzir os sinais de como o analito modifica o elemento de reconhecimento: como sua

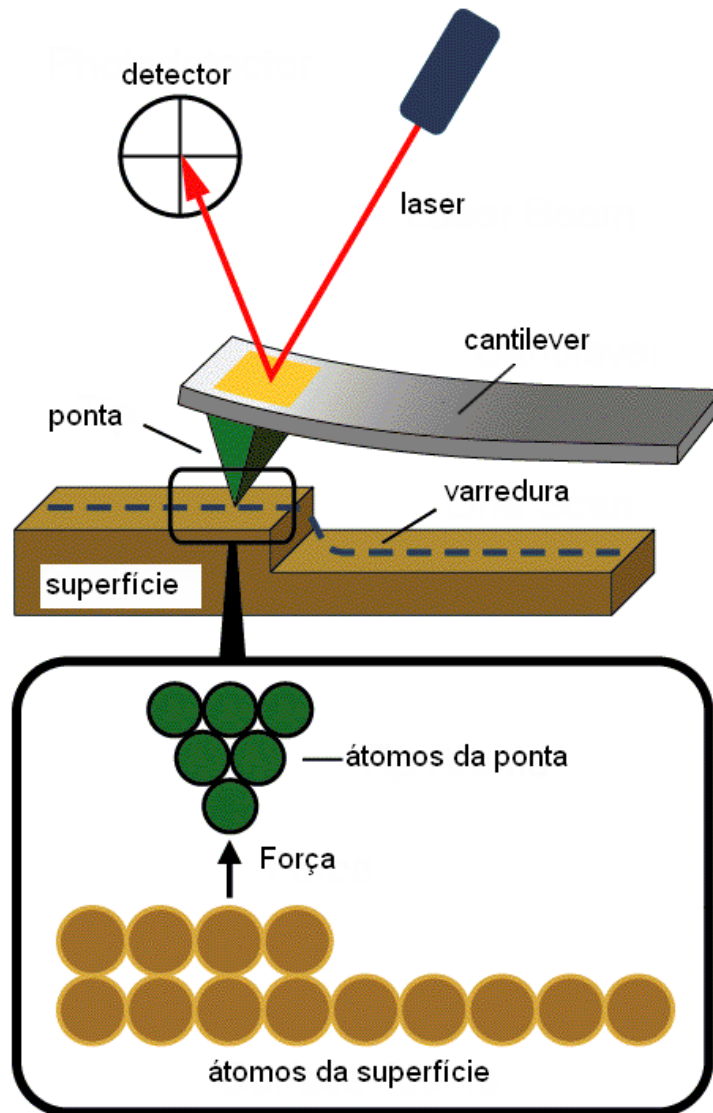
massa (transdutores piezoelétricos), índice de refração, resistividade elétrica e propriedades dielétricas (BANICA, 2012). Os transdutores ópticos se baseiam na luz emitida devido determinadas reações químicas e/ou biológicas que ocorrem no biossensor, transdutores calorimétricos fazem a detecção do analito levando-se em consideração para isso o calor envolvido na reação química. No entanto, os transdutores eletroquímicos são os mais utilizados nos biossensores devido a seu tamanho e a fácil instrumentação (LEE, 2008).

Quando o material biológico a ser utilizado no biossensor é uma enzima este recebe a denominação de biossensor enzimático, e a análise do analito é feita de acordo com a atividade enzimática antes e depois da inibição. Marques & Yamanaka (2008) descrevem alguns biossensores para detecção de pesticidas, dentre esses um biossensor potenciométrico para detecção de organofosforados em água por imobilização reticulada da enzima butilcolisterase com glutaraldeído; um de detecção óptica também de organofosforados baseado na enzima acetilcolinesterase; biossensores do tipo impresso para detecção de carbamatos em vegetais e frutas; biossensores baseados em enzimas tirosinases, peroxidases e fosfatases também são utilizados para detecção de herbicidas.

O grupo de pesquisa do professor Dr. Eduardo de Faria Franca e colaboradores “desenvolveu” um nanobiossensor baseado em inibição enzimática para detecção de herbicidas, utilizando para isso técnicas de modelagem molecular. Este nanobiossensor foi posteriormente produzido e testado experimentalmente pelo mesmo grupo de pesquisa do professor Fábio de Lima Leite da UFSCar (campus Sorocaba). Nos nanobiossensores o componente biológico é imobilizado em aparelhos de detecção nanoescalar, e é capaz de detectar analitos com concentrações baixas como  $10^{-18}$  mol.L<sup>-1</sup>. Neste nanobiossensor a enzima acetil-coenzima A carboxilase (ACCase) foi imobilizada na ponta funcionalizada de um microscópio de força atômica (*atomic force microscope* – AFM) para detectar herbicidas inibidores da ACCase, por meio da força de interação entre a enzima e o herbicida (FRANCA *et al.*, 2011).

O microscópio de força atômica tem como princípio medir forças de interação, que podem ser atrativas ou repulsivas, para construir imagens topográficas em resoluções atômicas de inúmeros tipos de materiais. Ele surgiu do esforço de Gerd Binnig, Calvin Quate e Christoph Gerber para solucionar a limitação da microscopia de tunelamento (*scanning tunneling microscopy* – STM) que tinha o requisito de que as amostras fossem condutoras. Assim, o AFM verificaria as forças de interação entre a ponta de sondagem e a amostra e não a condutividade da amostra. No AFM, a ponta de sondagem está ligada a um cantilever (uma ‘viga’ sustentada apenas em um lado) e quando ocorre a interação entre a ponta e a amostra e

o cantilever sofre uma deflexão que é medida por um detector (MEYER, 1992). Uma representação dos componentes principais de um AFM está ilustrada na Figura 2.



**Figura 2.** Representação geral dos principais componentes de um microscópio de força atômica (Adaptado de VILATA-CLEMENTE; GLOYSTEIN, 2008).

O cantilever tem geralmente um formato retangular ou a forma de V, a ponta pode ser em formato piramidal com base quadrada ou em formato de cone e são geralmente de nitreto de silício, enquanto a parte superior do cantilever é coberta por uma superfície refletora como alumínio ou ouro para que possa haver a detecção da deflexão causada devido à força de interação. A força é medida em função da distância entre os átomos da ponta do AFM e os átomos da superfície da amostra que é calculada medindo-se a deflexão ( $\Delta x$ ) que o cantilever sofre. Esse valor pode ser calculado, pois a constante de mola do cantilever ( $k$ ) é conhecida, a força é então dada pela equação que representa a lei de Hooke,  $F = k \Delta x$  (BOWEN; HILAL, 2009).

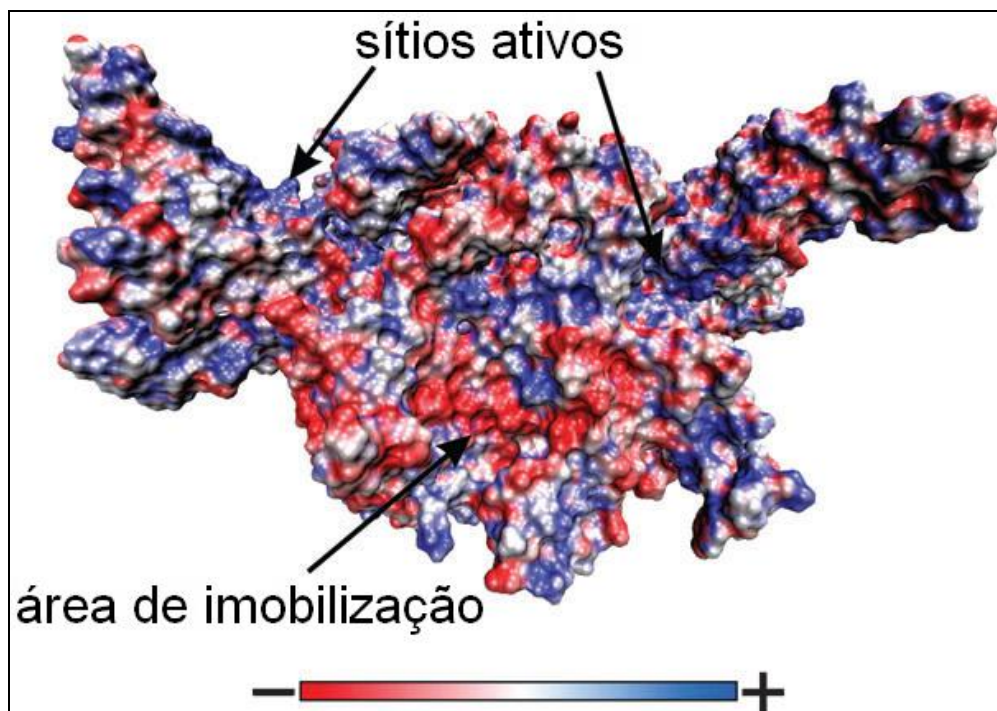
Devido a essa força que pode ocorrer entre a ponta do AFM e a amostra é possível então caracterizar superfícies de matérias e também medir forças de interação entre moléculas como uma enzima e um herbicida, caso a ponta for funcionalizada com um material biológico. No funcionamento do AFM as varreduras na amostra podem ser feitas no modo de contato ou no modo de não contato, ambos definidos pela distância entre a amostra e a ponta do AFM. O modo de contato acontece na região repulsiva entre a amostra e a ponta do AFM quando o cantilever fica a poucos Å de distância da amostra e as forças interatômicas são repulsivas, então a deflexão do cantilever ocorre na direção oposta da amostra. No modo de não contato as forças são atrativas e as interações de longo alcance como forças de van der Waals e eletrostáticas são observadas (MEYER, 1992).

Quanto aos modos de operação do AFM, há os modos estáticos e os modos dinâmicos; no modo estático as deflexões do cantilever ocorrem de acordo com a força  $F$  que atua sobre a ponta, neste modo há duas subdivisões: a) deflexão contínua na qual se regula a distância entre ponta e amostra; e b) deflexão variável, onde a deflexão do cantilever é monitorada para variar de modo que a força permaneça constante. No modo de operação dinâmico o cantilever oscila próximo a sua frequência de ressonância (BOWEN; HILAL, 2009; VILATA-CLEMENTE; GLOYSTEIN, 2008). A varredura feita pelo AFM permite então que se façam as medidas da força de interação que ocorre entre a ponta funcionalizada e a amostra.

Para a obtenção do nanobiossensor enzimático, com a ponta do AFM funcionalizada com a enzima ACCase, previamente foram feitas simulações de dinâmica molecular com a estrutura completada da estrutura do domínio CT (transcarboxilase) dessa enzima, cuja estrutura cristalográfica com código 1UYR está disponível no Protein Data Bank. Cálculos de Dinâmica Molecular foram feitos para verificar se o monômero ou dímero da enzima seria o mais adequado para a utilização na experimentação nanobiossensor. O resultado mostrou que a estrutura do dímero apresentou menor flutuação na conformação estrutural quando em meio aquoso (Franca *et al.*, 2011). Esta maior estabilidade ocorreu, pois no do dímero há maior interação eletrostática entre resíduos carregados com cargas opostas e menor repulsão entre aminoácidos de cargas iguais. Já no monômero há mais resíduos carregados acessíveis ao solvente e a interação destes com a água aumenta a flutuação estrutural. Por esse motivo a estrutura do dímero foi utilizada nos cálculos para modelagem do nanobiossensor (Franca *et al.*, 2011). Com a utilização do programa APBS foi possível verificar as regiões carregadas da enzima para assim modelar a melhor forma de imobilizar esta na ponta do AFM por meio de adsorção eletrostática (Franca *et al.*, 2011).

Para medir as interações de sistemas específicos a ponta do AFM pode ser funcionalizada quimicamente com diferentes tipos de materiais, essa técnica é chamada de microscopia de força química (BOWEN; HILAL, 2009). A funcionalização consiste em modificações químicas em superfícies materiais de modo a melhorar a resposta e/ou modificar o comportamento da substância de acordo com o interesse do trabalho em estudo. No nanobiossensor desenvolvido por Franca, Leite e colaboradores, o microscópio de força atômica foi o aparelho utilizado para realizar as detecções dos herbicidas. Na construção desse nanobiossensor a ponta do AFM foi funcionalizada quimicamente para possibilitar a imobilização da enzima acetil-coenzima A carboxilase (ACCase), em orientação que o sítio ativo ficasse exposto para o analito.

Na modelagem e construção do nanobiossensor, a imobilização da ACCase em uma orientação específica na ponta do AFM foi possível por meio da análise do potencial eletrostático da ACCase, calculado resolvendo a equação não-linear de Poisson-Boltzmann no programa APBS (HOLST; BAKER; WANG, 2000). Esta metodologia permitiu prever as características da distribuição de cargas da enzima ACCase sem que fosse necessária a realização de inúmeros experimentos, que são dispendiosos financeiramente e levam tempo para alcançar essa orientação específica. Na Figura 3 está ilustrada o potencial eletrostático da ACCase obtido do programa APBS. Nela estão mostradas as regiões do sítio ativo com cargas positivas (em azul) e uma região em vermelho, negativa, onde a enzima foi imobilizada na ponta do AFM. Com este conhecimento os cálculos teóricos foram feitos com a ponta funcionalizada com cargas positivas como  $R-NH_3^+$ , para permitir que as regiões do sítio ativo ficassem em exposição ao analito (FRANCA *et al.*, 2011).



**Figura 3.** Potencial eletrostático ( $-5k_B T/e$  até  $+5k_B T/e$ ) da ACCase (Adaptado de FRANCA *et al.*, 2011).

Esse processo de funcionalização é fundamental para a sensibilidade e seletividade do sensor, pois há as interações específicas que precisam ocorrer entre a enzima e os herbicidas quando da utilização do nanobiossensor, o que melhora a detecção das amostras. No trabalho de Leite *et al.* (2013) os autores falam da importância da funcionalização de um nanobiossensor para a detecção dos herbicidas imazaquin e metsulfuron, no qual a funcionalização da ponta do AFM foi feita por um processo de vaporização de 3-aminopropiltrietoxissilano (APTES) na presença de trietilamina, em seguida foi coberta por glutaraldeído, a enzima acetolactato sintase (ALS) então foi imobilizada nessa superfície. Os resultados mostraram que a força de adesão foi de  $40 \pm 4$  nN para a ponta do AFM funcionalizada e  $18 \pm 2$  nN para a ponta não funcionalizada, isso devido a interação específica entre o sítio ativo e a amostra, diferença esta que resulta em melhores detecções.

O AFM pode então ser utilizado para determinar a força de interação entre a enzima e a amostra que pode conter tipos diferentes de herbicidas. Essa interação depende da distância da amostra e seu uso é conhecido por espectroscopia de força atômica, em inglês *atomic force spectroscopy* (AFS). A AFS pode ser realizada por *local force* (LFS) que verifica a deflexão do cantilever (força em nN) e o deslocamento (em nm) do scanner piezoelétrico onde se encontra a amostra, de acordo com a distância entre o material biológico imobilizado na ponta do AFM e a amostra. Com o conhecimento da constante de elasticidade do cantilever juntamente com a sua deflexão é possível encontrar o valor da força para a deflexão sofrida em relação à

distância referente ao herbicida que se encontra presente na amostra. Depois, com um gráfico de força em função da distância é possível distinguir ruídos dos picos que indicam processos de adesão ou ruptura entre as moléculas, que varia entre a enzima e determinado herbicida (FRANCA; AMARANTE; LEITE, 2010).

Após a dinâmica molecular e cálculos no programa APBS, Franca *et al.* (2011) utilizando atracamento molecular (*molecular docking*) entre a enzima e os herbicidas (atrazina e diclofop) analisou a viabilidade da construção do nanobiossensor. Os resultados mostraram que a energia de interação foi melhor para herbicida diclofop, o que forneceu informações para afirmar que o diclofop deve ser detectado pelo nanobiossensor na interação com a enzima com maior valor de força de adesão que a atrazina. Todos esses resultados teóricos obtidos foram validados após a fabricação do nanobiossensor, no qual a força específica de adesão entre a ponta do AFM com a enzima ACCase e o diclofop presente na amostra foi de  $103 \pm 12 \text{ nN}$  e para a atrazina foi de  $36 \pm 7 \text{ nN}$ , e isso ocorre pois o diclofop é um herbicida inibidor da ACCase enquanto que a atrazina inibe o fotossistema II. Essa metodologia foi, portanto capaz de prever esse resultado experimental de que o diclofop seria detectado (FRANCA *et al.*, 2011).

Os cálculos de atracamento molecular podem, assim, fornecer informações prévias sobre a viabilidade da construção de um nanobiossensor enzimático para detecção de determinadas classes de herbicidas, pois calcula a energia de interação entre receptor e ligante. Energia que está relacionada com a força de interação, entre a enzima e o herbicida, medida pelo nanobiossensor. Foi possível verificar que herbicidas que sejam denominados inibidores de enzimas específicas deverão apresentar energia de interações mais favoráveis que outras classes de herbicidas (FRANCA *et al.*, 2011).

Levando-se em consideração que os cálculos teóricos foram capazes de prever os resultados do nanobiossensor enzimático que detectou o herbicida diclofop, este trabalho teve como objetivos avaliar e prever por meio das energias de interação do atracamento molecular a seletividade do nanobiossensor para detecção dos herbicidas das classes ariloxifenoxipropionatos (fops) e ciclohexanodionas (dims) por meio de cálculos de modelagem molecular.



## 2. Objetivos

### 2.1 *Objetivo geral:*

Avaliar por meio de atracamento molecular e Dinâmica Molecular a seletividade da enzima ACCase aplicada a um nanobiossensor enzimático para detecção de herbicidas fops e dims e verificar o efeito da água nesta seletividade.

### 2.2 *Objetivos específicos:*

- Avaliar a energia de interação entre a ACCase e os herbicidas bispyribac, clefoxydim, clethodim, clodinafop, ethoxysulfuron, glifosato, imazaquin, metsulfuron, oxasulfuron, pyriithiobac, propaquizafop e quizalofop através do atracamento molecular;
- Analisar as interações intermoleculares dos complexos enzima-herbicida formados a partir do atracamento molecular;
- Verificar o efeito da água na seletividade e sensibilidade do nanobiossensor por meio de Dinâmica Molecular e atracamento molecular.

### 3. Fundamentos Teóricos

#### 3.1 Agrotóxicos e herbicidas inibidores da ACCase

Substâncias químicas como os agrotóxicos são usadas com o objetivo de combater pragas que afetam plantações e animais desde a Antiguidade Clássica. Há registros de mais de 3000 anos que relatam o uso de arsênico para controle de insetos nas culturas gregas e romanas. A piretrina, um composto orgânico natural, extraído das flores de crisântemos (*Chrysanthemum sp*) já era utilizada a cerca de 2000 anos também como inseticida pelos chineses. No deserto, pó com piretrina era colocado nos grãos ou pendurando nas entradas das tendas guardavam cereais (ALVES FILHO, 2002).

Outros pesticidas como a nicotina e a rotenona eram extraídas das raízes de timbó (*Derris sp*) e utilizados como inseticidas; compostos a base de cobre, enxofre e mercúrio foram também usados para combater fungos na Europa no século XIX. A partir daí o uso de substâncias químicas para controle de pragas começou a aumentar e os compostos inorgânicos com esse uso foram chamados primeira geração dos agrotóxicos. No século XX, em 1932, o primeiro inseticida desenvolvido por síntese orgânica a base de tiocianato foi comercializado com o nome de *Lethane 384*, dando início à chamada *segunda geração* de agrotóxicos, cuja atenção principal foi a produção de agrotóxicos orgânicos (ALVES FILHO, 2002).

Dentre estes agrotóxicos da segunda geração, um deles foi o DDT (diclorocifeniltricloroetano), sintetizado pela primeira vez pelo cientista alemão Otto Ziedler, em 1873, e teve seu uso como pesticida descoberto somente mais tarde, em 1939, pelo químico suíço Paul Muller. Em poucos dias de uso, o DDT foi aclamado por seu amplo espectro de atividade, insolubilidade, facilidade de aplicação e baixo custo, e eficácia em matar as pragas, e logo se tornou utilizado no mundo todo. Foi utilizado também para dispersar soldados na segunda Guerra Mundial e para combater mosquitos vetores da malária (ZACHARIA, 2011).

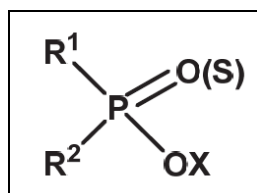
Foi somente após a Segunda Guerra Mundial que se deu o uso intensivo de agrotóxicos, porque havia nas indústrias químicas um excedente de venenos que eram utilizados como armas químicas, assim os fabricantes encontraram na agricultura um mercado ideal para a destinação dos mesmos. Dessa forma, medidas como políticas para ampliar o uso dos agrotóxicos e até modificações genéticas nas plantas para que estes pudessem reagir de forma satisfatória na presença dos agrotóxicos, foram incentivadas. Esse uso intensivo de

defensivos agrícolas e as medidas tomadas para a expansão do setor ficou conhecido como Revolução Verde (LONDRES, 2011).

Com isso houve o surgimento de inúmeras variedades de agrotóxicos, que podem ser classificados de acordo com três principais abordagens: classificação fundada no modo de ação, classificação baseada nas pragas que combatem, e, por último, de acordo com o grupo químico do qual fazem parte. De acordo com seu modo de ação, os agrotóxicos se incluem em duas classificações: sistêmicos ou de translocação e agrotóxicos de contato ou não sistêmicos (VARSHNEY; SONDHIA, 2008). Os primeiros agem de modo a entrar no sistema vascular da planta, enquanto que os não sistêmicos não entram no sistema vascular, afetando assim o local em que entram em contato (ZACHARIA, 2011).

A classificação de acordo com as pragas que controlam ou combatem se divide em: inseticidas, com uso para o controle de insetos; herbicidas para o controle de plantas daninhas; fungicidas, para o controle de fungos; raticidas para controle de roedores; acaricidas, para ácaros e carrapatos; moluscicidas usados para combate a moluscos; bactericidas para combate as bactérias; avicidas para controle de pássaros; algicidas para controlar e combater algas; virucidas para combater vírus (ZACHARIA, 2011).

A classificação química dos agrotóxicos se faz de acordo com o grupo químico a que pertencem. Há quatro grupos químicos maiores em que se classificam os agrotóxicos: os organoclorados, os organofosforados, carbamatos, e piretrinas e piretroides (análogos sintéticos das piretrinas). Os organoclorados possuem em sua estrutura pelo menos cinco ou mais átomos de cloro, estes foram os primeiros agrotóxicos orgânicos sintéticos utilizados na agricultura e na saúde pública como inseticidas e, por não serem facilmente degradados quimicamente e biologicamente, permanecem vários anos no meio ambiente. Por sua vez, os pesticidas organofosforados possuem um grupo fosfato em sua estrutura principal, cuja fórmula é apresentada na Figura 4 (ZACHARIA, 2011).

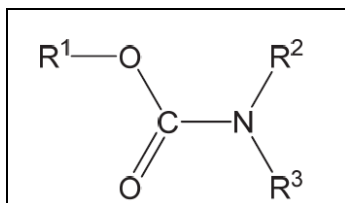


**Figura 4.** Fórmula geral de um pesticida organofosforado (ZACHARIA, 2011).

Os grupos  $\text{R}^1$  e  $\text{R}^2$  são grupos etila ou metila e os oxigênios podem ser substituídos por átomos de enxofre em alguns compostos, X pode representar inúmeros átomos ou grupos substituintes. Os organofosforados são prejudiciais a vertebrados e invertebrados, pois inibem

a enzima acetilcolinesterase (AChE) o que leva a um acúmulo do neurotransmissor acetilcolina na sinapse, o que leva a espasmos nos músculos causando a paralisia e a morte. Quanto aos danos ao meio ambiente, estes são facilmente decompostos por várias reações químicas e físicas no ambiente (ZACHARIA, 2011).

Outra classificação química dos agrotóxicos ou pesticidas inclui os carbamatos, derivados do ácido carbâmico, cuja fórmula geral está ilustrada na Figura 5.



**Figura 5.** Fórmula geral de um agrotóxico carbamato,  $\text{R}^1$  é um grupo álcool,  $\text{R}^2$  é um grupo metil e  $\text{R}^3$  um hidrogênio (ZACHARIA, 2011).

Carbamatos oxima e arilas possuem altas toxicidades a insetos e mamíferos por inibir a acetilcolinesterase, porém essa inibição é “reversível” em relação aos organofosforados. O termo reversível se refere à taxa de descarbamatação da enzima (organofosforados e carbamatos se ligam covalentemente à AChE) que ocorre em tempo que permite uma regeneração da enzima acetilcolinesterase, já a inibição por organofosforados requer que haja síntese de nova proteína para que sua atividade não cesse (ZACHARIA, 2011; TAYLOR, 2012).

Os agrotóxicos que compreendem a classe dos piretroides são análogos sintéticos das piretrinas, substâncias da *Chrysanthemum cinerariaefolium*, agem nas pragas de insetos que são seu alvo, tem baixa toxicidade em mamíferos e são facilmente biodegradadas. A substância ativa que age como inseticida são ésteres opticamente ativos derivados dos ácidos (+)-*trans*-crisantêmico e (+)-*trans*-piretroico. As piretrinas de origem natural tem fotoinstabilidade, já as modificações feitas a elas conferem uma maior estabilidade (ZACHARIA, 2011).

Na classificação de acordo com as pragas que combatem há os herbicidas, que são a classe dos agrotóxicos ou defensivos agrícolas utilizados para controlar e matar plantas daninhas que podem afetar áreas de culturas agrícolas, áreas urbanas e outros locais. Por séculos sais e cinzas foram utilizados com esse objetivo, controles seletivos só foram utilizados pela primeira vez em 1896 na França com o uso da cauda bordalesa para impedir que plantas daninhas de folhas largas afetassem videiras. Descobriu-se mais tarde que o sulfato de cobre presente na calda era a substância responsável pelos efeitos que causavam a morte das plantas daninhas. Entre 1898 e 1908 vários outros tipos de herbicidas como cloreto

de sódio, bissulfureto de carbono, arsenito de sódio foram desenvolvidos, porém não eram seletivos (VARSHNEY; SONDHIA, 2008).

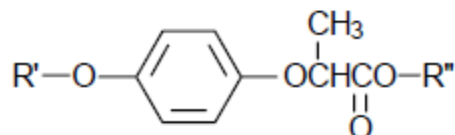
Posteriormente, com a descoberta da atividade do 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) como herbicida, sintetizado em 1941, houve o impulsionamento da produção de outros herbicidas como monuron, linuron, silvex, MCPA (ácido 4-cloro-2-metilfenoxiacético) e 2, 4, 5-T (ácido 2,4,5-Triclorofenoxiacético). Em 1970 foi introduzido o uso do glifosato que fazia um ótimo controle de gramíneas perenes e de plantas daninhas de folhas largas (VARSHNEY; SONDHIA, 2008).

Há também uma classificação química para os diferentes tipos de herbicidas, classificação esta utilizada pela Sociedade Científica de Plantas Daninhas da América, em inglês, *Weed Science Society of America* (WSSA), que inclui herbicidas inorgânicos e orgânicos. Os últimos compreendem os grupos: alifáticos, amidas, ariloxifenoxipropionatos, benzoicos, bipiridíliuns, carbamatos, ciclohexanodionas, dinitroanilinas, difenil éteres, imidazolininas, isoxazolidinonas, nitrilas, oxadiazóis, oxadiazolidas, fenóis, fenoxiácidos, N-fenilftalimidas, ftalamatos, pirazóliuns, ácidos picolínicos, piridinas, quinolinas, sulfoniluréias, tiocarbamatos, triazolopirimidina sulfonamida, triazolinonas, triazinas, uracila, ureias, entre outros (VARSHNEY; SONDHIA, 2008).

Herbicidas são distinguidos também por serem seletivos e não seletivos, dependendo do seu espectro de atividade. Os seletivos matam apenas determinadas espécies de plantas daninhas sem prejudicar outros tipos de plantas que são desejáveis, como a cultura na qual é aplicado. Enquanto que os não seletivos afetam tanto seu alvo bem como outras plantas que não se deseja combater e afetam também espécies animais (ZACHARIA, 2011). O modo de aplicação dos herbicidas pode ser feito diretamente no solo ou aplicado nas folhas. Geralmente a aplicação no solo é feita antes do plantio, antes da colheita ou em situações de emergência com plantas daninhas; esses três tipos de aplicação são chamados de pré-plantação, pré-emergência e pós-emergência. A aplicação nas folhas é feita pós-emergência (VARSHNEY; SONDHIA, 2008).

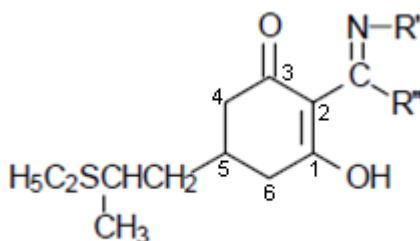
Há duas famílias de herbicidas que são inibidores da enzima acetil-coenzima A carboxilase: os ariloxifenoxipropionatos (fops) e as ciclohexanodionas (dims), estes também são conhecidos como graminicidas. Ambas as classes incluem herbicidas seletivos e sistêmicos. A fórmula geral da classe dos fops está representada na Figura 6. O R' se refere a grupos arilas, oxi diz respeito a oxigênio ligado a este grupo arila, o fenoxi diz sobre o anel benzeno ligado a um oxigênio, e o propionato faz referência à porção do herbicida que tem o ácido propiônico, R'' é um grupo éster, pois alguns herbicidas são preparados como ésteres de

seus ácidos (GRIFFIN, 2012). Os herbicidas dessa classe estudados neste trabalho foram o clodinafop-propargil, que é degradado em menos de um dia a clodinafop e os herbicidas propaquizafop e quizalofop, os três herbicidas são de aplicação feita em pós-emergência em culturas de algodão, soja, trigo, tomate, amendoim, cebola e feijão.

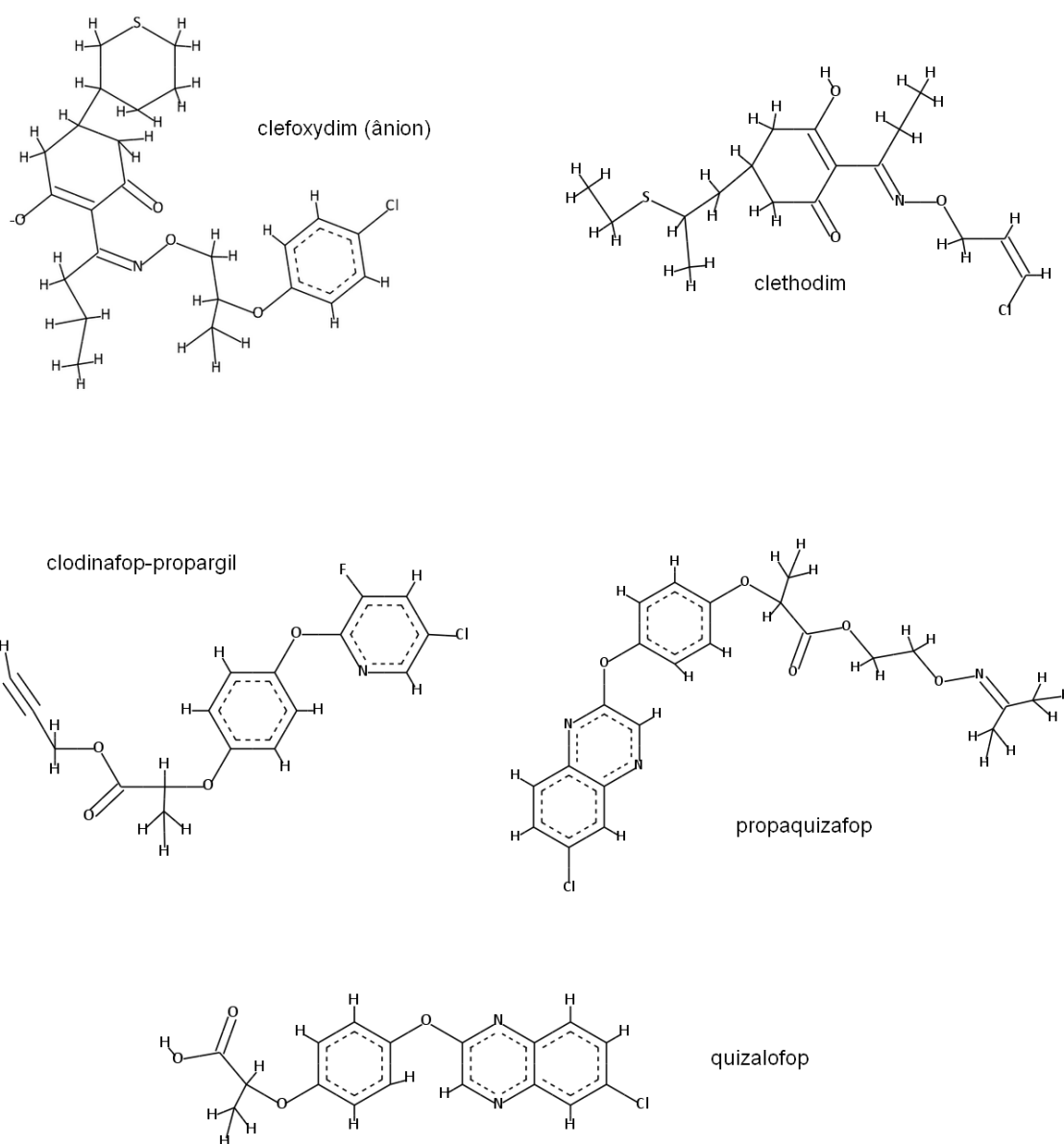


**Figura 6.** Fórmula geral dos herbicidas do grupo dos ariloxifenoxipropionatos (GRIFFIN, 2012).

A classe das ciclohexanodionas (Figura 7) tem uma estrutura básica que consiste de um anel ciclohexano com a ligação dupla na posição 1, uma carbonila na posição 3, os grupos das posições 2 e 5 podem variar bem como os grupos R' e R'' (GRIFFIN, 2012). Os dims estudados foram os herbicidas clefoxydim de lítio utilizado em culturas de arroz, e o clethodim utilizado nas culturas de soja, batata, alface e beterraba. Ambos utilizados para aplicação pós-emergente. Na Figura 8 estão ilustradas as estruturas dos herbicidas fops e dims que foram estudados neste trabalho.



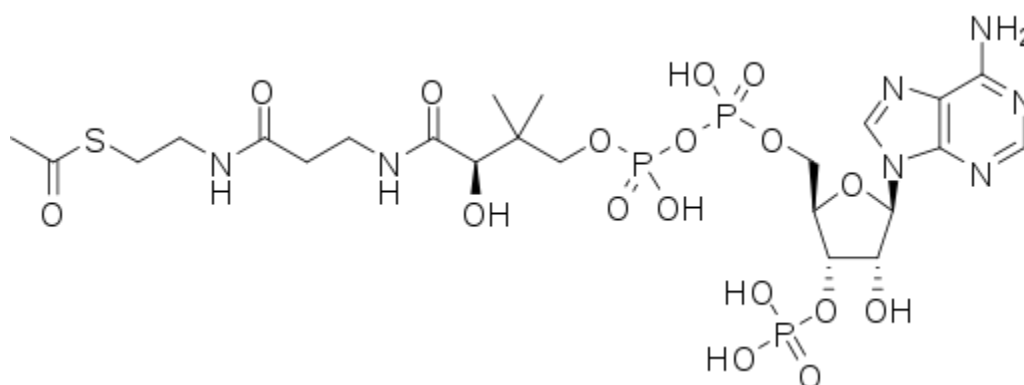
**Figura 7.** Fórmula geral dos herbicidas da classe das ciclohexanodionas (GRIFFIN, 2012).



**Figura 8.** Herbicidas fops e dims. Pode-se verificar no clefoxydim e clethodim os anéis da ciclohexanodionas e os grupos alquila (propil e etil) na porção oxima dos herbicidas. Entre os fops as regiões em comum: a hidroquinona substituída e o ácido propanoico.

### 3.2 Acetil-Coenzima A Carboxilase (ACCase)

A molécula de malonil-CoA, a qual é a acetil-CoA (Figura 9) com seu grupo acila ativado pelo  $\text{CO}_2$ , é um intermediário para a síntese de ácidos graxos pelo complexo multienzimático ácido graxo sintase. Como a condensação de grupos acila (de dois acetil-CoA, por exemplo) é um processo endergônico, e essa condensação é crucial para a formação de ácidos graxos, a ativação do acetil-CoA pelo grupo  $\text{CO}_2$  (que é um bom grupo de saída) torna o carbono situado entre o carbono da carbonila e da carboxila um bom nucleófilo, o que dá início a síntese de lipídios (NELSON; COX, 2002).



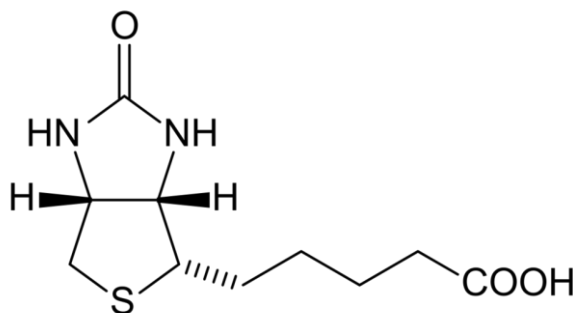
**Figura 9.** Estrutura da acetil-CoA.

A acetil-coenzima A carboxilase (ACCase) é a enzima dependente da biotina que catalisa essa carboxilação do acetil-CoA para malonil-CoA. A biotina (Figura 10) é uma vitamina também conhecida por vitamina H, vitamina B7 ou vitamina B8, que se liga a uma lisina da ACCase e atua como grupo prostético dessa enzima. A ACCase possui os domínios biotina carboxilase (em inglês *biotin carboxylase* - BC), transcarboxilase (*carboxyltransferase* - CT) e uma proteína carreadora de carboxil-biotina (*biotin carboxyl carrier protein* - BCCP), na qual a biotina está ligada covalentemente. (TONG, 2013).

Em mamíferos, fungos e outros organismos eucarióticos os domínios BC, CT e BCCP da ACCase se apresentam em um único polipeptídeo multifuncional, enzima com multidomínios; já em células procarióticas estes domínios se apresentam três subunidades separadas. No entanto, há espécies que apresentam diferentes formas da enzima algumas como híbridos

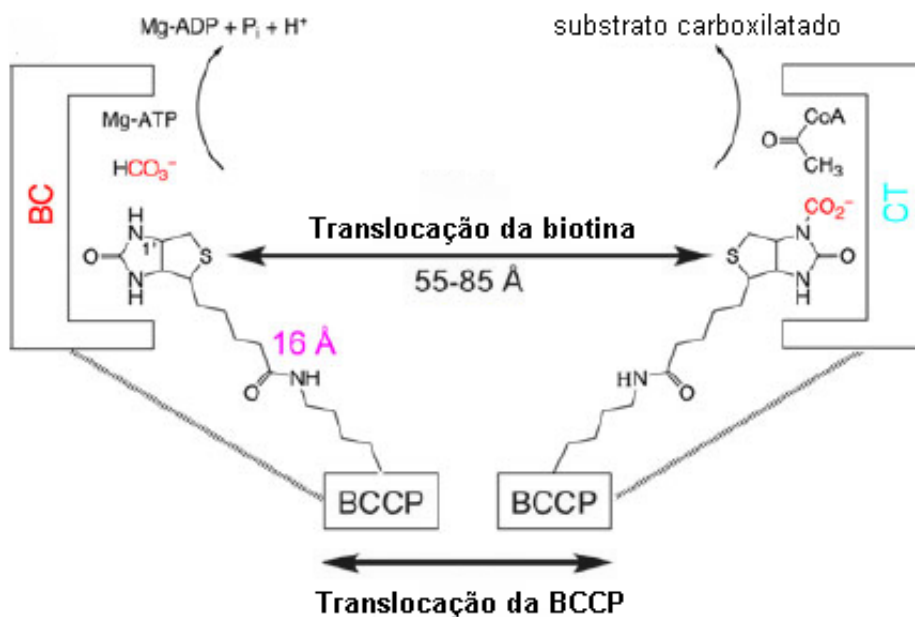


dessas duas formas maiores (NELSON; COX, 2002 & TONG, 2013).



**Figura 10.** Estrutura da biotina.

A ACCase converte então a acetil-CoA à malonil-CoA em duas etapas. Na primeira há a carboxilação, no domínio BC, de uma biotina ligada covalentemente a uma lisina da proteína carreadora de carboxil-biotina (BCCP), reação que consome energia através da adenosina trifosfato (ATP). Posteriormente, no domínio CT, há a transferência do  $\text{CO}_2$  para a acetil-CoA, convertendo-a em malonil-CoA (ZHANG; TWEEL; TONG, 2004). Neste passo, a carboxilação da biotina no domínio BC, se dá pela doação de uma molécula de  $\text{CO}_2$  procedente de um hidrogenocarbonato para a biotina, na segunda etapa o domínio CT catalisa a transferência do  $\text{CO}_2$  para o substrato, acetil-CoA. Como dito, a biotina se liga covalentemente a um  $\text{CO}_2$  e depois o transfere para o substrato, desse modo, como cada um desses passos ocorrem em domínios diferentes, a biotina precisa se mover entre o BC e CT. Isto ocorre por meio da proteína carreadora de carboxil-biotina. O mecanismo que tem sido aceito para essa movimentação da biotina descreve-a como um “braço”, ligado à BCCP, que se movimenta entre as duas subunidades para que haja esta translocação (TONG, 2013). Este esquema está ilustrado na Figura 11.



**Figura 11.** Esquema da translocação da biotina entre BC e CT (adaptado de TONG, 2013).

Nos mamíferos, há duas isoformas da ACCase: ACCase 1 ou ACCase  $\alpha$  e ACCase 2 ou ACCase  $\beta$ . A ACCase 1 está no citoplasma e controla a taxa limitante de velocidade da biossíntese de ácidos graxos no fígado e tecidos adiposos. A ACCase 2 está relacionada a membrana mitocondrial por meio de uma sequência de 140 resíduos (que não existem na ACCase 1) no aminoterminal. Ela está expressa nos tecidos musculares e do coração e também no fígado (TONG, 2013).

Em plantas, a ACCase localizada nos plastídios é denominada ACCase 1, esta produz malonil-CoA que é usada para a biossíntese de ácidos graxos de cadeia longa, já a ACCase 2 das plantas está localizada no citoplasma e é importante para o metabolismo secundário, na síntese de ácidos graxos de cadeia grande, síntese de flavonoides, ceras, e atua também no desenvolvimento embrionário. A ACCase 1 das dicotiledôneas é uma enzima com subunidades, similar a dos procarióticos. Enquanto que, nos plastídios das gramíneas, se assemelha a ACCase multi-domínios dos eucarióticos, esta última é alvo de herbicidas inibidores (TONG, 2013), especificamente um terço do C-terminal no domínio CT (ZHANG; TWEEL; TONG, 2004).

Estudos experimentais feitos há alguns anos com a ACCase do milho (Pioneer hybrid '3780') na presença do haloxyfop, diclofop e tralkoxydim já mostravam que a incorporação de  $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$  era dependente da presença da acetil-CoA e do ATP. E quando havia a presença de  $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  dos herbicidas haloxyfop e tralkoxydim 40% da atividade enzimática da ACCase era inibida neste estudo. No qual, a medida da inibição da atividade da ACCase

variou de acordo com a concentração dos herbicidas, pois cerca de 25% da atividade enzimática foi inibida com a presença de 125 nmol.L<sup>-1</sup>; enquanto, que em uma quantidade maior de 75 µmol.L<sup>-1</sup> de herbicida a inibição da atividade enzimática chegou a 80% (SECOR; CSÉKE, 1988).

Em estudos anteriores, o complexo formado pelo domínio CT da enzima com os herbicidas diclofop e haloxyfop foi sintetizado e determinado por cristalografia de raios X. Os resultados mostraram que o modo de ligação do herbicida haloxyfop no domínio CT apresentou interações  $\pi$ - $\pi$  entre o grupo piridil e os resíduos de aminoácidos TYR-1738 e PHE-1956; ligações de hidrogênio com um dos oxigênios do carboxilato com as amidas da cadeia principal dos resíduos ALA-1627 e ILE-1735; interações de van der Waals do grupo metil do haloxyfop e os resíduos ALA-1627 e LEU-1705; e a região do trifluorometil se apresentou sobre o plano do TRP-1924 (ZHANG; TWEEL; TONG, 2004). Esses dados são importantes, pois podem dizer sobre elementos de reconhecimento feito pela enzima em relação aos herbicidas da classe dos fops.

Também foi determinada por Xiang *et al.* (2009) a estrutura cristalográfica do domínio CT da enzima ACCase complexada ao herbicida tepraloxymid. Nesta estrutura, o anel ciclohexanodiona do tepraloxymid ficou entre os resíduos da GLY-1734 e VAL-2024; um dos oxigênios da ciclohexanodiona fez ligação de hidrogênio com as amidas da ALA-1627 e da ILE-1735, enquanto o outro oxigênio realizou ligação de hidrogênio com a amida da GLY-1998. A ligação dupla da região oxima está próxima aos resíduos GLY-1734, ILE-1735, GLY-1997 e GLY-1998. O grupo etil dessa mesma região está posicionado em uma região predominantemente hidrofóbica constituída dos resíduos alanina, serina, valina e leucina (XIANG *et al.*, 2009). Estes dados mostram interações que podem ser cruciais na inibição da enzima ACCase pelos herbicidas da classe dos dims.

Essas interações intermoleculares que ocorrem entre as moléculas biológicas são de extrema importância entre um ligante e um biopolímero, como no caso de complexos enzima-substrato, complexos antígeno-anticorpo e fármaco-receptor porque nesses complexos há no ligante grupos funcionais que interagem com grupos específicos de um sítio no biopolímero, assim contatos intermoleculares específicos devem ocorrer no complexo. Como resultado, alguns ligantes só formam complexos com determinadas biomacromoléculas. Há então ligantes que se assemelham aos substratos específicos das enzimas pelo fato de fazerem as mesmas interações que o substrato, tem-se assim os fármacos, os herbicidas entre outros. Nessas interações intermoleculares, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas são

responsáveis também pela conformação espacial das estruturas biológicas como proteínas, enzimas, ácidos nucleicos e membranas celulares (ATKINS, 2011).

Interações entre grupos apolares também são importantes na formação dos complexos. Isso ocorre, pois nos sítios ativos de muitas enzimas há bolsos e regiões hidrofóbicas que se ligam a regiões apolares do ligante, há então o efeito hidrofóbico, na qual a aglomeração de grupos apolares aumenta a entropia do solvente. Interações eletrostáticas também fazem parte das interações intermoleculares na formação dos complexos, já que no meio do sítio da enzima a permissividade relativa pode ser menor e os grupos carregados se atraem. Há também interações de empacotamento  $\pi$ , na qual sistemas  $\pi$  se agrupam em orientação quase paralela (ATKINS, 2011).

As interações  $\pi$ - $\pi$  ou empacotamento  $\pi$  ocorrem entre sistemas  $\pi$  ricos em elétrons e sistemas  $\pi$  pobres em elétrons que leva a uma maior estabilidade para o dímero. Trabalhos com estruturas do Protein Data Bank analisando-se o núcleo das enzimas para estudar a conformação das interações  $\pi$  -  $\pi$  nos resíduos de aminoácidos fenilalanina, tirosina, histidina e triptofano mostram que as interações  $\pi$ -  $\pi$  ocorrem em duas orientações mais comuns: uma quase paralela denominada 1p, e em forma de T denominada 1t. Agentes medicinais que possuem porções aromáticas devem sua ação em parte devido a interações com anéis aromáticos dos aminoácidos das enzimas. Para esses aminoácidos a distância dos centros de massa do sistema  $\pi$  foram menores que 12Å com um valor mínimo de 7,5Å. Para as distâncias de contato mais próximas entre os átomos desses resíduos o valor encontrado foi de 4,5 a 5Å. (MCGAUGHEY; GAGNÉ; RAPPÉ, 1998).

Os herbicidas fops e dims são ambos seletivos para as gramíneas, e não resultam na morte da planta da cultura em que o herbicida é aplicado. A seletividade desses herbicidas da ACCase ocorre devido ao fato de que a forma da enzima difere entre dicotiledôneas e monocotiledôneas, embora ambas possuam a ACCase nos cloroplastos e no citoplasma. Nas primeiras, a ACCase procariótica possui várias subunidades e está no cloroplasto, no citoplasma se encontra a ACCase eucariótica (uniproteica), já as monocotiledôneas têm apenas a forma eucariótica, que está tanto no citoplasma quanto nos cloroplastos. Assim, quando ocorre a ação do herbicida apenas a forma eucariótica é inibida, o que faz com que apenas as gramíneas caiam em detrimento, pois a enzima procariótica das dicotiledôneas é suficiente para a produção de malonil-CoA para a sobrevivência da planta (MARCHI; SANTOS MARCHI; GUIMARÃES, 2008).

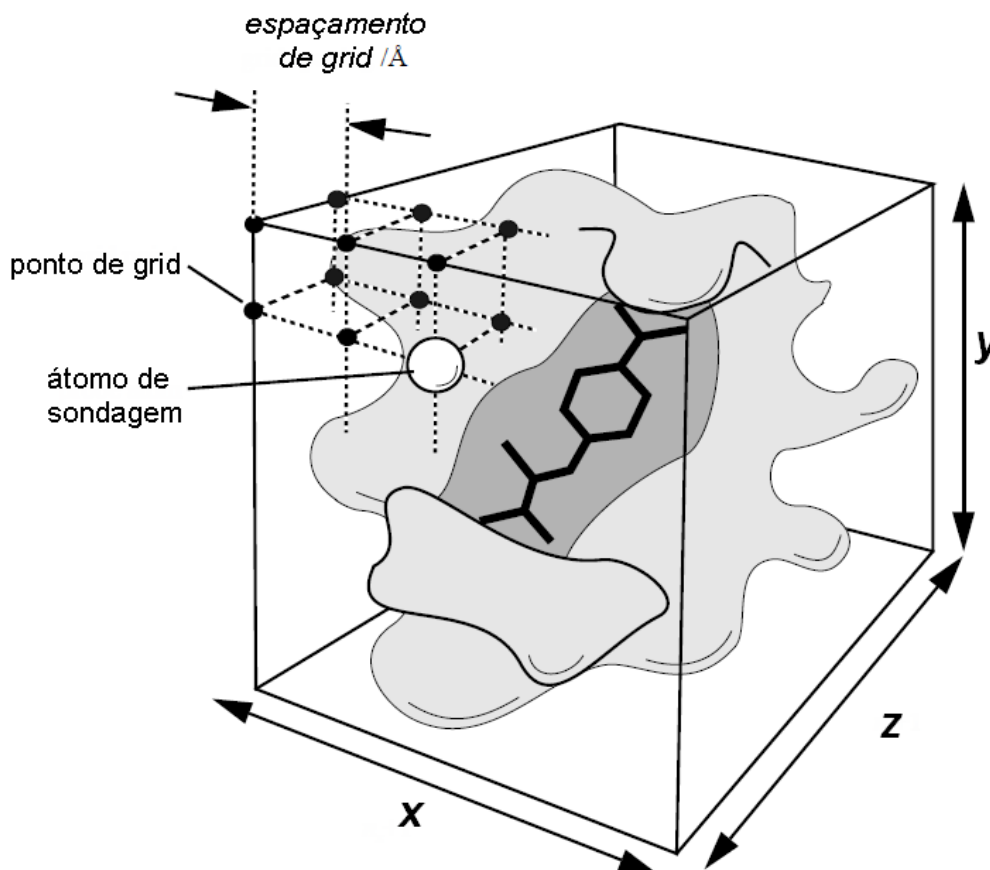
Como os lipídeos são fundamentais na produção de fosfolipídios para a formação de membranas, de cutículas, e de suberina nas estrias de Caspary das células endodérmicas, além

de ser fonte de energia. Quando a biossíntese de malonil-CoA e, assim, de lipídeos é inibida por algum herbicida específico o crescimento e o desenvolvimento da planta daninha são interrompidos (GRIFFIN, 2012). Após a aplicação, as plantas sensíveis aos herbicidas apresentam os primeiros sintomas nas regiões meristemáticas, na qual a síntese de lipídeos para membranas é maior, nessas regiões ocorre descoloração e desintegração. As folhas ficam avermelhadas e arroxeadas, e as folhas novas morrem entre uma e três semanas por clorose (OLIVEIRA JR, 2011).

### 3.3 Atracamento Molecular

O atracamento molecular é um dos métodos de modelagem molecular e busca, por meio de avaliações de energias livres de ligação, predizer o modo de ligação entre um ligante e um receptor, especificamente na região do sítio ativo da molécula receptora, que pode ser uma proteína, anticorpo, enzima, DNA, RNA, lipídios, polissacarídeos, um polímero, entre outros. A metodologia do atracamento molecular é dividida em dois subproblemas que são o *docking* e o *scoring*. O *docking* se refere aos algoritmos que investigam uma hipersuperfície de energia para prever a conformação e a orientação de uma molécula ligante em relação ao alvo molecular, chamado de receptor. O *scoring* se ocupa do modelo de avaliação da energia livre de ligação, que seja viável computacionalmente, para verificar de forma adequada dentre os diversos modos de ligação àquele que possui a maior afinidade de ligação (MAGALHÃES, 2006).

As avaliações de energia são feitas rapidamente devido ao fato de ser feito um pré-cálculo dos potenciais de afinidade de cada átomo do substrato, ligante, relativamente à região da enzima onde o atracamento será realizado. A biomolécula em sua totalidade ou alguma região específica dela é colocada em uma grade tridimensional que possui um átomo (*probe atom*) que investiga os pontos da grade onde a enzima está imersa e grava uma grade de afinidade para cada átomo do ligante, que é gerada de acordo com os átomos da enzima. Desse modo, são gerados mapas de grid, sendo um para cada tipo de átomo presente no ligante, esses mapas são requeridos pelo software AutoDock para a realização do atracamento. A Figura 12 ilustra um mapa de *grid* e o espaçamento padrão dos pontos de grade é de 0,375Å (MORRIS *et al.*, 2001).



**Figura 12.** Esquema de um mapa de *grid* (Adaptado de MORRIS *et al.*, 2001).

Depois do mapa de *grid* ser colocado em determinada região da enzima, a energia das configurações que o substrato (ligante) assume são avaliadas através de interpolação tri-linear dos valores de afinidade dos oito pontos de *grid* que estão ao redor do *probe atom*. A interação eletrostática é calculada de modo similar, por interpolação dos valores de potencial eletrostático multiplicado pela carga de cada átomo, o termo eletrostático é avaliado separadamente para permitir um maior controle das cargas atômicas do substrato (MORRIS *et al.*, 2001). O tempo dos cálculos de atracamento molecular depende apenas da quantidade de átomos no substrato e independe da quantidade de átomos do receptor. O programa utilizado para esses cálculos foi o AutoDock 4.0 com a interface AutoDockTools (ADT).

O programa foi validado por testes com complexos de proteínas-ligantes que haviam sido caracterizados por cristalografia de raios X. Dentre estes testes foram incluídos complexos da fosfocolina ligada a um anticorpo, N-formiltryptofano ligada a quimotripsina e N-acetilglucosamina ligada à lisozima. Os resultados de atracamento para a maioria dos testes reproduziram os complexos cristalográficos. Em outros casos o programa foi utilizado para prever interações entre complexos antes da análise cristalográfica e foi bem sucedido na previsão (MORRIS *et al.*, 2001).

A formação do complexo enzima-ligante depende da entropia e entalpia. O efeito hidrofóbico afeta a entropia do solvente, pois na formação do complexo regiões apolares do sítio ativo são ocultadas por regiões apolares do ligante, desse modo a região sofre dessolvatação e mais moléculas de água são liberadas para o meio da solução, o que aumenta a entropia. Por outro lado, quando há a formação do complexo alguns graus de liberdade são perdidos para que haja maior estabilização do mesmo, e há diminuição na entropia conformacional devido à menor mobilidade dos ângulos diedros durante a formação do complexo. A contribuição entálpica vem da entalpia da formação do complexo que pode ter um valor negativo ou positivo, e diz respeito se o complexo é mais favorável do que herbicida e enzima não complexados. Dessa forma, estes efeitos entálpicos e entrópicos da formação do complexo podem ser estimados com as equações (1) e (2) abaixo, referente à energia de Gibbs (MAGALHÃES, 2006).

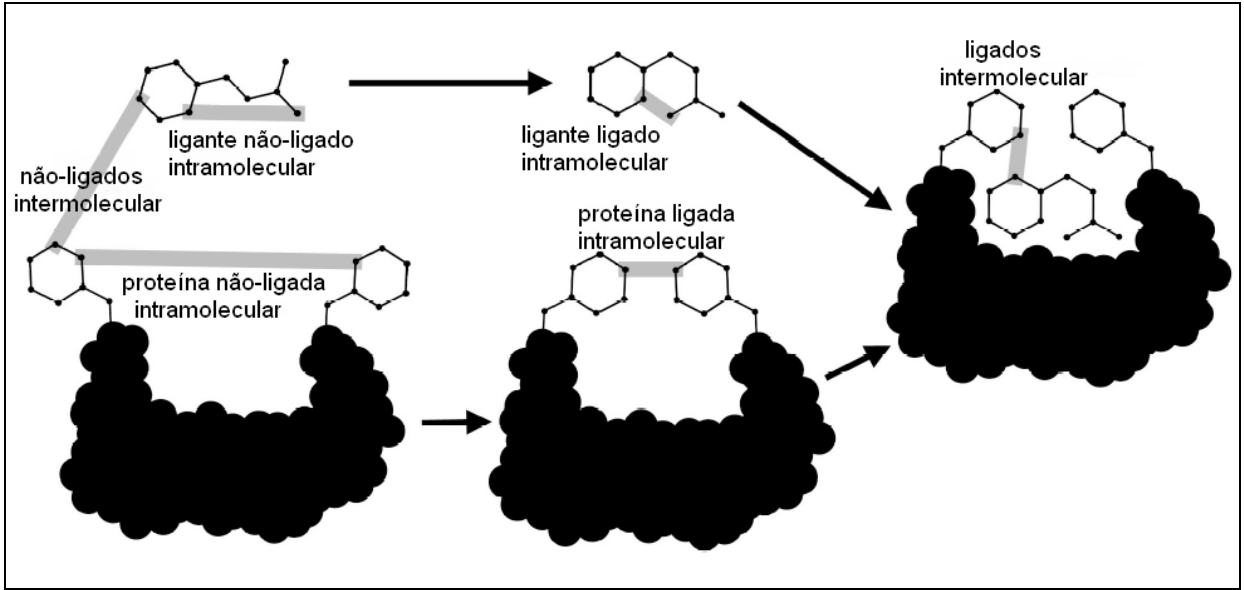
$$\Delta G_{lig} = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

$$\Delta G_{lig}^{\circ} = - RT \ln K_i \quad (2)$$

A segunda equação (2) mostra a relação da constante de inibição com a energia livre de ligação, assim, se a constante de inibição, que pode ser medida experimentalmente, for conhecida é possível calcular o valor da energia livre de Gibbs. A maioria dos programas de atracamento molecular utiliza funções de energia potencial baseados nos campos de força da mecânica Clássica para avaliar a energia (MAGALHÃES, 2006).

O programa AutoDock utiliza um campo de força semi-empírico para calcular as energias livres de ligação das conformações dos ligantes durante as simulações de atracamento. Este campo de força é parametrizado usando um grande número de complexos receptor-ligante, cujas estruturas e constantes de inibição são conhecidas. O campo de força avalia, então, a energia de interação em dois passos: primeiro as interações intramoleculares em que o receptor, macromolécula, e o ligante estão no estado não-ligado e vão para o estado ligado; depois avalia suas interações intermoleculares das conformações de ambos nos estados de interação intramolecular ligados para as interações intermoleculares quando há a formação do complexo receptor-ligante, estas interações estão representadas na Figura 13 (MORRIS *et al.*, 2012).





**Figura 13.** Representação das interações intra e intermoleculares do receptor, proteína, e o ligante (Adaptado de MORRIS *et al.*, 2012).

A energia livre de ligação é então calculada de acordo com a equação:

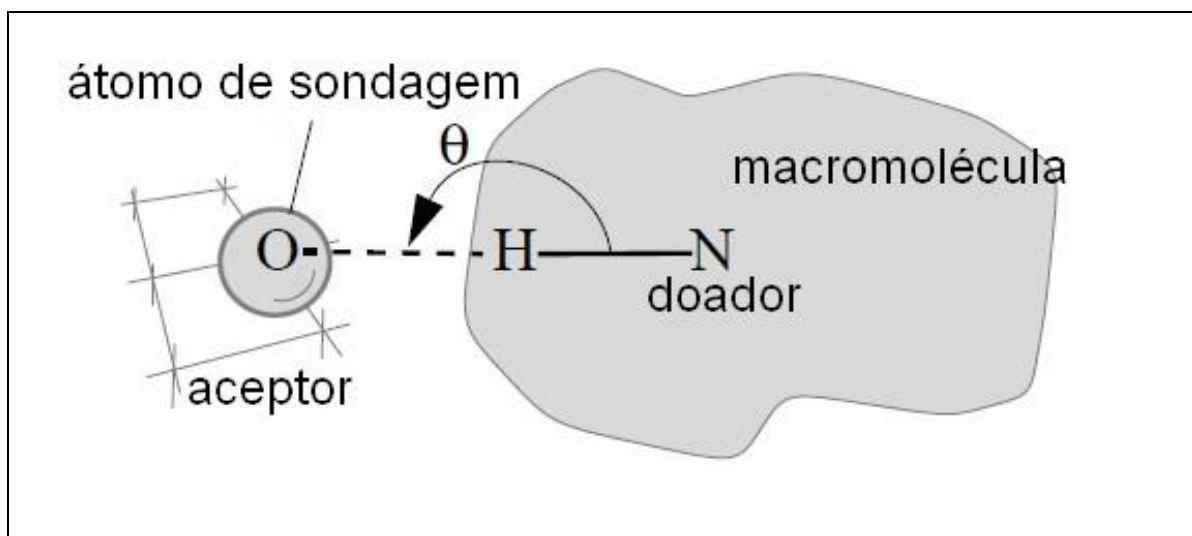
$$\Delta G = \left( V_{\text{ligados}}^{L-L} - V_{\text{não ligados}}^{L-L} \right) + \left( V_{\text{ligados}}^{P-P} - V_{\text{não ligados}}^{P-P} \right) + \left( V_{\text{ligados}}^{P-L} - V_{\text{não ligados}}^{P-L} + \Delta S_{\text{conf}} \right) \quad (3)$$

Onde, L se refere ao ligante e P à proteína,  $\Delta S_{\text{conf}}$  se refere à perda da entropia conformacional devido a formação do complexo proteína-ligante. Os seis pares de avaliação de energia incluem interação de van der Waals, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, e o último termo é a dessolvatação.

$$V = W_{\text{vdw}} \sum_{i,j} \left( \frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) + W_{\text{hbond}} \sum_{i,j} E(t) \left( \frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} \right) + W_{\text{elec}} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} + W_{\text{sol}} \sum_{(i,j)} (S_i V_j + S_j V_i) e^{(-r_{ij}^2/2\sigma^2)} \quad (4)$$

Os valores de W representam constantes de ponderação e são otimizadas para calibrar a energia livre empírica a partir de valores de constantes de inibição calculados experimentalmente. O primeiro termo usa potenciais 6/12 de Lenard-Jones para calcular as atrações e repulsões e utiliza parâmetros do campo de força AMBER, o segundo termo se refere às ligações de hidrogênio e usa potenciais 10/12, os parâmetros C e D são atribuídos de modo a fazer com que o máximo da profundidade do poço de ligações de hidrogênio entre oxigênio e nitrogênio e entre o oxigênio e o enxofre tenham energia de 5 kcal/mol com distância de 1,9 Å e 1 kcal/mol em 2,5 Å, respectivamente.  $E(t)$ , se refere ao ângulo ( $t$ ) ideal da ligação de hidrogênio (HUEY *et al.*, 2007).

O programa AutoGrid verifica essas ligações de acordo com os ângulos, nas quais o ângulo ideal deve ter  $180^\circ$  entre o átomo receptor da ligação de hidrogênio, o átomo de hidrogênio e o átomo doador da ligação. A Figura 14 mostra essa informação, na qual o átomo investigador ou de sondagem busca as ligações de hidrogênio de acordo com os átomos do ligante e do receptor. O terceiro termo é a energia coulombiana para as interações eletrostáticas. O potencial de dessolvatação, quarto termo, baseia-se no volume dos átomos que cercam os demais, sendo uma barreira que os isola do solvente (MORRIS *et al.*, 2012).



**Figura 14.** Ângulo de uma ligação de hidrogênio ideal, atracamento receptor-ligante, não há ligação e hidrogênio quando o ângulo é  $90^\circ$  ou menos (Adaptado de MORRIS *et al.*, 2001).

Para a busca pela melhor energia de interação o Autodock utiliza um Algoritmo Genético Lamarckiano. Estes algoritmos genéticos são métodos computacionais estocásticos que se baseiam na teoria da Evolução das Espécies de Charles Darwin. Os algoritmos genéticos (AG) foram inventados na década de 1960 por Jonh Holland, juntamente com a programação evolucionária. As estratégias de evolução e programação genéticas constituem a área chamada de Computação Evolucionista, que faz parte da área de inteligência artificial, que abrange os métodos computacionais baseados na teoria da evolução de populações biológicas naturais (MAGALHÃES, 2006).

Assim, os AG são métodos de busca inspirados na genética e no processo de evolução natural e trabalha com população de indivíduos que evoluem por meio de processos de seleção em evolução. Cada indivíduo é uma estrutura de dados (cromossomo-que representa cada conformação estrutural do ligante no sítio ativo da enzima), e cada um desses cromossomos representa uma possível solução ao problema a ser solucionado, uma função

aptidão (equação 4) então verifica a qualidade de cada estrutura de dados que podem ser soluções, se apresentarem boa solução possuem assim boa aptidão para o problema. A reprodução dos indivíduos é feita por operadores genéticos de recombinação (*crossover*) e mutação no cromossomo. Na recombinação conjuntos de genes do cromossomo, que representam graus de liberdade torcionais do ligante são trocados. Na mutação apenas um gene de um cromossomo, ou seja, apenas um grau de liberdade torcional da conformação estrutural do ligante é modificado. (MAGALHÃES, 2006). A Figura 15 descreve, de modo geral, um algoritmo genético.

1. Inicialize a população de soluções
2. Avalie os indivíduos da população
- Repita
  3. Selecione indivíduos para a reprodução
  4. Aplique operadores de reprodução
  5. Avalie os indivíduos gerados
  6. Selecione indivíduos para sobreviver
- Até critério de parada satisfeito
7. Fim

**Figura 15.** Algoritmo genético convencional (MAGALHÃES, 2006, p.60).

Com essas 7 etapas resolve-se os subproblemas do atracamento molecular por meio da função de avaliação para a melhor energia do ligante. Em 1. determinadas quantidades de conformações do ligante iniciam a população de soluções (as melhores conformações com menor valor de energia de interação); em 2. faz-se a avaliação dessas populações; em 3. as melhores conformações são selecionadas para a reprodução em 4.; em 5. uma nova avaliação é feita; em 6. a taxa de elitismo seleciona a quantidade de conformações que serão preservadas para a próxima reprodução. Quando a quantidade de conformações com melhores energias de interação são encontradas em 7. o cálculo é finalizado.

Deste modo, os algoritmos genéticos são operados sobre uma codificação (genótipo - conjunto de informações para a construção de um organismo) da solução procurada (fenótipo - o organismo). O cromossomo é uma cadeia de variáveis (genes) que representa os parâmetros para o problema; no *docking* as diferentes conformações encontradas para o ligante são os cromossomos e os genes são os graus de liberdade do ligante. A representação do cromossomo é binária, sendo este uma longa cadeia de dígitos  $\{0,1\}^n$ , com 0 para verdadeiro e 1 para falso. Depois de cada indivíduo gerado (a solução) uma função de aptidão ou função

de avaliação verifica se a solução gerada é a melhor. Os indivíduos com aptidão melhor passam seus genes para os próximos indivíduos que serão também avaliados quanto à aptidão (MAGALHÃES, 2006).

Na seleção para a geração de novos indivíduos há um parâmetro chamado Elitismo, que copia um ou mais indivíduos de uma geração para a próxima geração para preservá-los de serem perdidos em outra etapa de reprodução. Em uma reprodução indivíduos são gerados até que formem a quantidade da população determinada. A reprodução os operadores de recombinação atua de modo a trocar genes de dois ou mais cromossomos “pais” gerando dois ou mais cromossomos filhos. Para isso há um ponto de *crossover* (recombinação) que “corta” o cromossomo em determinado local, no qual haverá as trocas de genes. Já o operador de mutação determina a mudança nos valores de um ou mais genes de um cromossomo “pai” para gerar um novo indivíduo, assim o operador mutação faz uma pequena modificação no cromossomo (MAGALHÃES, 2006).

### 3.4 Dinâmica Molecular

A dinâmica molecular é uma técnica computacional que se ocupa em determinar os movimentos das partículas de sistemas químicos, biológicos e físicos, sendo para isso necessário conhecer seus potenciais de interação com as demais partículas e as equações que regem seu movimento (MORGON; COUTINHO, 2007). Ambos, potenciais e equações de movimento, constituem o que se denomina campo de força, que “é uma representação física de um sistema em simulações computacionais, que consiste de uma forma funcional e de um conjunto de parâmetros de ajuste às suas respectivas funções” (MAGALHÃES, 2006, p.16). O campo de força permite que se estude o modo como a configuração de um sistema evolui de acordo com o tempo, o que possibilita determinar propriedades do sistema baseadas nas leis da Mecânica Clássica e nos princípios da Mecânica Estatística. Com este método, partículas que interagem uma com as outras que estão em uma configuração inicial se movimentam de acordo com potenciais de interação ligados e não ligados (MORGON; COUTINHO, 2007).

A dinâmica molecular desconsidera os movimentos eletrônicos e trata os átomos como esferas rígidas que possuem carga e posições definidas, caracterizadas por energias potenciais. O campo de força define então os potenciais ligados: potencial harmônico de ligação ou linear, potencial harmônico angular, e potencial torcional ou diedral; e os potenciais não-ligados ou intermoleculares: potencial de van der Waals ou de Lenard-Jones e potencial de Coulomb. Tem-se, assim, uma equação para avaliar o valor da energia potencial total (AMARANTE *et al.*, 2013).

$$V_{\text{total}} = V_d + V_\theta + V_\varphi + V_{LJ} + V_C \quad (5)$$

Onde  $V_d$  é a energia potencial de ligação entre dois átomos,  $V_\theta$  a energia do ângulo de ligação entre eles e  $V_\varphi$  a energia torcional de um ângulo diedro. Os dois últimos termos que se referem aos potenciais não ligados e são  $V_{LJ}$ , potencial de Lenard-Jones e  $V_C$ , potencial de interações eletrostáticas, dada pela equação de Coulomb.  $V_d$  é o potencial de ligação que há entre dois átomos, neste potencial a ligação covalente é modelada como um oscilador harmônico clássico. A equação (6) descreve a energia resultante do estiramento da ligação em relação ao seu comprimento de equilíbrio,  $d_0$  (AMARANTE *et al.*, 2013).

$$V_d = \frac{1}{2} k_d (d - d_0)^2 \quad (6)$$

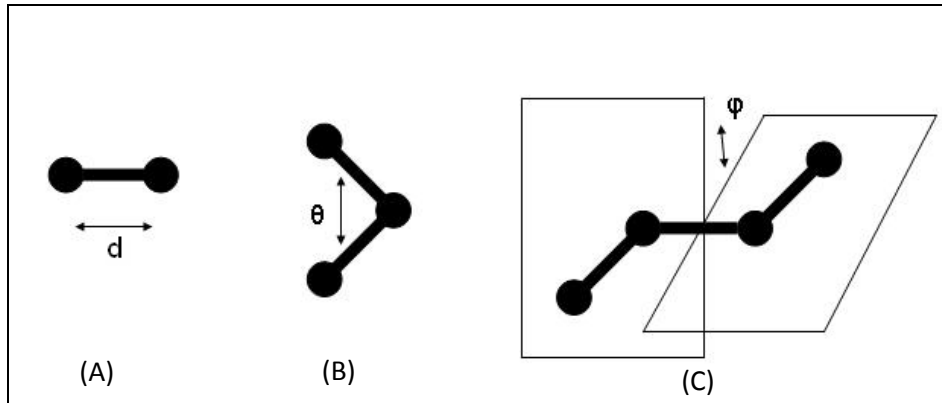
Onde  $d$  é o comprimento de ligação entre dois átomos  $i$  e  $j$ ,  $d_0$  o comprimento de equilíbrio e  $k_d$  a constante de força elástica. Na equação (7) está descrito o potencial harmônico angular que descreve a energia em relação aos desvios feitos a partir do ângulo de

referência formado entre três átomos,  $\theta$  é o ângulo formado entre os três átomos ligados,  $\theta_0$  é o ângulo de equilíbrio e  $k_\theta$  é a força para a torção do ângulo de ligação (AMARANTE *et al.*, 2013). As constantes  $k_d$  e  $k_\theta$  são determinadas pelos tipos de átomos que fazem a ligação covalente e que formam os ângulos, elas informam a quantidade de energia necessária por unidade de comprimento para que haja determinado estiramento ou determinada torção de um ângulo (MAGALHÃES, 2006).

$$V_\theta = \frac{1}{2} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 \quad (7)$$

$$V_\phi = k_\phi [1 + \cos(n\phi + \delta)]^2 \quad (8)$$

O potencial torcional,  $V_\phi$ , refere-se aos ângulos diedros, isto é, ângulos formados por quatro átomos ligados. Existem barreiras de energias que precisam ser superadas para que haja torções específicas nesses ângulos diedros. Na equação 8, que descreve o potencial torcional,  $k_\phi$  é a altura da barreira energética para determinada torção,  $\phi$  é o ângulo diedro da ligação do centro em relação as quatro átomos,  $\delta$  é a diferença de fase desse ângulo que pode assumir os ângulos  $0^\circ$  e  $180^\circ$  e  $n$  é o número de mínimos na curva de energia potencial pelo ângulo de torção (AMARANTE *et al.*, 2013). A Figura 16 ilustra os três tipos de interações ligadas.



**Figura 16.** Termos dos potenciais ligados: (A) potencial de ligação, (B) potencial angular e (C) potencial torcional (Adaptado de MAGALHÃES, 2006).

Os potenciais não-ligados são descritos pelas equações 9 e 10. O potencial de Lennard-Jones descreve interações não ligadas do tipo de van der Waals, que podem ser repulsivas ou atrativas. A expressão numérica para essa energia potencial pode ser vista na equação (9), onde  $\epsilon$  é a profundidade do poço que indica a menor energia para determinada distância de ligação de equilíbrio,  $\sigma$  é o diâmetro de Lennard-Jones que depende dos átomos ligados e  $r$  é a distância entre os átomos  $i$  e  $j$ . O potencial coulombiano se refere às atrações

e/ou repulsões geradas devido a presença de carga nas espécies atômicas, nesta equação  $r$  também denota a distância entre os átomos  $i$  e  $j$ ,  $q_i$  e  $q_j$  são as cargas desses átomos,  $\epsilon_0$  é a permissividade do vácuo, e  $\epsilon$  a constante dielétrica do meio, que informa o quanto esse é capaz de isolar cargas uma da outra.

$$V_{LJ} = 4\epsilon \left[ \frac{\sigma^{12}}{r_{ij}^{12}} - \frac{\sigma^6}{r_{ij}^6} \right] \quad (9)$$

$$V_c = \frac{q_i q_j}{4\pi \epsilon_0 \epsilon_{ij} r_{ij}} \quad (10)$$

Resolve-se então a equação que descreve a lei de Newton:

$$F_i(t) = m_i a_i \quad (11)$$

$$F_i(t) = - \frac{\partial V(r_i)}{\partial \vec{r}_i} \quad (12)$$

$$- \frac{dV}{dr_i} = m \frac{d^2 r_i}{dt^2} \quad (13)$$

Com os valores dos potenciais ligados e não-ligados é possível calcular a força que atua sobre cada partícula em determinado instante de tempo. A equação (11) diz sobre a aceleração da partícula. A partir desta informação, integrando-se as equações de movimento obtêm-se as velocidades, cujas integrais realizam mudanças nas posições dos átomos, com essas velocidades e posições se calcula então as novas energias do sistema, tendo uma trajetória para cada partícula durante o tempo de simulação (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

As mudanças conformacionais que ocorrem durante as simulações no sistema em estudo podem ser analisadas por meio da raiz quadrada do desvio quadrático médio (RMSD) e das flutuações da estrutura média expressas nas flutuações da raiz quadrada do desvio quadrático médio (RMSF). Na equação (14),  $N$  corresponde ao número de átomos,  $r_i(t)$  e  $r_i(0)$  são as coordenadas dos átomos nos tempos  $t$  e  $0$ . Na equação (15),  $\mathfrak{T}$  é o tempo de simulação

expresso pelo número total de passos,  $r_i(j)$  é a coordenada dos átomos no passo de tempo  $j$ ,  $\bar{r}_i$  são as posições médias do átomo.

$$RMSD = \left[ \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N [r_i(t) - r_i(0)]^2 \right]^{1/2} \quad (14)$$

$$RMSF = \left[ \frac{1}{3} \sum_{j=0}^3 [r_i(j) - \bar{r}_i]^2 \right]^{1/2} \quad (15)$$

Como as partículas de um sistema se movimentam de acordo com os potenciais descritos e conhecendo suas posições e velocidades iniciais, torna-se possível verificar como o sistema evolui após um acréscimo de tempo. Além disso, também é preciso determinar os parâmetros que regem essas ligações. Os parâmetros do potencial efetivo clássico são ajustados de modo a reproduzir algumas propriedades estruturais e termodinâmicas como a entalpia de vaporização, que está associada às forças coesivas entre as moléculas, e densidade, no caso de líquidos; para íons em solução busca reproduzir a energia livre de solvatação; para sólidos fatores da estrutura obtidos por raios X. Outras propriedades também podem ser usadas para fazer a parametrização dos potenciais de interação (MORGON; COUTINHO, 2007).

As forças atuantes no átomo são integradas em função do tempo para cada átomo do sistema em estudo em uma escala de femtossegundos (fs). Se o tempo de integração for grande, eventos que ocorrem em escalas menores de tempo não podem ser descritos, não havendo uma boa reprodução do sistema a ser simulado. Na equação 12, a força é igual ao negativo do gradiente da energia potencial em relação à posição  $r_i$  de cada átomo, de acordo com a equação de Newton. A dinâmica molecular fundamenta-se também no princípio da Hipótese Ergódica de Boltzmann, esta diz que o valor médio de uma simulação feita em um sistema com poucas partículas, mas por um intervalo de tempo maior, reproduz as mesmas propriedades de um sistema com muitas partículas simulado por um tempo menor, esta hipótese é importante para poder reproduzir fenômenos que ocorrem em escala macroscópica (AMARANTE *et al.*, 2013).

Os principais algoritmos para calcular a integração das equações de movimento são os do tipo *Verlet*, que são baseados nos métodos das diferenças finitas, nos quais a integração é feita dividindo-a em pequenos intervalos de tempo (passos de integração),  $\Delta t$ . Dentre eles os *Verlet*, *Velocity-Verlet* e *leap-frog* são os mais usados, pois seu custo computacional é menor



em relação a tempo de processamento e uso memória RAM. O algoritmo de *Verlet* utiliza as posições e acelerações das partículas no tempo  $t$  e as posições do passo anterior,  $r(t-\Delta t)$ , para determinar as novas posições no tempo  $t+\Delta t$ , conforme a equação 16 (AMARANTE *et al.*, 2013; NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

$$r(t + \Delta t) = 2r(t) - r(t - \Delta t) + a(t) \Delta t^2 \quad (16)$$

Outra questão a ser considerada nas simulações por dinâmica molecular é o tipo do modelo de solvente usado. O uso de modelos de solventes explícitos aumentam o custo computacional, mas permitem uma descrição mais precisa de várias propriedades que são dependes da interação com o solvente. Se o número de partículas do sistema a ser simulado for consideravelmente grande há também um problema de estimativa de força, usa-se então cópias da caixa de simulação ao redor da caixa de simulação original, para que haja sempre um número constante de partículas dentro da mesma, essa aproximação é chamada de condições periódicas de contorno. A Dinâmica Molecular permite assim que se analisem processos moleculares como adsorção, interação e o comportamento conformacional dos sistemas, dentre esses sistemas biológicos (AMARANTE *et al.*, 2013). Neste trabalho, a dinâmica molecular permitiu analisar o comportamento da enzima ACCase quando em meio aquoso, e assim a verificar se a água interfere na detecção de herbicidas pelo nanobiossensor.

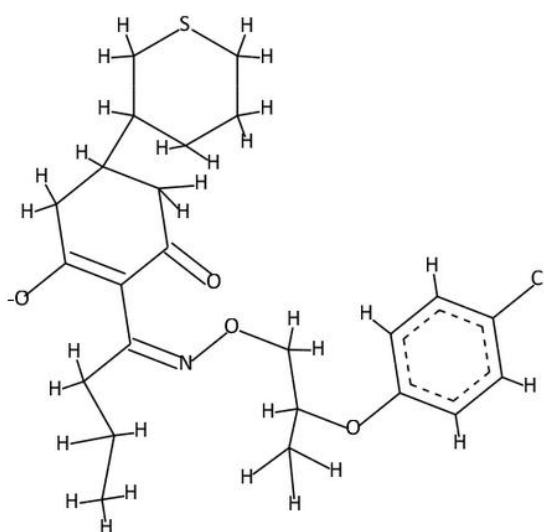
## 4. Metodologia

### 4.1 Atracamento Molecular

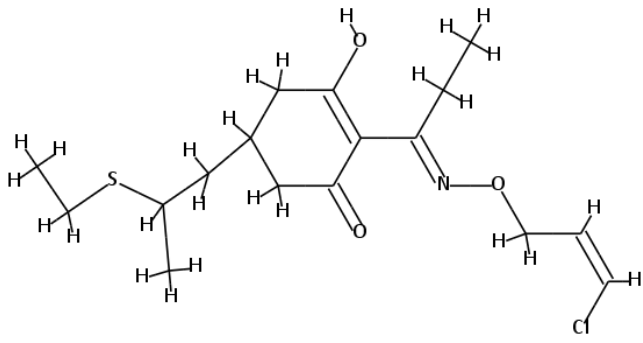
O atracamento molecular foi realizado um a um para cada ligante, com o objetivo de avaliar a energia de interação entre a enzima ACCase e os 12 herbicidas inibidores (Figura 17) e para verificar as interações que ocorrem entre esses herbicidas e os resíduos da ACCase, para deste modo avaliar a seletividade. Os herbicidas inibidores enzimáticos estudados se encontraram na Tabela 1 e na Figura 15. Os resultados do atracamento molecular foram analisados com o programa Discovery Studio Visualizer 3.5.

**Tabela 1.** Inibidores atracados na ACCase.

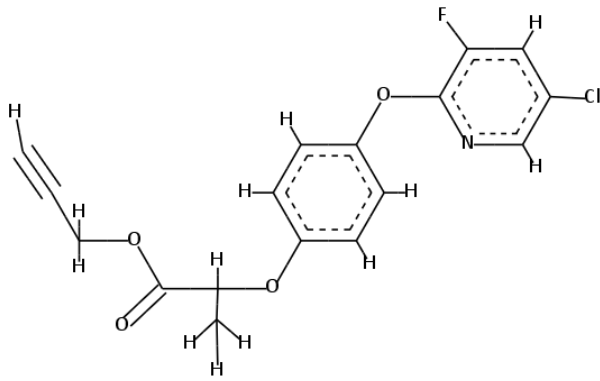
| <i>Inibidores atracados na ACCase</i>                          |   |
|--|---|
| clefoxydim de lítio (clefoxydim lithium ou profoxydim lithium) | imazaquin                                 |
| clethodim  | pyrithiobac de sódio (pyrithiobac sodium) |
| clodinafop-propargil (clodinafop-propargyl)                    | metsulfuron-metil (metsulfuron-methyl)    |
| propaquizafop  | oxasulfuron                               |
| quizalofop   | ethoxysulfuron                            |
| bispyribac de sódio (bispyribac sodium)                        | glifosato                                 |



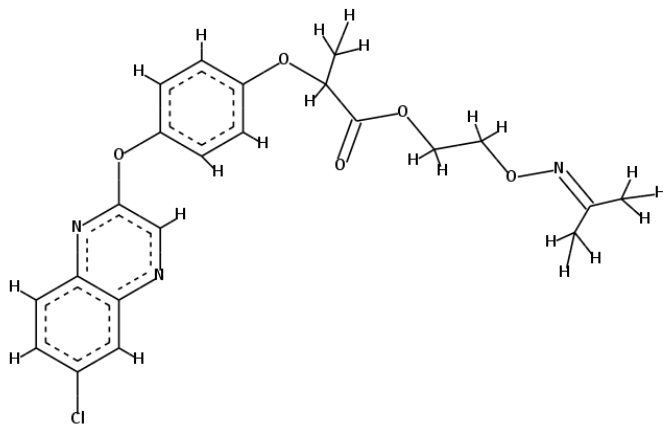
clefoxydim (ânion)



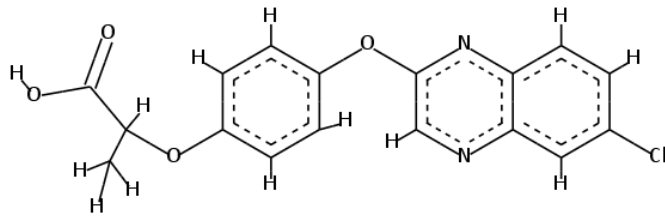
clethodim



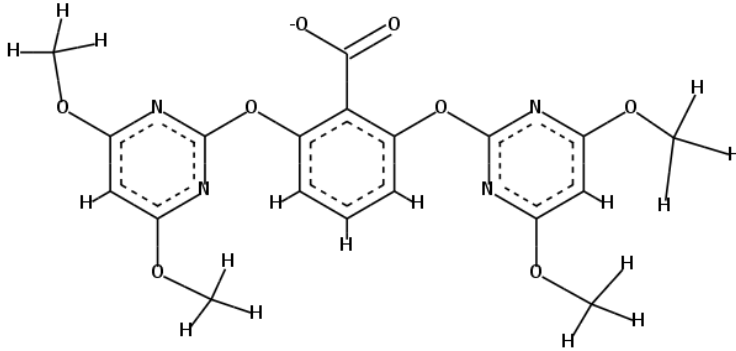
clodinafop-propargil



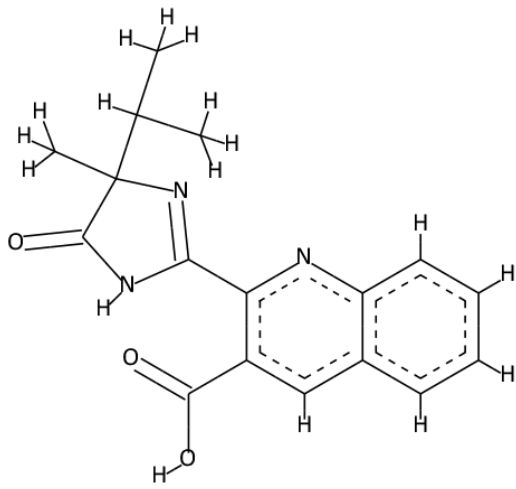
propaquizafop



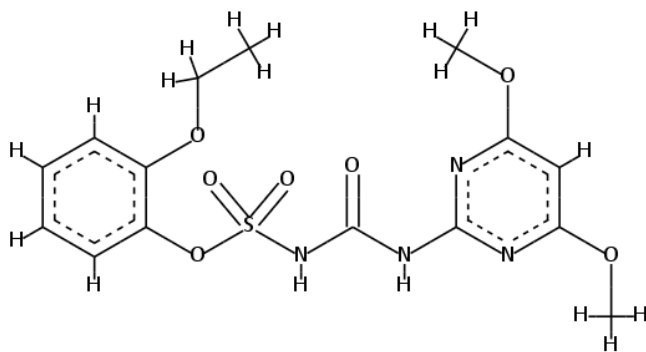
quizalofop



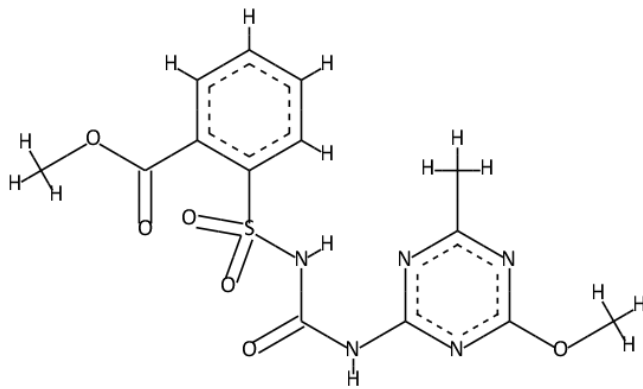
bispyribac (ânion)



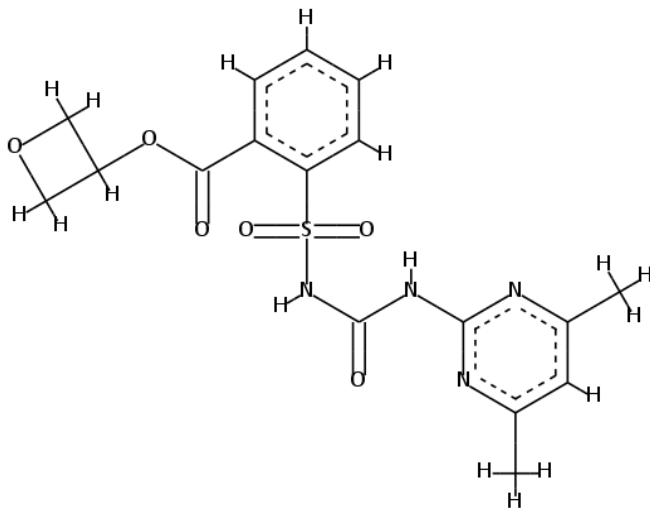
imazaquin



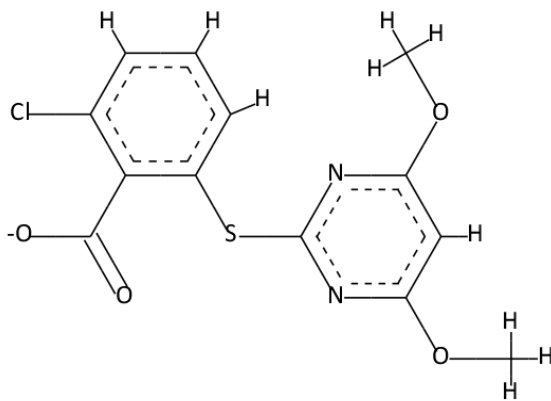
ethoxysulfuron



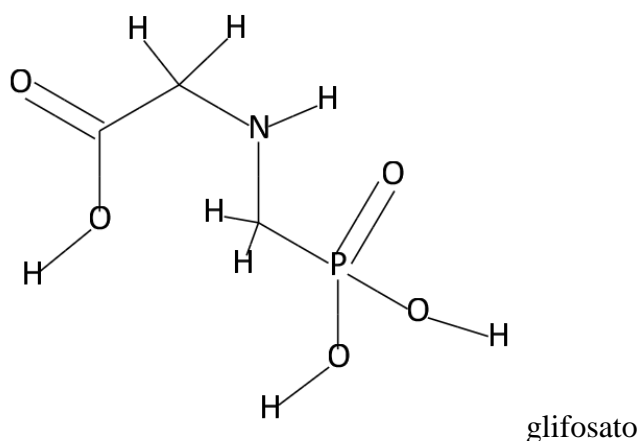
metsulfuron-metil



oxasulfuron



pyriithiobac (ânion)



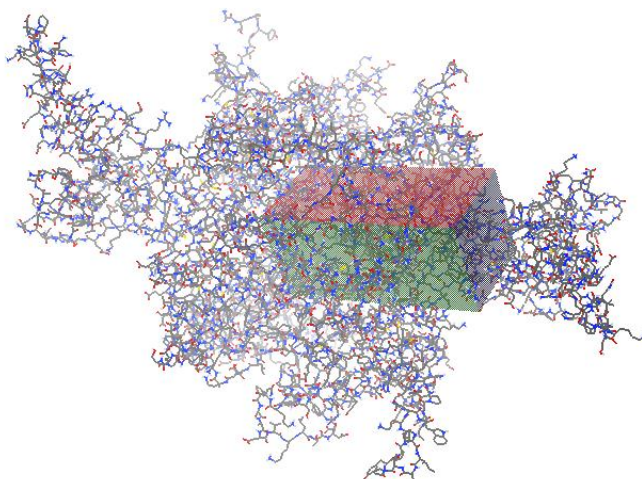
**Figura 17.** Os 12 herbicidas que foram os inibidores da ACCase estudados.

O atracamento molecular se propõe a procurar a melhor conformação de um ligante que possui a menor energia livre de interação calculada pelas funções de avaliação de energia no programa AutoDock 4.0. Neste trabalho, os ligantes foram os herbicidas, e o receptor (macromolécula) foi a estrutura da enzima ACCase que teve sua estrutura elucidada por raios X e disponibilizada no banco de proteínas PDB sob o código 1UYR e depois descrita por dinâmica molecular. Os cálculos de atracamento molecular realizados consideraram a enzima rígida e os ligantes flexíveis. No programa, a enzima pode conter partes consideradas flexíveis, no entanto escolheu-se realizar o atracamento com a enzima rígida, pois com a limitação dos graus de liberdade da enzima é possível verificar melhor a interação enzima-herbicida. O algoritmo utilizado para avaliar o atracamento foi o algoritmo genético Lamarckiano, que realiza mudanças aleatórias em um ligante ou em uma população de ligantes. Os melhores conformêros, neste trabalho 10 conformêros para cada ligante, foram obtidos através da função de avaliação, descrita pela equação (3).

A enzima foi tratada no programa AutoDock 4.0 para gerar o input PDBQT com as coordenadas necessárias para a execução do *autodock* e *autogrid*, macromolécula e ligante estavam anteriormente em formato PDB. O formato PDBQT inclui os hidrogênios polares, as cargas parciais Gasteiger (que utiliza o princípio da equalização da eletronegatividade através do procedimento PEOE - *Partial Equalization of Orbital Electronegativity*), os tipos de átomos e a flexibilidade do ligante e/ou enzima. No caso da consideração de regiões da enzima como flexíveis foram gerados três arquivos no formato PDBQT: um para o herbicida e dois para a enzima, um da parte flexível e outro da porção rígida. Neste trabalho, em cada atracamento foi gerado dois arquivos deste formato. Em seguida no programa AutoGrid

incluso no (Autodock 4.0), a partir do arquivo de entrada “.grid” que contém o tamanho da caixa e o espaçamento entre os pontos de grade, foram criados os mapas de *grid* que se baseiam nos tipos de átomo e nas interações eletrostáticas. Por fim, o atracamento foi realizado para encontrar as melhores conformações do ligante com o algoritmo genético Lamarckiano e funções de energia livre.

O código da enzima ACCase utilizado para a realização do atracamento foi 1UYR, disponível no banco de proteínas PDB. Os atracamentos foram feitos inicialmente entre esta estrutura e os doze herbicidas um de cada vez. O tamanho da caixa de grade foi 56x56x126 com espaçamento de 0,375Å entre os pontos de grade e esta foi colocada em uma região do domínio CT denominada sítio ativo (Figura 18). Os graus de liberdade do ligante são codificados em genes e o conjunto desses genes, cromossomo, foi avaliado pela função de avaliação de acordo com sua melhor interação no sítio ativo da enzima. Pelo operador de mutação há trocas aleatórias nos valores dos genes, enquanto que no *crossover* são feitas trocas de conjunto de genes por outros. O número da população para todos os cálculos de atracamento foi de 150; o número máximo de avaliações foi 2500000; o número máximo de gerações foi de 27000; a taxa de elitismo, ou seja, o número de indivíduos que sobrevivem automaticamente foi 1, a taxa de mutação 0,02 e a taxa de crossover: 0,8.



**Figura 18.** Caixa de grade de 56x56x126, localizado no sítio ativo da ACCase.

## 4.2 Dinâmica Molecular

Para avaliar o efeito do solvente foi feita simulação por Dinâmica Molecular (DM) (molecular dynamics-MD) com a enzima ACCase, utilizando-se o pacote de programas GROMACS (VAN DER SPOEL *et al.*, 2005), com o campo de força OPLS-AA (KAMINSKI *et al.*, 2001). O sistema modelado foi solvatado pelo preenchimento de uma caixa com modelo de solvente de água explícita usando o modelo SPC (Single Point Charge). Para neutralizar o sistema íons foram adicionados, em seguida o mesmo foi minimizado utilizando-se cerca de 10.000 passos do algoritmo *steepest decent*. Após a minimização, o solvente foi equilibrado realizando-se uma simulação de dinâmica molecular por 100 ps à 50, 150 e 298 K, com os átomos não-hidrogenoides fixados com uma força constante de  $1.0 \times 10^3 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-2}$ . Depois dessa equilibração, foi realizada uma simulação por dinâmica molecular por um tempo de integração de 10 ns com passos de 2fs utilizando o algoritmo *leapfrog* em um *ensemble* (o conjunto de configurações e propriedades do sistema que foram mantidas constantes durante a simulação) isotérmico isobárico (NPT) no qual número de partículas, pressão (1 bar) e temperatura (298 K) foram mantidos constantes. As configurações foram salvas a cada 1 ps para a realização das análises.

A temperatura foi mantida à 298 K acoplando-se o sistema ao termostato de Berendsen, com um tempo de relaxação de 0,1 ps e a pressão de 1 bar foi mantida barostato de Berendsen via escalonamento isotrópico com tempo de relaxação de 10 ps e compressibilidade de  $4,5 \times 10^{-6} \text{ (kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-3})^{-1}$ . Para caracterização das interações eletrostáticas e de van der Waals um raio de corte de 1,4 nm foi utilizado, as contribuições de longo alcance foram tratadas via campo de reação generalizada, com uma constante dielétrica  $\epsilon=66$ . Todas as simulações foram realizadas utilizando o campo de força OPLS-AA (KAMINSKI *et al.*, 2001) e o programa GROMACS 5.6 (VAN DER SPOEL *et al.*, 2005).

Após essas etapas, foi realizado o atracamento molecular com as estruturas provenientes da simulação de dinâmica molecular após 5 ns e 10 ns de simulação e os doze herbicidas para verificar qual o efeito da presença do solvente nas energias livres de interação dos complexos enzima-herbicida calculadas com o programa AutoDock 4.0. Para verificar o volume do sítio ativo foi utilizado o servidor *Computed Atlas of Surface proteins* (CASTp) (DUNDAS *et al.*, 2006).



## 5. Resultados e Discussões

### 5.1 Cálculos de atracamento molecular e interações específicas na seletividade do nanobiossensor

A partir da realização do atracamento molecular foram encontradas dez conformações para cada herbicida (ligante) com suas respectivas energias de livres de ligação, interação. A conformação escolhida foi aquela que apresentou menor valor de RMSD e a energia de interação mais favorável. A Tabela 2 mostra os valores das energias livres e constantes de inibição dos herbicidas que foram os ligantes dos 12 cálculos feitos no programa AutoDock para a enzima ACCase, código PDB: 1UYR. Para os herbicidas clefoxydim de lítio, bispyribac de sódio e pyriithiobac de sódio que são comercializados como sais realizou-se o atracamento com a estrutura dos ânions, e também foi feito atracamento com estes herbicidas caso protonados, considerando-se um meio mais ácido em que possam estar.

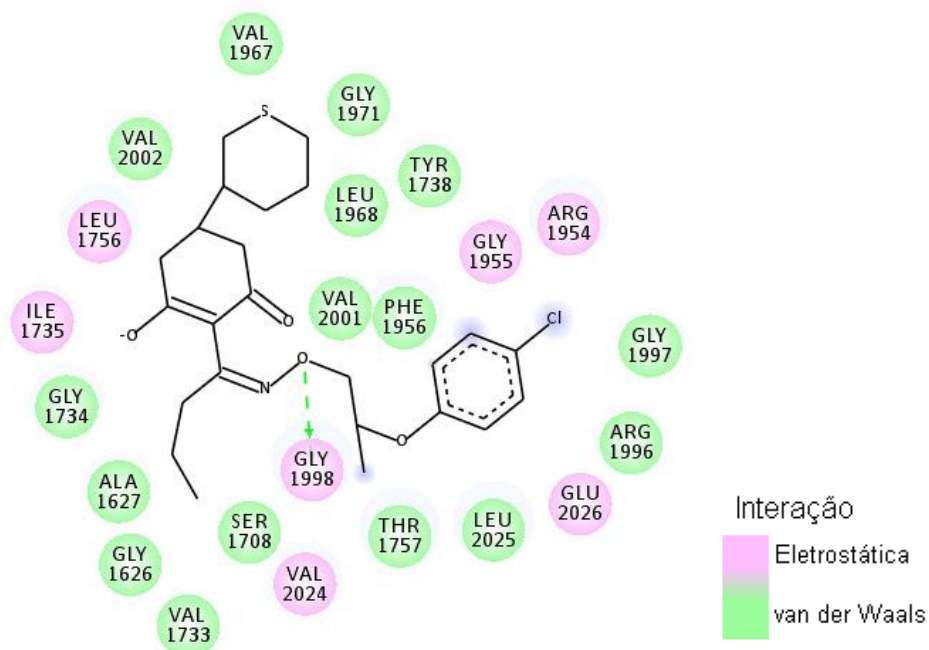
**Tabela 2.** Estimativas de energia de ligação para os complexos formados com a ACCase, código 1UYR.

| Classes         | Herbicidas           | ACCase ( <i>crist.</i> )*       |                              |
|-----------------|----------------------|---------------------------------|------------------------------|
|                 |                      | Score do atracamento (kcal/mol) | Constante de inibição, $K_i$ |
| dims            | clefoxydim (ânion)   | -10,23                          | 31,55 nmol.L <sup>-1</sup>   |
|                 | clefoxydim           | -9,22                           | 173,21 nmol.L <sup>-1</sup>  |
|                 | clethodim            | -8,47                           | 617,20 nmol.L <sup>-1</sup>  |
| fops            | clodinafop           | -7,62                           | 2,58 µmol.L <sup>-1</sup>    |
|                 | clodinafop-propargil | -7,20                           | 5,31 µmol.L <sup>-1</sup>    |
|                 | propaquizafop        | -7,32                           | 4,31 µmol.L <sup>-1</sup>    |
|                 | quizalofop           | -7,63                           | 2,55 µmol.L <sup>-1</sup>    |
| não específicos | bispyribac           | -5,43                           | 103,96 µmol.L <sup>-1</sup>  |
|                 | bispyribac (ânion)   | -4,95                           | 236,58 µmol.L <sup>-1</sup>  |
|                 | ethoxysulfuron       | -6,96                           | 7,96 µmol.L <sup>-1</sup>    |
|                 | glifosato            | -4,23                           | 790,93 µmol.L <sup>-1</sup>  |
|                 | imazaquin            | -7,42                           | 3,62 µmol.L <sup>-1</sup>    |
|                 | metsulfuron          | -7,03                           | 7,04 µmol.L <sup>-1</sup>    |
|                 | metsulfuron-metil    | -7,10                           | 6,30 µmol.L <sup>-1</sup>    |
|                 | oxasulfuron          | -7,66                           | 2,43 µmol.L <sup>-1</sup>    |
|                 | pyriithiobac         | -5,84                           | 52,48 µmol.L <sup>-1</sup>   |
|                 | pyriithiobac (ânion) | -6,31                           | 23,85 µmol.L <sup>-1</sup>   |

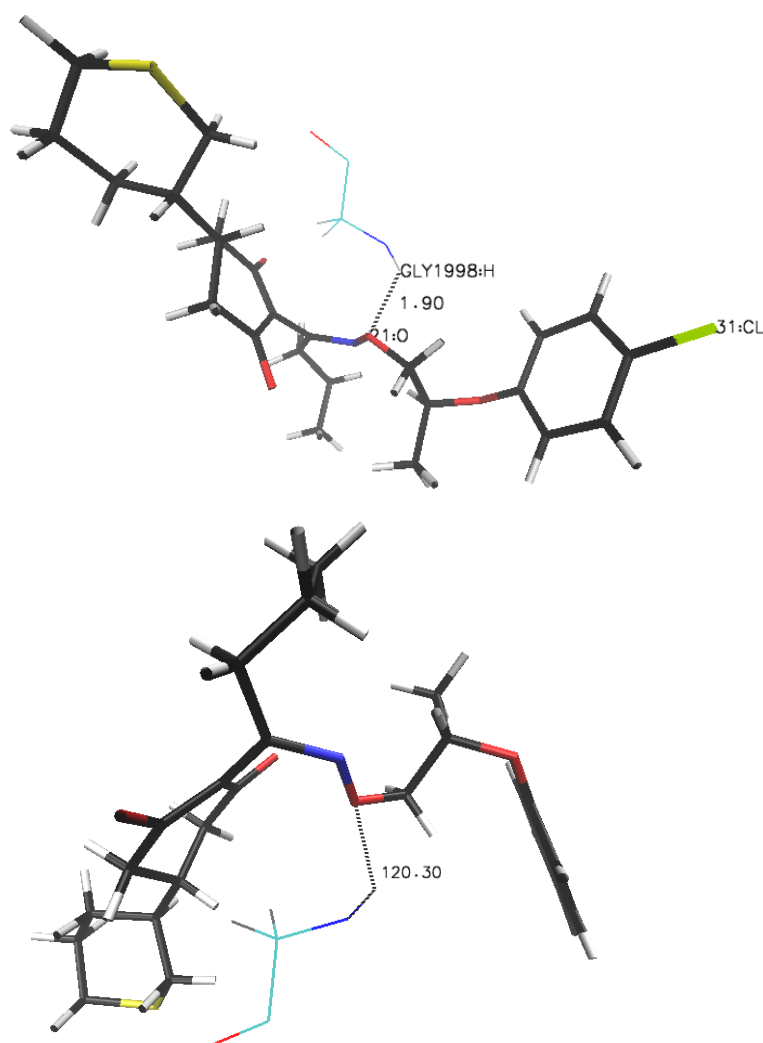
\*crist: estrutura cristalográfica

De acordo com a Tabela 2 pode-se verificar que os herbicidas fops e dims: clefoxydim, clethodim, clodinafop, clodinafop-propargil, propaquizafop e quizalofop, apresentaram energia de interação mais favorável que os demais herbicidas, dentre os quais

O atracamento da ACCase com os dims clefoxydim de lítio e clethodim realizado no programa AutoDock 4.0 resultou em valores de energia de inibição consideravelmente favoráveis com constantes de inibição em unidades nanomolares, 31,55 nmol.L<sup>-1</sup> e 617,20 nmol.L<sup>-1</sup> respectivamente. O programa avaliou as dez melhores conformações para cada herbicida, de acordo com a de energia livre de ligação e com o valor do RMSD que variou entre 0,0 e 2,0 Å. Todas as estruturas dos herbicidas com a energia de interação mais favorável das dez conformações tiveram o RMSD igual à zero. Na Figura 19 pode-se observar a conformação de energia mais favorável para o herbicida clefoxydim de lítio (ânion) com os resíduos de aminoácidos que entraram em contato ele, obtida pelo AutoDock 4.0. Foi possível verificar uma ligação de hidrogênio entre o herbicida e o H-N da amida do resíduo de glicina, GLY-1998, cujos comprimento e ângulo estão na Figura 20.

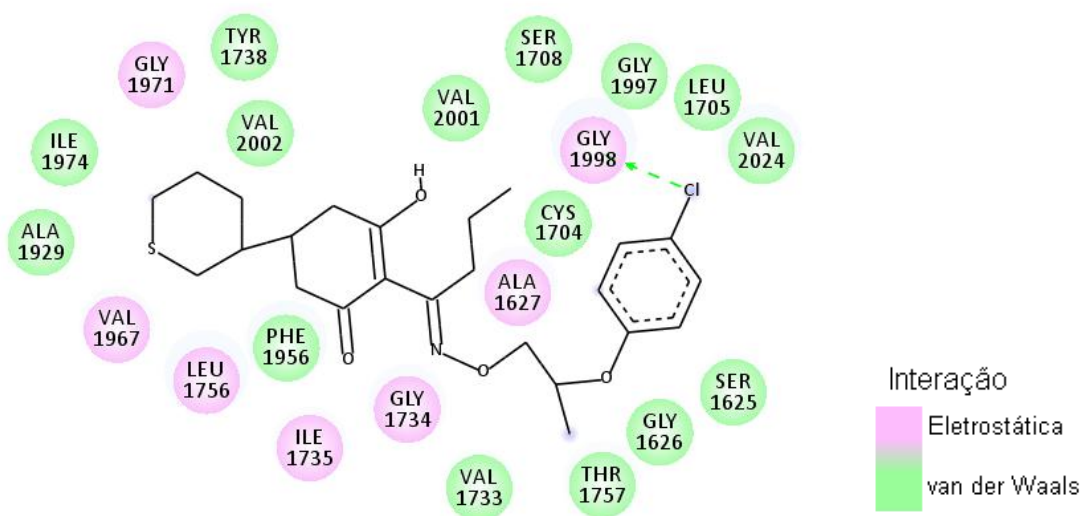


**Figura 19:** Herbicida clefoxydim de lítio (ânion) e alguns aminoácidos que o cercam no sítio ativo, adaptado para o formato 2D. O sombreado em azul indica regiões voltadas para o solvente e a linha tracejada em verde representa a ligação de hidrogênio (programa DS Visualizer 3.5, 2012).

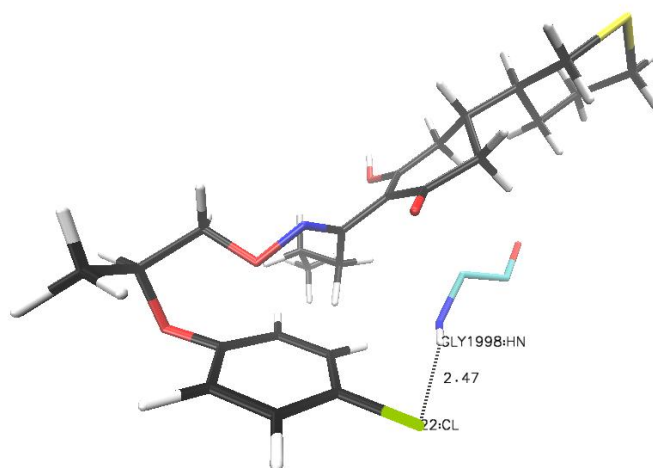


**Figura 20:** Comprimento e ângulo da ligação de hidrogênio entre o herbicida clefoxydim de lítio (ânion) e o resíduo GLY-1998 da ACCase. Em cor azul: nitrogênio; em vermelho: oxigênio; em amarelo: enxofre; em ciano e preto: átomos de carbono; em branco: hidrogênio (programa VMD, HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).

No atracamento feito entre a estrutura do herbicida clefoxydim de lítio protonado e a ACCase, o valor de energia de interação obtido foi -9,22 kcal/mol com constante de inibição de 173,21 nmol.L<sup>-1</sup>; a Figura 21 mostra os resíduos que participam da formação do complexo para esse herbicida. Houve também uma interação por ligação de hidrogênio com o resíduo GLY-1998 (Figura 22) com 2,47Å de comprimento e ângulo de 166,35°. Além disso, pode-se verificar que o grupo propil da parte oxima ficou localizado em uma região predominantemente hidrofóbica constituída dos resíduos VAL-2001, SER-1708, LEU-1705, Val-2024 e ALA-1627, o mesmo foi observado para o grupo etil do herbicida clethodim.



**Figura 21.** Herbicida clefoxydim (protonado) e alguns aminoácidos que o cercam no sítio ativo, adaptado para o formato 2D (programa DS Visualizer 3.5, 2012).

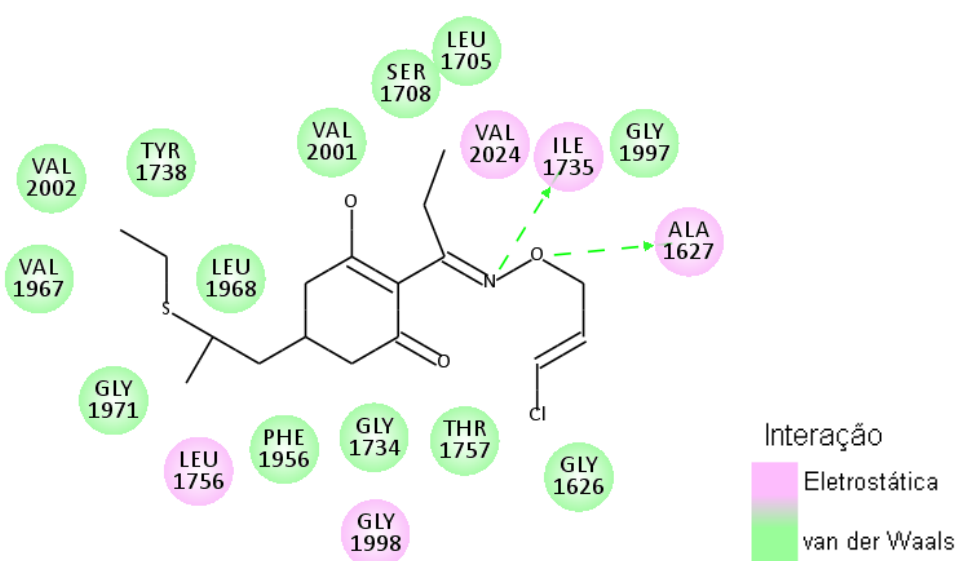


**Figura 22.** Comprimento da ligação de hidrogênio entre o átomo de cloro do herbicida clefoxydim (protonado) e o átomo de hidrogênio do resíduo GLY-1998. Em azul: átomos de nitrogênio; em vermelho: átomos de oxigênio; em amarelo: enxofre; em verde: cloro; branco: hidrogênio. Em preto e ciano: átomos de carbono (programa VMD, HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).

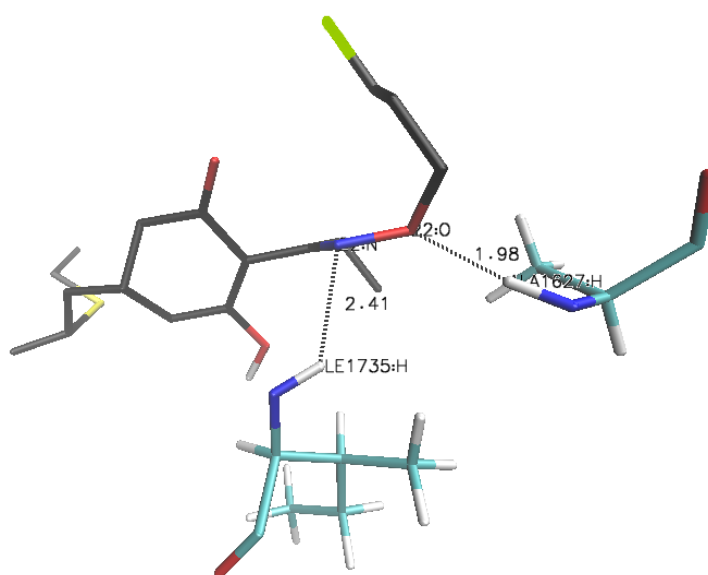
O grupo propil da região oxima para a conformação da segunda melhor energia de interação do herbicida clefoxydim (ânion) também se localizou na porção do sítio ativo com os resíduos VAL-2001, SER-1708, LEU-1705, Val-2024 e ALA-1627. O valor dessa energia foi de -8,82 kcal/mol e constante de inibição 344,13 nmol.L<sup>-1</sup>.

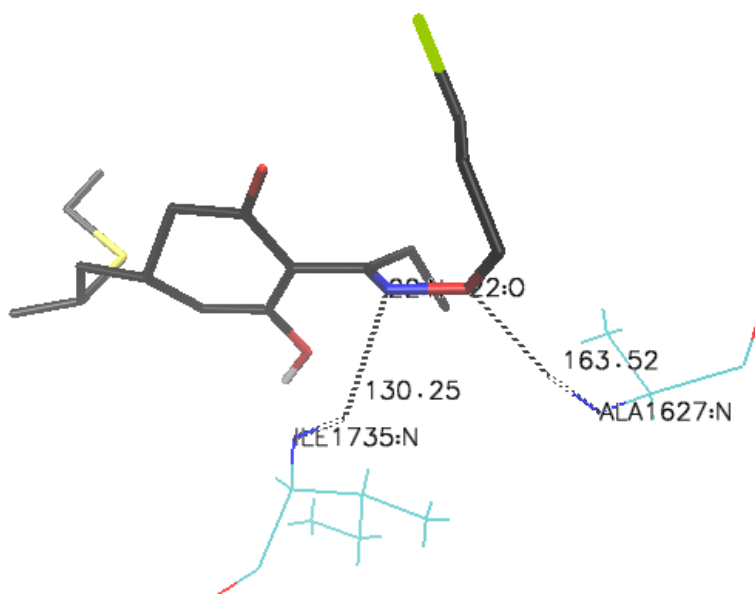
O herbicida clethodim quando feito o atracamento molecular, também apresentou uma conformação na qual o grupo etil de sua porção oxima está em uma região hidrofóbica composta dos resíduos VAL-2001, SER-1708, LEU-1705, Val-2024 e ALA-1627. Ademais, os átomos de oxigênio e nitrogênio com densidade de carga negativa da região oxima da

molécula realizaram ligação de hidrogênio com o grupo H-N das amidas dos resíduos ILE-1735 e ALA-1627 (Figura 23 e 24), o que contribui para a energia de interação de -8,47 kcal/mol. Considerando-se o atracamento para os dims, os grupos propil do clefoxydim protonado e etil da porção oxima do clethodim, mostraram boa sobreposição nessa região (Figura 25). Estas análises das interações intermoleculares que ocorrem nos herbicidas clefoxydim e clethodim são importantes por permitirem verificar as semelhanças e diferenças com os demais herbicidas e assim possibilitar previsões concernentes à seletividade do nanobiossensor, que depende dessas interações específicas a serem detectadas pelo AFM.



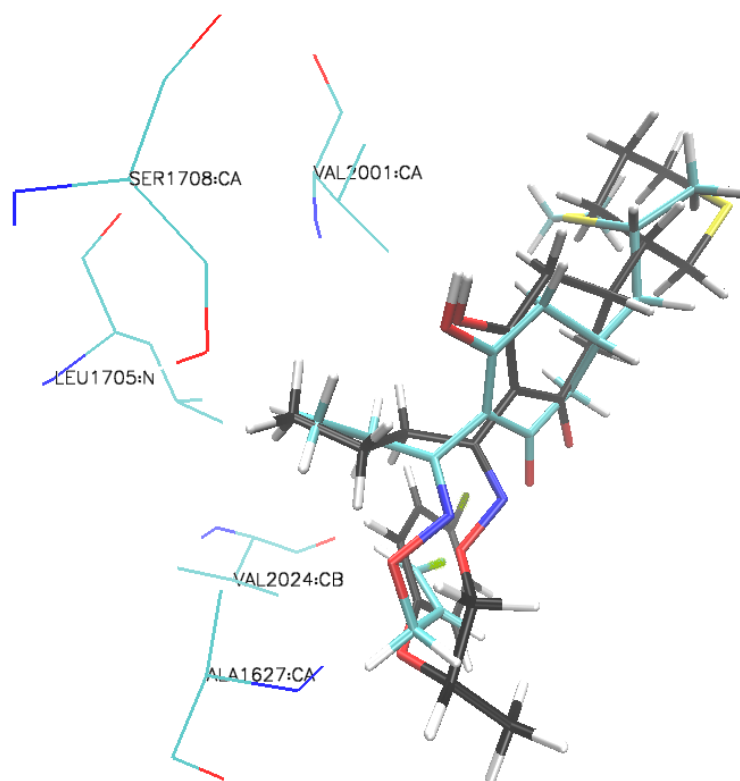
**Figura 23.** Herbicida clethodim e alguns aminoácidos que o cercam no sítio ativo, as setas em verde ilustram ligações de hidrogênio com os resíduos ILE-1735 e ALA-1627 (programa DS Visualizer 3.5, 2012).



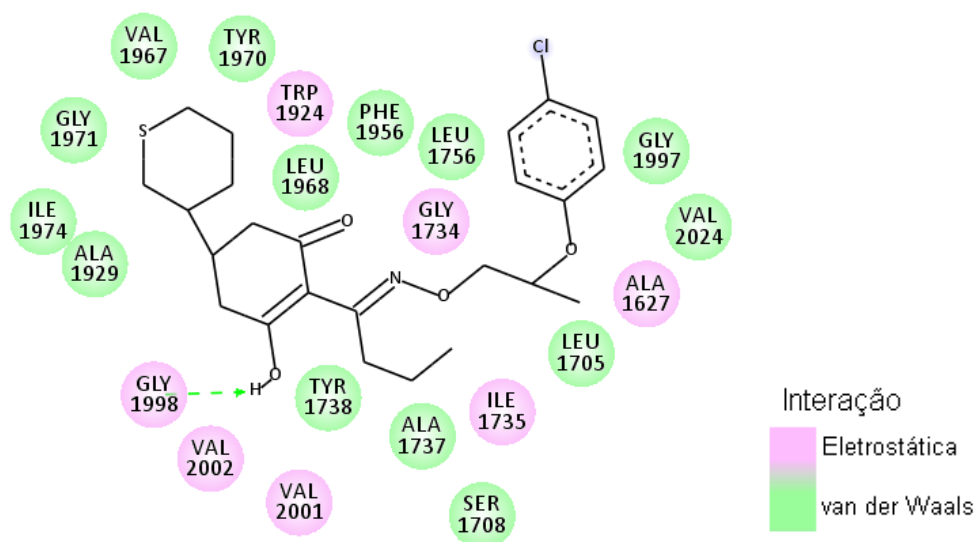


**Figura 24.** Comprimento e ângulo das ligações de hidrogênio entre resíduos da ACCase e o herbicida clethodim. Cores: azul: nitrogênio; vermelho: oxigênio; amarelo: enxofre; preto e ciano: carbono; branco: hidrogênio; e em verde: cloro (programa VMD, HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).

A Figura 25 mostra que os grupos propil do clefoxydim protonado e etil do clethodim se orientaram em conformações estruturais sobreponíveis voltadas para uma região hidrofóbica em comum na enzima, podendo-se concluir que o modo de orientação desses grupos possui papel importante para o encaixe dos herbicidas dims e para a atividade inibidora resultante. Determinados modos de conformação no encaixe do sitio ativo ocorrem para maximizar os contatos com resíduos específicos da enzima, o que aumenta as contribuições eletrostáticas, hidrofóbicas e de van der Waals na formação do complexo. Essa importância pode ser vista na quinta conformação resultante do atracamento molecular para o herbicida clefoxydim em sua forma ácida. Nesta conformação a energia de interação foi avaliada com uma energia desfavorável de +5.92 kcal/mol, mesmo com ligação de hidrogênio entre um dos oxigênios do anel ciclohexanodiona e o resíduo GLY-1998 (Figura 26). Supõe-se que isso ocorreu pelo fato de que nesta conformação o grupo propil não estava localizado na região hidrofóbica, nem próximo a ela, o que provavelmente desfavoreceu a contribuição hidrofóbica.



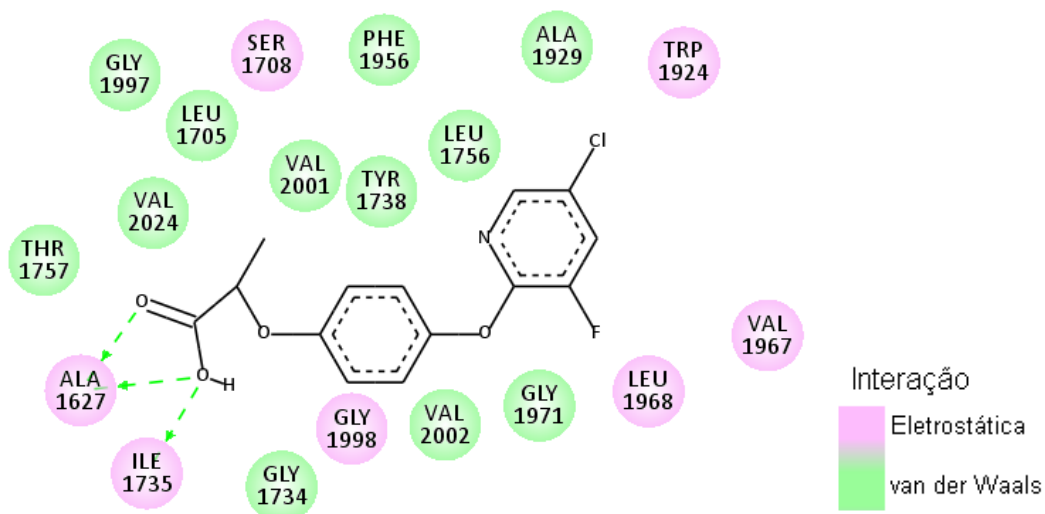
**Figura 25.** Conformações sobrepostas dos herbicidas clefoxydim (átomos de carbono em preto) e clethodim (átomos de carbono em ciano) com os grupos alquilas voltados para os aminoácidos VAL-2001, SER-1708, LEU-1705, Val-2024 e ALA-1627. Demais cores: azul: nitrogênio; vermelho: oxigênio; amarelo: enxofre; branco: hidrogênio (programa VMD, HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).



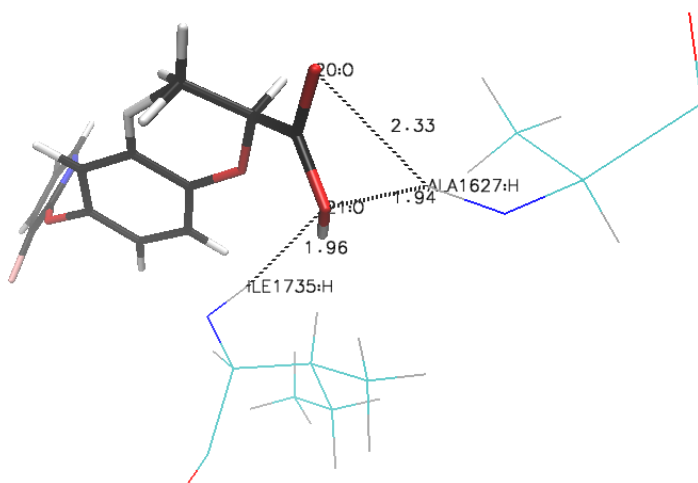
**Figura 26.** Quinta conformação do atracamento molecular, interações intermoleculares entre resíduos da ACCase e o anel ciclohexanodiona do clefoxydim protonado (programa DS Visualizer 3.5, 2012)

O herbicida clodinafop é comercializado na forma de um éster propargil, porém este é rapidamente degradado a clodinafop em sua forma ácida. Por isso o atracamento para este herbicida foi feito considerando as duas formas dos herbicidas.

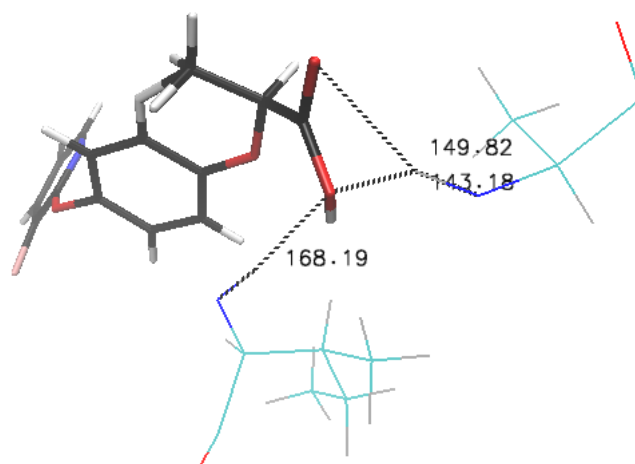
A análise do atracamento do clodinafop (Figura 27 e 28) no sítio ativo da ACCase, mostrou que este apresentou também o grupo metil voltado para a região hidrofóbica, formada pelos resíduos VAL-2001, SER-1708, LEU-1705, Val-2024 e ALA-1627, que os grupos alquila dos dims. Além disso, houve ligações de hidrogênio dos oxigênios do grupo carboxila do herbicida: entre a carbonila e o H-N do grupo amida do resíduo ALA-1627; entre o oxigênio da hidroxila e o H-N das amidas dos resíduos ALA-1627 e ILE-1735. O anel do resíduo TYR-1738 apresentou interação do tipo CH- $\pi$  com um dos hidrogênios do anel da hidroquinona do herbicida clodinafop (Figura 29).



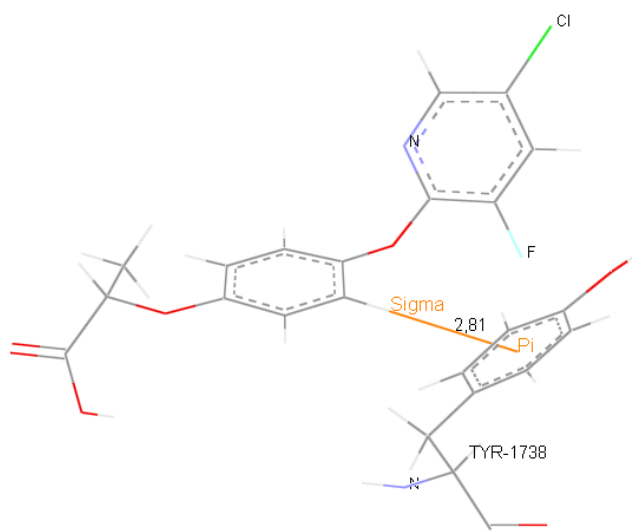
**Figura 27.** Herbicida clodinafop e alguns aminoácidos que o cercam no sítio ativo, as setas em verde ilustram ligações de hidrogênio com os resíduos ILE-1735 e ALA-1627, há também interação do tipo CH- $\pi$  entre o anel do resíduo TYR-1738 e um dos hidrogênios do anel da hidroquinona do herbicida, não mostrada na figura (programa DS Visualizer 3.5, 2012).







**Figura 28.** Comprimento e ângulo das ligações de hidrogênio entre resíduos da ACCase e o herbicida clodinafop. Cores: azul: nitrogênio; vermelho: oxigênio; rosa: flúor; preto e ciano: carbono; branco: hidrogênio (programa VMD, HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996)

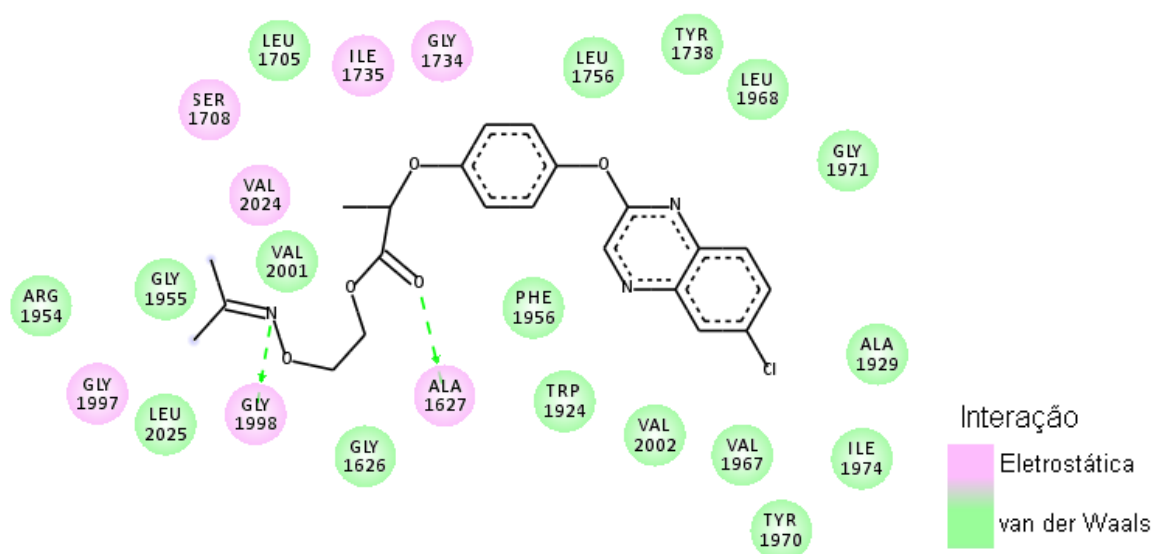


**Figura 29.** Interação do tipo CH- $\pi$  entre o anel do resíduo TYR-1738 e um dos hidrogênios do anel da hidroquinona do clodinafop. Em branco: átomos de hidrogênio; em vermelho átomos de oxigênio; em cinza átomos de carbono (programa DS Visualizer 3.5, 2012).

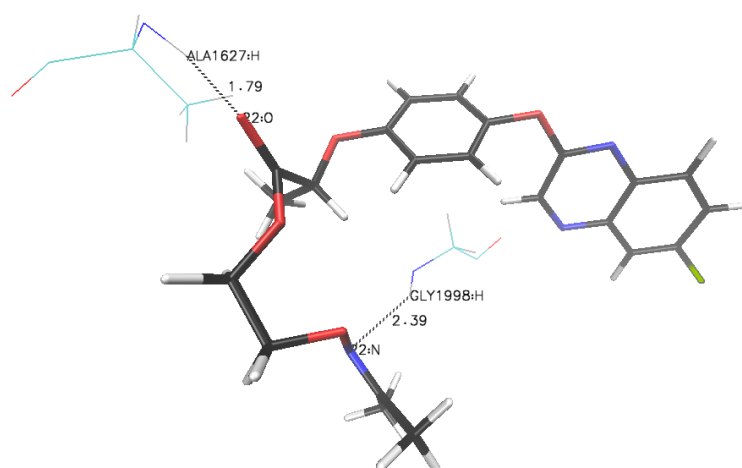
O programa DS Visualizer 3.5 verifica as interações  $\pi$ - $\pi$  entre os centros dos sistemas  $\pi$  em um valor de 8Å para o delimitador de distância, enquanto o valor do delimitador de distância (*Distance Cutoff*) de maior proximidade entre os átomos desses sistemas que interagem é de 4,5Å. Na Figura 30 pode-se ver a interação entre dois sistemas  $\pi$ ; o ângulo  $\theta$  varia de 0 a  $\pm 60^\circ$  e o ângulo  $\gamma$  varia de 0 a  $\pm 30^\circ$ . Para as interações  $\pi$ -sigma ou CH- $\pi$ , o sistema  $\pi$  e o grupo C-H com hidrogênio explícito ou implícito o delimitador de distância é de 4Å. As posições dos hidrogênios implícitos ou explícitos considerados são aquelas que apresentam uma distância 0,5 Å menor que 4Å, e o ângulo entre o vetor de C-H e o plano do anel é de  $45^\circ$ , mas geralmente esse valor pode ser maior.

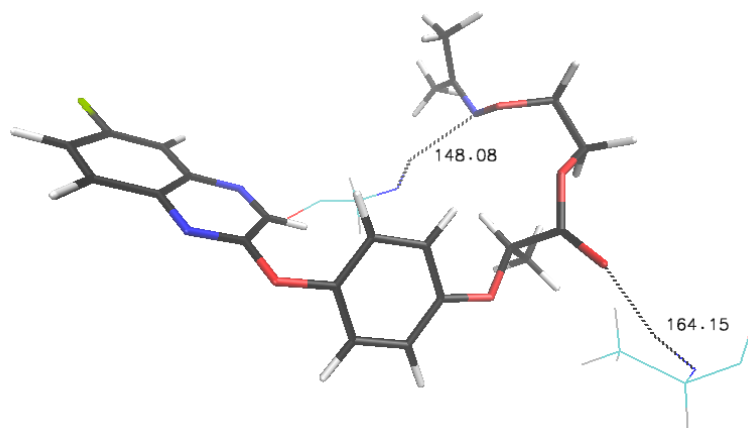


anel da hidroquinona do herbicida com a cadeia lateral do resíduo TYR-1738, além de uma ligação de hidrogênio entre carbonila do resíduo VAL-1967 com a hidroxila do herbicida. O atracamento dos fops permitiu entender que uma das interações mais importantes para a ligação desses herbicidas com a ACCase é a interação do tipo CH-  $\pi$  ou  $\pi$ - $\pi$  que ocorre com o resíduo TYR-1738. Esses resultados também se mostraram estar em acordo e afirmaram dados experimentais dos complexos com os herbicidas haloxyfop e diclofop obtidos da cristalografia de raios X (ZHANG; TWEEL; TONG, 2004).

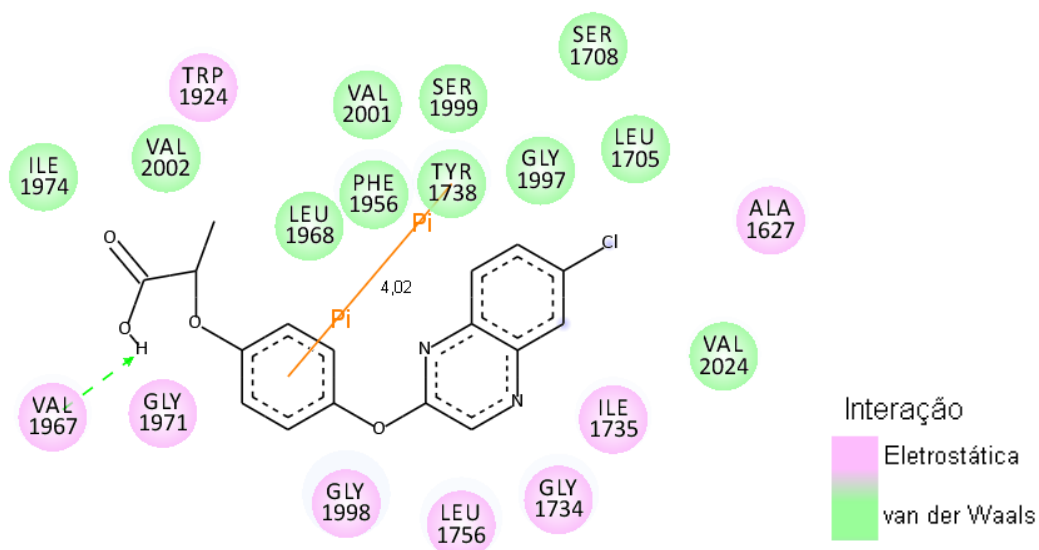


**Figura 32.** Herbicida propaquizafop e alguns aminoácidos que o cercam no sítio ativo, a seta em verde ilustra ligação de hidrogênio com o resíduo GLY-1998 e com a ALA-1627, ao redor da porção carboxila observa-se os aminoácidos ILE-1735 e ALA-1627 (programa DS Visualizer 3.5, 2012).

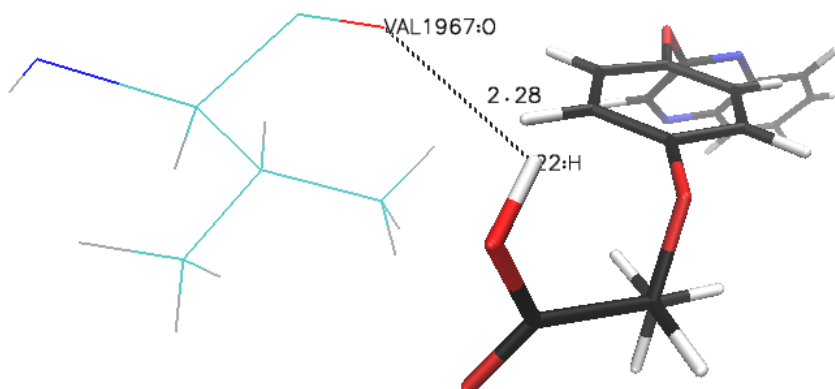


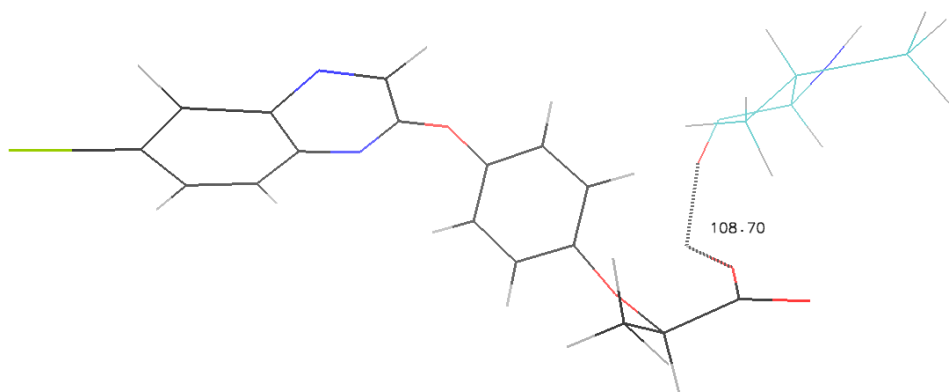


**Figura 33.** Comprimento e ângulo das ligações de hidrogênio entre resíduos da ACCase e o herbicida propaquizafop. Cores: azul: nitrogênio; vermelho: oxigênio; verde: cloro; preto e ciano: átomos de carbono; e em branco: hidrogênio (programa VMD, HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).



**Figura 34.** Herbicida quizalofop, o traço em laranja indica interações do tipo  $\pi$ - $\pi$  com o anel do resíduo TYR-1738 (programa DS Visualizer 3.5, 2012).

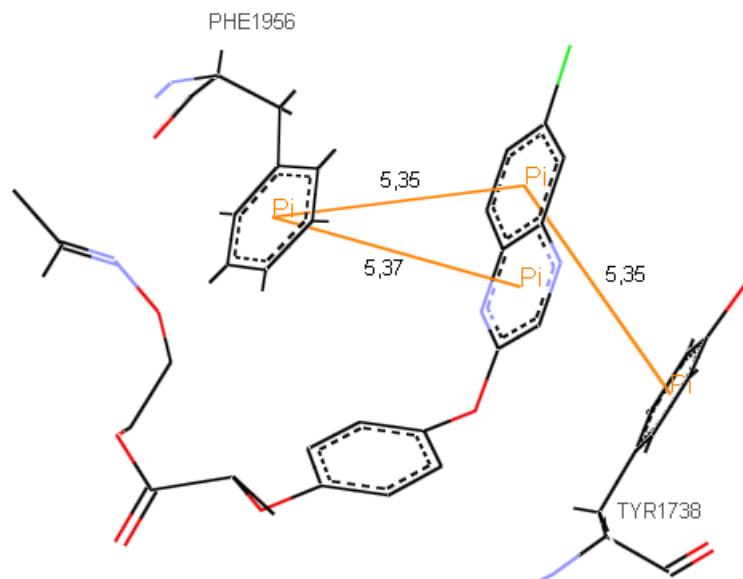




**Figura 35.** Comprimento e ângulo das ligações de hidrogênio entre resíduos da ACCase e o herbicida quizalofop. Cores: azul: nitrogênio; vermelho: oxigênio; preto e ciano: carbono; branco: hidrogênio; e em verde: cloro (programa VMD, HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).

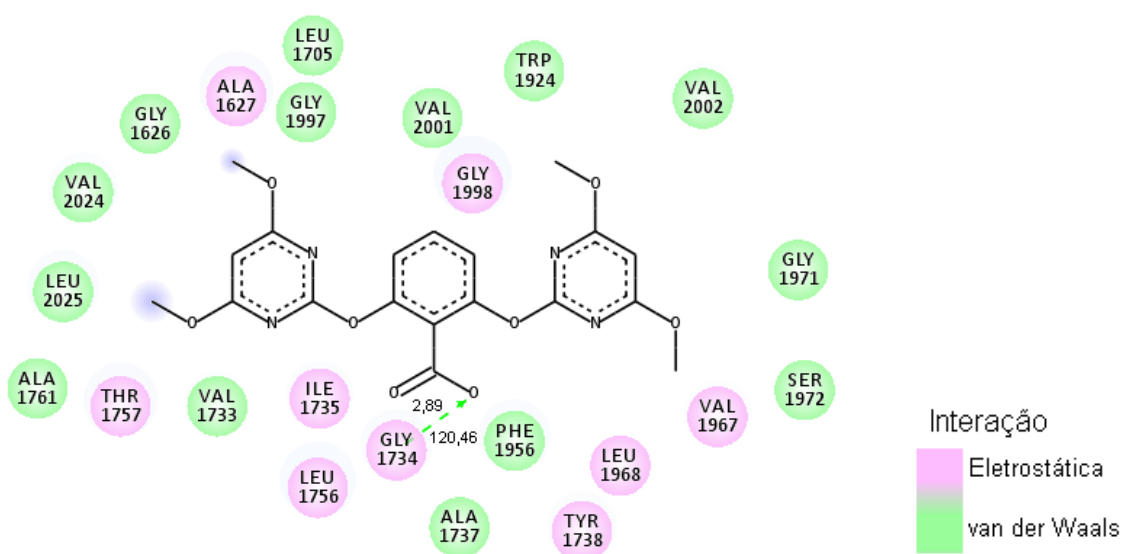
Assim, para os herbicidas da classe dos fops, especificamente clodinafop-propargil, clodinafop e quizalofop houve em comum a interação com o resíduo TYR-1738. No entanto, acredita-se que possa haver em uma das nove conformações do atracamento molecular para o propaquizafop alguma estrutura que possua essa interação  $\pi$ - $\pi$ . E isso ocorre com a quinta conformação do herbicida ligado à enzima, cuja energia de interação é a terceira maior (Figura 36). De forma geral, observam-se aspectos semelhantes entre os herbicidas que são de uma mesma classe e há semelhanças também entre herbicidas de classes diferentes, mas que são inibidores da ACCase.

Esse conhecimento é determinante para se inferir sobre o funcionamento do nanobiossensor para a detecção de herbicidas, pois essas interações compreendem elementos de reconhecimento de herbicidas que são de classes específicas e a fabricação do nanobiossensor propõe-se a detectar os inibidores da ACCase, ou seja fops e dims. Dessa forma, uma análise das interações que ocorrem com os inibidores não específicos é também necessária para maiores conclusões sobre previsões das prováveis detecções no AFM, como um nanobiossensor.



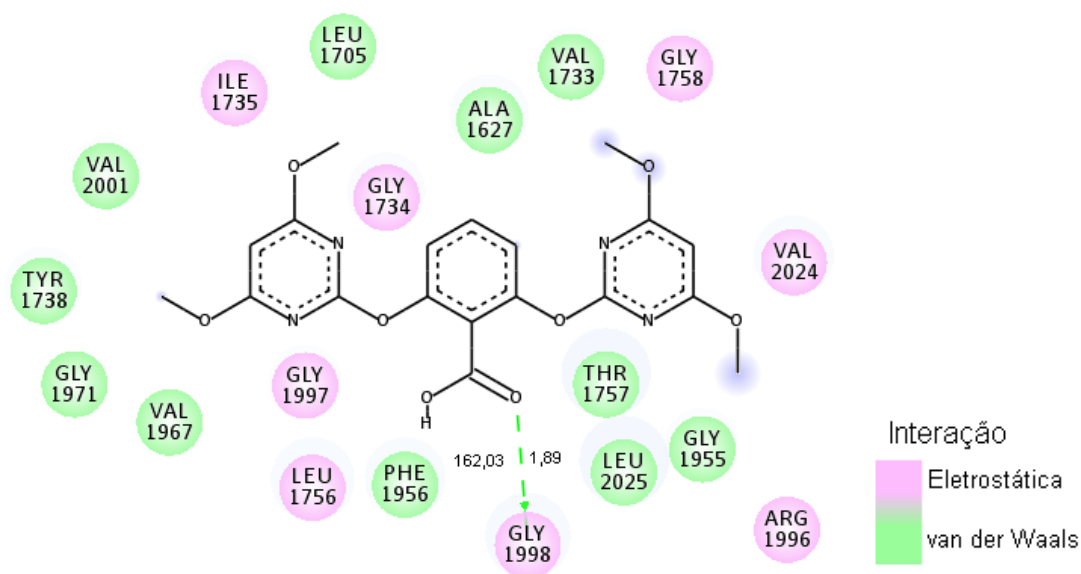
**Figura 36.** Interações  $\pi$ - $\pi$  entre o herbicida propaquizafop e os resíduos PHE-1956 e TYR-1738. Em preto: átomos de carbono; em vermelho: átomos de oxigênio; em azul: átomos de nitrogênio, em verde: átomo de cloro (programa DS Visualizer 3.5, 2012).

O bispyribac também é outro herbicida comercializado na forma de sal. Assim, para este também foram realizados atracamentos com a estrutura para o ânion e para a estrutura quando protonada. Para o herbicida bispyribac de sódio o atracamento foi feito para a estrutura do ânion, o resultado obtido para a energia de ligação foi de -4,95 kcal/mol, e houve uma interação por ligação de hidrogênio com o grupo carbonila do resíduo GLY-1734, que está ilustrada na Figura 37. Esta ligação de hidrogênio apresentou tamanho de 2,89 Å e ângulo de 120,46° entre o carbono ligado ao átomo doador e o oxigênio do resíduo da glicina.



**Figura 37.** Herbicida bispyribac de sódio e os resíduos do sítio ativo. A seta tracejada em verde representa a ligação de hidrogênio com o resíduo GLY-1734 (programa DS Visualizer 3.5, 2012).

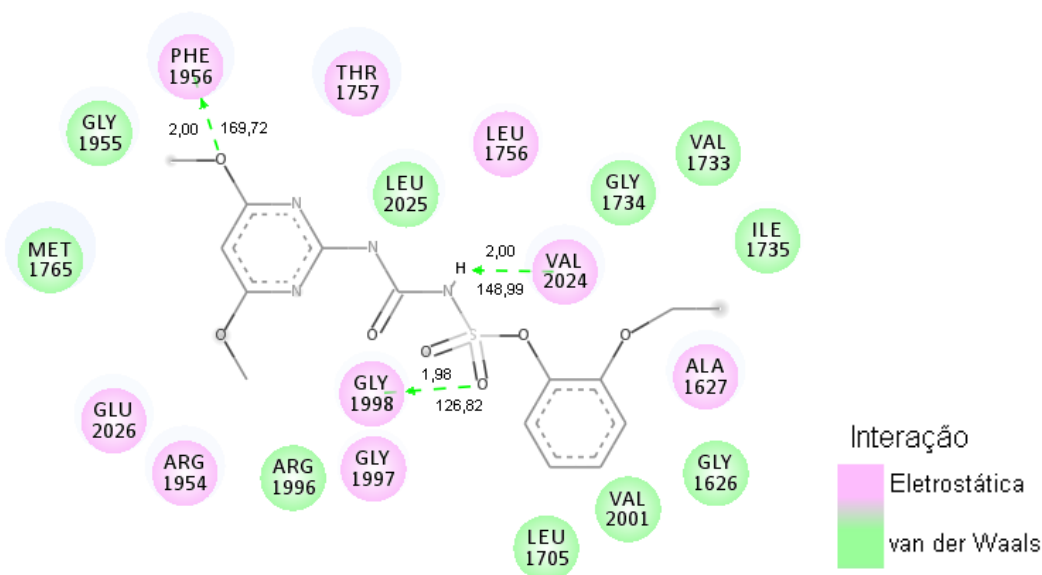
Com o bispyribac protonado (Figura 38) o resultado apresentou uma energia de interação no valor de -5,43 kcal/mol. A análise do atracamento no programa VMD mostrou que a região do benzoato, onde ligações de hidrogênio poderiam se formar com os dois resíduos ALA-1627 e ILE-1735, está em uma conformação desfavorável para interação efetiva com esses resíduos; no entanto, a carbonila faz ligação de hidrogênio com o H-N da GLY-1998 com comprimento de 1,89Å e ângulo de 162,03°. O herbicida não apresentou interações com TYR-1738 e também não há grupos apolares do herbicida situados na região hidrofóbica do sítio ativo, explicando assim a menor afinidade de interação. Sabe-se também que o herbicida bispyribac é um inibidor da enzima acetolactato sintase (ALS), de modo que a presença deste herbicida em alguma amostra a ser analisada pelo nanobiossensor não deve ser um interferente para a detecção de herbicidas inibidores específicos.



**Figura 38.** Herbicida bispyribac protonado e os resíduos do sítio ativo. As setas em verde indicam interações por ligação de hidrogênio, regiões sombreadas de azul representam porções da molécula que ficam voltadas para o solvente (programa DS Visualizer 3.5, 2012).

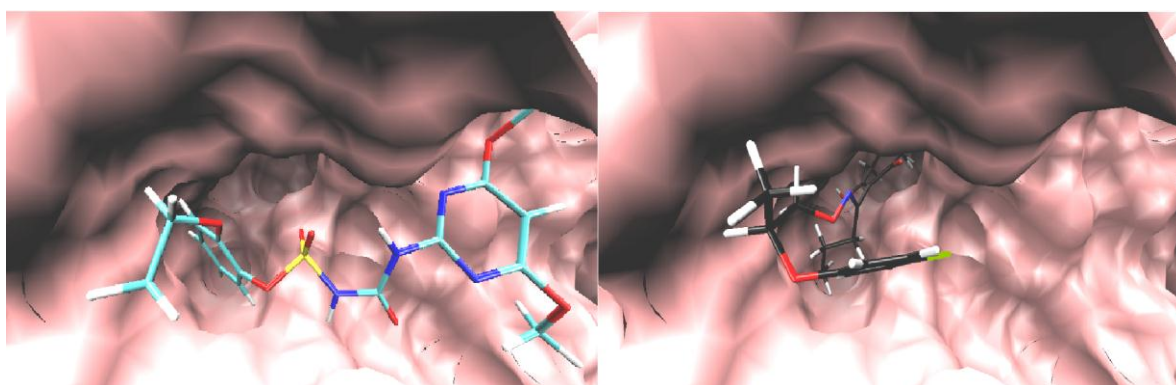
A interação mais favorável da conformação obtida do atracamento para o ethoxysulfuron (Figura 39) teve uma energia livre no valor de -6,96 kcal/mol, sendo favorável e comparável aos valores de energia para os fops; no entanto, este herbicida não apresenta as interações e modo de encaixe com a enzima da forma que foram observadas para os fops e dims; contudo, também foi possível verificar ligações de hidrogênio para este herbicida com os resíduos VAL-2024, PHE-1956 e GLY-1998. Para a ligação com a carbonila da VAL-2024 o comprimento foi 2,00Å e o ângulo 148,99°; para a ligação de hidrogênio com o H-N do

PHE-1956 o comprimento foi de 2,00Å e o ângulo de 169,72°; a ligação de hidrogênio com o H-N da GLY-1998 teve comprimento no valor de 1,98Å e ângulo de 126,82°.



**Figura 39.** Herbicida ethoxysulfuron e os resíduos do sítio ativo. As setas indicam interação por ligação de hidrogênio entre herbicidas e os resíduos da enzima (programa DS Visualizer 3.5, 2012).

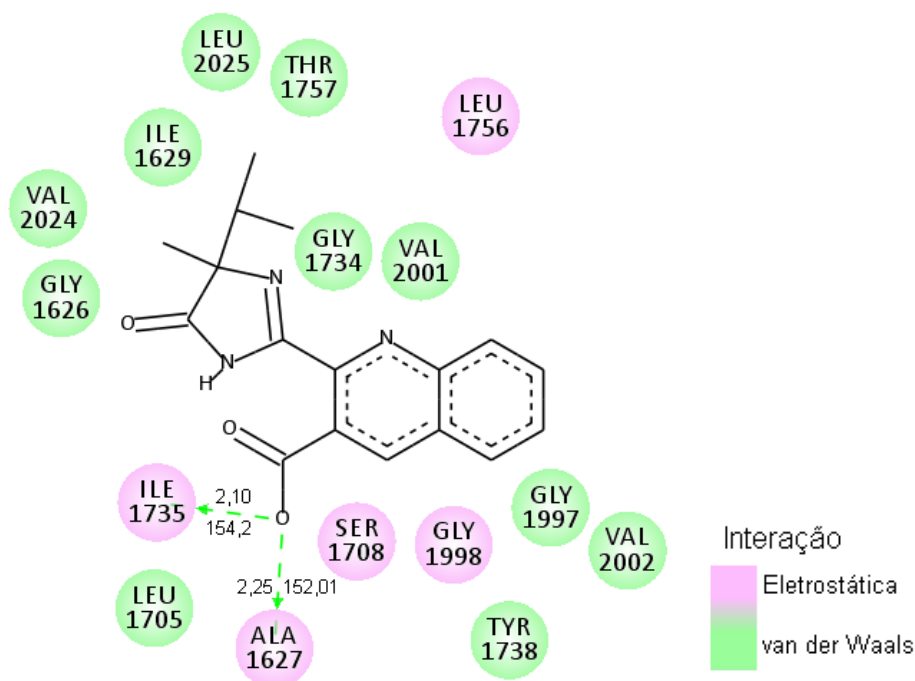
Além disso, com a análise da conformação do ethoxysulfuron complexado à ACCase pôde-se verificar que seu modo de encaixe não acompanha os dos herbicidas fops e dims, este modo está mostrado na (Figura 40), em comparação ao clefoxydim. Esta é uma informação importante quando aplicado à detecção do nanobiossensor, pois este medirá a força de deflexão do cantilever para os herbicidas presentes na amostra, assim mesmo que o ethoxysulfuron tenha apresentado uma energia bem favorável, no atracamento, difere bastante do modo que os fops e dims se acomodaram na cavidade do sítio ativo, pois ele se encaixa ao sítio ativo da enzima de um modo mais estendido. Deste modo, pode-se supor que a força de interação será maior para o clefoxydim. Assim, o ethoxysulfuron não será deverá ser detectado de modo a interferir na análise dos herbicidas específicos para a inibição da ACCase.





**Figura 40.** Encaixes dos herbicidas ethoxysulfuron (átomos de carbono em ciano) e clefoxydim protonado (átomos de carbono em preto) no sítio ativo da ACCase. Demais cores: azul: átomos de nitrogênio; vermelho: átomos de oxigênio; amarelo: átomo de enxofre; verde: átomo de cloro (programa VMD, HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996).

O atracamento do herbicida imazaquin revelou uma energia favorável, bem próxima à energia dos fops, e isso pode ser explicado pelo fato da carboxila fazer ligações de hidrogênio com o H-N dos resíduos ILE-1735 e ALA-1627, sendo esses alguns dos mesmos que interagem com o clethodim. Os tamanhos e ângulos dessas duas ligações de hidrogênio foram 2,10Å e 154,2°; e 2,27Å e 152,01°. Porém, não há grupos alquila na região hidrofóbica como existe para os dims e fops. Dessa forma, pode-se sugerir que o nanobiossensor específico para herbicidas inibidores da ACCase, também detecte o herbicida imazaquin (inibidor específico da ALS); mas, com os resultados apresentados nesse trabalho pode-se inferir que a intensidade de deflexão do cantilever para este herbicida seja menor quando comparado com os dims e fops, pois que não há o encaixe na região hidrofóbica. A Figura 41 mostra as interações do imazaquin no sítio de atividade da enzima.

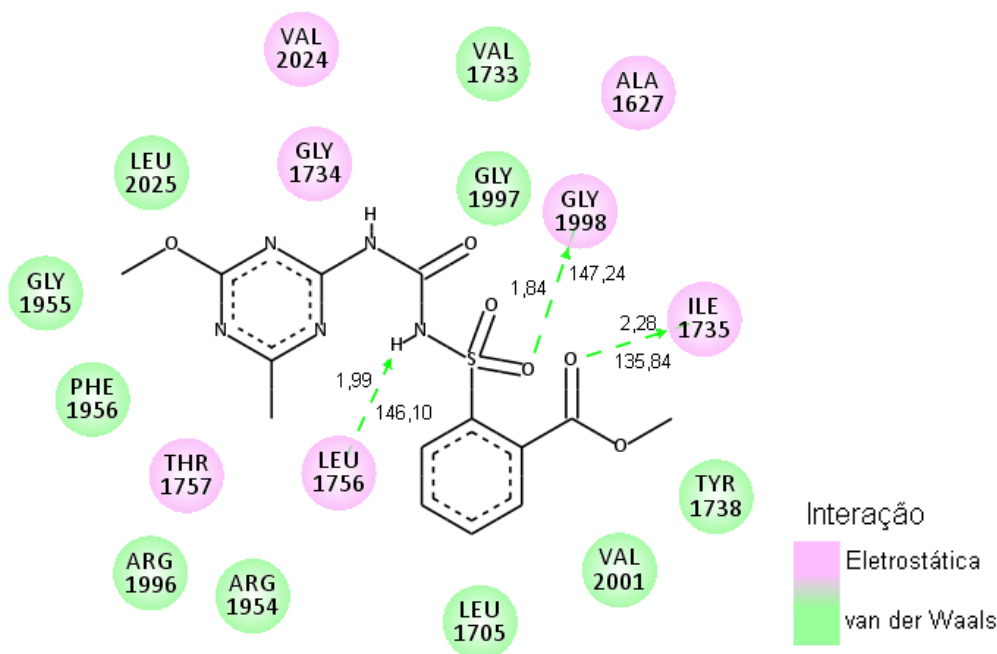


**Figura 41.** Imazaquin e os resíduos do sítio ativo. As setas verdes indicam interações por ligação de hidrogênio (programa DS Visualizer 3.5, 2012).

A conformação de energia de interação mais favorável do herbicida metsulfuron-metil obtida do atracamento também apresentou energia da ordem dos inibidores específicos da ACCase. A Figura 42 mostra as interações nos resíduos do sítio ativo. A molécula realizou interações de hidrogênio com o H-N dos resíduos ILE-1735 e GLY-1998 e com a carbonila do resíduo LEU-1756, o que justifica sua energia de interação no valor de -7,10 kcal/mol. Isto

sugere que este herbicida pode ser detectado pelo nanobiossensor. A distância das ligações de hidrogênio e os ângulos com os resíduos ILE-1735, LEU-1756 e GLY-1998 foram 2,28Å e 135,84°; 1,99Å e 146,10°; 1,84Å e 147,24°, respectivamente.

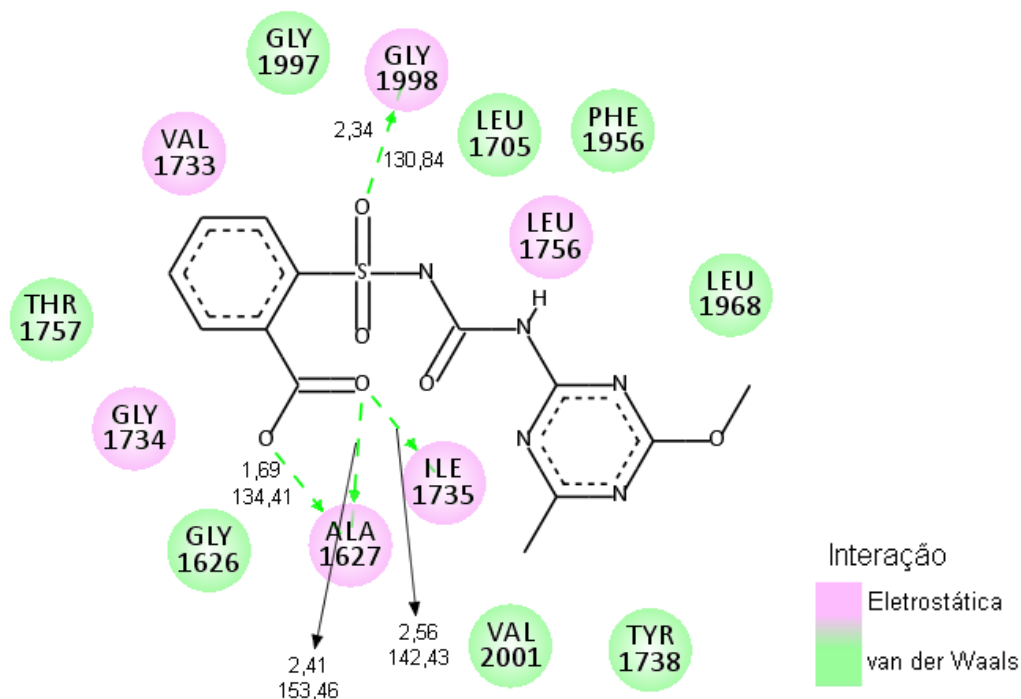
No entanto, da mesma forma que o imazaquin, não há grupos alquila na região em que se encontram os resíduos VAL-2001, SER-1708, LEU-1705, Val-2024 e ALA-1627. Conjetura-se, dessa forma, que os resultados de atracamento molecular sugerem que esses dois herbicidas poderão ser detectados pelo nanobiossensor e serão interferentes do mesmo. Cabe ainda ressaltar que imazaquin e metsulfuron ocuparam um volume menor no sítio ativo da enzima em comparação aos fops e dims, e esta propriedade pode ser um fator importante para garantir a seletividade do nanobiossensor. Estudos futuros, utilizando o cálculo do potencial de força média, na metodologia de Dinâmica Molecular poderá tirar melhor a dúvida com relação ao caráter interferente desses dois herbicidas.



**Figura 42.** Herbicida metsulfuron-metil e os resíduos do sítio ativo, as setas tracejadas em verde indicam ligações de hidrogênio (programa DS Visualizer 3.5, 2012).

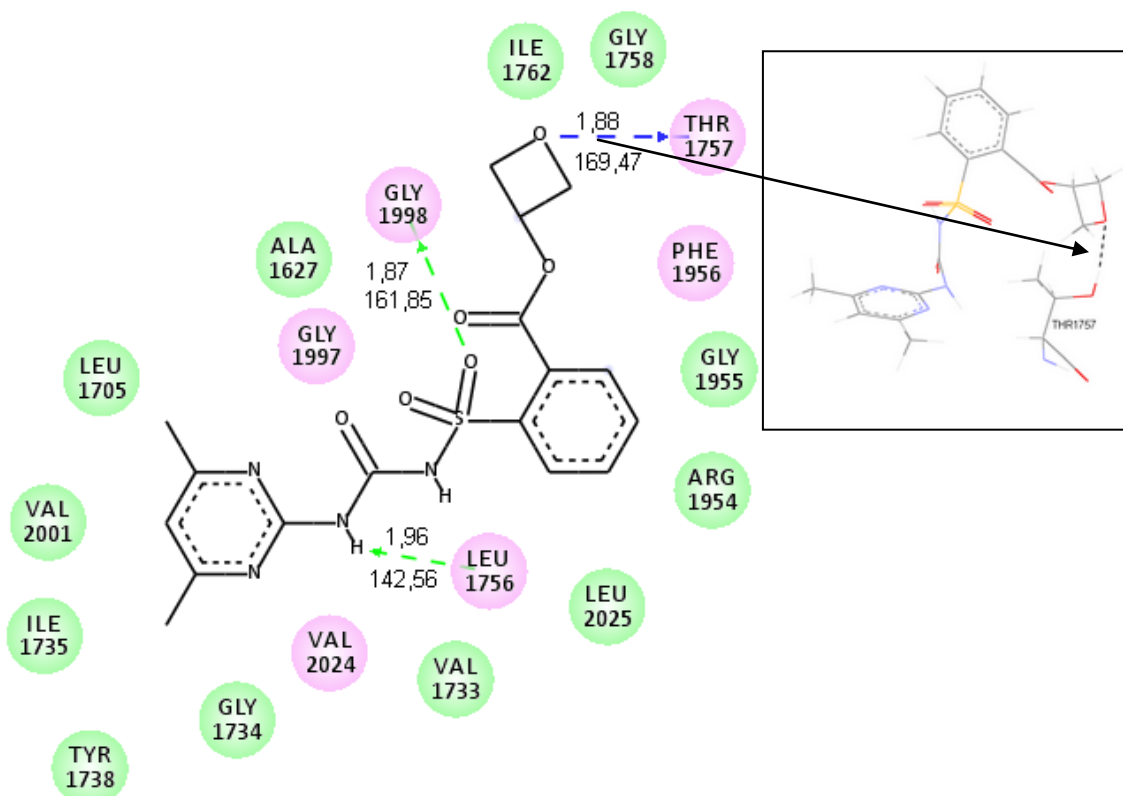
Considerando-se também a degradação do metsulfuron-metil, foi realizado atracamento para a estrutura do metsulfuron. A conformação de energia mais favorável para o metsulfuron obtida do atracamento também apresentou energia da ordem dos inibidores específicos da ACCase, a Figura 43 mostra as interações nos resíduos do sítio ativo. A molécula do herbicida realizou interações por ligação de hidrogênio com o H-N dos resíduos ILE-1735, ALA-1627 e GLY-1998. No entanto, da mesma forma que o metsulfuron-metil

não há grupos alquila na região em que se encontram os resíduos VAL-2001, SER-1708, LEU-1705, Val-2024 e ALA-1627.



**Figura 43.** Herbicida metsulfuron e os resíduos do sítio ativo, as setas tracejadas indicam ligações de hidrogênio (programa DS Visualizer 3.5, 2012).

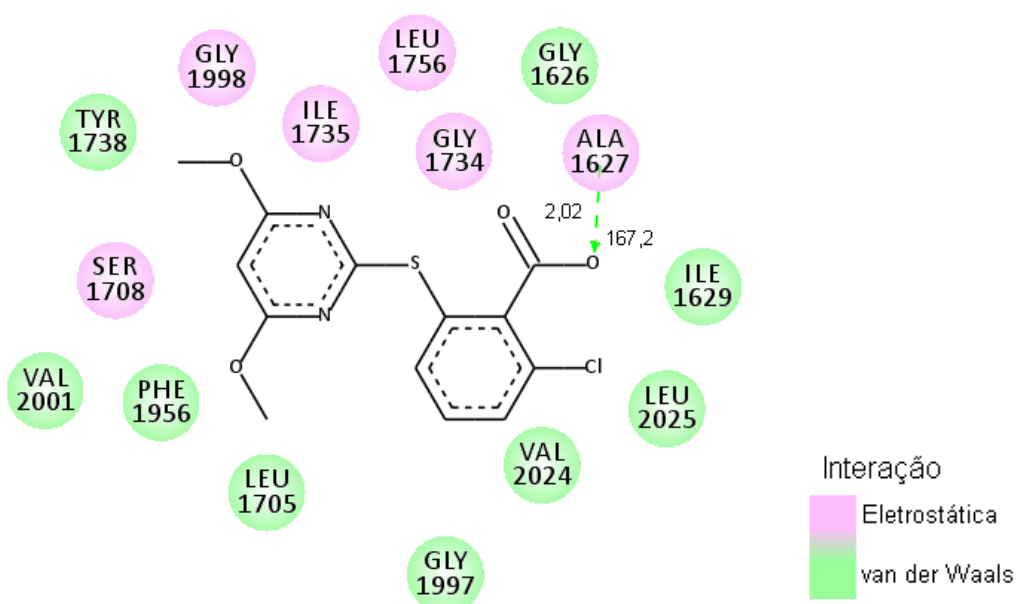
A energia de interação entre o herbicida oxasulfuron e a ACCase obtida pelo atracamento foi de -7,66 kcal/mol, energia muito favorável ao complexo. A análise das interações no sítio ativo mostrou ligações de hidrogênio entre a cadeia lateral do resíduo da THR-1757, entre o H-N da GLY-1998 e a carbonila da LEU-1756 com o oxasulfuron. Os comprimentos e ângulos dessas três ligações de hidrogênio são 1,88Å e 169,47°; 1,87Å e 161,85°; e 1,96Å e 142,56 °, respectivamente. Dois desses resíduos não possuem interação com os herbicidas específicos. Além disso, o oxasulfuron adquiriu uma configuração de encaixe semelhante ao do ethoxysulfuron, o que permite supor que este não possa ser detectado na ordem de comparação com os herbicidas inibidores da ACCase. Na Figura 44 é possível visualizar as ligações de hidrogênio entre o oxasulfuron e os resíduos citados.



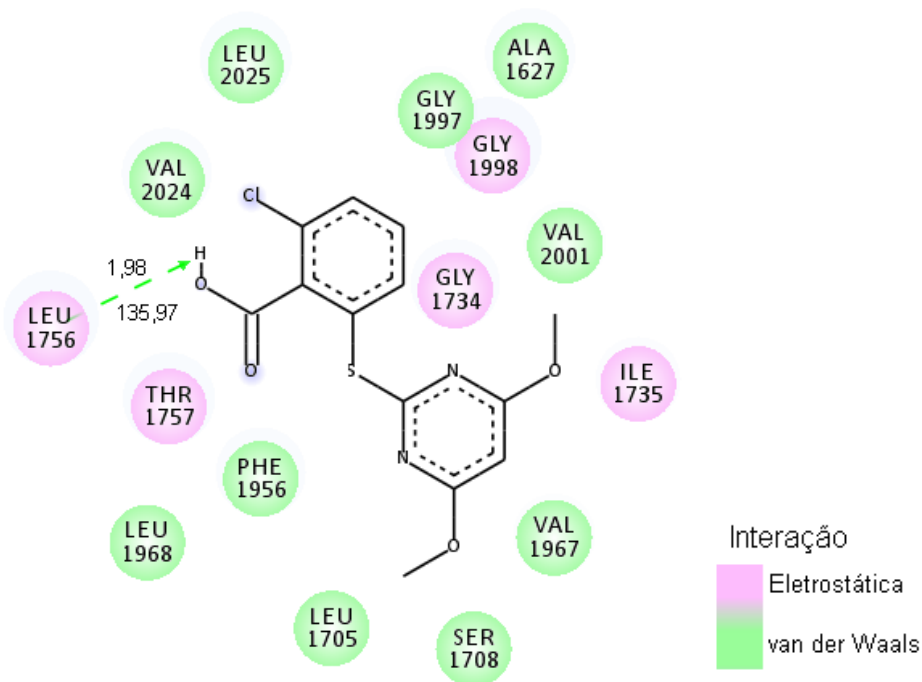
**Figura 44.** Oxasulfuron e interações com os resíduos THR-1757, GLY-1998 e LEU-1756 da enzima ACCase. Em destaque a ligação de hidrogênio com a cadeia lateral da treonina: em branco: átomos de hidrogênio; em vermelho: átomos de oxigênio; em cinza átomos de carbono (programa DS Visualizer 3.5, 2012).

O atracamento realizado com o herbicida pyriithiobac de sódio foi feito para a estrutura do ânion, a conformação com energia de interação mais favorável (-6,31 kcal/mol) pode ser vista na Figura 45, na qual uma das interações intermoleculares se deu por meio da ligação de hidrogênio com o H-N do resíduo ALA-1627, cujo comprimento de ligação foi de 2,02Å com ângulo de 167,2°. Este composto possui uma das interações em comum com os herbicida inibidores da ACCase, e por isso, sua energia de interação é favorável. Entretanto, como observado para outros inibidores não específicos da ACCase, também não há interações com os resíduos hidrofóbicos da enzima, o que indica que o pyriithiobac, caso estiver presente em uma amostra a ser analisada pelo nanobiossensor, poderá não ser um interferente na especiação química.

O atracamento realizado com o ligante pyriithiobac protonado resultou na energia livre de interação de -5,84 kcal/mol, cuja hidroxila fez ligação de hidrogênio com a carbonila do resíduo LEU-1756 (Figura 46). Esta interação teve um comprimento no valor de 1,98Å e o ângulo de 135,97°.



**Figura 45.** Herbicida pirithiobac de sódio e resíduos do sítio ativo da ACCase, ligação de hidrogênio entre a hidroxila e o resíduo ALA-1627 (programa DS Visualizer 3.5, 2012).



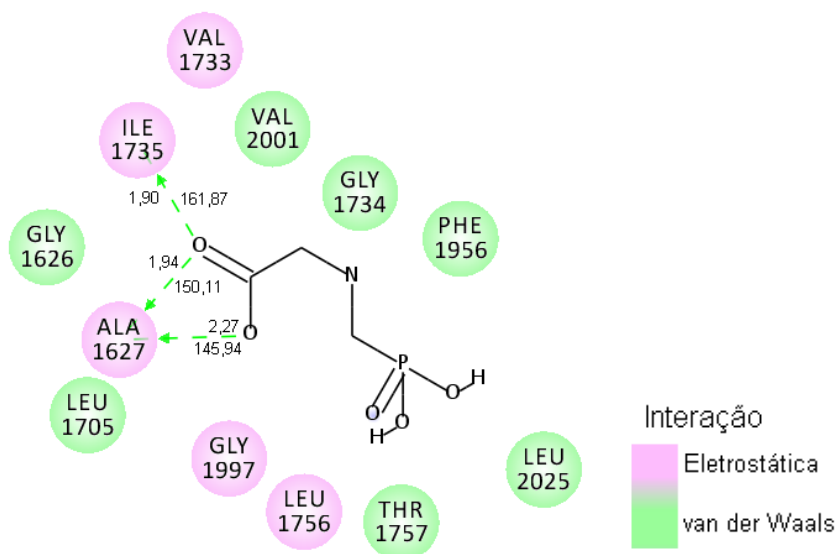
**Figura 46.** Herbicida pirithiobac e resíduos do sítio ativo da ACCase, ligação de hidrogênio entre a hidroxila e o resíduo LEU-1756 (programa DS Visualizer 3.5, 2012).

Assim, como os seis herbicidas: bispyribac, ethoxysulfuron, imazaquin, metsulfuron, oxasulfuron e pirithiobac são inibidores da síntese de aminoácidos de cadeia ramificada cujo alvo é a enzima ALS, supunha-se que suas energias de interação quando complexados à ACCase seriam mais desfavoráveis quando comparadas as energias de interação resultantes

dos complexos formados no atracamento molecular entre a ACCase e os herbicidas da classe dos fops e dims. Porém foi possível verificar que isso não ocorre, pois há em contrapartida os herbicidas imazaquin e metsulfuron que podem influenciar as medidas nas detecções de amostras, pois apresentaram energia de interação quando complexados a ACCase em um valor próximo a dos fops e dims. Deste modo, torna-se necessário a realização do teste com nanobiossensor com amostras que contenham esses herbicidas para que se confirme ou não essa hipótese.

O atracamento do glifosato foi analisado por último, e este é o herbicida mais utilizado no Brasil. A energia de interação resultou em um valor de -4.23 kcal/mol que comparada aos dims é bem desfavorável; com isso, supõe-se que a presença deste em amostras não afetaria a seletividade do nanobiossensor. A verificação das interações intermoleculares que ocorreram devido à formação deste complexo, para melhor validar as hipóteses, está na Figura 47, na qual é possível verificar que houve ligações de hidrogênio entre o glifosato e os resíduos que podem ser parte dos elementos de reconhecimento para a seletividade do nanobiossensor, os resíduos ILE-1735 e ALA-1627.

A ligação de hidrogênio entre o oxigênio da carbonila e o H-N da ILE-1735 da ACCase teve comprimento de 1,90Å e ângulo de 161,87°. A ligação que ocorreu entre o H-N ALA-1627 e o oxigênio da carbonila do glifosato apresentou o comprimento de 1,94Å e o ângulo de 150,11°. E a outra ligação de hidrogênio com o H-N da ALA-1627 e a hidroxila do glifosato teve um comprimento de 2,27Å e ângulo de 145,94°. No entanto, o modo de encaixe no sítio ativo e a ocupação da região hidrofóbica não foi igual e nem ocupada pelo glifosato, de tal modo que o nanobiossensor não deverá detectá-lo com o mesmo sinal de força no AFM que para os herbicidas da classe dos fops e dims, não deve ser o glifosato um interferente para a detecção específica.



**Figura 47.** Glifosato e interações com resíduos do sítio ativo da ACCase com ligações de hidrogênio nos resíduos ILE-1735 e ALA-1627 (programa DS Visualizer 3.5, 2012).

A análise do atracamento molecular para os doze herbicidas com a estrutura cristalográfica da ACCase permitiu verificar teoricamente que o nanobiossensor poderá apresentar seletividade e sensibilidade em concentrações nanomolares para os ariloxifenoxipropionatos (fops) e ciclohexanodionas (dims); mas, dois herbicidas (imazaquin e metsulfuron), não inibidores da ACCase, podem ser interferentes na detecção quando do uso do nanobiossensor, hipótese a ser validada experimentalmente por meio de análises com amostras que contenham esses herbicidas.

### 5.2 Efeito da água na seletividade do nanobiossensor

Posteriormente a esses cálculos foram realizados mais cálculos de atracamento molecular, com estruturas da ACCase após dinâmica molecular, para avaliar o efeito do solvente explícito na estrutura da enzima e assim avaliar implicitamente se a modificação causada pelo solvente favorece ou não a detecção dos herbicidas pelo nanobiossensor. Dessa forma, as estruturas depois de 5 ns e 10 ns de dinâmica molecular foram utilizadas para mais 24 cálculos de atracamento molecular para verificar como as energias e constantes de inibição se alteram com a estrutura da ACCase afetada pelo solvente explícito da dinâmica molecular. A Tabela 3 mostra os valores obtidos do atracamento para as duas estruturas em 5 ns e 10 ns.

**Tabela 3.** Estimativas de energia de ligação obtidas do atracamento molecular para a ACCase (código 1UYR) em 0 ns, 5 ns e 10 ns de dinâmica molecular.

| Classes         | Herbicidas           | Score do atracamento (kcal/mol) 0 ns | Score do atracamento (kcal/mol) 5 ns | Score do atracamento (kcal/mol) 10 ns |
|-----------------|----------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| dims            | clefoxydim           | -9,22                                | -9,10                                | -8,20                                 |
|                 | clefoxydim (ânion)   | -10,23                               | -7,97                                | -8,43                                 |
|                 | clethodim            | -8,47                                | -6,27                                | -7,14                                 |
| fops            | clodinafop           | -7,62                                | -6,28                                | -6,47                                 |
|                 | clodinafop-propargil | -7,20                                | -5,70                                | -6,30                                 |
|                 | propaquizafop        | -7,32                                | -6,40                                | -6,73                                 |
|                 | quizalofop           | -7,63                                | -6,70                                | -7,04                                 |
| não específicos | bispyribac           | -5,43                                | -4,73                                | -5,00                                 |
|                 | bispyribac (ânion)   | -4,95                                | -5,44                                | -5,18                                 |
|                 | ethoxysulfuron       | -6,96                                | -6,24                                | -6,74                                 |
|                 | glifosato            | -4,23                                | -5,18                                | -4,84                                 |
|                 | imazaquin            | -7,42                                | -6,06                                | -6,48                                 |
|                 | metsulfuron          | -7,03                                | -6,31                                | -6,16                                 |
|                 | metsulfuron-metil    | -7,10                                | -7,81                                | -7,15                                 |
|                 | oxasulfuron          | -7,66                                | -7,91                                | -7,16                                 |
|                 | pyrithiobac          | -5,84                                | -5,32                                | -5,62                                 |
|                 | pyrithiobac (ânion)  | -6,31                                | -5,87                                | -5,88                                 |

De acordo com a Tabela 3 pode-se verificar que a energia livre de ligação entre a estrutura cristalográfica e os herbicidas para a estrutura após 5 ns de dinâmica e herbicidas aumentou, ou seja, ficou menos favorável, exceto pelos herbicidas glifosato, oxasulfuron, metsulfuron-metil e bispyribac (ânion). A mesma análise pode ser feita de 0s em relação à estrutura após 10 ns de dinâmica molecular, o que mostra que as energias de interação também ficaram mais positivas para todos os herbicidas com exceção do herbicida glifosato, metsulfuron-metil e do bispyribac (ânion). Para o clefoxydim, que apresentou a energia de interação mais favorável dentre os demais herbicidas, a energia de interação obtida do



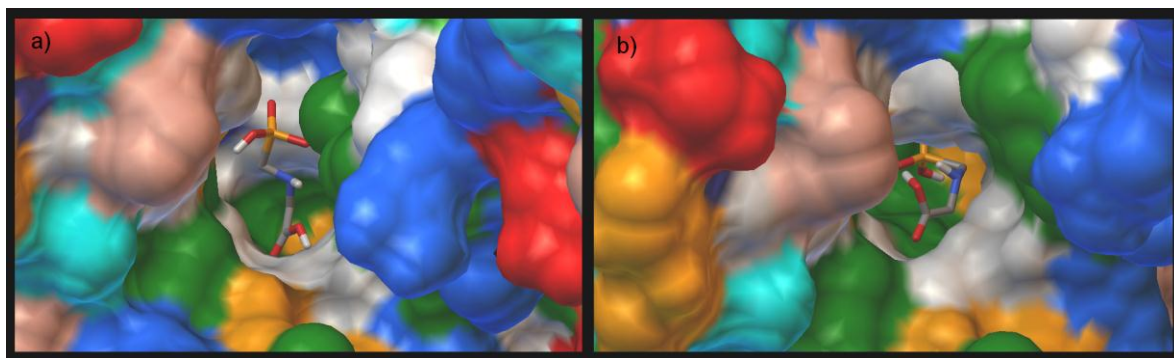
atracamento molecular se tornou relativamente desfavorável de acordo com o incremento no tempo de simulação de dinâmica molecular. Isto sugere que a sensibilidade do nanobiossensor pode ser afetada quando há presença de água na amostra para a detecção de herbicidas inibidores da ACCase, visto que com um valor mais positivo de energia uma concentração maior do herbicida deve estar presente na amostra a ser detectada. Isso pode ser verificado na Tabela 4, na qual para o herbicida clefoxydim a constante de inibição aumentou de 173,21 nmol.L<sup>-1</sup> para 970,63nmol.L<sup>-1</sup>.

**Tabela 4.** Estimativas teóricas das constantes de inibição obtidas do atracamento molecular para a ACCase.

| Classes         | Herbicidas           | Constante de inibição, K <sub>i</sub><br>0 ns | Constante de inibição, K <sub>i</sub><br>5 ns | Constante de inibição, K <sub>i</sub><br>10 ns |
|-----------------|----------------------|---|---|--|
| dims            | clefoxydim           | 173,21 nmol.L <sup>-1</sup>                   | 214,20 nmol.L <sup>-1</sup>                   | 970,63 nmol.L <sup>-1</sup>                    |
|                 | clefoxydim (ânion)   | 31,55 nmol.L <sup>-1</sup>                    | 1,44 µmol.L <sup>-1</sup>                     | 659,05 nmol.L <sup>-1</sup>                    |
|                 | clethodim            | 617,20 nmol.L <sup>-1</sup>                   | 25,26 µmol.L <sup>-1</sup>                    | 5,83 µmol.L <sup>-1</sup>                      |
| fops            | clodinafop           | 2,58 µmol.L <sup>-1</sup>                     | 25,08 µmol.L <sup>-1</sup>                    | 18,08 µmol.L <sup>-1</sup>                     |
|                 | clodinafop-propargil | 5,31 µmol.L <sup>-1</sup>                     | 65,81 µmol.L <sup>-1</sup>                    | 29,98 µmol.L <sup>-1</sup>                     |
|                 | propaquizafop        | 4,31 µmol.L <sup>-1</sup>                     | 20,41 µmol.L <sup>-1</sup>                    | 11,62 µmol.L <sup>-1</sup>                     |
|                 | quizalofop           | 2,55 µmol.L <sup>-1</sup>                     | 12,22 µmol.L <sup>-1</sup>                    | 6,92 µmol.L <sup>-1</sup>                      |
| não específicos | bispyribac           | 103,96 µmol.L <sup>-1</sup>                   | 341,48 µmol.L <sup>-1</sup>                   | 217,56 µmol.L <sup>-1</sup>                    |
|                 | bispyribac (ânion)   | 236, 58 µmol.L <sup>-1</sup>                  | 102,47 µmol.L <sup>-1</sup>                   | 160,62 µmol.L <sup>-1</sup>                    |
|                 | ethoxysulfuron       | 7,96 µmol.L <sup>-1</sup>                     | 26,67 µmol.L <sup>-1</sup>                    | 11,42 µmol.L <sup>-1</sup>                     |
|                 | glifosato            | 790,93 µmol.L <sup>-1</sup>                   | 160,30 µmol.L <sup>-1</sup>                   | 281,73 µmol.L <sup>-1</sup>                    |
|                 | imazaquin            | 3,62 µmol.L <sup>-1</sup>                     | 36,40 µmol.L <sup>-1</sup>                    | 17,68 µmol.L <sup>-1</sup>                     |
|                 | metsulfuron          | 7,04 µmol.L <sup>-1</sup>                     | 23,87 µmol.L <sup>-1</sup>                    | 30,46 µmol.L <sup>-1</sup>                     |
|                 | metsulfuron-metil    | 6,3 µmol.L <sup>-1</sup>                      | 1,87 µmol.L <sup>-1</sup>                     | 5,77 µmol.L <sup>-1</sup>                      |
|                 | oxasulfuron          | 2,43 µmol.L <sup>-1</sup>                     | 1,60 µmol.L <sup>-1</sup>                     | 5,68 µmol.L <sup>-1</sup>                      |
|                 | pyrithiobac          | 52,48 µmol.L <sup>-1</sup>                    | 126,12 µmol.L <sup>-1</sup>                   | 75,35 µmol.L <sup>-1</sup>                     |
|                 | pyrithiobac (ânion)  | 23,85 µmol.L <sup>-1</sup>                    | 49,75 µmol.L <sup>-1</sup>                    | 48,60 µmol.L <sup>-1</sup>                     |

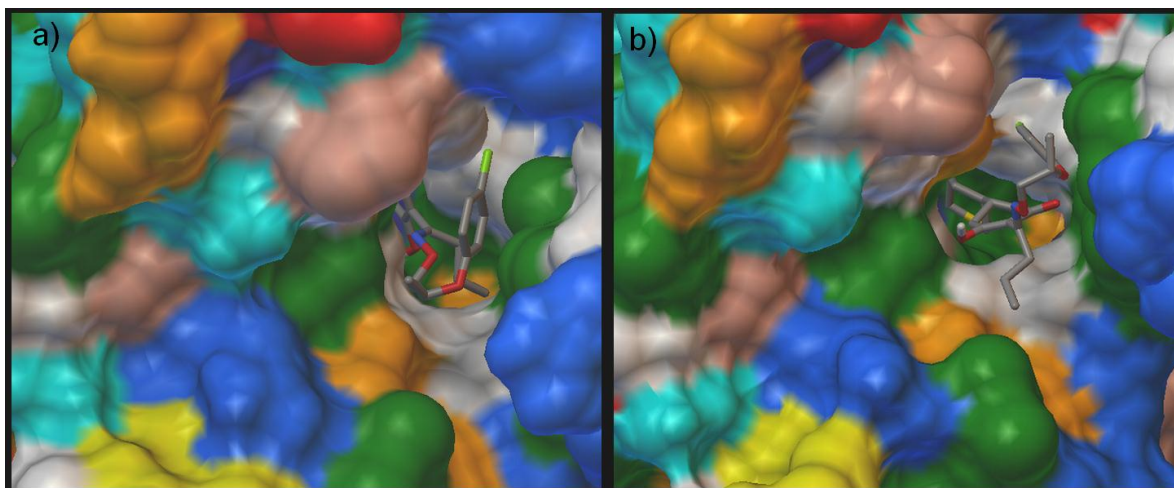
A energia de interação entre o glifosato e a ACCase se comportou de modo inverso à energia do clefoxydim em relação ao tempo de simulação por dinâmica molecular, pois a formação do complexo se tornou mais favorável na estrutura após 10 ns de simulação, como pode ser visto nos scores do atracamento molecular na Tabela 3. Esse resultado permite sugerir que a formação do complexo ACCase-glifosato é favorecido pela presença de água. Na Figura 48 encontra-se uma ilustração do complexo obtido pelo atracamento molecular, em que (a) tem-se a estrutura cristalográfica na qual o glifosato assumiu uma conformação mais

estendida na entrada do sítio ativo; em (b) o atracamento com a estrutura após a dinâmica molecular com o glifosato em uma conformação que apresenta maior contato com os resíduos do sítio ativo da enzima.



**Figura 48.** Ilustração do complexo ACCase-glifosato obtido do atracamento molecular: (a) ACCase em 0 ns; (b) ACCase 10 ns de simulação por dinâmica molecular (programa AutoDock 4.0).

Na Figura 49 tem-se a ilustração do clefoxydim complexado a ACCase em (a) estrutura cristalográfica e em (b) à estrutura após a dinâmica na qual o herbicida não fica completamente encaixado ao sítio ativo.



**Figura 49.** Ilustração do complexo ACCase-clefoxydim: (a) ACCase 0 ns; (b) ACCase 10 ns de simulação por dinâmica molecular (programa AutoDock 4.0).

Considerando as Figuras 48 e 49, observa-se claramente que houve uma modificação no formato do sítio ativo da enzima ACCase. Uma verificação da trajetória dos resíduos do sítio ativo durante a dinâmica molecular mostrou que alguns desses resíduos apresentaram flutuação estrutural com valor acima de 1,6 Å. Isto pode justificar o fato da energia livre de interação do clefoxydim ter se tornado menos favorável, quando realizado atracamento molecular com a estrutura da enzima após a dinâmica. A mesma justificativa se aplica ao

glifosato, que ao contrário, teve uma energia de interação mais favorável. Deste modo, foi utilizado o servidor *Computed Atlas of Surface proteins* (CASTp) (DUNDAS *et al.*, 2006), que realiza o cálculo do volume e a área de cavidades proteicas, e assim permite identificar modificações no sítio ativo.

O CASTp localiza e calcula volume e áreas das cavidades ou bolsas existentes nas proteínas. Assim, foi possível verificar que os resíduos dos aminoácidos que compuseram o sítio ativo interagindo com os inibidores integraram uma grande cavidade denominada pelo CASTp como POC208, na estrutura cristalográfica (1UYR). A área do POC208 foi de 4.056,386 Å<sup>2</sup> e o volume de 10.760,05 Å<sup>3</sup>. Nas estruturas da enzima após 5 ns e 10 ns de dinâmica essas cavidades análogas a da estrutura cristalográfica foram denominadas, pelo servidor CASTp, como POC215 e POC225, respectivamente. A área do POC215 foi de 4.558,090 Å<sup>2</sup> e o volume de 13.452,34 Å<sup>3</sup>. A área do POC225 foi de 4.599,35 Å<sup>2</sup> e o volume de 13.249,48 Å<sup>3</sup>. A Tabela 5 mostra as áreas e volumes dessas cavidades.

**Tabela 5.** Áreas e volumes das cavidades POC208, POC215 e POC225.

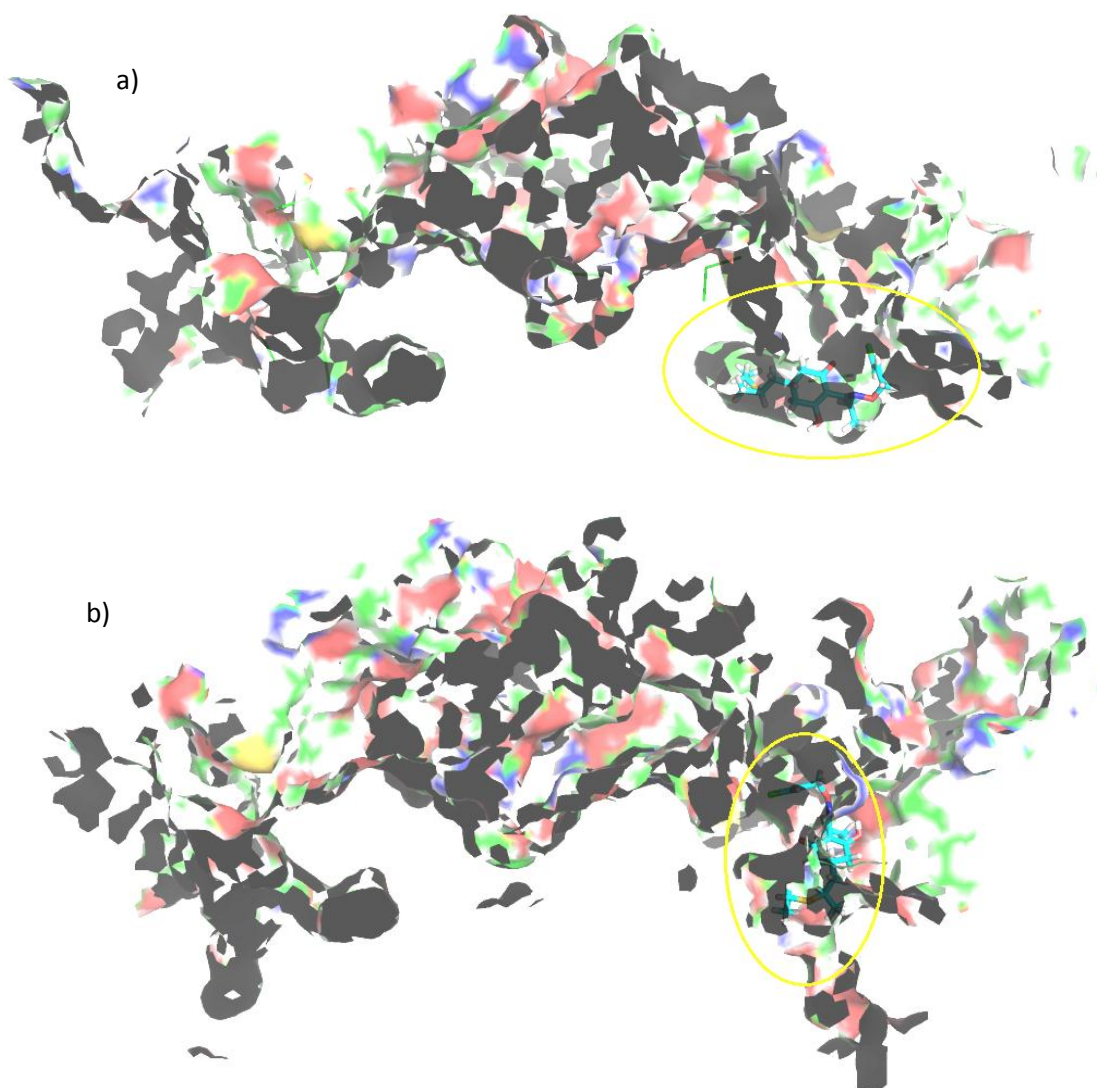
| Nome da cavidade | Área (Å <sup>2</sup> ) | Volume (Å <sup>3</sup> ) |
|------------------|------------------------|--------------------------|
| POC208           | 4.056,386              | 10.760,05                |
| POC215           | 4.558,090              | 13.452,34                |
| POC225           | 4.599,35               | 13.249,48                |

Estas três cavidades estão ilustrados na figura 50 em uma representação da superfície molecular dessa cavidade da ACCase, as regiões das três cavidades circuladas em amarelo mostram o herbicida clethodim. Como esses valores de área e volume englobam uma área extensa e não somente a região do sítio ativo onde se forma o complexo enzima-herbicida, ou seja, as regiões circuladas em amarelo, foi necessário utilizar o programa D.S. 3.5 Visualizer para verificar esses valores somente nessa região.

Analisando o volume e a área ocupada pelo herbicida clodinafop no sítio ativo pode-se verificar que a área do sítio ativo na estrutura cristalográfica teve um valor de 350,904 Å<sup>2</sup> e volume 194.745 Å<sup>3</sup>; na estrutura da ACCase de 5 ns o sítio ativo compreendeu uma área de 379,184 Å<sup>2</sup> e volume no valor de 192.412 Å<sup>3</sup>; e para a estrutura com 10 ns de dinâmica molecular a área da região do sítio ativo foi 342,928 Å<sup>2</sup> e o volume de 192.241 Å<sup>3</sup>. Percebe-se que os volumes se tornaram menores, no entanto a área da estrutura de 5 ns apresentou um valor maior em relação às demais estruturas. Uma comparação entre esses valores e as

energias livres de interação para o herbicida clodinafop, que foram de -7,62; -6,28 e -6,47 kcal/mol, se tornou menos favorável para a estrutura da ACCase em 5 ns e para estrutura de 10 ns voltou a aumentar um pouco. Uma explicação para o valor de -6,28 kcal/mol pode ser o fato da maior área de superfície da enzima nessa conformação de 5 ns.

As imagens das três *cavidades* (Figura 50) ilustram também o modo como a região do sítio ativo foi afetada devido a presença do solvente. Em a) o herbicida se encaixa completamente nessa região, já em b) e c) maior parte do herbicida fica voltada para o solvente e em menor contato com os resíduos, ou seja, não estão tão perfeitamente encaixados na região do sítio ativo, o que explica os volumes encontrados para o clodinafop no D.S. 3.5 Visualizer.





**Figura 50.** Representação da superfície molecular das cavidades das estruturas da ACCase: a) cavidade POC208 da estrutura 1UYR, b) cavidade POC215 da estrutura após 5 ns de dinâmica molecular e c) POC225 estrutura da cavidade após 10 ns de dinâmica molecular. Na representação da superfície molecular das três cavidades a cor verde representa átomos de carbono, a cor azul representa átomos de nitrogênio, a cor vermelha representa os oxigênios e a cor amarela os átomos de enxofre. Nas regiões circuladas em amarelo está o herbicida (programa PyMOL, Schrödinger LLC, 2009).

Por outro lado, energia de interação do atracamento para o glifosato com a estrutura da ACCase após a dinâmica se tornou mais favorável. Em razão do glifosato ser um herbicida que possui menor volume molecular este foi favorecido na formação do complexo enzima-herbicida no sítio ativo, e essa modificação do sítio ativo contribuiu para que mais resíduos do sítio ativo entrassem em contato com o herbicida glifosato.

## 6. Considerações finais

O nanobiossensor para detecção de herbicidas inibidores da acetil-coenzima A carboxilase (ACCase), que foi construído com o suporte de estudos teóricos prévios constitui uma alternativa interessante para análise de herbicidas presentes em produtos da cultura agrícola, pois este é capaz de detectar herbicidas em amostras em concentrações nanomolares. A realização experimental também mostrou que este consegue diferenciar a detecção entre um herbicida da classe dos fops, o diclofop do herbicida atrazina (FRANCA, *et al.*, 2011). Com o presente trabalho, por meio da metodologia do atracamento molecular feito com doze herbicidas (clefoxydim de lítio, clethodim, clodinafop-propargil, propaquizafop, quizalofop, bispyribac de sódio, imazaquin, pyriithiobac de sódio, metsulfuron-metil, oxasulfuron, ethoxysulfuron, glifosato) e a enzima ACCase juntamente com o estudo das interações intermoleculares dos complexos enzima-herbicida formados foi possível verificar que há a viabilidade da utilização do nanobiossensor quanto à seletividade para herbicidas das classes dos ariloxifenoxipropionatos (fops) e ciclohexanodionas (dims), ambas classes que são de herbicidas inibidores da ACCase.

Para os herbicidas clefoxydim, clethodim, clodinafop, propaquizafop e quizalofop, os cálculos de atracamento molecular e as análises das interações intermoleculares dos complexos formados mostraram que a ACCase tem seletividade para estes herbicidas. Isso foi observado com o atracamento molecular, cujo valor da energia de interação para a formação dos complexos entre a enzima e os herbicidas fops e dims apresentaram energia de interação mais favorável que os demais herbicidas. Foi possível verificar também que para essas duas classes há interações intermoleculares específicas com a enzima, que faz com que estas sejam possíveis elementos de reconhecimento pela enzima.

Essas interações incluem a presença de grupos alquila dos herbicidas localizados em uma região do sítio ativo da ACCase formada pelos resíduos VAL-2001, LEU-1708, SER-1708, VAL-2024 e ALA-1627; ligações de hidrogênio com os átomos de oxigênio e nitrogênio dos grupos amida dos resíduos GLY-1998, ILE-1735, ALA-1627 e VAL-1967; e interações do tipo CH- $\pi$  ou  $\pi$ - $\pi$  com o resíduo de aminoácido TYR-1738. Essas interações fizeram com que o valor da energia dos complexos encontrados pelo atracamento molecular fosse mais favorável e deste modo permite colocar a hipótese de que a força detectada pelo nanobiossensor será maior para esses herbicidas. Estes resultados obtidos mostram correlação com os trabalhos de Xiang *et al.* (2009) e Zhang, Tweel & Tong (2004) no qual as estruturas



cristalográficas com herbicidas da classe dos fops e dims e a ACCase apresentaram interações intermoleculares reconhecidas no presente trabalho, estas que podem ser considerados elementos de reconhecimento para essas duas classes de herbicidas.

No entanto, os cálculos de atracamento molecular também permitem supor que a seletividade para fops e dims pode ser afetada pelos herbicidas imazaquin e metsulfuron, que se estiverem presentes na amostra analisada também poderiam ser detectados, mesmo não sendo inibidores específicos da ACCase. Esta hipótese se faz, pois suas energias de interação do atracamento foram comparáveis às energias de interação para fops e dims. Valores de energia que se deram porque ambos imazaquin e metsulfuron apresentaram interações intermoleculares comuns às duas classes. Contudo, para validar essas informações é necessário experimentações com o nanobiossensor para se conhecer com que força imazaquin e metsulfuron são detectados pelo AFM.

Comparando as energias de interações para os herbicidas - clefoxydim de lítio, bispyribac de sódio e pyriithiobac de sódio - cujo atracamento foi realizado com as estruturas protonadas e com as estruturas do ânion, foi verificado que os ânions apresentam valores de energia de interação menores, ou seja, mais favoráveis. Isso ocorre porque o potencial eletrostático da enzima mostra que o sítio ativo é predominantemente carregado com cargas positivas. Deste modo, considerando o pH em que o herbicida se encontra, um meio fosse básico pode favorecer a detecção quando do uso do nanobiossensor, já que este meio deixaria maior concentração do herbicida desprotonado.

Quanto a influencia da presença da água nas energias dos cálculos de atracamento, a dinâmica molecular permitiu verificar flutuações estruturais na região do sítio ativo com RMSD maior que 1,6Å. Os resultados mostraram que o funcionamento do nanobiossensor pode ser afetado quanto à sensibilidade, pois a comparação das energias livres de interação do atracamento com a estrutura da enzima antes e depois da dinâmica mostrou que essas são desfavorecidas para a última. Assim, com o aumento nos valores das energias os valores das constantes de inibição encontrados no atracamento também aumentaram, o que indica a necessidade de maior quantidade do herbicida presente na amostra para que este possa ser detectado.

Para os herbicidas da classe dos fops e dims, as energias livres de interação para os complexos formados com a enzima antes e após dinâmica se tornaram menos favoráveis após dinâmica molecular. Pode-se observar também que o comportamento do complexo ACCase-glifosato diferiu do comportamento geral apresentado pela maioria dos herbicidas estudados, já que a sua energia de interação foi favorecida pela presença implícita da água no

atracamento. O que se deve pelo menor volume ocupado pelo glifosato no sítio ativo, no qual apresentou contato com mais resíduos de aminoácidos em relação à estrutura cristalográfica, assim sua formação do complexo com a enzima foi mais favorecida que os demais. Em relação à seletividade, esta não foi afetada pela presença da água, pois as melhores energias de interações, de acordo com a energia livre de interação do atracamento, continuaram a ser para os herbicidas fops e dims.



## 7. Trabalhos Futuros

- Calcular as forças de interação e o potencial de força entre os herbicidas e a enzima ACCase utilizando a metodologia de Dinâmica Molecular, em particular a Dinâmica Molecular Direcional.
- Analisar as interações específicas ao redor do sítio ativo para os complexos enzima-herbicida com as estruturas da enzima após a dinâmica molecular para comparação dos resultados obtidos aqui;
- Realizar testes experimentais com nanobiossensor com os herbicidas estudados neste trabalho.

## 8. Referencias bibliográficas

ALVES FILHO, J. P. **Uso de agrotóxicos no Brasil**: controle social e interesses corporativos. São Paulo: Annablume; Fapesp, 2002. 188p.

AMARANTE, A. M. *et al.* Modelagem molecular aplicada a sistemas biológicos. In: LEITE, F.; FERREIRA, M.; OLIVEIRA Jr, O. N (Ed). **Nanociência e Nanotecnologia**: Aplicações, Princípios e Nanoestruturas. 2013, cap.17.

ATKINS, Peter; de PAULA, Julio. **Físico-Química: fundamentos**. 5. Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2011)

**Autodock User Guide**: Automated Docking of Flexible Ligands to Receptors, Version 3.0.5. Scripps Research Institute, Department of Molecular Biology, 2001.

BANICA, Florinel-Gabriel. **Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications**. John Wiley & Sons, 2012.

BRASIL. **Em questão**, Secretaria de Comunicação Social da Presidência da República, 1647.ed. p.3, 30 out. 2012. Disponível em: <<http://www.secom.gov.br/sobre-a-secom/acoes-e-programas/comunicacao-publica/em-questao/edicoes-anteriores/em-questao-pdf-1/2012-outubro/em-questao-1647-dia-30-terca-feira/view>>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Vegetal. Exportação. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/>> Acesso em: 15 jun. 2013.

BOWEN, W. R.; HILAL, N. **Atomic Force Microscopy in Process Engineering** - Introduction to AFM for improved processes and products. 1. ed. Burlington: Butterworth-Heinemann, 2009.

CALIL, Simone Saad; QUEIROZ, Paulo Roberto. Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade. **6ª Mostra de Produção Científica da Pós-Graduação Lato Sensu da PUC Goiás**, v. 1, 2011.

CARNEIRO, F. *et al.* Dossiê ABRASCO –Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. **ABRASCO**, Rio de Janeiro, abril de 2012. 1ª Parte. 98p.

Discovery Studio Modeling Environment, Release 3.5. Accelrys Software Inc.: San Diego. 2012.

DUNDAS, Joe *et al.* CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. **Nucleic acids research**, v. 34, n. suppl 2, p. W116-W118, 2006.

FRANCA E. F.; AMARANTE A. M.; LEITE F. L. In: MÉNDEZ-VILAS A.; DÍAZ J. (Eds.) **Microscopy: Science, Technology, Applications and Education**. Formatex: 2010. p. 1338-1349.

FRANCA, E. F. *et al.* Designing an enzyme-based nanobiosensor using molecular modeling techniques. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 19, p. 8894–8899, 27 abr. 2011.

FERREIRA, V. Agronegócio responde por 40% das exportações brasileiras. **Estadão**, São Paulo, 09 nov. 2012. Economia e Negócios. Disponível em: <<http://economia.estadao.com.br/noticias/negocios+agronegocio,agronegocio-responde-por-40-das-exportacoes-brasileiras,134301,0.htm>> Acesso em: 6 jan. 2013.

GRIFFIN, James L. **Chapter 19: Acetyl CoA Carboxylase (ACCase) Inhibition and Fatty Acid and Lipid Biosynthesis Inhibition**. 21 set. 2012. LSU AgCenter. 8 f. Notas de Aula.

HOLST, M.; BAKER, N.; WANG, F. **Journal of Computational Chemistry**, v. 21, n. 15, p. 1319–1342, 2000.

HUEY, Ruth *et al.* A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. **Journal of computational chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1145-1152, 2007.

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K., "VMD - Visual Molecular Dynamics", **J. Molec. Graphics**, 1996, vol. 14, pp. 33-38.

Jmol: an open-source Java viewer for chemical structures in 3D. <http://www.jmol.org/>

KAMINSKI, G. A. *et al.* Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 105, n. 28, p. 6474–6487, 2001.

LEE, Thomas Ming-Hung. Over-the-counter biosensors: Past, present, and future. **Sensors**, v. 8, n. 9, p. 5535-5559, 2008.

LEITE, F. L. *et al.* The use of functionalized AFM tips as molecular sensors in the detection of pesticides. **Materials Research**, v. 16, n. 3, p. 683-687, Jun. 2013.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida.** – Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011. 190 p.

MAGALHÃES, C. S. **Algoritmos genéticos para o problema de docking proteína-ligante.** 2006. 261f. Tese (Doutorado em Modelagem Computacional) – Laboratório Nacional de Computação Científica – LNCC, Petrópolis – RJ, 2006.

MARCHI, G.; SANTOS MARCHI, E. C.; GUIMARÃES, T. G. **Herbicidas: mecanismos de ação e uso.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2008.

MARQUES, Paulo Roberto Brasil de Oliveira; YAMANAKA, Hideko. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Quim. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791-1799, 2008.

MCGAUGHEY, Georgia B.; GAGNÉ, Marc; RAPPÉ, Anthony K.  $\pi$ -Stacking interactions alive and well in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 25, p. 15458-15463, 1998.

MEYER, E. Atomic force microscopy. **Progress in Surface Science**, Vol. 41, p. 3-49, 1992.

MORGON, N. H; COUTINHO, K. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular.** 1. ed. São Paulo: LIVRARIA DA FÍSICA, 2007. 539 p.

MORRIS, G. M. *et al.* **Autodock User Guide: Automated Docking of Flexible Ligands to Receptors, Version 4.2.** Scripps Research Institute, Department of Molecular Biology, 2012.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** 3 ed. São Paulo, 2002.

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

OLIVEIRA JR, R.S. Mecanismos de ação de herbicidas. In: Rubem Silvério de Oliveira Jr.; Jamil CONstantin; Miriam Hiroko Inoue. (Org.). **Biologia e manejo de plantas daninhas**. 1ed. Curitiba, PR: Omnipax Editora Ltda., 2011, v. 1, p. 141-192.

Schrödinger LLC (2009) The PyMOL molecular graphics system, Version 1.2r1.

SECOR, Jacob; CSÉKE, Csaba. Inhibition of acetyl-CoA carboxylase activity by haloxyfop and tralkoxydim. **Plant physiology**, v. 86, n. 1, p. 10-12, 1988.

TAYLOR P. Agentes anticolinesterásicos. In: BRUNTON, Laurence L.; CHABNER, Bruce A.; KNOLLMANN, Björn C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. McGraw Hill Brasil, 2012. cap.10, p.239-254.

TONG, L. Structure and function of biotin-dependent carboxylases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 5, p. 863-891, 2013.

VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E.; HESS, B.; GROENHOF, G.; MARK, A. E. & BERENDSEN, H. J. C. GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, 26(16):1701-1718, 2005.

VARSHNEY, J. G.; SONDHIA, S. **Introduction to herbicides**. Appears in Collections: Weed Management. 2008. (e-book) Disponível em: < <http://hdl.handle.net/123456789/559> >

VILALTA-CLEMENTE, Arantxa; GLOYSTEIN, Kathrin. Principles of Atomic Force Microscopy (AFM). **Physics of Advanced Materials Winter School**, 2008.

XIANG, Song *et al.* A different mechanism for the inhibition of the carboxyltransferase domain of acetyl-coenzyme A carboxylase by tepraloxym. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 49, p. 20723-20727, 2009.

ZACHARIA, James Tano (2011). Identity, Physical and Chemical Properties of Pesticides, **Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis**, Dr. Margarita Stoytcheva (Ed.), ISBN: 978-953-307-437-5, InTech, Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/pesticides-in-the-modern-world-trends-in-pesticidesanalysis/identity-physical-and-chemical-properties-of-pesticides> >

ZHANG, Hailong; TWEEL, Benjamin; TONG, Liang. Molecular basis for the inhibition of the carboxyltransferase domain of acetyl-coenzyme-A carboxylase by haloxyfop and diclofop. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 16, p. 5910-5915, 2004.