

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DO SERTÃO PERNAMBUCANO
CAMPUS PETROLINA ZONA RURAL**

CURSO DE BACHARELADO EM AGRONOMIA

**AVALIAÇÃO IN-SILICO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COM
POSSÍVEL AÇÃO NA ENZIMA (EPSPS)**

ALEXANDRE BATISTA DE LIMA

**PETROLINA,PE
2018**

ALEXANDRE BATISTA DE LIMA

**AVALIAÇÃO IN-SILICO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
COM POSSÍVEL AÇÃO NA ENZIMA (EPSPS)**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao IF SERTÃO-PE *Campus*
Petrolina Zona Rural, exigido para a
obtenção de título de Engenheiro Agrônomo.

**PETROLINA,PE
2018**

ALEXANDRE BATISTA DE LIMA

**AVALIAÇÃO IN-SILICO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COM
POSSÍVEL AÇÃO NA ENZIMA (EPSPS)**

Trabalho de Conclusão do Curso apresentado ao IF
SERTÃO-PE *Campus* Petrolina Zona Rural, exigido
para a obtenção de título de Engenheiro Agrônomo.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

Professor (Membro da banca examinadora)

Professor (Membro da banca examinadora)

Professor (Orientador)

RESUMO

De todas as práticas de manejo de plantas espontâneas, o controle químico é o mais utilizado na agricultura brasileira. Herbicidas de modo de ação sistêmico são essenciais para o alto rendimento das culturas e para apresentar uma agricultura sustentável. Atualmente, plantas espontâneas resistentes ao controle de herbicida avançam em áreas de campos cultivados no Brasil e ameaçam o vantajoso sistema de plantio direto, dessa forma os herbicidas naturais ganham uma maior importância para agricultura tanto familiar quanto no agronegócio, com o objetivo de diminuir os impactos ambientais. O presente trabalho realizou docking molecular com 15 substâncias a base de plantas medicinais na área de atuação da enzima (EPSPS) objetivando ranquear estas moléculas, assim como, compreender a interação intermolecular com o alvo. A estrutura da molécula glifosato (GPJ_702 [A].mvdml) utilizado para performance do estudo de docking, utilizando o programa Molegro Virtual Docker. O docking foi validado pelo redocking do ligante cristalizado no sítio ativo, resultando em boa sobreposição. Após avaliação por docking molecular, observou-se que houve energia de interação dos metabólitos secundários com a molécula glifosato, sugerindo uma afinidade pela enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS).

Palavras-chave: Fotossistema II; Docking; Metabólitos secundários.

ABSTRACT

Of all the management practices of spontaneous plants, chemical control is the most used in Brazilian agriculture. Herbicides of systemic action mode are essential for the high yield of crops and for presenting a sustainable agriculture. Currently, herbicide-resistant spontaneous plants advance in areas of cultivated fields in Brazil and threaten the advantageous no-tillage system, thus natural herbicides gain greater importance for both family and agribusiness agriculture, with the aim of reducing environmental impacts. The present work carried out molecular docking with 15 substances based on medicinal plants in the area of action of the enzyme (EPSPS) aiming to rank these molecules, as well as to understand the intermolecular interaction with the target. The structure of the glyphosate molecule (GPJ_702 [A] .mvdml) used for the performance of the docking study, using the program Molegro Virtual Docker. The docking was validated by redocking the crystallized binder in the active site, resulting in good overlap. After evaluation by molecular docking, it was observed that there was interaction energy of the secondary metabolites with the glyphosate molecule, suggesting an affinity for the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS).

Keywords: Photosystem II; Docking; Secondary metabolites.

AVALIAÇÃO IN-SILICO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COM POSSÍVEL
AÇÃO NA ENZIMA (EPSPS)

Vitor Prates Lorenzo^a, Alexandre Batista de Lima^a

^a IF Sertão - Campus Petrolina Zona Rural, Petrolina, Brazil.

^a IF Sertão - Campus Petrolina Zona Rural, Petrolina, Brazil.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, minha família e aos meus amigos, em especial, meu avô João Batista (*in memoriam*), minha mãe Ana Lúcia e meu pai Homero Luna (*in memoriam*) por me proporcionarem os estudos e me formarem como cidadão, bem como a minha noiva Geórgia Espínola por estar sempre me ajudando nos momentos mais difíceis da minha graduação. Agradeço, também, ao meu orientador Vitor Prates Lorenzo e ao Instituto Federal Sertão Pernambucano, que, durante esse árduo período, foi minha segunda casa.

1 INTRODUÇÃO

Plantas espontâneas ou plantas daninhas são plantas não desejáveis na produção, podendo ser: vegetais nativos ou exóticos, gramíneas, fruteiras, entre outros. São plantas que o produtor não deseja na sua lavoura, que disputará por nutrientes, água e espaço com a cultura a ser produzida. As perdas variam conforme a espécie e podem, inclusive, inviabilizar a colheita. Nesse sentido, dependendo da espécie e da densidade de indivíduos na área, o valor potencial da terra pode ser reduzido.

As plantas daninhas são potenciais hospedeiras de pragas, doenças, nematoides, ácaros, bactérias e vírus, sendo, portanto, fonte de inóculo desses organismos em culturas de interesse comercial.

Controlar plantas espontâneas é um trato muito antigo na agricultura, pois a produtividade também depende da eficácia do seu controle. Os mais utilizados no campo são os controles cultural, biológico, mecânico e o químico. O químico surge logo após a Segunda Guerra Mundial, redirecionando aquelas substâncias químicas que foram usadas na guerra para a fabricação de herbicida.

Apesar de eficaz e muito utilizado, o controle químico é muito nocivo para população e para o meio ambiente, além de ter um alto custo do produto e na mão-de-obra para a sua aplicação. Alternativas para substituí-lo é sempre uma ótima opção tanto para a agricultura convencional ou orgânica.

No controle químico os mecanismos de ação podem ser classificados em: as de aplicação no solo movem-se das raízes para as folhas (via xilema); de aplicação nas folhas (contato) que reagem rapidamente no ponto de contato e não se movem no sistema interno da planta (não translocado); aplicado nas folhas (sistêmico) movimentam-se das folhas para os pontos de crescimento das plantas (translocam via floema).

O glifosato é um herbicida sistêmico de ação total, facilmente translocável, motivo pelo qual provoca a morte do sistema radicular e de estruturas reprodutivas de plantas perenes, como rizomas, bulbos e tubérculos. Permite a semeadura de culturas imediatamente após a aplicação, em função de sua rápida e forte adsorção ao solo. A decomposição microbiana é rápida e as perdas por volatilização são insignificantes.

Quanto à absorção, lembramos que o glifosato é absorvido basicamente pela região clorofilada das plantas (folhas e tecidos verdes) e translocado, preferencialmente pelo floema, para os tecidos meristemáticos.

O glifosato atua como um potente inibidor da atividade da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), que é catalisadora de uma das reações de síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, influencia também outros processos, como a inibição da síntese de clorofila, estimula a produção de etileno, reduz a síntese de proteínas e eleva a concentração do IAA (Cole, 1985; Rodrigues, 1994). Tais aminoácidos são essenciais para formação de proteínas

Segundo Vicente (2015) “glifosato é um ácido, mas é aplicado nas lavouras na forma de sal (sal de isopropilamina, amônio, potássio). As formulações de glifosato são geralmente comercializadas como concentrados solúveis em água ou como granulados dispersáveis em água”.

Em seu artigo, Herbicidas inibidores da EPSPS: Revisão de Literatura, Kruse, Trezzi e Vidal (2000, p. 01) destaca que:

A molécula glyphosate foi inventada em 1950, pela indústria Cilag/Ciba, na Suíça, num processo de seleção de compostos quelatizantes para tintas. Na década de 60, cientistas da Stauffer também descobriram outras propriedades quelatizantes de glifosato. Somente no início dos anos 70, cientistas da Monsanto descobriram as propriedades herbicidas de glyphosate.

Seu nome comercial é Roundup. Hoje o produto está registrado para as seguintes culturas: algodão, ameixa, arroz, aveia preta e azevém (dessecação), banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citrus, coco, eucalipto, feijão, fumo, maçã, mamão, milho, nectarina, pastagens, pera, pêssigo, pinus, seringueira, soja, trigo e uva.

De acordo com Taiz e Zeiger (2006), as plantas produzem uma larga e diversa ordem de componentes orgânicos divididos em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia. Os metabólitos secundários, produtos secundários ou produtos naturais, aparentemente não possuem relação com crescimento e desenvolvimento da planta.

Conforme Souza Filho e Alves (2002), teoricamente, todas as plantas são potencialmente capazes de sintetizar metabólitos secundários. No entanto, essa característica é mais comum entre as plantas selvagens, que, ao longo do seu ciclo evolutivo, desenvolveram mecanismos de adaptação para competir com outras, assegurando sua sobrevivência quer pela formação de estandes puros, quer para se defender de seus inimigos naturais.

Os metabólitos secundários são de suma importância para as plantas principalmente no diz respeito no seu manejo ecológico, tendo em vista a sua proteção contra pragas, patógenos e herbívoros. Destarte, também serve para atrair agentes polinizadores por conta do aroma, cor, sabor, sendo divididos em: compostos fenólicos, terpenos, alcaloides e os óleos essenciais.

Registra-se que o óleo essencial é o líquido obtido de uma planta, através de destilação ou extração química por solventes. Apesar do nome, ele nem sempre é um líquido gorduroso ou oleoso. Óleos voláteis obtidos de diferentes órgãos de uma mesma planta podem apresentar composição química, caracteres físico-químicos e odores bem distintos. Compete lembrar que a composição química de um óleo volátil extraído de um mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal pode variar significativamente de acordo com a época, condições climáticas e solo.

2 PARTE EXPERIMENTAL

Os óleos essenciais foram extraídos de 7 plantas cultivadas no horto medicinal do Instituto Federal Sertão Pernambucano Campus Petrolina Zona Rural, as quais foram: alecrim de vaqueiro (*Lippia Aff. Gracillis* H.B.K), capim santo (*Cymbopogon citratus*), confrei (*Symphytum officinale*), erva cidreira (*Melissa officinalis*), falso boldo (*Plectranthus barbatus*), hortelã (*Mentha*) e manjeriço (*Ocimum basilicum*). A extração do óleo essencial foi realizada no laboratório de química por meio de hidrodestilação em aparelho de Clevenger, processo no qual coloca-se o material vegetal fracionado em balão de fundo redondo posto em manta aquecedora por faixa de 2 horas. Este aparelho proporciona o processo de condensação extraíndo o óleo essencial presente no material. Foram selecionados os compostos majoritários do óleo, com abundância superior a 5%, totalizando 17 metabólitos secundários que foram desenhadas no programa Marvin Sketch, e canonizadas no Standardizer para adicionar hidrogênios, converter em aromático,

limpar a estrutura em 3D e salvar no formato .sdf[JChem 14.9.1.0, 2014; ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>)] (IMRE, 2003). A estrutura inibidora da atividade da enzima 5- enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) em complexo com glifosato, agroquímico comercial (GPJ_702 [A].mvdml), foi obtida do banco de dados Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). As estruturas dos compostos foram submetidas à docking molecular, utilizando o programa Molegro Virtual Docker, v.6.0.1 (MVD) (THOMSEN e CHRISTENSEN, 2006). A estrutura da proteína e dos ligantes foram preparados utilizando a configuração padrão do programa (Score function: MolDock Score; Ligand evaluation: Internal ES, Internal HBond, Sp2-Sp2 Torsions, all checked; Number of runs: 10 runs; Algorithm: MolDock SE; MaximumInteractions: 1500; Max. population size: 50; Max. steps: 300; Neighbour distance factor: 1.00; Max. number of poses returned: 5). O grid foi definido manualmente, de modo a inserir o sítio ligante da estrutura, sendo posicionado em X:130.0, Y:70.0 e Z:0.0, com 15 Å de raio e 0.30 de resolução (figura 1).

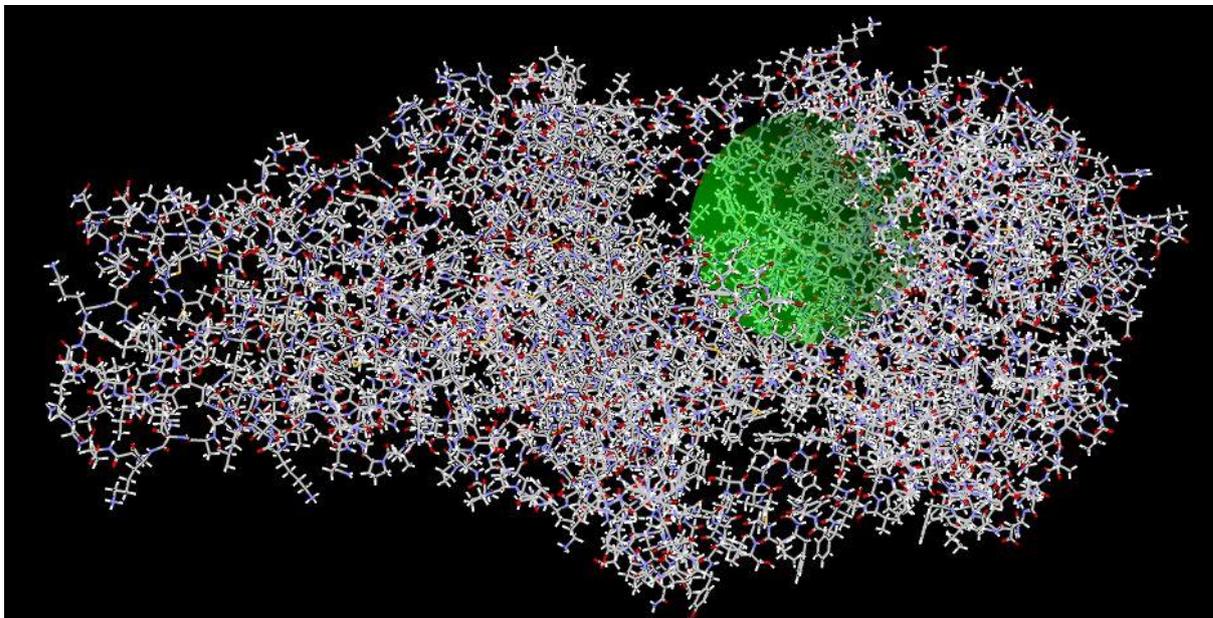


Figura 1. SITIO ATIVO

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 17 (dezessete) metabólitos avaliados, 3 (três) compostos expressaram energia de ligação inferior ao ligante glifosato, (GPJ_702 [A].mvdml), onde quanto menor a energia maior a afinidade do composto com os ligantes. Os

valores de energia dos compostos avaliados estão dispostos no material complementar (tabela complementar).

Uma análise da estrutura química dos compostos com melhor performance permite sugerir uma afinidade dos metabólitos secundários. Os três compostos com maior desempenho estão dispostos na tabela 1, com as respectivas energias de interação.

Tabela 1. Demonstra os três ligantes mais atuantes em relação ao glifosato.

LIGANTE	ENERGIA
1,3 – ÁCIDO BENZENODICARBOXÍLICO BIS(2ETILHEXIL) ÉSTER	-151,51
ÁCIDO HEXAEDÓICO, BIS (2- ETILHEXIL) ÉSTER	-140,50
1,2 - BENZENODICARBOXÍLICO, DIISOCÍLICO ÉSTER	-132,96
GLIFOSATO	-124,831

Houve interações semelhantes de resíduos de aminoácidos lisina (lys22) com (glifosato, 1,3 – ácido benzenodicarboxílico bis(2etilhexil) éster e o ácido hexaaidóico, bis (2- etilhexil) éster).

Glutamina (gln171) com (glifosato, ácido hexaaidóicobis (2- etilhexil) éster).

Não foi observado resíduos semelhantes ao glifosato na substância 1,2 - benzenodicarboxílico, diisocílico éster.

Na treonina (thr174) e arginina (arg27) a interação foi nas substâncias (1,3 – ácido benzenodicarboxílico bis(2etilhexil) éster e o 1,2 - benzenodicarboxílico, diisocílico éster.

Serina (ser170) (1,3 – ácido benzenodicarboxílico bis(2etilhexil) éster; ácido hexaaidóico bis (2- etilhexil) éster e a substância 1,2 - benzenodicarboxílico, diisocílico éster.

Lisina (lys22) ((glifosato, 1,3 – ácido benzenodicarboxílico bis(2etilhexil) éster e a ácido hexaaidóico, bis (2- etilhexil) éster).

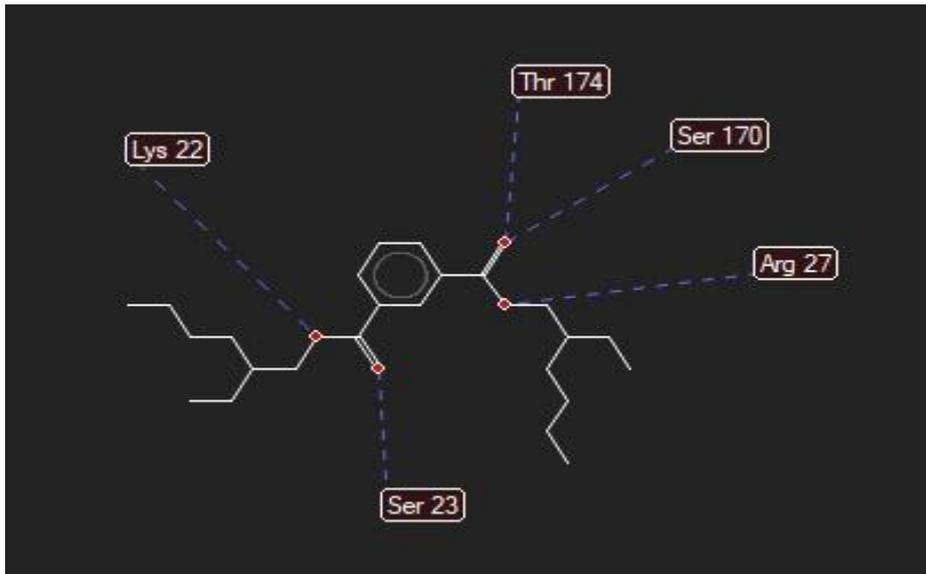


Figura 2. 1,3 – ÁCIDO BENZENODICARBOXÍLICO, BIS(2ETILHEXIL) ÉSTER

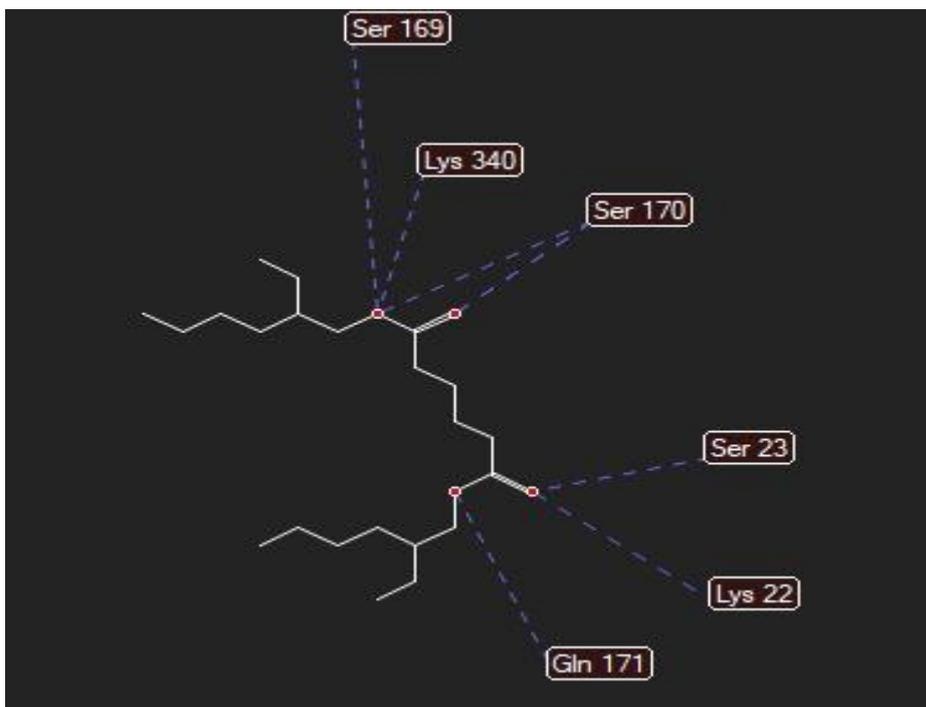


Figura 3. ÁCIDO HEXAEDÓICO, BIS (2- ETILHEXIL) ÉSTER

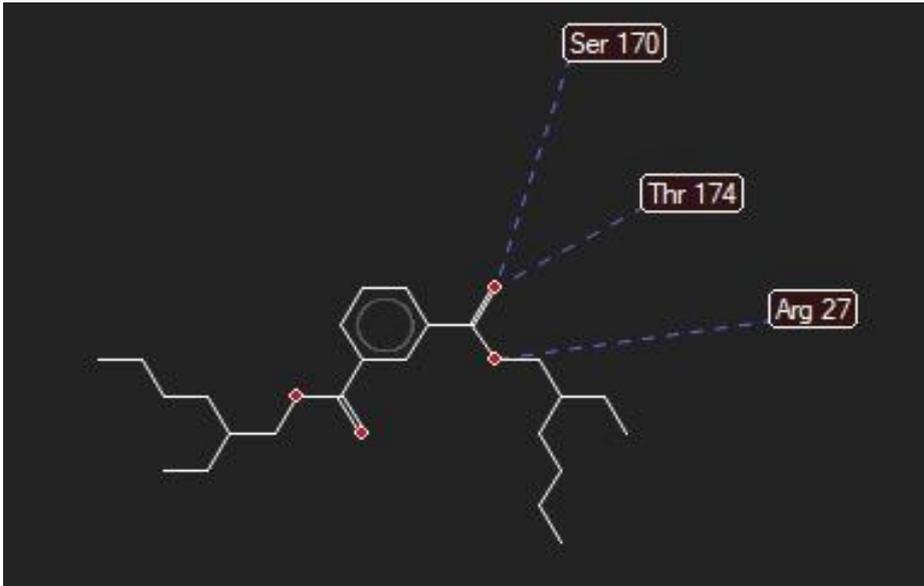


Figura 4. 1,2 - BENZENODICARBOXÍLICO, DIISOCÍLICO ÉSTER

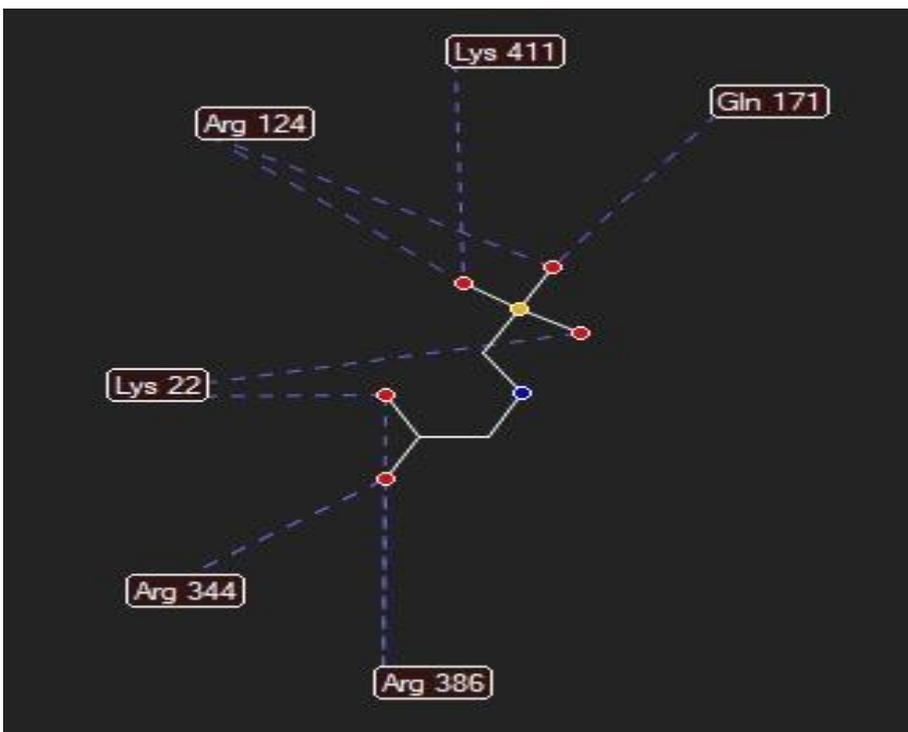


Figura 5. GLIFOSATO

4 CONCLUSÃO OU CONSIDERAÇÕES FINAIS

O experimento avaliou metabólitos secundários e seus respectivos potenciais como inibidores da enzima EPSPS para controle de plantas daninhas. Dentre os 17 (dezessete) compostos avaliados mais glifosato apenas 3 (três) tiveram o resultado com melhor performance quando equiparados ao glifosato que é um dos produtos

mais usados no Brasil e no mundo, onde os mesmos apresentam em sua composição o ligante éster e sendo encontrado no óleo essencial da planta alecrim de vaqueiro (*Lippia Aff. Gracillis H.B.K*), possibilitando um maior estudo com os metabólitos secundários desta espécie afim de confirmar a atividade observada in-silico.

REFERÊNCIAS

CARVALHO, L. B, “**PLANTAS DANINHAS**”, 2013, Disponível em: http://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/fitossanidade/leonardobiancodecarvalho/livro_plantasdaninhas.pdf, Acesso em: 19/07/2018.

GALLI, A. J. B; MONTEZUMA, M. C, “**GLIFOSATO: ALGUNS ASPECTOS DA UTILIZAÇÃO DO HERBICIDA GLIFOSATO NA AGRICULTURA**”, 2005, Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Plantas_daninhas_glifosatoID-VCQ0aRyNYE.pdf>, Acesso em: 17/07/2018.

KRUSE, N. D; TREZZI, M. M; VIDAL, R. A, “**HERBICIDAS INIBIDORES DA EPSPS: REVISÃO DE LITERATURA**”, 2000, Disponível em: <http://www.rbherbicidas.com.br/index.php/rbh/article/view/328>>, Acesso em: 22/07/2018.

MARCHI, G; MARCHI, E. C. S; GUIMARÃES, T. G, “**HERBICIDAS: MECANISMOS DE AÇÃO E USO**”, 2008, Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPAC-2010/30295/1/doc-227.pdf>>, Acesso em: 22/07/2018.

SIMÕES, C. M. O; SCHENKEL, E. P, “**A PESQUISA E A PRODUÇÃO BRASILEIRA DE MEDICAMENTOS A PARTIR DE PLANTAS MEDICINAIS: A NECESSÁRIA INTERAÇÃO DA INDÚSTRIA COM A ACADEMIA**”, 2002, Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v12n1/a05v12n1.pdf>>, Acesso em: 01/08/2018.

SOUZA FILHO, A. P. S; ALVES, S. M, “**ALELOPATIA: PRINCÍPIOS BÁSICOS E ASPECTOS GERAIS**”, Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2002, p. 260.

TAIZ, L; ZEIGER, E, “**PLANT PHYSIOLOGY**”, 4. Ed, Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 2006.

VICENTE, D, “**INFORMAÇÕES TÉCNICAS SOBRE O HERBICIDA GLIFOSATO**”, 2015, Disponível em: <
<http://sementesfiscalizadas.com.br/artigos/8/informac%20oes%20-tecnica%20s-%20sobre-o-herbicida-Glifosat%20o>>, Acesso em: 26/07/2018.

VIZZOTTO, M; KROLOW, A. C; WEBER, G. E. B, “**METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ENCONTRADOS EM PLANTAS E SUA IMPORTÂNCIA**”, 2010, Disponível em:
<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/886074/1/documento316.pdf>, Acesso em: 01/08/2018.