

SIMULAÇÃO DE CONJUGAÇÃO EM PLATAFORMA COMPUTACIONAL DO HERBICIDA BENTAZON E UMA GST DE ARROZ

Vinícius Costa Amador (1); Gérsia Gonçalves de Melo (2); Izabela Cristina Pereira Campos(3); Luana Camilla Cordeiro Braz (4); Rafael Maia Trindade(5)

¹ Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, CDSA, Sumé-PB – vinicius.costa.amador@gmail.com

² Universidade Federal Rural de Pernambuco- UFRPE, PPGAMGP, Recife-PE – gersia.fera@gmail.com

³ Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, CDSA, Sumé-PB – izapcampos@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, CDSA, Sumé-PB – luana.camilla.braz@gmail.com

⁵ Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, CDSA, Sumé-PB – rafael.trindade@ufcg.edu.com

INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa*) é uma cultura agrícola de grande interesse e importância mundial, tanto pelo seu peso na agroindústria quanto pelo seu valor nutricional. Não obstante sua notável importância, verifica-se certa escassez de estudos para desenvolver técnicas com potencial de minimizar problemas intrínsecos ao cultivo desta cerealífera, como a competição com plantas daninhas, por exemplo (COBUCCI, 2006).

Sabe-se que a superfamília de enzimas glutatona s-transferases (GSTs) confere em arroz (*Oryza sativa*) ação catalisadora, proteção a estresse biótico e abiótico, além de resistência a herbicidas (FROVA, 2003, 2006), tal que, sua principal reação consiste na conjugação do tripeptídeo glutatona a um composto hidrofóbico, tornando-o mais solúvel e menos tóxico (MARRS, 1996), mantendo assim a homeostase celular.

Ferramentas da bioinformática apresentam alternativas para predição de estruturas proteicas por meio de homologia entre a sequência alvo de interesse e sequências proteicas com estruturas terciárias conhecidas que servirão de modelos (*templates*) (de SOUZA M. L., 2008). Neste contexto, o *docking* molecular é uma técnica que complementa a modelagem molecular no que diz respeito ao entendimento funcional da molécula visa descrever a melhor posição de orientação da molécula ao seu ligante.

Pela necessidade de estudos que contribuam para a solução da problemática apresentada, justifica-se a realização do presente trabalho, que lançando mão das ferramentas da bioinformática, foi desenvolvido com o objetivo de construir, validar e analisar em plataforma computacional, um modelo teórico de uma proteína glutatona (OsGSTU4) de arroz (*Oriza sativa*) que confere tolerância a herbicidas à plantas.

METODOLOGIA

O modelo validado e refinado teve sua estrutura depositada no PMDB-- *Protein Model DataBase* (<https://bioinformatics.cineca.it/PMDB/>) e encontra-se disponível para acesso público através do código *PM0079277*.

A estrutura dos ligantes herbicidas (Quadro 2) foram obtidas na base de dados de pequenas moléculas *ZINC database* (<http://zinc.docking.org/>) em arquivos .mol2.

Os arquivos .mol2 foram convertidos para .pdbqt no Autodock 1.5.6 (<https://www.chpc.utah.edu/documentation/software/autodock.php>), tiveram os hidrogênios polares removidos e suas moléculas foram assinaladas com os parâmetros de carga Gasteiger (GASTEIGER; MARSILI, 1980). A estrutura da OSGSTU4 foi obtida a partir do arquivo .pdb do modelo teórico, o qual foi convertido para arquivo .pdbqt no Autodock e foi adicionado hidrogênios e parâmetros de carga Kollman (WEINER et al. 1984). A glutationa foi tratada como co-fator.

Os cálculos de *docking* rodaram no programa Autodock 1.5.6 (<https://www.chpc.utah.edu/documentation/software/autodock.php>) e as simulações foram realizadas através do algoritmo genético lamarckiano (LGA). Neste trabalho, o LGA foi usado em conjunto com o método de Goodford, permitindo, ao mesmo tempo, realizar a amostragem do espaço configuracional do ligante e efetuar o cálculo da energia de interação atômica do receptor e do ligante (GOODFORD, 1985). O uso de *grids* neste trabalho teve a finalidade de construir uma caixa de pontos reticulados regularmente espaçados, sendo centrado na região de interesse do receptor. Cada ponto expresso no *grid* corresponde a uma energia potencial representante de grupos funcionais presentes no receptor, como carbonos alifáticos, carbonos aromáticos, oxigênio e nitrogênio sendo doadores-aceptores de ligações de hidrogênio. Os parâmetros usados para simulações foram os seguintes: 10.000 réplicas, análises de energia a cada 1.500.000 e 27.000 gerações, tamanho populacional de 150 e taxas de mutação e crossing-over de 0,02 e 0,08 respectivamente. Foram geradas 10 conformações que foram ranqueadas com base na menor energia e analisadas no VMD (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>).

RESULTADOS

O resultado do *docking* realizado para o herbicida bentazon, igualmente executado no programa autodock, é apresentado na Tabela 7. Como o caso anterior, este procedimento tem como base os scores de energias intermoleculares, energia de ligação e ligações de hidrogênio,

evidenciando os átomos (e resíduos) da proteína e do ligante que apresentam interações favoráveis para o modelo, conforme descrevem Morris et al. (2009).

Os resultados da Tabela 1 revelam ainda a identificação de um resíduo que se repete (GLN 75) e apresenta a mais baixa Energia de Ligação, se mostrando possivelmente como resíduo âncora para o herbicida bentazon, corroborando com os resultados obtidos por Rigo (2011).

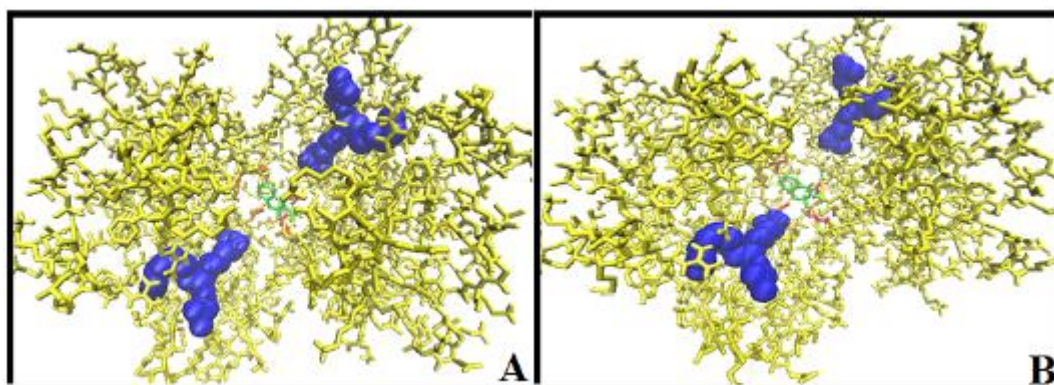
Tabela 1. Resultados dos complexos ranqueados pelo autodock no *docking* do bentazon

Complexo	Energia de ligação Kcal/mol	Energia intermolecular Kcal/mol	Ligações de hidrogênio
1	-0.86	-1.16	B: GLN 75 HE21 – O3
2	-0.85	-1.15	B: GLN 75 HE21 – O3
3	-0.84	-1.14	B: GLN 75 HE21 – O3
4	-0.83	-1.13	B: GLN 75 HE21 – O3
5	-0.91	-1.21	B: GLN 75 HE21 – O3 B: GLN 75 HE22 – O2
6	-0.86	-1.15	B: GLN 75 HE21 – O3
7	-0.91	-1.21	B: GLN 75 HE21 – O3 B: GLN 75 HE22 – O2
8	-0.81	-1.1	B: GLN 75 HE21 – O3
9	-0.83	-1.13	B: GLN 75 HE21 – O3
10	-0.91	-1.2	B: GLN 75 HE21 – O3 B: GLN 75 HE22 – O2

Fonte: Tabela produzida pelo desenvolvedor da pesquisa.

Com relação ao herbicida bentazon, o primeiro dos resultados ranqueados pelo autodock pode ser visualizado na Figura 1. Da mesma forma que no caso do metsulfuron, pode-se observar a seguinte sequência: em amarelo, sob representação gráfica de bastões, a estrutura da glutatona S transferase; em azul, sob representação gráfica VDW (Van Der Waals) as moléculas de glutatona; em vermelho, denotam-se os mais próximos átomos de resíduos de aminoácidos que circundam o ligante a uma distância de 4 Å, que por sua vez está representado em verde. Salienta-se que o padrão de 4 Å foi escolhido para avaliar resíduos que estavam a uma distância que possibilitem uma interação atômica (BUENO, M.A 2015, OLIVEIRA, B.G. 2012).

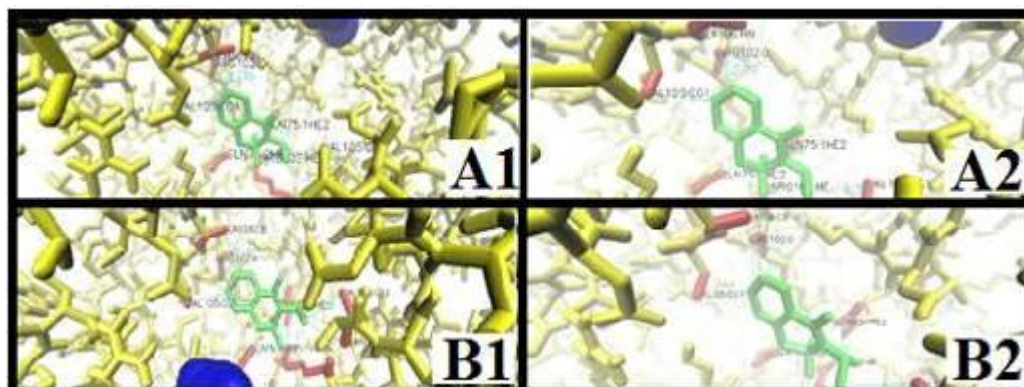
Figura 1. Visualização e caracterização dos resultados obtidos para o bentazon feitos por meio do programa autodock.



Fonte: Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa.

Foi feita, por meio de ferramentas do programa *Visual Molecular Dynamics*, a caracterização de átomos dos resíduos sob a referida distância de 4Å, que podem ser observados em detalhe nas Figuras 2, onde foi dividido cada resultado com sua respectiva letra, e números indicando cada uma das duas representações criadas para cada resultado.

Figura 2. Representação do sítio ativo, identificação dos resíduos e suas respectivas distâncias até o ligante, em duas perspectivas diferentes sobre o mesmo ponto (“a” e “b”).



Fonte: Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa.

Complementando as informações da Figura 2 (A1 e A2), a Tabela 2 apresenta os átomos de resíduos de aminoácidos circunvizinhos a distâncias menores de 4 Å e suas respectivas distâncias até átomos do ligante, onde podemos observar os átomos dos resíduos valina 105, e glicina 75, se ligando a átomos de oxigênio, à distância de dentro dos padrões pré-estabelecidos, reforçando a hipótese de houve ligações entre os complexos. (BUENO, M.A 2015, OLIVEIRA, B.G. 2012)

Tabela 2. Lista de átomos de resíduos próximos pertencentes ao bentazon, átomos usados como

correspondentes no ligante e suas respectivas distâncias em ângstroms no output número um.

Átomos de resíduos próximos	Átomo usado de referência (ligante)	Distâncias respectiva(Å)
Val105:CG'	<0>0:C8	3.38
ALA106:HN	<0>0:C7	3.25
ARG102:O	<0>0:C7	2.79
VAL105:CG'	<0>0:C1	3.58
ALA106:HN	<0>0:C1	3.45
ARG102:HE	<0>0:O2	3.71
GLN75:2HE2	<0>0:N2	2.11
GLN75:1HE2	<0>0:O3	1.78

Fonte: Tabela produzida pelo desenvolvedor da pesquisa.

O complemento para as informações Figura 2 (B1 e B2) é a Tabela 3, que trás listados os átomos de resíduos de aminoácidos circunvizinhos a distâncias menores de 4 Å e suas respectivas distâncias até átomos do ligante. Reforçando a hipótese do primeiro resultado ranqueado pelo programa.

Tabela 3. Lista de átomos de resíduos próximos pertencentes ao bentazon, átomos usados como correspondentes no ligante e suas respectivas distâncias em ângstroms, no output número dois.

Átomos de resíduos próximos	Átomo usado de referência (ligante)	Distâncias respectiva(Å)
ARG102:HE	<0>0:O3	3.27
GLN75:1HE2	<0>0:O3	1.80
ALA106:HN	<0>0:C1	3.47
VAL105:CG'	<0>0:C1	3.57
GLN75:2HE2	<0>0:O2	3.10
ARG102:O	<0>0:C8	3.02
VAL105:CG'	<0>0:C8	3.37
ALA106:CB	<0>0:C7	3.08

Fonte: Tabela produzida pelo desenvolvedor da pesquisa.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos para o modelo desenvolvido e estudado neste trabalho são consistentes e permitem confirmar a sua estabilidade físico-química estrutural, evidenciando a ligação do OsGSTU4 ao herbicida bentazon. O estudo apresenta importância biotecnológica para a agroindústria e indústria de defensivos agrícolas, visto que a compreensão funcional-estrutural da molécula estudada e concebida neste trabalho, pode auxiliar no possível desenvolvimento de defensivos com maior precisão, considerando que é uma cultura com desenvolvimento de poucas tecnologias voltadas para o seu cultivo e manutenção.

REFERÊNCIAS

- Bueno M.A, Oliveira B.G. A influência da ligação de hidrogênio em reações químicas: reação de Prileschajew. **Quim. Nova**, Vol. 38, No. 1, 1-7, 2015.
- COBUCCI, T. Cultivo de arroz de terras altas no estado de mato grosso. **Sistemas de Produção**, n.7, 2006, Embrapa Arroz e Feijão.
- FROVA, C. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. **Biomolecular Engineering**, Amsterdam, v. 23, n. 4, p. 149-169, 2006.
- FROVA, C. The plant glutathione gene family: genomic structure, functions, expression and evolution. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 119, n. 4, p. 469-479, 2003.
- GASTEIGER J, MASILI M. TETRAHEDRON. 1980; 36: 3219-3228. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0040402080801682> Acessado em 15/06/2015
Acessado em: 15/05/2015
- GOODFORD PJ. A Computational Procedure for Determining Energetically Favorable Binding Sites on Biologically Important Macromolecules. **Journal of Computational Chemistry** 1985;28:849--857.
- INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CINÉTICA, 16., 2008. São Paulo. Anais... Disponível em:<
<https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=128&numeroEdicao=16>> Acessado em 20/05/2015
- KILILI, K.; et al. Differential Roles of Tau Class Glutathione S-Transferases in Oxidative Stress. **The Journal of Biological Chemistry**, 2004.
- MARRS, K. A. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 127-158, 1996.
- MORRIS G. M., et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry** 19(14): p. 1639-1662. 1998.
- MORRIS GM, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **J Comput Chem** ;30(16):2785-2791. 2009.



OLIVEIRA B.G., ARAÚJOR.C.M.U. SAPT: Ligação de hidrogênio ou interação de van der Waals?. **Quim. Nova**, Vol. 35, n. 10, 2002-2012, 2012

RIGO, MAURÍCIO MENEGATTI. Estudo in silico da reatividade cruzada entre epitopos de hantavírus. Tese (Mestrado) -Instituto de Biociências da UFRS. Rio Grande do Sul. 2011. 91p.

SOUZA, M. L. de; JORGE D.M., Giuliatti S., Modelagem in silico da proteína Melittin II de Apis melífera In Silico Modeling of Protein Melittin II of Apis melífera. In: SIMPOSIO

WEINER SJ, et al. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. **J Am Chem Soc**. 1984; 106: 765-784.