



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR - PBC

AMANDA CASTRO COMAR

**PROSPECÇÃO DE INIBIDORES DA ENZIMA
FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASE (PEPC) POR
TÉCNICAS *IN SILICO* E *IN VIVO***

MARINGÁ
Janeiro - 2023

AMANDA CASTRO COMAR

**PROSPECÇÃO DE INIBIDORES DA ENZIMA
FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASE (PEPC) POR
TÉCNICAS *IN SILICO* E *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Alves Bueno

MARINGÁ

Janeiro - 2023

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

C728p

Comar, Amanda Castro

Prospecção de inibidores da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) por técnicas *in silico* e *in vivo* / Amanda Castro Comar. -- Maringá, PR, 2023.
41 f.: il. color., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos.

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Alves Bueno.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2023.

1. Herbicidas. 2. Fosfoenolpiruvato carboxilase (Enzima). 3. Inibidores enzimáticos . 4. Dinâmica molecular. 5. *Zea mays*. I. Santos, Wanderley Dantas dos, orient. II. Bueno, Paulo Sérgio Alves, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). IV. Título.

CDD 23.ed. 572

AMANDA CASTRO COMAR

PROSPECÇÃO DE INIBIDORES DA ENZIMA
FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASE (PEPC) POR
TÉCNICAS *IN SILICO* E *IN VIVO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 20/01/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos

Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Josielle Abrahão de Souza

Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Ferro

Universidade Estadual de Maringá

SUMÁRIO

BIOGRAFIA	vi
AGRADECIMENTOS	vii
APRESENTAÇÃO	viii
RESUMO GERAL	9
GENERAL ABSTRACT	11
Resumo	13
Abstract.....	13
Introdução.....	14
Materiais e métodos	17
<i>Modelagem molecular por homologia da enzima PEPC</i>	17
<i>Varredura virtual pelo método de docking molecular</i>	17
<i>Dinâmica molecular</i>	18
<i>Germinação, cultivo e tratamento das plantas em substrato</i>	19
<i>Germinação, cultivo e tratamento das plantas em hidroponia</i>	20
<i>Atividade enzimática</i>	21
<i>Análise combinada dos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência de clorofila</i>	21
<i>Quantificação de clorofila</i>	22
<i>Análise estatística</i>	22
Resultado e discussão	23
<i>Modelagem molecular e validação da estrutura da PEPC</i>	23
<i>Varredura virtual</i>	24
<i>Dinâmica molecular</i>	27
<i>Efeitos de diferentes concentrações de BTC sobre a atividade in vitro da PEPC em folhas de Zea Mays</i>	30
<i>Impactos de diferentes concentrações de BTC sobre o desenvolvimento de plantas de milho cultivadas em substrato e, efeitos do BTC sobre as trocas gasosas, fluorescência de clorofila e índice SPAD</i>	31
<i>Impactos de diferentes concentrações de BTC sobre o desenvolvimento de plantas de milho cultivadas em hidroponia</i>	35

Conclusão	36
Agradecimentos	36
Referências	37
Anexos	40

BIOGRAFIA

Amanda Castro Comar nasceu em Cianorte/PR, em 12 de novembro de 2001. Iniciou a graduação no ano de 2019 no curso Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Cesumar (Unicesumar), concluindo em 2021. No ano de 2022, ingressou no mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Realizou sua pesquisa sob orientação do Professor Dr. Wanderley Dantas dos Santos, sob coorientação do professor Dr. Paulo Sérgio Alves Bueno, no laboratório de Bioquímica de Plantas (Bioplan), na cidade de Maringá.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus, que durante este período me concedeu inúmeras bênçãos, me fortaleceu e, me deu forças para superar os obstáculos impostos nesta trajetória. Obrigada pelo cuidado e proteção a mim concedido, Senhor!

Aos meu pais, Adauto e Vania e ao meu irmão, Daniel, por me apoiarem e não medirem esforços para que este trabalho fosse concluído. Obrigada pelo amor, dedicação, carinho, conselhos, e por todo apoio emocional. Ao meu namorado, Celso, por me apoiar, me compreender, me ouvir, me aconselhar e me incentivar, obrigada por estar sempre ao meu lado.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade e suporte prestado.

Ao meu orientador, Dr. Wanderley Dantas dos Santos, por aceitar me orientar, transmitir diversos ensinamentos e por toda paciência, apoio e incentivo durante a pesquisa.

Ao meu coorientador, Dr. Paulo Sérgio Alves Bueno, pela disponibilidade, paciência, apoio e por todos os ensinamentos prestados. Eu o agradeço muito!

Aos meus colegas de laboratório, em especial, Ana Paula, Luiz, Isabela e Erika, pela ajuda e pela parceria durante os experimentos!

Ao Professor Rogério Marchiosi, pelo conhecimento compartilhado, todo apoio e compreensão.

À CAPES pelo financiamento dessa pesquisa.

APRESENTAÇÃO

Em concordância com as normas fixadas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, a dissertação foi redigida na forma de um artigo a ser submetido à revista *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* e inicia com uma revisão sobre os herbicidas atuais e segue com a caracterização da enzima alvo do trabalho, a Fosfoenolpiruvato Carboxilase, juntamente com a justificativa de sua utilização em cada etapa computacional, até a identificação de um possível candidato a herbicida.

RESUMO GERAL

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

Introdução - As ervas daninhas vêm alcançando grande sucesso dispersivo e trazem consigo um grande impacto na agricultura reduzindo a produtividade agrícola. Nos dias atuais, o seu controle é obtido, predominantemente, com o uso de herbicidas, porém a maior parte dos compostos herbicidas disponíveis no mercado apresentam falhas no controle de alguns genótipos resistentes. A utilização de ferramentas de bioinformática auxilia a prospecção de novas moléculas que podem atuar como princípio herbicida e, a subsequente investigação da sua efetividade sobre o alvo de ação desejado. A inibição da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) pode gerar um distúrbio no metabolismo da planta C4 já que essa enzima é responsável por realizar a assimilação primária do CO₂.

Objetivos - Determinar a estrutura tridimensional da PEPC de *Zea mays* (ZmPEPC), prospectar inibidores competitivos com potencial herbicida para a enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), testar o melhor candidato em plantas de milho e realizar estudos de trocas gasosas e fluorescência da clorofila.

Materiais e métodos - Foi realizada a modelagem molecular por homologia da enzima PEPC de *Zea Mays*, utilizando o servidor Uniprot para a aquisição da sequência de resíduos de aminoácidos alvo, o servidor Protein Data Bank (PDB) para a obtenção de moldes 3D, e o servidor Modeller para o alinhamento da sequência de aminoácidos alvo e da sequência de aminoácidos dos moldes de PEPC, além de, em seguida, realizar a construção dos modelos tridimensional. Após a estrutura construída realizou-se o *redocking* utilizando três programas, sendo eles, Autodock Vina, Autodock 4 e molegro. Para a varredura virtual foram utilizadas três bibliotecas: biblioteca de similares, catalogo de moléculas comercializáveis da empresa Acros e da empresa Sigma. As moléculas foram selecionadas por meio de docking molecular, utilizando o protocolo de redocking validado. Para a avaliação do complexo proteína ligante, foi realizado simulações de dinâmica molecular, durante 32 nanosegundos (ns). Foi feito análise indireta da atividade enzimática da enzima PEPC, na presença ou ausência do composto selecionado, por espectrofotometria, utilizando extrato bruto de folha de milho.

33 Os efeitos do composto também foram avaliados *in vivo* por meio de análises de
34 trocas gasosas, fluorescência e parâmetros biométricos.

35 **Resultado e discussão** - A estrutura tridimensional da enzima ZmPEPC foi
36 obtida através dos moldes 1JQO e 1JQN, sendo estes moldes de milho e de E.
37 coli, respectivamente. No sitio ativo, foi modelado o ligante 3,3 *dichloro-2-*
38 *phosphonomethyl-acrylic acid* (DCO), além do cofator Mg²⁺. O modelo foi
39 validado utilizando a extensão DOPE Score e pelo gráfico de Ramachandran. A
40 viabilidade da utilização da PEPC modelada em estudos de triagem virtual, e a
41 validação do protocolo de *docking* foi realizada pelo método de *redocking*, com
42 algoritmo de busca e ranqueamento padrão, grid de 0.375 Å, com centro de
43 busca nos eixos x, y e z de 16, -85, -7 para os programas Autodock Vina e
44 Autodock 4, e tamanho da caixa em cada eixo de 15 e 30, respectivamente. Para
45 o Molegro, o protocolo validado foi função de pontuação MolDock Score,
46 algoritmo de busca MolDock (Simplex Evolution) SE, com raio de 15 Å,
47 centralizado no ligante DCO. Nove moléculas foram selecionadas e três delas
48 submetidas a simulações de dinâmica molecular e a testes *in vivo* pelo grupo de
49 pesquisa do BioPlan. A molécula testada neste trabalho, ácido 1,2,4,5-
50 Benzenotetracarboxílico (BTC), causou redução no consumo de NADH quando
51 a atividade da enzima foi avaliada *in vitro*, demonstrando um potencial inibitório
52 sobre a enzima PEPC. Nos testes *in vivo* não foi possível detectar alterações
53 nos parâmetros analisados, sendo necessário investigar se a molécula
54 conseguiu atravessar as barreiras e entrar em contato com o alvo enzimático.

55 **Conclusão** - A modelagem da enzima ZmPEPC foi eficiente para seleção de
56 inibidores putativos, com base nos resultados obtidos por simulações de
57 dinâmica molecular e nos ensaios *in vitro*. Os estudos *in vivo* não foram
58 conclusivos até o momento.

59 **Palavras-chaves:** Herbicida, inibição, dinâmica molecular, fosfoenolpiruvato
60 carboxilase, *Zea mays*

61

62

63

GENERAL ABSTRACT

64

65

66 **Introduction** – Weeds have achieved great dispersal success and bring with
67 them a great impact on agriculture, reducing agricultural productivity. Nowadays,
68 its control is predominantly achieved with the use of herbicides, but most of the
69 herbicide compounds available on the market fail to control some resistant
70 genotypes. The use of bioinformatics tools helps prospecting for new molecules
71 that can act as a herbicide principle and the subsequent investigation of its
72 effectiveness on the desired target of action. The inhibition of the enzyme
73 phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) can generate a disturbance in the
74 metabolism of the C4 plant, since this enzyme is responsible for carrying out the
75 primary assimilation of CO₂.

76 **Objectives** - Determine the three-dimensional structure of PEPC from Zea mays
77 (ZmPEPC), prospect competitive inhibitors with herbicidal potential for the
78 enzyme phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC), test the best candidate in
79 maize plants and carry out studies of gas exchange and chlorophyll fluorescence.

80 **Materials and methods** – Molecular homology modeling of the PEPC enzyme
81 from Zea Mays was carried out, using the Uniprot server to acquire the target
82 amino acid residue sequence, the Protein Data Bank (PDB) server to obtain 3D
83 templates, and the Modeller server for aligning the target amino acid sequence
84 and the amino acid sequence of the PEPC templates, in addition to then building
85 the three-dimensional models. After the structure was built, redocking was
86 performed using three programs, namely, Autodock Vina, Autodock 4 and
87 Molegro. The virtual scan was carried out in three libraries, namely, the similar
88 library, the catalog of marketable molecules by the company Acros and the
89 company Sigma. Molecules were selected by means of molecular docking, using
90 the validated redocking protocol. To evaluate the protein-binding complex,
91 molecular dynamics simulations were performed for 32 ns. An indirect analysis
92 of the enzymatic activity of the PEPC enzyme was carried out, with and without
93 the selected compound, by spectrophotometry, using crude corn leaf extract. The
94 effects of the compound were also evaluated in vivo through analysis of gas
95 exchange, fluorescence and biometric parameters.

96 **Result and discussion** - The three-dimensional structure of the ZmPEPC
97 enzyme was obtained using the 1JQO and 1JQN templates, these being corn
98 and *E. coli* templates, respectively. In the active site, the ligand 3,3 dichloro-2-
99 phosphonomethyl-acrylic acid (DCO) was modeled, in addition to the cofactor
100 Mg²⁺. The model was validated using the DOPE Score extension and the
101 Ramachandran graph. The feasibility of using PEPC in virtual screening studies,
102 and the validation of the docking protocol was performed using the redocking
103 method, with standard search and ranking algorithm, grid of 0.375 Å, with search
104 center on the x, y and z axes of 16, -85, -7 for Autodock Vina and Autodock 4
105 programs, and box size on each axis of 15 and 30 respectively. For Molegro, the
106 validated protocol was the MolDock Score function, MolDock (Simplex Evolution)
107 SE search algorithm, with a radius of 15 Å, centered on the DCO ligand. Nine
108 molecules were selected and three of them were submitted to molecular
109 dynamics simulations and in vivo tests by the BioPlan research group. The
110 molecule tested in this work, 1,2,4,5-Benzenetetracarboxylic acid (BTC), caused
111 a reduction in NADH consumption when the enzyme activity was evaluated in
112 vitro, demonstrating an inhibitory potential on the PEPC enzyme. In the in vivo
113 tests, it was not possible to detect alterations in the analyzed parameters, being
114 necessary to investigate if the molecule managed to cross the barriers and come
115 into contact with the enzymatic target.

116 **Conclusion** – The modeling of the ZmPEPC enzyme was efficient for the
117 selection of putative inhibitors, based on the results obtained by molecular
118 dynamics simulations and in vitro assays. In vivo studies have not been
119 conclusive until now.

120 **Keywords:** Herbicide, inhibition, molecular dynamics, phosphoenolpyruvate
121 carboxylase, *Zea mays*

1 **Resumo**

2

3 A proliferação de ervas daninhas nas culturas agrícolas, ameaça a produção de
4 grãos, ao competir por nutrientes, espaço e luminosidade. O controle das plantas
5 indesejadas é realizado por meio de herbicidas, os quais apresentam natural
6 redução na eficácia por exercerem pressão de seleção sobre genótipos
7 resistentes. Com o intuito de desenvolver um herbicida com novo mecanismo de
8 ação, neste trabalho investigamos inibidores da enzima fosfoenolpiruvato
9 carboxilase (PEPC). Para isso, a enzima PEPC de milho (*ZmPEPC*) foi
10 modelada, e estudos de docking molecular foram realizados para selecionar
11 compostos com potencial inibitório. O complexo proteína ligante foi simulado por
12 dinâmica molecular (DM). A modelagem da *ZmPEPC* foi validada e utilizada para
13 a varredura virtual. Nove compostos foram selecionados, sendo três destes
14 simulados por DM. O composto 1,2,4,5- ácido benzenotetracarboxílico (BTC)
15 teve seu potencial inibitório avaliado *in vitro* de forma indireta pelo consumo de
16 NADH, apresentando 66% de redução no consumo desta molécula o que pode
17 indicar inibição na enzima alvo. Seus efeitos também foram avaliados *in vivo*,
18 porém os tratamentos não apresentaram resultados significativos até o
19 momento.

20 **Palavras-chaves:** Herbicida, inibição, dinâmica molecular, fosfoenolpiruvato
21 carboxilase, *Zea mays*

22

23 **Abstract**

24 The proliferation of weeds in agricultural crops threatens grain production by
25 competing for nutrients, space, and light. The control of unwanted plants is
26 conducted by means of herbicides, which have a natural reduction in
27 effectiveness due to exerting selection pressure on resistant genotypes. In order
28 to develop a new herbicide with a new mechanism of action, in this work we
29 investigated inhibitors of the enzyme phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC).
30 For this, the enzyme PEPC from maize (*ZmPEPC*) was modeled, and molecular
31 docking studies were performed to select compounds with inhibitory potential.
32 The protein-binding complex was simulated by molecular dynamics (DM). The

33 *ZmPEPC* modeling was validated and used for the virtual scan. Nine compounds
34 were selected, three of which were simulated by DM. The 1,2,4,5-
35 benzenetetracarboxylic-acid (BTC) compound had its inhibitory potential
36 evaluated in vitro indirectly by the consumption of NADH, showing a 66%
37 reduction in the consumption of this molecule, which may indicate inhibition of the
38 target enzyme. Its effects were also evaluated in vivo, but the treatments did not
39 show significant results until now.

40 **Keywords:** Herbicide, inhibition, molecular dynamics, phosphoenolpyruvate
41 carboxylase, *Zea mays*

42

43 **Introdução**

44 O contínuo aumento da população humana demanda uma maior
45 produção de alimentos. Para isso, é preciso manter e, preferencialmente, elevar
46 a qualidade e a sustentabilidade dos sistemas produtivos, o que vem sendo o
47 grande desafio do setor agrônômico (Garnett et al., 2013).

48 As ervas daninhas reduzem a produtividade agrícola causando enormes
49 perdas (Verma et al., 2015). Desde a revolução verde, o controle de centenas de
50 espécies de ervas daninhas tem sido obtido por meio da aplicação de herbicidas.
51 No entanto, o uso desses agroquímicos ao longo do tempo impôs uma forte
52 pressão de seleção, o que desencadeou a evolução da resistência à herbicidas
53 (Thompson et al., 2022). As mutações em genes que codificam enzimas-alvo de
54 herbicidas que alteram a ligação destes compostos, são os principais motivos de
55 desenvolvimento de resistência (Gaines et al., 2020) que ocorre em resposta ao
56 estresse induzido pela exposição subletal a herbicidas (Dyer, 2018).

57 Os herbicidas são eficientes no controle de plantas daninhas pelo fato de
58 prejudicarem a fisiologia das plantas invasoras. A eficácia de um herbicida está
59 relacionada sua capacidade de: 1) entrar em contato com a planta daninha; 2)
60 ser absorvido; 3) ser translocado para o local de ação, e 4) acumular em níveis
61 suficientes no local de ação para suprimir sua atividade e prejudicar a planta alvo
62 (Roman, 2007). O passo bioquímico ou biofísico a ser inibido, no interior da
63 célula, pela atividade herbicida, é conhecido como mecanismo de ação, emitindo
64 um efeito inicial sobre o metabolismo da planta, podendo ou não desencadear a

65 morte do vegetal. Porém, várias outras reações químicas são necessárias para
66 se matar uma planta, cujo somatório é conhecido como modo de ação, ou seja,
67 o modo de ação consiste no efeito final expresso na planta após a aplicação de
68 um herbicida (Marchi et al., 2008). Por sua vez, o sítio de ação, consiste no local
69 específico em que ocorrerá a inibição, geralmente uma enzima ou um receptor
70 hormonal (De Oliveira Jr. et al., 2011).

71 A classificação dos herbicidas se baseia na seletividade, tempo de
72 aplicação, translocação na planta, e persistência ou sítio de ação (Gunsolus et al.,
73 2002). Os herbicidas comerciais atuais podem afetar o funcionamento do
74 fotossistema II, o metabolismo celular ou o crescimento/divisão celular, de acordo
75 com o *Herbicide Resistance Action Committee* (HRAC). Estes herbicidas atuais,
76 compreendem aproximadamente 26 mecanismos de ação, dentre os quais se
77 destacam os inibidores: da biossíntese de aminoácidos e lipídios, da síntese de
78 clorofila e carotenoides, dos fotossistemas I e II, do arranjo dos microtúbulos, da
79 síntese de celulose, do transporte de auxinas e os mimetizadores de auxinas
80 (Gaines et al, 2020).

81 Com o avanço da bioinformática, é possível utilizar suas ferramentas
82 como auxílio para a prospecção de novas moléculas, de forma *in silico*, que
83 posteriormente, ao serem testadas *in vitro* e/ou *in vivo*, possam apresentar
84 potencial herbicida. Os estudos *in silico* permitem investigar mecanismos das
85 interações proteína-proteína e proteína-ligante além de permitirem simulações
86 que se aproximem da realidade da proteína na planta, servindo como ferramenta
87 de apoio para a investigação teórica da capacidade de inibição que enzimas alvo
88 possam apresentar. Além disso, favorece o estudo para as descobertas de novos
89 mecanismos de ação herbicida, e verificar possíveis mutações alvo (Verli, 2014).

90 Neste aspecto, surge a possibilidade de se estudar os efeitos gerados por
91 um inibidor em uma enzima presente na via fotossintética como um novo
92 mecanismo de ação. Como um herbicida atua sobre ervas daninhas e a maioria
93 destas apresentarem metabolismo C4 (Nguyen et al., 2016 e Doyle et al., 2005).
94 A fotossíntese C4 consiste em um mecanismo de concentração de CO₂ que
95 aumenta a produtividade em condições tropicais (Moody et al., 2020). A enzima
96 fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC; EC 4.1.1.31) que atua como enzima chave

97 deste metabolismo, e ao ser inibida pode gerar um desequilíbrio metabólico que
98 seja favorável para combate dessas plantas.

99 A PEPC presente em folhas com mecanismo fotossintético C₄, consiste
100 em um homotetrâmero com subunidades de 110 kDa (Kanai; e Edwards, 1999).
101 A enzima é composta por quatro subunidades idênticas e tem um tamanho total
102 de aproximadamente 130 x 120 x 70 Å. As características estruturais
103 secundárias da enzima PEPC, consiste em 65% de α-hélices e 5% de folha β.
104 As estruturas secundárias da enzima PEPC de milho são essencialmente as
105 mesmas que as de PEPC de *E. coli* (Kai et al., 2003).

106 A PEPC está presente em organismos fotossintéticos, tais como plantas,
107 algas, cianobactérias, bactérias fotossintéticas e também na maioria das
108 bactérias não fotossintéticas e protozoários. A enzima PEPC está ausente em
109 animais, fungos e leveduras (Izui et al., 2003).

110 A reação que a enzima PEPC catalisa é altamente exergônica e
111 estritamente irreversível. O mecanismo de reação da PEPC, ocorre nas células
112 do mesófilo da folha, e pode ser descrito em três etapas: inicialmente o ânion
113 enolato de piruvato e carboxifosfato é formado a partir de fosfoenolpiruvato e
114 bicarbonato, por reação parcial reversível. O ânion enolato isomeriza e o
115 carboxifosfato cliva-se em CO₂ e fosfato inorgânico dentro do sítio catalítico. O
116 CO₂ faz um ataque eletrofílico ao ânion enolato para formar oxaloacetato e
117 liberar fosfato inorgânico de forma irreversível. Essa atividade pode ser medida
118 através do acoplamento da enzima malato desidrogenase (MDH) (Izui et al.,
119 2003). A MDH é a enzima de atuação posterior a PEPC, e atua convertendo
120 oxaloacetato em malato, e para isso consome NADH. O malato formado, é então
121 enviado para as células da bainha vascular onde produzem o CO₂ que é liberado
122 em açúcares pelo ciclo de Calvin no cloroplasto dessas células (Barreda-Huerta
123 et al., 2021).

124 Sendo assim, surge a possibilidade de se estudar um possível inibidor da
125 PEPC e seus efeitos sobre plantas de metabolismo C₄, de forma a trabalhar com
126 um novo mecanismo herbicida de ação.

127

128 **Materiais e métodos**

129

130 ***Modelagem molecular por homologia da enzima PEPC***

131 A estrutura da enzima PEPC de *Zea mays* foi obtida pela técnica de
132 modelagem molecular por homologia pelo programa Modeller v10.2 (Webb et al.,
133 2014). A sequência de aminoácidos foi adquirida no banco de dados Uniprot
134 (Magrane, 2011), a qual foi submetida ao servidor BlastP (Mount,2007) para a
135 busca de moldes estruturais disponíveis no servidor Protein Data Bank- PDB
136 (Berman et al, 2000). A qualidade, dos modelos gerados foram avaliados pela
137 função *Discrete Optimized Protein Energy* (DOPE) *score* e pela análise do
138 gráfico de Ramachandran. Para a modelagem, utilizou-se dois moldes
139 disponíveis no banco de dados PDB, visto que o molde contendo a sequência
140 de aminoácidos da enzima PEPC de milho não apresentava em sua estrutura o
141 cofator da enzima (Mg^{2+}), e um ligante de referência. O ligante de referência,
142 trata-se de uma molécula já testada anteriormente e que tenha apresentado
143 resultados positivos como inibidor da enzima. O segundo molde utilizado,
144 continha a sequência de aminoácidos da enzima PEPC de *E. coli*, e a presença
145 do cofator e de um ligante de referência, neste caso, o *3,3 dichloro-2-*
146 *phosphonomethyl-acrylic acid* (DCO). O DCO foi testado por Jenkins (1989), e
147 apresentou altas taxas de inibição para a enzima PEPC.

148

149 ***Varredura virtual pelo método de docking molecular***

150 Para validar protocolos de docking molecular foi realizado o método de
151 *redocking* do inibidor *3,3 dichloro-2-phosphonomethyl-acrylic acid* (DCO) na
152 enzima PEPC em três programas: AutoDock Vina (Trott et al., 2010) e Autodock
153 4 implementados na interface Pyrx-0.9 (Dallakyan et al., 2015), e o Molegro
154 Virtual Docker v6.0 (MVD) (Thomsen et al., 2006).

155 Para a varredura virtual foram construídas três bibliotecas de moléculas a
156 partir da base de dados ZINC Database (Sterling et al., 2015). A primeira
157 biblioteca continha as moléculas com similaridade de 40% aos inibidores

158 conhecidos da enzima PEPC do banco de dados *Brenda Enzymes* (Chang et al.,
159 2021). A segunda e a terceira bibliotecas foram compostas por moléculas
160 pequenas comercializáveis, disponíveis no catálogo das empresas Sigma-
161 Aldrich e Acros, respectivamente. Após a construção das bibliotecas, estas
162 foram filtradas pelos critérios ADMETOX (absorção, distribuição, metabolismo,
163 excreção e toxicidade) pelo programa *DataWarrior* (Sander et al., 2015) e pelas
164 Regras de Lipinsk (Lipinsk, 2016).

165 Na varredura virtual as três bibliotecas foram avaliadas pelos programas
166 de docking molecular validados por *redocking*. Para a seleção de moléculas
167 candidatas, foram utilizados os *scores* obtidos em cada programa para o inibidor
168 DCO. Ou seja, as moléculas que possuírem *scores* melhores que o DCO foram
169 selecionadas para a próxima etapa. Além disso, foram realizadas quatro
170 repetições das varreduras virtuais para eliminar resultados falsos-positivos e
171 chegar às moléculas candidatas.

172

173 ***Dinâmica Molecular***

174 As simulações de minimização de energia foram realizadas através do
175 pacote NAMD2/VMD (Phillips et al., 2005/ Humphrey, 1996). O processo de
176 dinâmica molecular (DM), ocorreu em cinco etapas e em condições constantes:
177 temperatura (300K), pressão (1atm) e número de átomos (*NPT ensemble*). A
178 estrutura obtida na modelagem anteriormente, foi solvatada com água TIP3P em
179 uma caixa periódica com limites de 10 Å de distância a partir da superfície mais
180 externa da proteína. Foram adicionados contra íons Na⁺ em concentração
181 suficiente para neutralização das cargas do sistema. O campo de força adotado
182 para os átomos da proteína foi o CHARMM c35b2-c36a2 (Mackerell et al., 2004).
183 Para o ligante o campo de força foi gerado no mesmo formato pelo servidor
184 Swissparam (Zoete et al., 2011). Na primeira etapa, os átomos do ligante e
185 cofator foram fixados no espaço, enquanto os da proteína e demais átomos do
186 sistema foram mantidos livres para se movimentar, por 40.000 passos de
187 minimização pelo método de Gradiente Conjugado (CG). Na segunda etapa,
188 todos os átomos do sistema foram minimizados por 25.000 passos de CG.

189 Na terceira etapa, os átomos da proteína e ligantes foram mantidos fixos
190 enquanto as águas, e sais foram submetidos a 40 ps de DM de equilíbrio. Na
191 quarta etapa, todos os átomos foram submetidos a um novo ciclo de minimização
192 por 25.000 passos. Na quinta e última etapa, todo o sistema foi submetido a 35
193 ns de DM de equilíbrio. As simulações foram realizadas no supercomputador
194 Lovelace do Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho
195 (CENAPAD), Campinas, Brasil.

196 Em seguida, a simulação foi analisada em termos do Desvio Quadrático
197 Médio dos átomos (RMSD- *Root mean square deviation of atomic position*), Raio
198 de Giro e Flutuação Quadrática Média dos resíduos de aminoácidos (RMSF-
199 *Root mean square fluctuation*). Foi avaliada também a frequência de interação
200 do ligante com cada resíduo da proteína com o intuito de identificar os mais
201 importantes no ancoramento do ligante, para propor um mecanismo de
202 interação.

203

204 ***Germinação, cultivo e tratamento das plantas em substrato***

205 Sementes de milho (*Zea mays* L. cv. VT PRO 2) foram sanitizadas com
206 hipoclorito de sódio 2% por 5 min, lavadas extensivamente com água deionizada
207 e semeadas diretamente em vaso de plástico preto (5,0 × 5,8 × 4,2 cm)
208 preenchido com 100 g de substrato de pinus e vermiculita na razão 1:1. Cada
209 vaso recebeu três semente, a qual foi semeada 2,5 cm abaixo da superfície. Os
210 vasos foram umedecidos até a capacidade de campo pela adição de 130 mL de
211 água e, em seguida, foram acondicionados em sala de cultivo de plantas com
212 temperatura de 30°C, fotoperíodo 12/12 h e DFF de 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, onde
213 permaneceram por 21 dias. Até a emergência das primeiras folhas, os vasos
214 foram regados, a cada 48 h, com 50 mL de água. Após a emergência das
215 primeiras folhas, os vasos foram regados, a cada 48 h, com 50 mL de solução
216 nutritiva de Hoagland (pH 6,0) (Hoagland & Arnon, 1938). Foram cultivados 30
217 vasos, cada um com a presença de duas plantas. Os testes foram realizados
218 utilizando um número de 5 vasos para cada aplicação, sendo 5 para o controle
219 e 25 para aplicação, visto que foram feitas aspersões foliares nas doses de

220 0,125 mM, 0,250 mM, 0,500 mM, 0,750 mM e 1 mM com o composto ácido
221 1,2,4,5-benzenotetracarboxílico (BTC). A primeira aspersão foliar foi feita no
222 décimo terceiro dia de cultivo e a segunda no décimo sétimo dia de cultivo.

223 Após o cultivo, foi determinado o comprimento, massa fresca e massa
224 seca da raiz principal, comprimento, massa fresca e massa seca da parte aérea
225 da planta. Os dados foram expressos em centímetros (cm) para comprimento de
226 raiz, e parte aérea. Os resultados de massa fresca e massa seca foram
227 expressos em gramas (g). Cada análise foi realizada com o número total de 5
228 plantas por tratamento.

229

230 ***Germinação, cultivo e tratamento das plantas em hidroponia***

231 Sementes de milho (*Zea mays* L. cv. VT PRO 2) foram sanitizadas com
232 hipoclorito de sódio 2% por 5 min, lavadas extensivamente com água deionizada
233 e germinadas no escuro dentro de tubos de vidro transparente. A germinação
234 ocorreu entre duas folhas de papel filtro (Germitest®) umedecidas com água
235 deionizada. Os tubos foram acondicionados em câmaras de germinação (Tecnal
236 TE 400, São Paulo, Brazil) por 72 h e temperatura em 30°C. Quinze plântulas de
237 milho, com 3 dias de desenvolvimento e comprimento uniforme de raízes (4 a 6
238 cm – milho), foram transferidas para suportes de acrílico com altura ajustável
239 (específicos para cada espécie) e, em seguida, para um recipiente de vidro
240 contendo um volume total de 150 mL, de solução nutritiva 1/3 de força (pH 6,0)
241 (Dong et al., 2006). A solução nutritiva com ausência de BTC e a solução nutritiva
242 com a presença de BTC nas concentrações de 0,500 mM ou 0,750 mM, foi
243 substituída a cada 48 h. Os recipientes contendo as plântulas foram mantidos
244 em câmaras de crescimento à 31°C por 9 dias, com fotoperíodo 12/12 h, e
245 densidade do fluxo de fótons (DFF) de 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após os 9 dias, foi
246 determinado o comprimento, massa fresca e massa seca da raiz total,
247 comprimento, massa fresca e massa seca da parte aérea da planta. Os dados
248 foram expressos em centímetros (cm) para comprimento de raiz, e parte aérea.
249 Os resultados de massa fresca e massa seca foram expressos em gramas (g).
250 Cada análise foi realizada com o número total de 4 plantas por tratamento.

251 Atividade Enzimática

252 Inicialmente, as plantas cultivadas em substrato foram submetidas a
253 exposição à luz por 40 minutos. Para extração da enzima PEPC, 250 mg da folha
254 mais expandida, foram retirados e homogeneizados por 40 s em almofariz e pilão
255 com 1,5 mL de meio de moagem contendo 50 mM de HEPES-KOH (pH 7,2), 10
256 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 25% (v/v) glicerol e 2% (p/v) BSA. O homogeneizado foi
257 transferido para um tubo Eppendorf e centrifugado a 10.000 g por 10 minutos. O
258 sobrenadante foi mantido a 25 °C e usado como fonte de PEPC. A atividade
259 enzimática foi analisada espectrofotometricamente a 25 °C pela diminuição em
260 340 nm devido à oxidação do NADH na presença de excesso de malato
261 desidrogenase como enzima de acoplamento. A mistura de ensaio continha 25
262 mM HEPES-KOH (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM NaHCO₃, 0,2 mM NADH, 1 UI
263 de malato desidrogenase e 1 mM de PEP, para o controle, e as demais análises
264 apresentavam, também, o composto BTC nas seguintes concentrações: 0,125
265 mM, 0,250 mM, 0,500 mM, 0,750 mM e 1 mM (Jenkins, 1989). Todas as
266 amostras foram analisadas em triplicata.

267

**268 Análise combinada dos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência de
269 clorofila**

270 Para este teste, utilizou-se plantas cultivadas em substrato. Um analisador
271 de gás por infravermelho (LICOR-6800) foi utilizado para avaliar os parâmetros
272 de trocas gasosas, tais como taxa fotossintética (A), condutância estomática
273 (gs), transpiração (E) e concentração intercelular de CO₂ (C_i). As medições
274 foram realizadas das 7 h às 11 h e 30 minutos, a 31 °C e sob uma densidade de
275 fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) de 1200 mol m⁻² s⁻¹
276 (Marchiosi et al., 2016).

277 A fluorescência da clorofila a foram estimadas usando o fluorímetro do
278 LICOR-6800 de amplitude modulada. Após 10 horas de adaptação ao escuro, a
279 fluorescência inicial (F₀) e a fluorescência máxima (F_m) foram estimadas nas
280 duas últimas folhas completamente expandidas. O rendimento quântico
281 fotossintético máximo do PSII (F_v/F_m) foi calculado e o rendimento quântico do

282 PSII *in vivo* (ΦF) em plantas adaptadas à luz, simultaneamente com as análises
283 de trocas gasosas (Marchiosi et al., 2016).

284 Nas condições adaptadas à luz, após 25 a 30 min de aclimação por
285 planta, foram mensurados em conjunto com as análises de trocas gasosas os
286 seguintes parâmetros: eficiência quântica fotoquímica efetiva (F_v'/F_m'), taxa de
287 transporte de elétrons no PSII (ETR), *quenching* fotoquímico (qP) e *quenching*
288 não-fotoquímico (qN) (Genty et al. 1989; Galazzi 2011). Estes parâmetros foram
289 determinados sob uma DFFFA de $1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em duas condições de
290 concentração de CO_2 mantidas na câmara foliar (400 e $2000 \mu\text{mol mol}^{-1}$). Todas
291 as avaliações foram realizadas utilizando uma cabeça sensora com câmara foliar
292 de 2 cm^2 , temperatura de $27 \text{ }^\circ\text{C}$ e déficit de pressão de vapor controlado entre o
293 ar e a folha (DPV) em $0,2 \text{ KPa}$ com vazão de $700 \mu\text{mol s}^{-1}$.

294

295 **Quantificação de clorofila**

296 A determinação dos teores de clorofilas e carotenoides foi realizada de
297 acordo com Lichtenthaler (1987). O índice SPAD foi determinado usando um
298 clorofilômetro (SPAD-502, Konica Minolta, Ramsey, EUA). A quantificação de
299 clorofila foi realizada em plantas de milho cultivadas em substrato, 24 h após
300 cada aplicação do composto BTC.

301

302 **Análise estatística**

303 A análise de variância (ANOVA), com pós teste de Dunnett, foi realizada
304 para testar a significância das diferenças observadas usando o pacote de
305 software GraphPad Prism® (versão 6.0, GraphPad Software Inc., EUA). Um
306 valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

307

308

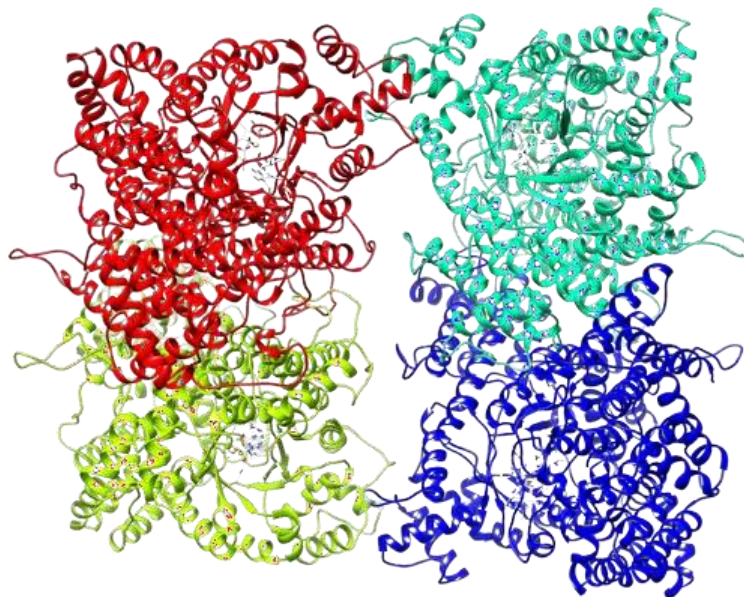
309

310 **Resultados e Discussão**

311

312 ***Modelagem molecular e validação da estrutura da PEPC***

313 A estrutura tridimensional da enzima PEPC de *Zea mays* já foi
314 determinada experimentalmente e está depositada no banco de dados *Protein*
315 *Data Bank* (PDB) (id.: 1jqo). Esta estrutura do PDB não está completa, com
316 ausência de regiões flexíveis como alças e voltas não obtidas pelo método de
317 difração de raio-X. Assim, para a construção da estrutura completa foi utilizado
318 o método de modelagem molecular por homologia. A partir da sequência de
319 aminoácidos (Uniprotid:P04711) foram selecionados dois moldes do PDB
320 (PDBid.: 1jqo e 1jqn). As duas estruturas foram obtidas por difração de raio-X
321 (resolução: 3,00 e 2,35 Å) e possuem identidade com a sequência-alvo de 99,2%
322 e 40,9%, respectivamente. A primeira corresponde à estrutura da PEPC de *Zea*
323 *mays*, citada anteriormente. A segunda estrutura, com similaridade de 40,9%, é
324 referente a enzima PEPC de *E. coli*, e foi escolhida como molde por apresentar
325 como ligante o DCO, o qual já foi testado em estudos anteriores e demonstrou
326 capacidade de inibição da enzima PEPC (Jenkins, 1989), além do cofator Mg²⁺.
327 Para a modelagem foi imposta uma restrição de simetria entre os carbonos alfa
328 das quatro cadeias para serem gerados 1200 modelos, onde os 12 melhores
329 foram escolhidos com base na DOPE Score do Modeller. A seleção do melhor
330 modelo (Figura 1) foi realizada pela análise do gráfico de Ramachandran. Os
331 resíduos de aminoácidos do modelo contidos em regiões não permitidas do
332 gráfico foram ajustados utilizando o script *loop* do programa Modeller e
333 manualmente pelo programa Coot (Lohkamp et al., 2005). Ao fim de toda a
334 modelagem o melhor modelo não apresentou nenhum resíduo de aminoácido
335 em regiões proibidas (Figura suplementar).



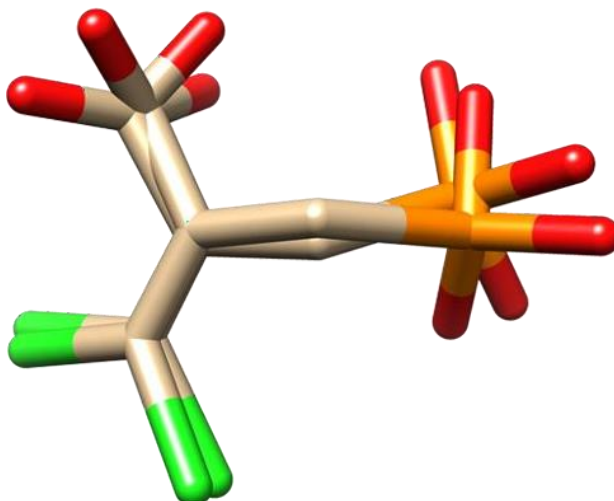
336

337 **Figura 1:** Representação da estrutura tridimensional da enzima PEPC de milho (*Zea mays*) na
338 forma homotetramérica, composta por quatro cadeias idênticas, modelada com o ligante de
339 referência 3,3 *dichloro-2-phosphonomethyl-acrylic acid* (DCO), e o cofator da enzima Mg^{2+} no
340 sítio ativo da enzima.

341

342 ***Varredura virtual***

343 A varredura virtual foi realizada pelo método de docking molecular. Foram
344 validados três protocolos por *redocking* do inibidor DCO na enzima PEPC, em
345 três programas diferentes (Figura 2). Os dois primeiros foram o programa
346 AutoDock Vina e AutoDock 4, com algoritmo de busca e ranqueamento padrão,
347 grid de 0.375 Å, com centro de busca nos eixos x, y e z de 16, -85, -7 para ambos
348 e tamanho da caixade 15(30), 15(30) 15(30), respectivamente. O terceiro
349 programa foi o Molegro Virtual Docker v6.0 (MVD), com função de pontuação
350 MolDock Score, algoritmo de busca MolDock (Simplex Evolution) SE e restrições
351 de busca em uma esfera de raio de 10 Å, centralizada no ligante DCO, com os
352 resultados ordenados por MolDock Score e Rerank Score. Os protocolos foram
353 validados com um *Root mean Square deviation* (RMSD) médio de 0,93.



354

355 **Figura 2:** *Redocking* médio do ligante de referência (DCO), obtido através dos programas de
356 docking molecular Autodock Vina, Autodock 4 e Molegro, com RMSD médio de 0,93 e *score*
357 médio de -6,5 no Autodock Vina, -6,65 no Autodock 4 e -124,619 no Molegro. As cores são
358 representativas e indicam: vermelho: oxigênios, laranja: fósforo e verde: cloro.

359

360 Na varredura virtual a primeira biblioteca contendo moléculas similares
361 aos inibidores já testados continha 3200 moléculas. Após submetidos aos
362 protocolos validados no *redocking* para os três programas, selecionou-se 523
363 moléculas melhores ranqueadas que o inibidor conhecido DCO. Destas
364 moléculas, foram selecionados 10 compostos que apresentaram
365 reprodutibilidade em três novas varreduras em cada programa, e em todas as
366 repetições o composto identificado como ZINC12405021 apresentou melhor
367 *score* que o inibidor DCO.

368

369 A biblioteca construída utilizando o catálogo da Sigma, apresentava um
370 número aproximado de 124 mil moléculas, sendo que após submetida a filtragem
371 pelas Regras de Lipinski e critérios ADMETOX, resultou em 52 mil moléculas
372 para a varredura virtual. Neste passo, primeiramente a biblioteca foi submetida
373 ao programa Autodock Vina, e as moléculas com melhores *scores* em relação
374 ao DCO foram submetidas ao programa Autodock 4, e assim, como no programa
375 anterior, foi possível filtrar novas moléculas através do seu *score*. Por fim, as
376 moléculas selecionadas foram submetidas ao programa Molegro. Após a
377 docagem neste programa, restaram 645 moléculas, as quais foram avaliadas
cautelosamente com base em suas interações com o sítio ativo. Com isso, 76

378 moléculas foram classificadas como promissoras à inibidores da enzima PEPC,
 379 a partir da biblioteca da Sigma. Estas moléculas foram submetidas a mais três
 380 repetições nos três programas utilizados, para avaliação da reprodutibilidade dos
 381 resultados, possibilitando a seleção das seguintes candidatas: ZINC391925,
 382 ZINC4962639, ZINC14679714, ZINC4207097, ZINC19093969, ZINC3869471,
 383 ZINC1848619, ZINC1680376 e ZINC225866.

384 A terceira biblioteca utilizada com os compostos disponíveis para venda
 385 na empresa Acros, continha aproximadamente 17 mil moléculas. Após as
 386 filtragens nenhuma molécula apresentou bons resultados quando comparadas
 387 com o DCO, não sendo possível selecionar nenhum candidato.

388 As moléculas selecionadas na varredura virtual a partir das três
 389 bibliotecas construídas encontram-se na Tabela 1. Os compostos denominados
 390 BTC, TBF e CBTCA foram adquiridos a partir da empresa Sigma-Aldrich para os
 391 testes *in vivo* e *in vitro*. Os dados na tabela estão organizados em função do
 392 Score Médio Relativo (MRS). O MRS é um cálculo do valor médio dos scores
 393 obtidos nos diferentes programas de docking molecular utilizados na varredura
 394 virtual. Quanto maior seu valor, melhor a interação da molécula candidata com
 395 o sítio de ligação na enzima.

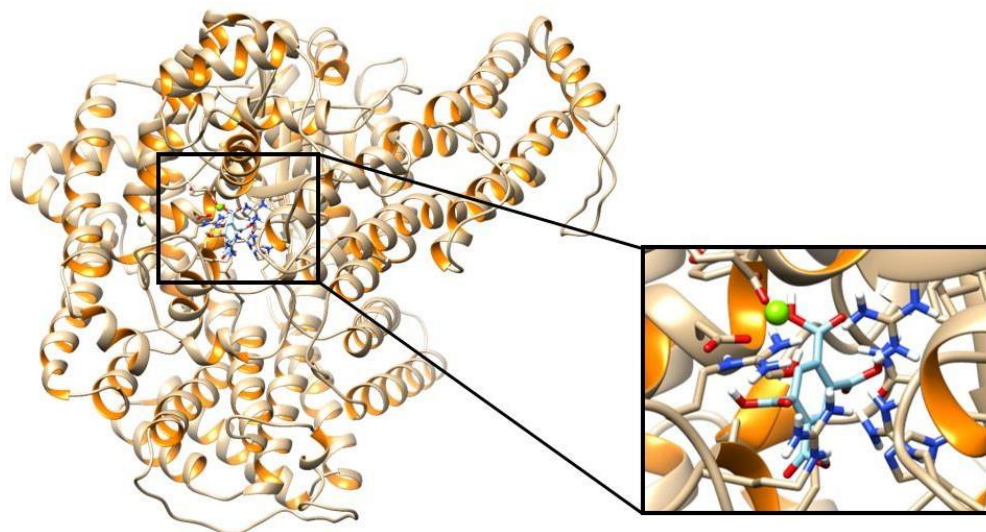
396 **Tabela 1:** Moléculas selecionadas após *virtual screening* nas bibliotecas: Similares, Acros e
 397 Sigma. Ligantes com seus respectivos códigos retirados do servidor Zinc Database, sigla das
 398 moléculas candidatas e Valor do Score médio relativo (MRS) de cada molécula.

Ligantes	Sigla	Vina Score	Autodock Score	Molegro Score	MRS
ZINC4207097		-7,9	-9,69	-150,109	0,93
ZINC4962639	CBTCA	-7,3	-7,78	-176,81	0,89
ZINC12405021		-7,5	-6,72	-175,035	0,86
ZINC14679714		-7,4	-7,86	-155,514	0,86
ZINC391925	BTC	-7,3	-6,6	-180,414	0,86
ZINC19093969		-7,8	-7,56	-145,92	0,85
ZINC3869471		-7,9	-7,28	-138,048	0,83
ZINC1680376		-8	-7,34	-127,687	0,81
ZINC1848619		-7,5	-7,56	-127,148	0,8
ZINC1625170	DCO	-6,5	-6,65	-124,619	0,72
ZINC225866	TBF	-7,8	-6,24	-94,66	0,71

399

400 O composto BTC, foi escolhido para testes *in vitro* e *in vivo* devido ao
 401 excelente score apresentado nos programas de docagem e com base na
 402 conformação que este composto apresenta quando em contato com o sítio ativo

403 da enzima PEPC. Sua interação e ancoragem no sítio ativo da enzima ZmPEPC,
404 é mostrado na Figura 3.



405

406 **Figura 3:** Representação da ancoragem da molécula BTC no sítio ativo do monômero da enzima
407 ZmPEPC. Na imagem à esquerda, representado o ligante em seu sítio ativo com sua cadeia
408 proteica e em detalhes, à direita, a representação da molécula inibidora em seu sítio ativo. O
409 composto BTC foi avaliado *in silico* e testado *in vivo* no presente trabalho.

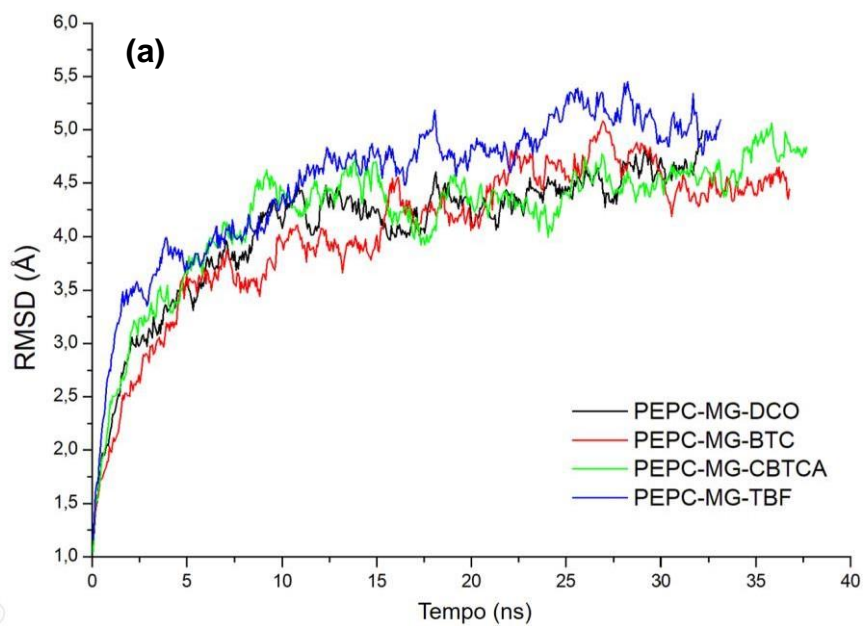
410

411 **Dinâmica Molecular**

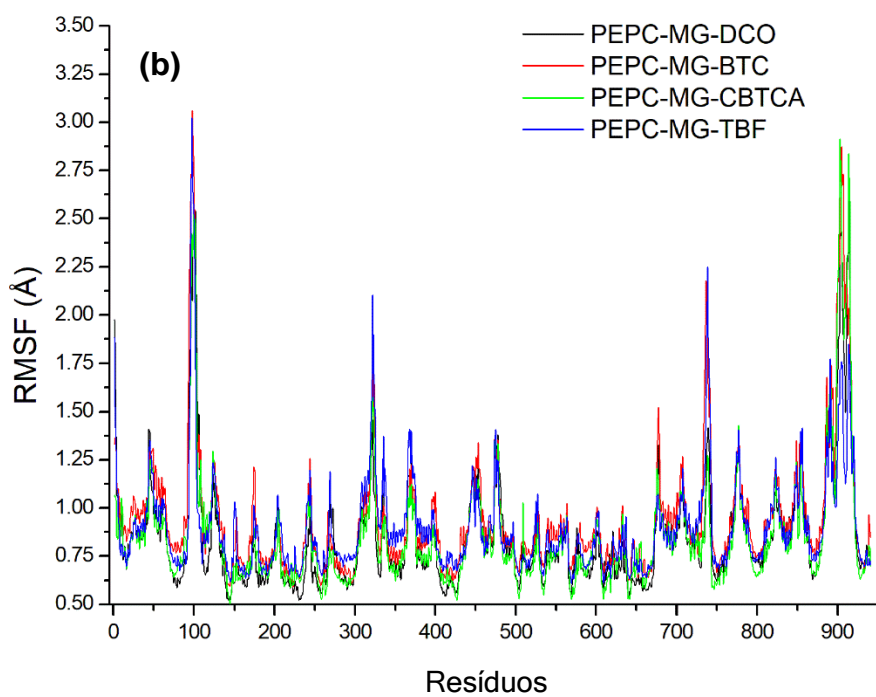
412 Para avaliar a estabilidade de interação dos complexos formados entre a
413 enzima PEPC com os ligantes BTC, TBF e CBTCA e o ligante de referência
414 (DCO), foram realizadas simulações de dinâmica molecular (DM) por um tempo
415 que variou em torno de 35 ns para os diferentes complexos.

416 A convergência para o equilíbrio termodinâmico foi acompanhada pelo
417 cálculo de RMSD, Raio de giro e RMSF dos átomos da cadeia principal da
418 proteína em função do tempo. Para os quatro complexos analisados, houve uma
419 tendência ao equilíbrio em aproximadamente 10 ns, oscilando em um platô
420 constante até o final das simulações com valores de RMSD inferiores a 5,5 Å
421 (Figura 4a). Por meio do RMSF verificou-se que a maior parte dos ligantes
422 simulados não apresentaram flutuações significativamente diferentes do inibidor
423 DCO (Figura 4b). As regiões com maiores flutuações referem-se a regiões
424 flexíveis da proteína contendo *loops* que normalmente apresentam um valor de
425 RMSF mais elevado (Benson et al., 2012). Os resultados obtidos em termos de
426 Raio de Giro (Figura 4c) demonstram que a estrutura da proteína não apresentou

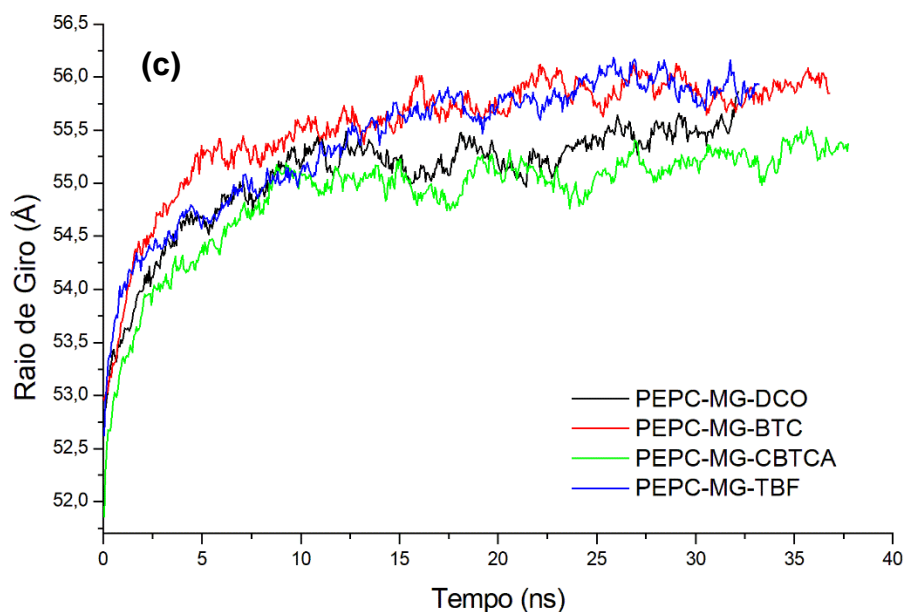
427 mudanças significativas no seu raio em função do tempo, indicando que a
428 presença dos ligantes não levaram nenhum dos complexos a se desenovelar.



429



430



431

432 **Figura 4:** Análise da trajetória de dinâmica molecular dos Complexos ZmPEPC-ligante em
 433 termos de RMSD (a), RMSF (b) e Raio de Giro (c).

434

435 Os principais resíduos de aminoácidos envolvidos na estabilização dos
 436 ligantes foram obtidos pelo cálculo da frequência de contato a partir das
 437 trajetórias de simulações de DM (Tabela 2). Os resíduos da proteína que
 438 estavam a uma distância de até 4.0 Å do ligante e que apresentaram uma
 439 frequência de contato maior que 0,6 durante a simulação foram considerados
 440 importantes na estabilização. A Tabela 2 mostra uma lista completa dos resíduos
 441 elencados pelo programa de dinâmica molecular, que apresenta maior taxa de
 442 frequência de contato no sítio ativo da enzima, para cada ligante avaliado. Os
 443 valores estão representados como probabilidade. Os resíduos ARG-427, ASP-
 444 574, HSD-148, e SER-573, são aparentemente os mais importantes para a
 445 estabilização do inibidor DCO e as moléculas BTC, CBTCA e TBF. O cofator
 446 Mg^{2+} se mostra relevante para a estabilização apenas do inibidor DCO e das
 447 moléculas CBTCA e TBF.

448

449

450 **Tabela 2:** Frequência de contato em até 4 Å entre ZmPEPC com os ligantes avaliados. O íon
 451 Mg^{2+} e os resíduos em negrito possuem frequência de contato com o ligante maior que 0,6, e
 452 assim, são os resíduos considerados importantes para os quatro ligantes.

Resíduos	Ligantes				Resíduos	Ligantes			
	DCO	BTC	CBTC A	TBF		DCO	BTC	CBTCA	TBF
ALA-147	0,0833	0,8281	0,3445	0,0058	GLY-611	0,5111	0,0036	0,2265	0,7093
ALA-745	0,013	0,9714	0,6426	0,1175	GLY-613	0,0055	-	0,0043	0,0497
ARG-427	1	0,934	1	0,8648	HSD-148	0,6271	0,9845	0,9511	0,9882
ARG-538	-	0,0008	0,1419	-	HSD-610	0,1797	-	-	-
ARG-612	0,1964	-	0,1164	0,6736	ILE-746	0,2709	0,9877	0,7722	0,2504
ARG-618	0,1573	0,1319	0,9849	0,5086	LEU-535	0,0191	-	0,3382	0,3725
ARG-730	0,7379	0,8408	1	-	MET-569	0,6538	-	0,0906	0,7703
ARG-735	0,1913	0,0411	0,6196	0,0162	PRO-149	-	0,754	0,1705	0,0994
ARG-744	0,4325	0,9401	1	0,5488	PRO-747	-	0,4877	-	0,0031
ASP-263	0,0358	0,693	0,033	-	SER-573	0,9879	0,7308	0,9189	0,8815
ASP-265	0,2872	0,7255	0,0393	0,6008	THR-146	0,3696	0,0883	0,3783	0,6581
ASP-574	1	0,8994	1	0,9489	THR-642	0,3468	0,0191	0,3088	0,7531
GLN-644	0,3538	0,0252	0,8434	0,8562	TRP-259	0,5707	0,2805	0,6836	0,6496
GLU-537	-	0,0101	1	0,9281	TYR-572	0,3901	-	0,0171	-
GLY-266	0,0228	0,4503	-	-	VAL-570	0,2341	-	0,0012	0,004
GLY-571	0,3901	-	0,279	0,0795	Mg²⁺	1	0,2658	1	0,7617

453

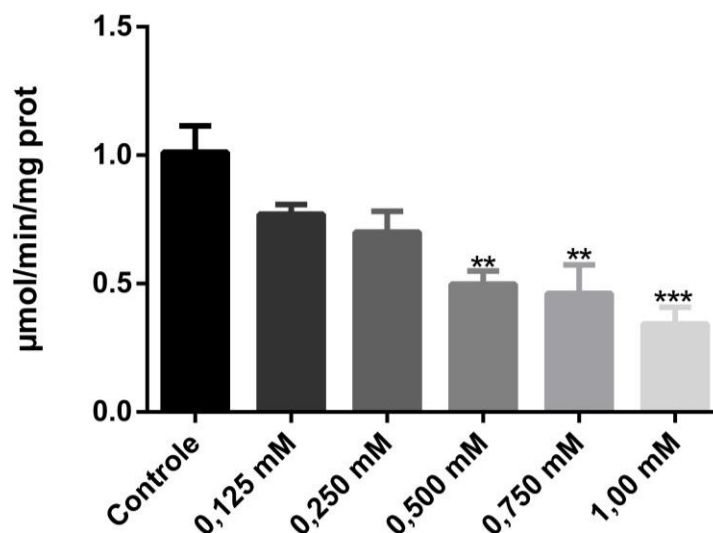
454 Cada ligante possui geometria e composição específica, que os fazem
 455 interagirem de forma diferente com a proteína e, portanto, estruturando sítios
 456 distintos. Mutações nas posições citadas poderia afetar significativamente a
 457 atividade enzimática e/ou perturbar a interação com a molécula ligante.

458

459 ***Efeitos de diferentes concentrações de BTC sobre a atividade in vitro da*** 460 ***PEPC em folhas de Zea mays***

461 Para a avaliação da atividade enzimática da PEPC e as taxas de inibição
 462 do BTC sobre esta enzima, utilizou-se um extrato rico em PEPC obtido a partir
 463 das folhas de plantas de milho com 14 dias de desenvolvimento. A atividade
 464 enzimática foi monitorada colorimetricamente de forma indireta através da
 465 redução de NADH do meio de reação. As concentrações de 0,500 mM,
 466 0,750 mM, e 1,00 mM, causaram reduções significativas na atividade da PEPC
 467 (Figura 5). Na maior concentração de BTC o consumo de NADH apresentou
 468 redução de 66%.

469



470

471 **Figura 5:** Avaliação da taxa inibitória do composto BTC sob a enzima PEPC. Considerou-se
 472 $P \leq 0,05$ para os resultados que apresentaram diferenças significativas. Os tratamentos
 473 significativos estão representados com ** quando a significância foi de 1% e, com *** quando a
 474 significância foi de 0,1%.

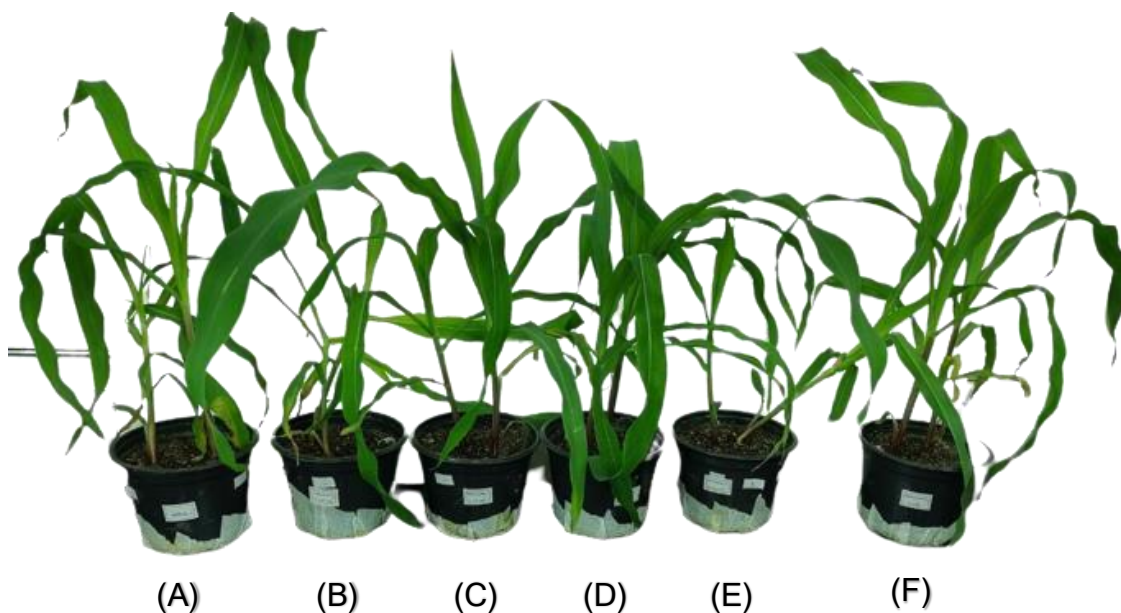
475

476 Apesar destes resultados, para confirmar que a PEPC é inibida pelo
 477 composto BTC, é necessária uma avaliação de sua atividade utilizando a enzima
 478 purificada.

479

480 ***Impactos de diferentes concentrações de BTC sobre o desenvolvimento de***
 481 ***plantas de milho cultivadas em substrato e efeitos do BTC sobre as trocas***
 482 ***gasosas, fluorescência da clorofila e índice SPAD***

483 Após as aplicações do composto por aspersão nas folhas, foi possível
 484 notar o surgimento de uma película esbranquiçada sobre o limbo, o que pode
 485 indicar uma absorção parcial do composto BTC. Os aspectos morfológicos das
 486 folhas não sofreram alteração, em comparação com o controle, como ilustrado
 487 nas figuras 6 e 7.



488

(A) (B) (C) (D) (E) (F)

489 **Figura 6:** Representação dos aspectos visuais das folhas de plantas de milho, cultivadas em
 490 substrato por 21 dias, após duas aplicações de BTC via aspersão foliar. Controle (A); dose 0,125
 491 mM (B); dose 0,250 mM (C); dose 0,500 mM (D); dose 0,750 mM (E); dose 1,00 mM (F).



492

(A) (B) (C) (D) (E) (F)

493 **Figura 7:** Representação dos aspectos visuais das raízes de plantas de milho, cultivadas em
 494 substrato por 21 dias, após duas aplicações de BTC via aspersão foliar. Controle (A); dose 0,125
 495 mM (B); dose 0,250 mM (C); dose 0,500 mM (D); dose 0,750 mM (E); dose 1,00 mM (F).

496

497 O limbo foliar do milho apresenta uma epiderme constituída por um
 498 sistema de células de formas e funções variadas. Essas células são arranjadas

499 de forma extremamente compactada e justapostas, com o intuito de dificultar a
 500 ação de choques mecânicos e a penetração de patógenos/pragas na planta,
 501 sendo responsável também pelas trocas gasosas, por meio dos estômatos e pela
 502 proteção (Raven et al., 1996). A epiderme é recoberta por uma camada lipídica
 503 contínua, chamada de cutícula, responsável por evitar a difusão de água (Raven
 504 et al., 1996). O BTC, é um ácido orgânico solúvel em água. Esta característica
 505 faz com que sua absorção pela planta seja mais difícil, por apresentar dificuldade
 506 de interação com a cutícula foliar. Essa barreira pode inferir em reduções no
 507 nível de absorção da molécula, justificando a cristalização do composto sobre a
 508 superfície da folha.

509 Como esperava-se, com base nos aspectos morfológicos visualizados, a
 510 biomassa fresca, biomassa seca, a o comprimento das folhas e raízes de milho
 511 não demonstraram diferenças significativas, como exposto na tabela 3.

512 Possivelmente a quantidade de composto absorvido não foi o suficiente
 513 para demonstrar efeitos de inibição.

514 **Tabela 3:** Parâmetros biométricos de plantas de milho cultivadas em substrato por 21 dias,
 515 tratadas com BTC.

BTC	Comprimento de Raiz	Comprimento de Parte aérea	Massa fresca de Raiz	Massa fresca de Parte aérea	Massa seca de Raiz	Massa seca de Parte aérea
mM	cm	cm	g	g	g	g
0	33,5 ± 3,25	63,3 ± 1,29	2,98 ± 0,40	8,82 ± 1,11	0,19 ± 0,02	0,53 ± 0,04
0,125	28,6 ± 1,14	59,8 ± 1,20	1,92 ± 0,26	7,67 ± 0,91	0,13 ± 0,01	0,42 ± 0,02
0,250	34,5 ± 1,54	61,8 ± 1,45	3,90 ± 0,35	9,40 ± 1,17	0,14 ± 0,01	0,68 ± 0,06
0,500	29,0 ± 2,70	61,6 ± 1,19	3,54 ± 0,38	8,91 ± 1,14	0,13 ± 0,01	0,49 ± 0,04
0,750	34,0 ± 2,05	58,2 ± 1,48	3,35 ± 0,61	7,98 ± 1,04	0,15 ± 0,02	0,65 ± 0,08
1,00	33,9 ± 2,28	59,4 ± 2,21	3,68 ± 0,57	9,17 ± 0,74	0,19 ± 0,01	0,57 ± 0,04

516

517 Os efeitos do BTC sobre as trocas gasosas de planta de milho são
 518 mostrados na Tabela 4. Quando comparadas ao controle, não foram observadas
 519 alterações na condutância estomática (Gs), na concentração de CO₂ intracelular
 520 (Ci), assimilação de CO₂ (A), e na transpiração (E). Os efeitos da fluorescência
 521 de planta de milho também não mostraram alterações significativas em relação
 522 ao controle (Tabela 5). Os parâmetros de fluorescência analisados foram:
 523 eficiência fotoquímica máxima (Fv/Fm), eficiência máxima efetiva (Fv'/Fm'),
 524 rendimento fotoquímico do Fotossistema II (ΦPSII), taxa de transporte de
 525 elétrons (ETR), *quenching* fotoquímico (qP) e *quenching* não fotoquímico (qN).

526 **Tabela 4:** Efeitos do BTC em plantas de milho, na condutância estomática (Gs), na concentração
527 de CO₂ intracelular (Ci), assimilação de CO₂ (A), e na transpiração (E).

Dose de BTC	g _s	Ci	A	E
mM	mol (H ₂ O) m ⁻² s ⁻¹	μmol (CO ₂) mol ⁻¹	μmol (CO ₂) mol ⁻¹	mol (H ₂ O) m ⁻² s ⁻¹
0	0,19 ± 0,01	160,7 ± 10,7	27,1 ± 1,13	3,36 ± 0,22
0,125	0,20 ± 0,02	197,5 ± 11,2	23,5 ± 2,23	3,42 ± 0,34
0,250	0,16 ± 0,01	153,1 ± 11,0	23,1 ± 1,95	2,82 ± 0,23
0,500	0,18 ± 0,01	166,5 ± 19,6	25,0 ± 1,25	3,22 ± 0,18
0,750	0,17 ± 0,02	152,0 ± 20,0	24,2 ± 0,77	3,03 ± 0,34
1,00	0,16 ± 0,01	133,3 ± 12,7	25,6 ± 0,88	2,93 ± 0,24

528

529 **Tabela 5:** Efeitos do BTC, em plantas de milho na eficiência fotoquímica máxima (Fv/Fm),
530 eficiência máxima efetiva (Fv'/Fm'), rendimento fotoquímico do Fotossistema II (ΦPSII), taxa de
531 transporte de elétrons (ETR), *quenching* fotoquímico (qP) e *quenching* não fotoquímico (qN).

Dose de BTC	Fv/Fm	Fv'/Fm'	Φ(PSII)	ETR	qP	qN
mM				μmol (e ⁻) m ⁻² s ⁻¹		
0	0,79 ± 0,01	0,48 ± 0,01	0,24 ± 0,01	143,9 ± 8,75	0,51 ± 0,02	0,78 ± 0,01
0,125	0,79 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,21 ± 0,02	123,9 ± 13,0	0,45 ± 0,03	0,80 ± 0,01
0,250	0,78 ± 0,01	0,43 ± 0,02	0,21 ± 0,02	127,9 ± 11,8	0,49 ± 0,02	0,83 ± 0,01
0,500	0,80 ± 0,01	0,46 ± 0,01	0,24 ± 0,01	144,7 ± 6,90	0,53 ± 0,02	0,82 ± 0,01
0,750	0,78 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,22 ± 0,01	129,2 ± 3,56	0,50 ± 0,01	0,82 ± 0,01
1,00	0,80 ± 0,01	0,44 ± 0,01	0,24 ± 0,01	140,6 ± 2,52	0,54 ± 0,01	0,83 ± 0,01

532

533 O índice SPAD, faz a quantificação de clorofila na planta. Os dados não
534 demonstraram significância em comparação ao controle, como ilustrado na
535 tabela 6.

536 **Tabela 6:** Efeitos do BTC, em plantas de milho cultivadas em substrato, no índice SPAD.

Dose de BTC (mM)	Índice SPAD 1	Índice SPAD 2
0	36,6 ± 1,05	34,3 ± 0,51
0,125	36,6 ± 0,60	33,4 ± 0,77
0,250	35,1 ± 0,77	33,1 ± 0,45
0,500	36,5 ± 0,73	35,5 ± 0,41
0,750	36,2 ± 0,94	35,6 ± 0,50
1,00	36,6 ± 0,51	33,7 ± 0,64

537

538 **Impactos de diferentes concentrações de BTC sobre o desenvolvimento de**
539 **plantas de milho cultivadas em hidroponia**

540 Como não houve um efeito no crescimento em substrato, optamos por
 541 escolher as maiores concentrações de BTC para observar os efeitos deste
 542 composto em hidroponia. Neste sistema o composto é adicionado à solução
 543 aquosa e absorvido pela planta via raiz. Após 9 dias de cultivo, não se observou
 544 mudanças significativas nos parâmetros biométricos avaliados. Os valores
 545 obtidos são descritos na Tabela 7.

546 **Tabela7:** Parâmetros biométricos de plantas de milho cultivadas em hidroponia por 9 dias,
 547 tratadas com BTC.

BTC	Comprimento de Raiz	Comprimento de Parte aérea	Massa fresca de Raiz	Massa fresca de Parte aérea	Massa seca de Raiz	Massa seca de Parte aérea
mM	cm	cm	g	g	g	g
0	24,8 ± 3,07	28,0 ± 4,20	1,01 ± 0,17	1,94 ± 0,66	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,05
0,500	31,8 ± 2,79	36,2 ± 1,00	1,04 ± 0,12	2,60 ± 0,26	0,13 ± 0,01	0,19 ± 0,02
0,750	32,5 ± 1,59	38,8 ± 1,80	1,19 ± 0,14	3,20 ± 0,22	0,12 ± 0,01	0,26 ± 0,02

548

549 As características morfológicas não sofreram alterações quando
 550 comparado o controle com as plantas tratadas, como mostrado na Figura 8.



551

552 **Figura 8:** Aspectos morfológicos visuais de plantas de milho cultivadas em hidroponia por 9 dias.
 553 Controle (A); dose 0,500 mM (B); dose 0,750 mM (C).

554

555

556

557

558 Conclusão

559 A modelagem da enzima *ZmPEPC*, apresentou boa qualidade e permitiu
560 os estudos de docking molecular para seleção de inibidores enzimáticos. Os
561 compostos selecionados na varredura em larga escala, mostraram-se bons
562 candidatos a inibidores da PEPC quando submetidos a simulações de dinâmica
563 molecular. Em adição, este estudo demonstrou que o composto BTC inibiu a
564 atividade enzima PEPC *in vitro*. Os ensaios *in vivo* não apresentaram resultados
565 significativos sugerindo que o composto pode não ter sido absorvido pela planta,
566 quando realizada aspersão foliar nas plantas cultivadas em substrato. No cultivo
567 em hidroponia não foi possível identificar as causas dos resultados não
568 significativos. Ensaios adicionais são necessários para aprofundar nossa
569 compreensão das limitações do composto como princípio de ação herbicida e
570 como elas podem ser contornadas.

571

572 Agradecimentos

573 A CAPES pelo financiamento desta pesquisa.

Referências

- Barreda-Huerta F., Bustos-Jaimes I., Mújica-Jiménez C., Munõz-Clares R.A. (2021) Multiple conformations in solution of the maize C₄-phosphoenolpyruvate carboxylase isozyme. *Heliyon*. 7(11):e08464. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e08464. PMID: 34888425; PMCID: PMC8637149.
- Benson, N. C., & Daggett, V. (2012). A comparison of multiscale methods for the analysis of molecular dynamics simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(29), 8722-8731.
- Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G. Bhat T.N., Weissing H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. The Protein Data Bank (2000) *Nucleic Acids Research*, 28: 235-242. doi:10.1093/nar/28.1.235
- Chang A., Jeske L., Ulbrich S., Hofmann J., Koblitz J., Schomburg I., Neumann-Schaal M., Jahn D., Schomburg D. (2021) BRENDA, the ELIXIR core data resource in 2021: new developments and updates. *Nucleic Acids Res.*, 49:D498-D508. DOI: [10.1093/nar/gkaa1025](https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1025).
- Dallakyan, S; Olson, A.J. (2015) Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Methods Mol Biol.* 1263:243-250.
- De Oliveira Jr., R. S., Constantin, J., & Inoue, M. H. (2011). Biologia e manejo de plantas daninhas. *Curitiba, Brasil: Omnipax*.
- Dong J., Wu F., Zhang G. (2006) Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). *Chemosphere* 64:1659-1666. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.01.030>
- Doyle, J. R. et al. (2005) A rapid screening method to detect specific inhibitors of pyruvate orthophosphate dikinase as leads for C₄ plant-selective herbicides. *Journal of Biomolecular Screening*, v. 10, n. 1, p. 67-75.
- Dyer, W. E. (2018). Stress-induced evolution of herbicide resistance and related pleiotropic effects. *Pest Management Science*, 74(8), 1759-1768.
- Gaines, T. A., Duke, S. O., Morran, S., Rigon, C. A., Tranel, P. J., Kopper, A., & Dayan, F. E. (2020). Mechanisms of evolved herbicide resistance. *Journal of Biological Chemistry*, 295(30), 10307-10330.
- Galazzi E.B. (2011) Desempenho fotossintético de plantas de *Jatropha curvas* L. cultivadas no Estado do Espírito Santo. Universidade Federal do Espírito Santo
- Garnett T., Appleby M.C., Balmford A., Bateman I.J., Benton T.G., Bloomer P., Burlingame B., Dawkins M., Dolan L., Fraser D., Herrero M., Hoffmann I., Smith P., Thornton P.K., Toulmin C., Vermeulen S.J., Godfrays H.C. (2013) Agriculture. Sustainable intensification in agriculture: premises and policies. *Science*. 341(6141):33-4. doi: 10.1126/science.1234485. PMID: 23828927.
- Genty B., Britantais J.M., Baker N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 990:87-92. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(89\)80016-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9).
- Gunsolus, J.L. e Curran, W.S. (2002). Herbicide mode of action and injury symptoms. North Central Regional Extension Publication, 377.
- Humphrey, W; Dalke, A; Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14(1), 33-38.
- Izui, K., Matsumura, H., Furumoto, T., & Kai, Y. (2004). Phospho enol pyruvate carboxylase: a new era of structural biology. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 69-84.
- Jenkins C.L. (1989) Effects of the Phosphoenolpyruvate Carboxylase Inhibitor 3,3-Dichloro-2-(Dihydroxyphosphinoylmethyl)propenoate on Photosynthesis: C(4) Selectivity and Studies on C(4) Photosynthesis. *Plant Physiol.* 89(4):1231-7. doi: 10.1104/pp.89.4.1231.

- Kai, Y., Matsumura, H., & Izui, K. (2003). Phosphoenolpyruvate carboxylase: three-dimensional structure and molecular mechanisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 414(2), 170-179.
- Kanai, R; E. Edwards, G. The Biochemistry of C4 Photosynthesis, *C4 Plant Biology* (1999), Pages 49-87. Retrieved from doi.org/10.1016/B978-012614440-6/50004-5
- Lichtenthaler H.K. (1987) Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods Enzymol* 148:350-382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Lipinski, C. A. (2016). Rule of five in 2015 and beyond: Target and ligand structural limitations, ligand chemistry structure and drug discovery project decisions. *Advanced drug delivery reviews*, 101, 34-41.
- Mackerell A.D., Jr.; Feig, M; Brooks, C.L.; (2004) Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *J Comput Chem* 25:1400-15. doi:10.1002/jcc.20065.
- Magrane, M. (2011) UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data. *Database (Oxford)* 2011 bar009.
- Marchi, G., Marchi, E. C. S., & Guimarães, T. G. (2008). Herbicidas: mecanismos de ação e uso.
- Marchiosi R., Bido G.S., Bohm P.A.F., et al. (2016) Photosynthetic response of soybean to L-DOPA and aqueous extracts of velvet bean. <https://doi.org/10.1007/s10725-016-0154-2>.
- Moody N.R., Christin P.A., Reid J.D. (2020) Kinetic Modifications of C4 PEPC Are Qualitatively Convergent, but Larger in *Panicum* Than in *Flaveria*. *Front Plant Sci.*; 11:1014. doi: 10.3389/fpls.2020.01014. PMID: 32719709; PMCID: PMC7350407.
- Mount, D. W. (2007). Using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2007(7), pdb.top17. doi:10.1101/ pdb.top17.
- Nguyen, G. T. T., Erlenkamp, G., Jack, O., Kuberl, A., Bott, M., Fiorani, F., ... & Groth, G. (2016). Chalcone-based selective inhibitors of a C4 plant key enzyme as novel potential herbicides. *Scientific reports*, 6(1), 1-12.
- Phillips, JC; Braun, R; Wang, W; et al (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem* 26:1781-802. doi:10.1002/jcc.20289.
- Raven, P. H., Evert, R. F., & Eichhorn, S. E. (2007). *Biologia vegetal*. In *Biologia vegetal* (pp. 830-830).
- Roman, E. S., Beckie, H., Vargas, L., Hall, L., Rizzardi, M. A., & Wolf, T. M. (2007). *Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação* (p. 152). Passo Fundo: Berthier.
- Sander T., Freyss J., Korff M.V., Rufener C. (2015) An Open-Source Program For Chemistry Aware Data Visualization And Analysis. *J Chem Inf Model*, 55, 460-473, doi 10.1021/ci500588j.
- Sterling and Irwin, J. (2015) *Chem. Inf. Model*, <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jcim.5b00559>.
- Thompson, M., & Chauhan, B. S. (2022). History and perspective of herbicide use in Australia and New Zealand. *Advances in Weed Science*, 40.
- Thomsen R. e Christensen M.H.J. (2006) *Med. Chem. MolDock: Uma Nova Técnica para Ancoragem Molecular de Alta Precisão*, 49(11), pp 3315-3321.

Trott, O.; Olson, A.J. (2010) AutoDock Vina: melhorando a velocidade e precisão do encaixe com uma nova função de pontuação, otimização eficiente e multithreading, *Journal of Computational Chemistry* 31, 455-461.

Verli, H. (2014) *Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular*. Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.

Verma S.K., Singh S.B., Meena R.N., Prasad S.K., Meena R.S., Gaurav A. (2015) A review of weed management in India: the need of new directions for sustainable agriculture. *The Bioscan*. 10: 253-263.

Webb, B; Sali, A. (2014) Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. *Current Protocols in Bioinformatics*, John Wiley & Sons, Inc., 5.6.1-5.6.32.

Zoete, V.; Cuendet, MA; Grosdidier, A; Michelin, O.(2011) *SwissParam, uma ferramenta de geração de campo de força rápida para pequenas moléculas orgânicas* , *J. Comput. Chem*, 32(11), 2359-68. PMID: 21541964 , DOI: 10.1002/jcc.21816.

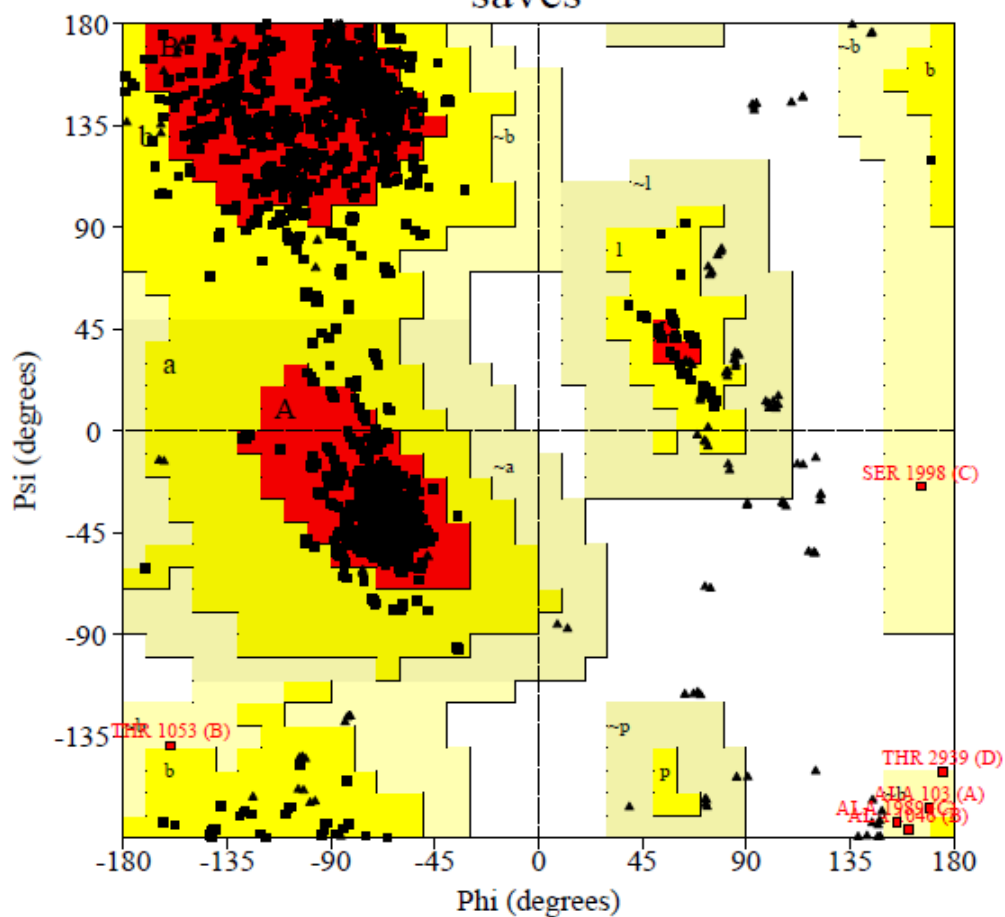
Anexo

Figura suplementar:

PROCHECK

Ramachandran Plot

saves



Plot statistics

Residues in most favoured regions [A,B,L]	3101	94.0%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	193	5.8%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	6	0.2%
Residues in disallowed regions	0	0.0%

Number of non-glycine and non-proline residues	3300	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	12	
Number of glycine residues (shown as triangles)	252	
Number of proline residues	208	

Total number of residues	3772	

Based on an analysis of 118 structures of resolution of at least 2.0 Angstroms and R-factor no greater than 20%, a good quality model would be expected to have over 90% in the most favoured regions.