



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE TECNOLOGIA DO
DESENVOLVIMENTO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA
E BIOPROCESSOS

VINÍCIUS COSTA AMADOR

ANÁLISE ESTRUTURAL FUNCIONAL “IN-SÍLICO” DE UMA PROTEÍNA
GLUTATIONA-S-TRANSFERASE DE ARROZ, COM POTENCIAL APLICAÇÃO
NA RESISTÊNCIA DE PLANTAS A HERBICIDAS

SUMÉ - PB

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE TECNOLOGIA DO
DESENVOLVIMENTO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA
E BIOPROCESSOS

VINÍCIUS COSTA AMADOR

ANÁLISE ESTRUTURAL FUNCIONAL “IN-SÍLICO” DE UMA PROTEÍNA
GLUTATIONA-S-TRANSFERASE DE ARROZ, COM POTENCIAL APLICAÇÃO
NA RESISTÊNCIA DE PLANTAS A HERBICIDAS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Trindade Maia

SUMÉ - PB

2015

A481a Amador, Vinícius Costa.

Análise estrutural “in-sílico” de uma proteína glutationa-s-transferase de arroz, com potencial aplicação na resistência de plantas e herbicidas / Vinícius Costa Amador. - Sumé - PB: [s.n], 2015.

93 f.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Trindade Maia.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Biotecnologia. 2. Agroindústria. 3. Arroz - Alimento. I. Título.

CDU: 60 (043.3)

**ANÁLISE ESTRUTURAL FUNCIONAL “IN-SÍLICO” DE UMA
PROTEÍNA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE DE ARROZ, COM
POTENCIAL APLICAÇÃO NA RESISTÊNCIA DE PLANTAS A
HERBICIDAS**


VINÍCIUS COSTA AMADOR

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Rafael Trindade Maia
UAEDUC/CDSA/UFCG
Orientador



Prof.^a. Dr.^a. Magnólia de Araújo Campos
UABQ/CES/UFCG
Examinador 1



Prof. Dr. Ranoel José de Sousa Gonçalves
UATEC/CDSA/UFCG
Examinador 2

Aprovado em 23 de novembro de 2015.

**Dedico este trabalho aos meus amados pais,
Antônio Amador de Sousa e Ivonalda Costa Silva.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu amado pai, Antônio Amador de Sousa, que através de seu exemplo de vitória ao sair de condições que não favoreciam sua trajetória acadêmica, lutando pela sabedoria e conhecimento, seus ensinamentos e suas pegadas, vou tentar trilhar o meu caminho em paralelo;

À minha amada mãe, Ivonalda Costa Silva, que, com seu exemplo de vitoriosa, a cada manhã deu-me forças para prosseguir sempre que me deparei com dificuldades, que achei que não iria transpassar;

À minha querida irmã, que sempre foi meiga e amável, mesmo quando eu não correspondia a tanto amor. Minha família, vocês são minha raiz pivotante e vocês formam aos meus olhos um quadro colorido em uma parede cinza. Gostaria de agradecê-los por tanta confiança e crença em minha capacidade e dizer que vos amo muito;

Gostaria de agradecer à minha namorada Kalliene Lira Tavares de Sousa, por ter tido paciência nessa fase em que fiquei enclausurado, por ser confidente, por ser mais que uma amante, uma verdadeira amiga, que me forneceu ótimas conversas intermináveis, gargalhadas e principalmente amor, em tempos em que isso parecia em escassez; meu amor, eu te digo, muito obrigado;

Ao meu professor Dr. Rafael Trindade Maia, pela orientação e por ter aberto as portas para o mundo da pesquisa científica, sendo o principal personagem que me permitiu ingressar nesse universo, sempre clareando as sombras de dúvidas que surgiam no meu caminho e sempre atiçando minha curiosidade. Sou extremamente grato por seu apoio e dedicação, muito obrigado;

Gostaria de agradecer ao Biomat, o grupo de modelagem de biomateriais do DQF (Departamento de química fundamental) da UFPE, por sua contribuição de fundamental importância para o presente trabalho;

Agradeço a todos os professores e funcionários do CDSA-Sumé, pois todos, sem exceção, tiveram papel fundamental em minha trajetória acadêmica em Sumé. Em especial, gostaria de agradecer ao professor José Ranoel e à professora Magnólia A. Campos, que contribuíram muito para o aperfeiçoamento deste trabalho;

À cidade de Sumé, por ter me ajudado a crescer e amadurecer nesse tempo de curso.

Àqueles que contribuíram para meu aprendizado na vida universitária e na minha vida pessoal. Em especial, agradeço a três principais personagens que levarei para sempre, depois desse capítulo de minha vida, que são: Gérsia Gonçalves de Melo, primeiramente por sua fundamental ajuda acadêmica, pondo combustível em minha mente, pelos calos que inclusive o presente trabalho fizeram em suas mãos, posteriormente sendo também uma figura que com simplicidade promoveu momentos épicos de descontração, gostaria de homenageá-la com singelo muito obrigado; Emanuele Cardoso Dias, por ter me dado auxílio e sido meu café em madrugadas lavadas de estudo e muita luta acadêmica, sendo minha companhia de cafés (quase) revigorantes para mais um dia em pé, e também minha amiga de cervejas com seu estoque ilimitado de sorrisos que me deixavam de bom humor ao mergulhar em nossas animadas conversas, gostaria de prestar um muito obrigado como uma forma de homenageá-la; Leandro da Costa Clementino, com quem tanto aprendi exemplo de pessoa, e tanto mais gostaria de ter aprendido, meu caro ex-vizinho e irmão, uma humildade proporcional a sua grandeza foi uma mensagem que você deixou para mim em nossas tardes de feijoada, de cerveja e muita conversa, nutrindo uma amizade que cresceu e espero para sempre levar, deixo-te meu muito obrigado por tudo.

Às pessoas que também fizeram parte desta minha trajetória, Édipo da Silva Almeida, Hemerson R. Viana, é muita história para contar, e muitas adversidades que enfrentamos. Muito obrigado por terem contribuído em minha vida, seja com uma conversa ou com nossos grupos de estudo, vocês foram fundamentais nessa luta que tivemos.

Agradeço também a compreensão de Ariel e Stefano, meus amigos de infância, por terem entendido minha ausência por tanto tempo, sem nunca esquecer de mim, muito obrigado por essa amizade genuína, e a meus amigos de treinos, Vanklin e Damina, sempre me ajudando a manter o equilíbrio entre mente e corpo;

Aos demais que tornaram minha estadia em Sumé uma experiência ainda mais proveitosa para meu crescimento pessoal, Édna Lúcia (Teté), Doda Ferreira, Cláudia Bezerra. vocês que me acolheram como se fossem meus familiares, me deixaram entrar em vossas casas como se fosse em minha própria casa. Vocês me estenderam a mão transformando uma estadia que seria uma experiência assustadora (pois eu havia acabado de sair do conforto de casa, para morar só em uma cidade completamente desconhecida por mim até então) em uma experiência suave e extremamente proveitosa. Este lugar, graças a pessoas como vocês, se

tornou algo que mais tarde veio a ser o lugar que chamei de lar. Foram vocês que fizeram de minhas dificuldades algo suportável, e aliviaram até minhas limitações físicas, e assim deram motivos para que eu prosseguisse até o fim de minha jornada. Mesmo que neste momento esta seja apenas uma humilde demonstração de gratidão, me permitam dizer o meu muito obrigado.

Muito obrigado!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin - O grande ditador

RESUMO

O arroz é uma cultura de grande interesse e importância mundial, tanto na esfera agroindustrial quanto nutricional, sendo inclusive intitulada fonte primária do *layout* nutricional de países asiáticos em desenvolvimento, mas estudos para minimizar os problemas intrínsecos ao cultivo desta cerealífera ainda são escassos. Sabe-se que a superfamília de enzimas *glutathione S-transferases* (GSTs) confere em arroz (*Oryza sativa*) proteção a estresse biótico e abiótico e que sua estrutura tridimensional, que em estudos de natureza proteômica servem para identificar a funcionalidade da proteína, ainda não foi elucidada. Nesse contexto, o presente trabalho busca contribuir para a solução desta problemática, cujo desenvolvimento se deu numa sequência de três etapas gerais, complementares entre si, quais sejam: construção de um modelo teórico válido para a proteína *glutathione-S-transferase classe Tau4* de *Oryza sativa* (OsGSTU4) em plataforma computacional, por meio de modelagem por homologia. Para isso, usou-se como *template* (molde) uma sequência de uma GSTs classe Tau 4 de trigo (*Aegilops tauschii*) (AtGSTU4) por ser uma sequência ortóloga a OsGSTU4; estudo da natureza funcional da proteína modelada, em que foi simulado o processo de ligação por meio do programa AUTODOCK 1.5.6, entre a proteína e ligantes (herbicidas Bentazon e Metsulfuron), no qual foi verificado, como resultado, processo de conjugação entre a proteína e o herbicida Metuslfuron, evidenciando o processo de desintoxicação do herbicida por meio da rota metabólica da proteína OsGSTU4; análise da dinâmica (atomística) molecular por meio de simulação computacional, de forma que possibilitou observar, numa fração de tempo, os movimentos de grande amplitude por meio de Análise de Modos Normais (NMA) pelo servidor ÉLNemo e movimentos de grande e média amplitude por meio do pacote de programa GROMACS. O conjunto de técnicas desta última etapa permitiu avaliar a cinética estrutural ao longo de toda a cadeia da proteína e evidenciar a estabilidade da estrutura, revelando que o modelo obtido pela primeira etapa da metodologia apresenta-se em seu estado nativo. Conclui-se que o modelo obtido apresenta alta confiabilidade estrutural, estabilidade físico-química e revela potencial de ação catalítica para os herbicidas estudados. Além disso, os resultados forneceram dados que podem auxiliar posteriores pesquisas visando o desenvolvimento de tecnologias voltadas para outras culturas agronomicamente importantes, como o arroz.

Palavras chave: Modelagem. OsGST. *Oryza sativa*. Docking. Dinâmica Molecular.

ABSTRACT

Rice is one of the most important crops in the world, and this includes the fact that's being called the primary source of nutritional layout in developing countries in Asian developing countries, however there are few studies of agro-industrial and technological bias for rice. It is known that the superfamily of s-transferase enzymes glutathione (GST) confer rice (*Oryza Sativa*) protection to biotic and abiotic stress and its three dimensional structure, which in proteomics studies serve to identify the protein functionality, that have not been elucidated. In this context, this work aims to contribute to solution of this problem and has been developed in a sequence of three general complementary steps, which are: construction of a valid theoretical model for glutathione-S-transferase protein Tau4 class oriza Sativa (OsGSTU4) in computational platform through homology modeling, for which was used a wheat template sequence of one GSTs Tau 4 *Aegilops tauschii* (AtGSTU4) ortholog sequence to the OsGSTU4; Study of the functional nature of the patterned protein, which the binding process between the protein and ligands (herbicides, Bentazon and Metsulfuron), that was simulated in AutoDock 1.5.6 program, which was found as a result of the conjugation process between protein and Metuslfuron herbicide, showing the herbicide detoxification process by metabolic route OsGSTU4 protein; dynamic (atomistic) analysis through computer simulation enabling to observe, in a fraction of time, the movements of large amplitude by Normal Mode Analysis (NMA) by ÉINemo server and large movements and average amplitude through GROMACS program package. The set of techniques of this latter step allows to evaluate the structural kinetic throughout the protein chain and show the structure stability, revealing that the model obtained by the first step of the methodology presented itself in its native state. We conclude that the model obtained in the first methodology step shows high structural reliability, physical and chemical stability and reveals catalytic action potential for the studied herbicides. In addition, the results provide data that can aid further research aimed at developing technologies for agronomically important crops such as rice.

Keywords: Modeling. OsGST. oriza Sativa. Herbicide. Docking. Molecular Dynamics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Visualização dos sítios de ligação do bentazon (inibidore do fotossistema II) ao complexo protéico QB na membrana dos cloroplastos.	24
Figura 2. Visualização das rotas de síntese de aminoácidos, esquematizando a interrupção (indicado pelo “X” vermelho) da rota do ALS (acetolactato sintase), ocasionada pelas sulfoniluráias.	26
Figura 3. Esquematização química da GSH.	27
Figura 4. Esquematização da biossíntese da Glutathiona.	29
Figura 5. Formação Complexo Proteína- Ligante.	32
Figura 6. Representação dos termos dos campos de forças utilizados em dinâmica molecular clássica. Em (a): energia potencial da distância de ligação, (b): energia potencial das flexões angulares, (c): energia potencial das torsões, (d): interações não-ligantes.	35
Figura 7. Alinhamento entre as sequências da OsGSTU4 e AtGSTU4. Estão representadas regiões idênticas (*), mutações conservativas (:) e mutações semiconservativas (.). Traços representam gaps.	42
Figura 8. Diagrama de Ramachandran com 91,9% dos resíduos situados nas regiões mais favoráveis (vermelho), 7,3% em regiões permitidas (amarelo), 05% em regiões generosamente permitidas (creme) e 0,3% em regiões proibidas (branco).	43
Figura 9. Quality Mean Score para 6 parâmetros a proteína OsGSTU4.	44
Figura 10. Gráfico do Z-score e QMEAN para a OsGSTU4.	44
Figura 11. Distribuição do Z score.	45
Figura 12. Visualização e caracterização do primeiro resultado para o metsulfuron obtido por meio do programa autodock.	48
Figura 13. 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”).	48
Figura 14. Visualização e caracterização do segundo resultado para o metsulfuron obtido por meio do programa autodock.	49
Figura 15. 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”).	50
Figura 16. Visualização e caracterização do terceiro resultado para o metsulfuron	51

obtido por meio do programa autodock.

Figura 17. 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”). **51**

Figura 18. Visualização e caracterização do primeiro resultado para o bentazon obtido por meio do programa autodock. **52**

Figura 19: 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”). **53**

Figura 20. Visualização e caracterização do segundo resultado para o bentazon obtido por meio do programa autodock. **54**

Figura 21. 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”). **54**

Figura 22. Visualização e caracterização do terceiro resultado para o bentazon obtido por meio do programa autodock. **55**

Figura 23. 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”). **56**

Figura 24. RMSF para o 1º autovetor obtido no *Élnemo*. RMSF calculado para átomos do esqueleto da proteína (*backbone*) **57**

Figura 25. Representação dos resíduos de maior flutuação, em duas perspectivas diferentes sobre o mesmo ponto (“a” e “b”). **58**

Figura 26. Matriz de flutuações das distâncias entre átomos do Carbono alfa entre todos os pares de resíduos, obtida pelo *Élnemo*. **58**

Figura 27. RMSD para átomos do carbono alfa. **59**

Figura 28. Raio de giro para a GST **60**

Figura 29. Gráfico de Superfície de Acessibilidade ao Solvente. **61**

Figura 30. RMSF do backbone da proteína. **62**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação do arroz pelo sistema de classificação botânica de Heinrich Gustav Adolf Engler e Arthur John Cronquist	18
Tabela 2. As dez mercadorias mais produzidas no Brasil no ano de 2012	19
Tabela 3. Produção de arroz no mundo em 2005.	20
Tabela 4. Principais plantas daninhas ocorrentes em lavouras de arroz de terras altas e várzeas no Brasil	21
Tabela 5. Principais herbicidas registrados para o controle de plantas daninhas na cultura do arroz destacando-se os herbicidas a serem explorados nesse trabalho (Bentazon e Metsulfuron).	22
Tabela 6. Resultados dos complexos ranqueados pelo autodock no docking do Bentazone	46
Tabela 7. Resultados dos complexos ranqueados pelo autodock no docking do Metsulfuron	47
Tabela 8. Representação de átomos de resíduos próximos pertencentes ao metsulfuron, átomos usados como correspondentes no ligante e suas respectivas distâncias em ângstroms no output número um (1).	49
Tabela 9. Representação de átomos de resíduos próximos pertencentes ao metsulfuron, átomos usados como correspondentes no ligante e suas respectivas distâncias em ângstroms. no output número dois (2).	50
Tabela 10. Representação de átomos de resíduos próximos pertencentes ao metsulfuron, átomos usados como correspondentes no ligante e suas respectivas distâncias em ângstroms . no output número três (3).	52
Tabela 11. Representação de átomos de resíduos próximos pertencentes ao bentazon, átomos usados como correspondentes no ligante e suas respectivas distâncias em ângstroms . no output número um (1).	53
Tabela 12. Representação de átomos de resíduos próximos pertencentes ao bentazon, átomos usados como correspondentes no ligante e suas respectivas distâncias em ângstroms . no output número dois (2).	55
Tabela 13. Representação de átomos de resíduos próximos pertencentes ao bentazon, átomos usados como correspondentes no ligante e suas respectivas distâncias em ângstroms . no output número três (3).	56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Lista de substratos mais comuns das glutionas transferases	28
Quadro 2. Moléculas ligantes utilizadas no experimento de <i>docking</i> molecular.	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOLEA	<i>Atomic Non-Local Environment Assessment</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
GROMOS	<i>Groningen Molecular Simulation</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OsGSTU4	Glutathione-S-Transferase classe tau 4 em <i>Oriza sativa</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PMDB	<i>Protein Model Database</i>
Rmsd	<i>Root mean square deviation</i>
Rmsf	<i>Root mean square fluctuation</i>
VMD	<i>Visual Molecular Dynamics</i>
NMA	<i>Normal Mode Analysis</i>
ElNemo	<i>Elastic Network Model</i>
LGA	<i>Lamarckian Genetic Algorithm</i>
SAS	<i>Superfície de Acessibilidade ao Solvente</i>
Qmean	<i>Quality Mean Score</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Angstrom	Referente a unidade de medida
β	Beta	Referente a energia potencial de ligação
∂	Derivada	Referente ao indicativo de derivação parcial
φ	Fí	Referente a energia potencial torsional
ω	Ômega	Referente a energia potencial dos diedros impróprios
θ	Teta	Referente a energia potencial angular
δ	Delta	Referente a energia potencial angular
π	Pí	Referente a dízima “pí”
E	Épsilon	Referente à energia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO ARROZ.....	18
2.1.1 Importância nutricional do arroz	18
2.1.2 Produção e consumo	19
2.1.3 Ervas daninhas no plantio do arroz e o uso de herbicidas	20
2.1.4 Bentazon/basagran	23
2.1.4.1 <i>Inibidores do fotossistema ii</i>	24
2.1.4.2 <i>Modo de ação</i>	24
2.1.5 Metsulfuron/Ally	25
2.1.5.1 <i>Características gerais do metsulfuron</i>	26
2.1.5.2 <i>Mecanismo de ação das sulfoniluréias</i>	26
2.2 A GLUTATIONA S-TRANSFERASE E SEU PAPEL NA DESINTOXICAÇÃO.....	27
2.3 HOMOLOGIA E PREDIÇÃO ESTRUTURAL POR MEIO DE HOMOLOGIA	29
2.4 DOCKING MOLECULAR.....	31
2.5 DINÂMICA MOLECULAR.....	33
3 METODOLOGIA	37
3.1 CONSTRUÇÃO DO MODELO TRIDIMENSIONAL	37
3.2 REFINAMENTO E VALIDAÇÃO DO MODELO	37
3.3 DOCKING MOLECULAR.....	38
3.3.1 Mineração e preparação dos ligantes e da estrutura do receptor	38
3.3.2 Simulação de docking	38
3.4 ANÁLISE DE MODOS NORMAIS	40
3.5 SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE ESTRUTURAL.....	42
4.2 DOCKING MOLECULAR.....	45
4.3 DINÂMICA MOLECULAR.....	57
4.3.1 Análise de modos normais (nma)	57
4.3.2 Simulação de dinâmica molecular atomística	59
5 CONCLUSÕES	63
6 PERSPECTIVAS	64
REFERÊNCIAS	65
APÊNDICE	73

1 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, sendo inclusive considerada fonte primária do quadro nutricional de países asiáticos em desenvolvimento (NASCIMENTO, 2008). 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 glutathione 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 glutathione a um composto hidrofóbico, tornando-o mais solúvel e menos tóxico (MARRS, 1996), mantendo assim a homeostase celular. Entretanto, a estrutura tridimensional da proteína deste estudo, que em estudos de natureza proteômica serve para identificar a sua funcionalidade, até o momento não foi elucidada.

A construção de moléculas, concomitantemente com a predição de suas características químicas e do seu comportamento, através da execução de uma variedade de cálculos, em meio computacional, é perfeitamente possível com a utilização de recursos da bioinformática. A partir desta informação, e tendo em vista que, o mecanismo evolutivo de duplicação de genes, associado às mutações, leva à diferenciação de moléculas e, conseqüentemente, à formação de famílias de proteínas evolutivamente relacionadas com semelhança estrutural, as proteínas homólogas tendem a conservar a estrutura ancestral visto sua importância para a manutenção da função das proteínas. Assim, pode-se afirmar que as estruturas tridimensionais de proteínas homólogas tendem a se conservar porque a estrutura ancestral comum é crucial para a manutenção da função das proteínas (HÖLTJE et al., 1997).

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 em questão, uma vez que se desenvolve analogamente a um esquema de chave fechadura, no qual se está interessado em descobrir a orientação correta da chave, que proporcionará o encaixe mais favorável e efetivo. Assim, esta técnica pode ser definida como um método de otimização,

que visa descrever a melhor posição de orientação da molécula ao seu ligante. Com esta definição e ponderando-se que ambas as moléculas podem moldar-se durante a interação, a analogia mão-em-luva é mais adequada que chave-fechadura (JORGENSEN, 1991).

Dinâmica Molecular (DM) é uma técnica in-silico que possibilita o entendimento da natureza cinética da molécula alvo, cujo objetivo é descrever movimentos atômicos em um sistema molecular, de forma que permite reproduzir propriedades médias de sistemas líquidos e sólidos. Sua metodologia é fundamentada nos princípios da Mecânica Clássica e fornece informações sobre o comportamento dinâmico microscópico, dependente do tempo, dos átomos individuais que compõem o sistema (BURKERT, et al. 1982).

Pela importância mundial da cultura do arroz, conforme mencionado no início, e a 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 glutathione (OsGSTU4) de arroz (*Oriza sativa*) que confere tolerância a herbicidas à plantas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO ARROZ

Considerado o cereal mais importante do mundo e o alimento primário de mais da metade da população mundial, segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2005), *Oryza Sativa*, comumente conhecido como “arroz”, é uma planta herbácea, de característica hidrófila, cujo processo evolutivo tem levado à sua adaptação às mais variadas condições ambientais (ALMEIDA e BORÉM, 2010).

Oryza é um gênero integrante da família das gramíneas (Poaceae) composto por cerca de 20 espécies, mas apenas *O. sativa*, *O. glaberrima* (uma espécie cultivada na África), em menor quantidade, e o chamado arroz selvagem (*Zizania aquática*), são cultivares produzidas, este último encontrado em grandes lagos dos EUA, sendo entretanto geneticamente mais próximo à aveia do que ao arroz (FAO/INPhO, 1993).

Na Tabela 1 vê-se a classificação botânica do arroz segundo A. Engler e A. Cronquist, apresentada por Castro e Kluge (1999).

Tabela 1- Classificação do arroz pelo sistema de classificação botânica de Heinrich Gustav Adolf Engler e Arthur John Cronquist

Taxonomia	Engler	Cronquist
Divisão	Angiospermae	Magnoliophyta
Classe	Monocotyledonae	Liliopsida
Subclasse	-	Commelinidae
Ordem	Graminales	Cyperales
Família	Gramineae	Poaceae
Gênero	<i>Oryza</i>	<i>Oryza</i>
Espécie	<i>Oryza sativa</i>	<i>Oryza sativa</i>

Fonte: Castro e Kluge (1999).

2.1.1 Importância nutricional do arroz

O arroz é uma das culturas mais importantes no mundo, sendo inclusive nomeada como fonte primária do *layout* nutricional de países asiáticos em desenvolvimento (CHANG e LUH, 1991; NASCIMENTO, 2008).

Como fonte de nutrição, o arroz pode suprir 20% da energia e 15% da proteína necessária diariamente para um adulto, além de fornecer vitaminas, sais minerais, fósforo, cálcio e ferro, sendo, portanto, a mais significativa fonte de energia para metade da população mundial, onde mais de 850 milhões de pessoas em todo o mundo passam fome, com mais de 50% delas vivendo em zonas que dependem da produção do arroz. Em detalhes, informa-se que, no Camboja, o produto representa 73,29% da energia; para a China, 29,99%; para o Japão, 23,06%; na Guiné Bissau é responsável por 42,17%; na Costa do Marfim, por 23,47% e, no Brasil, por 12,09% (CONAB, 2012). No caso do Brasil, o arroz, juntamente com o feijão, constitui, tradicionalmente, o principal alimento da população (IBGE, 2010).

2.1.2 Produção e consumo do arroz

Dados publicados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2012) revelam que o arroz é considerado o terceiro maior cerealífero cultivado no mundo, sendo superado apenas pelo milho e o trigo.

Dados da FAO em 2012 informam ainda que o arroz é nomeadamente a oitava mercadoria mais produzida no Brasil como (visto) se vê na Tabela 2.

Tabela 2- As dez mercadorias mais produzidas no Brasil no ano de 2012

Ordem	Mercadoria	Quantidade (t)	Ordem	Mercadoria	Quantidade (t)
01	Cana de açúcar	721.077.287	06	Laranjas	18.012.560
02	Milho	71.072.810	07	Carne, frango	11.588.139
03	Soja	65.848.857	08	Arroz, paddy	11.549.881
04	Leite, toda vaca fresco	32.304.421	09	Carne, gado	9.399.963
05	Mandioca	23.044.557	10	Bananas	6.902.184

Fonte: FAOSTAT, FAO da ONU (estatística atualizada).

A cultura do arroz é dispersa e produzida em todo o mundo, sendo que nesse panorama produtivo o Brasil se destaca como o nono maior produtor mundial da cultura (WANDER, 2006), caracterizando-o como um dos principais produtores do ocidente (Tabela 3). O Brasil, todavia, direciona majoritariamente sua produção para o abastecimento do mercado interno, o que corrobora para a independência das cotações nacionais frente o mercado internacional (SANTOS JÚNIOR, 2015).

Tabela 3- Produção de arroz no mundo em 2005.

País	Tonelada	Participação (%)
China	185.454.000	30,0
Índia	129.000.000	20,9
Indonésia	53.984.592	8,7
Bangladesh	40.054.000	6,5
Vietnã	36.341.000	5,9
Tailândia	27.000.000	4,4
Myanmar	24.500.000	4,0
Filipinas	14.800.000	2,4
Brasil	13.140.900	2,1
Demais países	93.666.587	15,1
Total	617.941.079	100

Fonte: FAO (2006).

O consumo per capita de arroz no Brasil chegou a alcançar patamares de 57,5 kg/hab/ano, base casca, na década de 70, mas, em 2002, esse consumo foi reduzido para cerca de 52,5 kg/hab/ano. Essa redução é atribuída ao longo do tempo, a vários fatores, entre os quais se destacam: a substituição do arroz por fontes de proteína de origem animal e a mudança de hábito alimentar com o advento do *fast food*. Deve-se considerar ainda que no Brasil há variações regionais na quantidade consumida (WANDER, 2006).

2.1.3 Ervas daninhas no cultivo do arroz e o uso de herbicidas

Plantas daninhas são consideradas o principal fator limitante no cultivo do arroz por competirem diretamente por todos os recursos, como luz, água e nutrientes, inerentes a um desenvolvimento saudável (ANTIGUA et al., 1990). Além disso, plantas daninhas podem promover decréscimo na qualidade do produto colhido e dificultar a realização da colheita da cultura (CARDOSO et al., 2010; FREITAS, 2003).

A evolução que estas plantas tiveram com a agricultura, é marcada pela adesão de características que permitiram sua coexistência nas culturas e até mesmo ocupando nichos ecológicos não explorados pela planta cultivada. Tal processo evolutivo permitiu que as plantas daninhas adquirissem características biológicas de grande agressividade (GALLI,

2005). As principais plantas daninhas distribuídas quanto à forma de plantio do arroz se encontram na Tabela 4.

Tabela 4- Principais plantas daninhas ocorrentes em lavouras de arroz de terras altas e várzeas no Brasil.

Ervas Daninhas		Classificação do Sistema de cultivo	
Nome Científico	Nome vulgar	Terras Altas	Várzeas
<i>Acanthospermum australe</i>	Carrapicho-rasteiro	X	X
<i>Acanthospermum hispidum</i>	Carrapicho-de-carneiro	X	X
<i>Aeschynomene spp</i>	Angiquinho		X
<i>Ageratum conyzoides</i>	Mentrasto	X	X
<i>Amaranthus spp</i>	Caruru	X	X
<i>Brachiaria decumbens</i>	Capim-braquiária	X	X
<i>Brachiaria plantaginea</i>	Capim-marmelada	X	X
<i>Cenchrus echinatus</i>	Capim-carrapicho	X	X
<i>Commelina spp</i>	Trapoeraba	X	X
<i>Cynodon dactylon</i>	Gramma-seda	X	X
<i>Cyperus rotundus</i>	Tiririca	X	X
<i>Digitaria horinzontalis</i>	Capim-colchão	X	X
<i>Eleusine indica</i>	Capim-pé-de-galinha	X	X
<i>Emilia sonchifolia</i>	Falsa-serralha	X	X
<i>Euphorbia heterophylla</i>	Leiteira	X	X
<i>Ipomoea spp</i>	Corda-de-viola	X	X
<i>Ludwigia longifolia</i>	Cruz-de-malta		X
<i>Ludwigia octovalvis</i>	Cruz-de-malta		X
<i>Nicandra physaloides</i>	Joá-de-capote	X	X
<i>Pennisetum setosum</i>	Capim-custódio	X	
<i>Portulaca oleracea</i>	Beldroega	X	X
<i>Richardia brasiliensis</i>	Poaia-branca	X	X

Fonte: Adaptado de Cobucci (2006).

Na cultura do arroz, sabe-se que por muito tempo não foi tratado como relevante o controle de plantas daninhas, por ser uma cultura de áreas abertas, livres de invasoras, situação em que nenhuma medida de controle torna-se necessária. Entretanto, é reconhecido que há carência de tecnologias e produtos voltados para o controle de plantas daninhas em

arroz, em rotação com culturas comerciais como, por exemplo, soja e milho, problema que, somado à baixa capacidade de competição do arroz com plantas daninhas, constitui um dos principais obstáculos para a introdução dessa cultura em sistemas agrícolas já instalados há várias safras de grãos em solos corrigidos (COBUCCI, 2006).

O manejo de plantas daninhas pode ser feito de forma direta, na qual as atividades são direcionadas à eliminação das plantas daninhas por métodos químicos, mecânicos, manuais e biológicos, sendo na monocultura do arroz o controle químico a forma mais importante de manejo de plantas daninhas, onde são aplicados múltiplos herbicidas na área cultivada (COBUCCI, 2006). Os principais herbicidas aplicados na cultura do arroz estão relacionados na Tabela 5.

Tabela 5- Principais herbicidas registrados para o controle de plantas daninhas na cultura do arroz, destacando-se os herbicidas a serem explorados nesse trabalho (Bentazon e Metsulfuron).

Nome técnico (nome comercial)	Plantas controladas
<i>Oxadiazon</i> (Ronstar 250BR) (Ronstar SC)	Gramíneas e algumas folhas largas
<i>Pendimethalin</i> (Herbadox 500CE)	Gramíneas e algumas folhas largas
<i>Oxyfluorfen</i> (Goal BR)	Gramíneas e algumas folhas largas
2,4-D (vários)	Folhas largas
<i>Bentazon</i> (Basagran)	Folhas largas
<i>Fenoxaprop-p-ethyl</i> (Starice) (Whip S)	Gramíneas
<i>Trifluralin</i> (Premerlin 600 CE)	Gramíneas
<i>Clomazone</i> (Gamit 500 CE)	Algumas gramíneas e folhas largas
<i>Metsulfuron</i> (Ally)	Folhas largas
<i>Clefoxydim</i> (Aura)	Gramíneas
<i>Cyhalofop-butyl</i> (Clincher)	Gramíneas
<i>Ethoxysulfuron</i> (Gladium)	Ciperáceas

Fonte: Adaptado de Cobucci (2006).

Nesta forma de manejo, devido à fitotoxicidade dos compostos utilizados, os herbicidas atingem também a cultura. Em um experimento conduzido para avaliação do efeito do herbicida glifosato (*glyphosate*), um agente de amplo espectro e comumente utilizado em monoculturas de arroz revelou diversos efeitos contraproducentes, tais como: diminuição da altura, número de filhos aférteis, e perdas de grãos de até 63% em *O. sativa* (FERREIRA et al., 2006). Além dos agravos causados pelo glifosato, outros fatores de natureza biótica ou

abiótica, associados ao estresse, levam à produção de radicais livres, essencialmente as espécies reativas do oxigênio. Esses radicais são responsáveis por danos possivelmente irreversíveis, em componentes celulares, caracterizando estresse oxidativo (CHAGAS R. M., 2007).

Segundo Oliveira (2011), os principais mecanismos de atuação dos herbicidas remetem-se a: mimetizadores da auxina, inibidores de fotossíntese, inibidores de divisão celular, inibidores da PROTOX, inibidores da síntese de carotenoides, inibidores da síntese de lipídeos e inibidores da síntese de aminoácidos.

Tendo em vista os mecanismos de atuação previamente descritos, os herbicidas abordados nesse trabalho pertencem as classes, “inibidores de fotossíntese” e “inibidores de síntese de aminoácidos”.

2.1.4 Bentazon/Basagran®

O Bentazon é um herbicida da classe das benzotiazinonas, de efeito localizado, que, após absorvido, interfere na fotossíntese sendo, portanto, um inibidor da fotossíntese do fotossistema II, incidindo na paralisação da síntese de carboidratos nas áreas foliares que receberam tratamento, podendo ocasionalmente acarretar na morte das plantas, principalmente quando estas se encontram em fase inicial de desenvolvimento.

Algumas espécies apresentam resistência a este herbicida, a exemplo das gramíneas, leguminosas e algumas outras espécies, apresentando capacidade de fixar ou mesmo desativar o produto absorvido, podendo apresentar alguns sintomas de fitotoxicidade no início do tratamento, como amarelecimento e necrose das folhas, mas retomando seu desenvolvimento normal após o processo de desativação do produto, sem qualquer incidência negativa sobre o caráter produtividade das plantas. Em contraposto, não participam desta classe de resistência, apresentando suscetibilidade, muitas espécies ciperáceas, algumas espécies de monocotiledôneas e muitas dicotiledôneas (BASF SE, s.a).

2.1.4.1 Inibidores do Fotossistema II

Estes compostos possuem ação seletiva e atuam inibindo a evolução do oxigênio através da presença de água nos cloroplastos e um aceptor de elétrons adequado, sendo conhecidos por tal propriedade como inibidores da síntese de Hill, visto que impedem a fotólise da água. Amplamente utilizados em diversas culturas, estes inibidores constituem

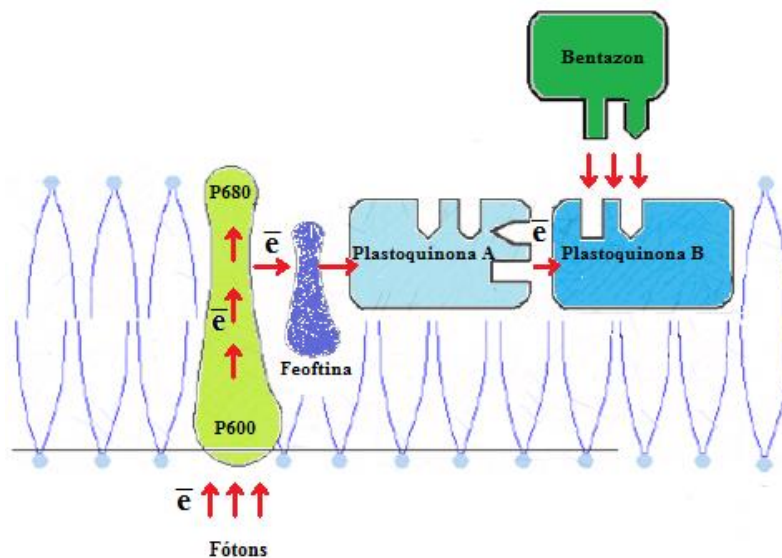
desde sua descoberta na década de 50 até hoje, um dos grupos de herbicidas de mais acentuada importância. O atrazine, por exemplo, foi introduzido na década de 60 e apresentou um efeito demasiadamente positivo na produção de milho, tornando possível o controle de folhas largas nesta cultura com alta confiabilidade.

O mecanismo de ação dos inibidores de fotossíntese consiste na remoção ou inativação de carregadores intermediadores do processo de transporte de elétrons (OLIVEIRA, 2011), sendo por tal motivo, considerados inibidores do transporte de elétrons (BALKE, 1985).

2.1.4.2 *Modo de ação dos inibidores do fotossistema II*

O mecanismo inibitório da fotossíntese resulta no bloqueio do transporte de elétrons entre QA e QB como mostra a Figura 1.

Figura 1- Visualização dos sítios de ligação do bentazon (inibidor do fotossistema II) ao complexo protéico QB na membrana dos cloroplastos.



Fonte: Adaptado de Oliveira (2011) apud Gressel (1985).

O bloqueio mencionado se dá através da ligação dos herbicidas ao sítio ativo da QB, na proteína D1 pertencente ao fotossistema II, com localização nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos. Esse processo interrompe a fixação de CO₂ e interfere na produção de elementos indispensáveis ao crescimento das plantas, como ATP e NADPH₂, no entanto, a morte das plantas geralmente ocorre por outros fatores (OLIVEIRA, 2011).

Inicialmente, os primeiros trabalhos consideraram que as plantas eram induzidas a morte pelo processo de inanição, que seria ocasionado pela inibição da reação luminosa da fotossíntese. Posteriormente, constatou-se que as plantas morrem mais rápido na presença do que na ausência de luz, evidenciando que o herbicida promove algo além da inibição da fotossíntese. Nesse sentido, sugeriu-se que a clorose foliar demonstrada após o tratamento correspondesse a um processo peroxidativo de lipídeos, visto que a oxidação dessas moléculas acarreta no rompimento de membranas, que por sua vez incide na desidratação e desintegração de células e organelas. Devido sua propriedade autocatalítica, a peroxidação de lipídeos se dissemina rapidamente para outros lipídios presentes na constituição de membranas, assim como cloroplastos e outras estruturas celulares, promovendo a destruição destas membranas e a perda de clorofila (BARTELS, 1985).

A interrupção do fluxo de elétrons no fotossistema II promove uma significativa elevação do estado energético da clorofila, resultando em um estado denominado *triplet*, que acarreta em uma sobrecarga do efeito de atenuação de energia oriundo dos pigmentos carotenoides e caracteriza o processo de peroxidação. Segundo Dan Hess (1994), a peroxidação de lipídios devido ao excesso de clorofila triplet pode ocorrer através de dois mecanismos, quais sejam: formação direta de radicais lipídicos em moléculas insaturadas de ácidos graxos constituintes das membranas ou produção de oxigênio singlet através da reação da clorofila triplet com oxigênio. Em ambos os casos, o processo de peroxidação irá corroborar com danos às membranas celulares.

2.1.5 Metsulfuron/Ally®

O herbicida metsulfuron pertencente ao grupo das sulfoniluréias e atua sobre a enzima acetolactato sintase (ALS), conseqüentemente inibindo a síntese dos aminoácidos leucina, vanila e isoleucina, interferindo por sua vez na síntese de proteínas e induzindo a morte da planta por interferir na divisão celular. Dentre suas propriedades relata-se que Ally possui ação sistêmica e é rapidamente absorvido por toda planta, além de apresentar seletividade para as culturas para qual é recomendado seu uso (DU PONT AGRICULTURAL CARIBE INDUSTRIES, 2014).

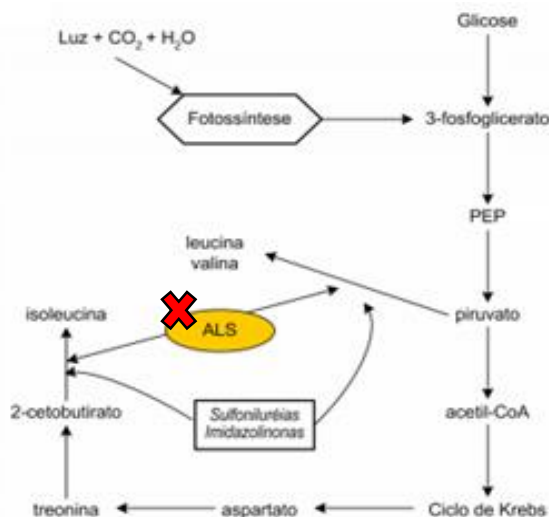
2.1.5.1 Características gerais do metsulfuron

A empresa química americana Dupont® é a reponsável pela descoberta da família das sulfoniluréias. Este grupo de herbicidas são muito relevantes por apresentarem níveis de atividade consideráveis em doses baixas de aplicação e o primeiro produto comercial foi desenvolvido em 1981, o chlorsulfuron, no entanto ressalta-se que este não possuía registro para utilização no Brasil. A translocação das moléculas deste grupo pode ocorrer via apoplasto e simplasto, sendo estas ativas tanto via folhas quanto solo e as interações entre as culturas e plantas daninhas promovem a ocorrência de diferentes especificidades dos produtos, no que se refere a seletividade, época de aplicação e também culturas nas quais sua utilização é recomendada (OLIVEIRA, 2011).

2.1.5.2 Mecanismo de ação das sulfoniluréias

Como já mencionado, o grupo das sulfoniluréias atua inibindo a ação da enzima acetolactato sintase, como mostra a Figura 2, interrompendo a síntese de aminoácidos importantes.

Figura 2- Visualização das rotas de síntese de aminoácidos, esquematizando a interrupção (indicado pelo “X” vermelho) da rota do ALS (acetolactato sintase), ocasionada pelas sulfoniluréias.



Fonte: Adaptado de Vargas et al (1999).

Em plantas suscetíveis, a absorção deste herbicida resulta inicialmente na paralisação do crescimento, devido à rápida translocação das moléculas deste grupo para os meristemas e ápices e, posteriormente, a morte é inevitável, considerando-se impossibilidade da biossíntese

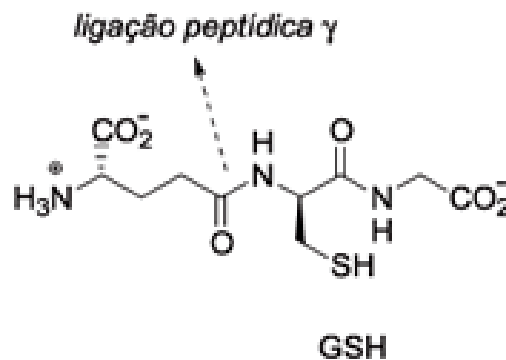
de aminoácidos essenciais à planta. Este mecanismo de ação, baseado na inibição de ALS é elucidado em trabalhos realizados e publicados por Schloss (1990) e Durner et al (1991).

2.2 A GLUTATIONA S-TRANSFERASE E SEU PAPEL NA DESINTOXICAÇÃO

As Glutathione S-transferases (GSTs) denotam uma superfamília de proteínas catalíticas e ligantes que estão presentes em quase todos os seres vivos, estando distribuídas em uma grande diversidade de organismos aeróbicos, que vão de bactérias a humanos (FROVA, 2003, 2006). Elas estão envolvidas em diversos processos biológicos, apresentando, por sua vez, relevante importância na manutenção da homeostase celular (FREITAS et al, 2008).

As GSTs geralmente se encontram no meio biológico como homo ou heterodímeros, havendo a possibilidade da existência de complexos, apresentando em geral dois sítios ativos por dímero os quais exprimem atividades independentes uma da outra. Cada sítio ativo consiste no mínimo de dois sítios de ligação, um para a glutathione GSH (Figura 3) que é muito específico para este tripeptídeo, e outro sítio de ligação que apresenta uma menor especificidade para os eletrófilos (DANIELSON, 1985).

Figura 3- Esquematização química da GSH.

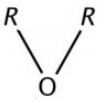
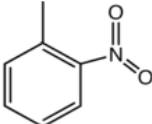
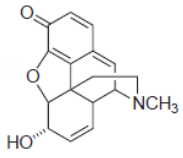
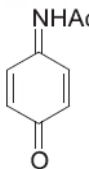
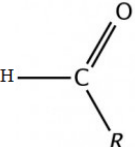
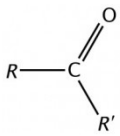
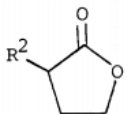
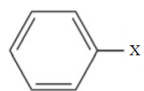


Glutathione, γ -L-glutamyl-L-cisteinilglicina

Fonte: Adaptado de Huber et al. (2007).

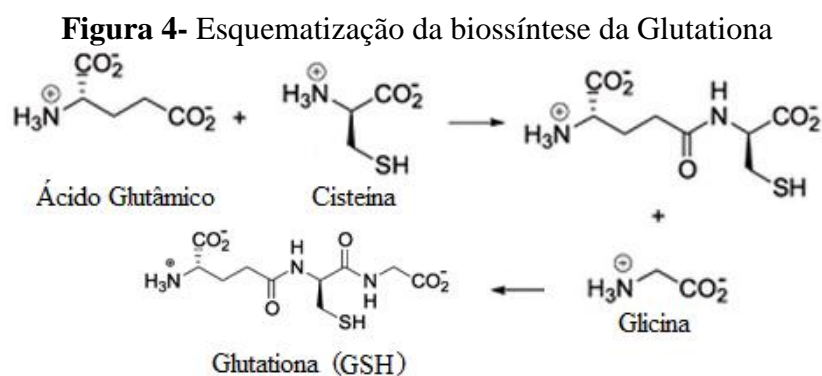
Os substratos (eletrófilos) mais comuns das glutathione transferases incluem: haletos de alquila, epóxidos, compostos α,β -insaturados (como quinonas, iminoquinonas, aldeídos, cetonas, lactonas e ésteres), haletos de arila e nitro aromáticos (KEEN, 1978 e SHEEHAN, 2001). No Quadro 1 podem ser vistos os substratos mais comuns.

Quadro 1- Lista de substratos mais comuns das glutionas transferases.

Haleto de Alquila	$R-N$	Epóxidos, óxidos ou éteres de cadeia fechada	
Nitro aromáticos		Quinonas	
Iminoquinonas		Aldeído	
Cetona		Lactona	
Ésteres	$R-C(=O)-O-R'$	Haleto de Arila	

Fonte: Adaptado de Ruest (1988); Ricardo (2012); Huber (2008); Solomons (1986); Ricardo A.J. et al. (2012).

Sua biossíntese ocorre no meio intracelular através da atuação de duas enzimas que fazem a ligação peptídica entre os aminoácidos envolvidos, dividida em duas etapas, na seguinte ordem: primeiramente a biossíntese, que se inicia com a catalisação da ligação peptídica dos aminoácidos ácido glutâmico e cisteína, feita pela enzima γ -glutamilcisteína sintetase; logo após, este dipeptídeo liga-se a glicina pela reação da enzima glutiona sintetase, conforme mostra a Figura 4 (HUBER et al., 2007)



Fonte: Adaptação de Huber et al. (2007).

Muitas funções destas enzimas já foram descritas na literatura, correspondentes a sua forma de atuação nos diferentes organismos em que estão dispostas. Tais relatos correspondem principalmente aos seguintes aspectos: tolerância ao estresse oxidativo (KAMPRANIS, 2000); transporte de produtos secundários tóxicos (MUELLER et al., 2000); sinalização da célula durante respostas a à estresse (LOYALL et al., 2000) e tolerância a herbicidas (RANSON; PRAPANTHADARA; HEMINGWAY, 1997).

As enzimas GSTs apresentam um espectro amplo de especificidade, acarretando em sua efetiva propriedade de metabolização de diversos componentes tóxicos, tanto de caráter hidrofóbico quanto hidrofílico, caracterizando-as como as principais proteínas da fase II do processo de detoxificação, no qual participam ativamente do metabolismo de compostos de origem endógena ou exógena (ENAYATI; RANSON; HEMINGWAY, 2005).

Edwards et al (2005), evidenciaram que a enzima GST está associada à acentuada tolerância de diversas culturas aos efeitos danosos de herbicidas, atuando na promoção da resistência de, principalmente, gramíneas a estes produtos químicos. O processo metabólico de desintoxicação das plantas, em algumas culturas, é ativado pela enzima como uma resposta direta à atuação dos herbicidas.

De forma geral, o processo de detoxificação consiste inicialmente na reação catabólica, promovida pela glutathione S-transferase, de transferência do tripeptídeo glutathione na forma reduzida (GSH) para substratos tóxicos, resultando em compostos solúveis e menos tóxicos à célula, que em seguida são transportados para o vacúolo (MARRS, 1996).

2.3 HOMOLOGIA E PREDIÇÃO ESTRUTURAL POR MEIO DE HOMOLOGIA

O mecanismo evolutivo de duplicação de genes, associado às mutações, leva à diferenciação de moléculas e, conseqüentemente, à formação de famílias de proteínas evolutivamente relacionadas com semelhança estrutural. Nesse contexto, proteínas derivadas de um ancestral comum são ditas homólogas (HÖLTJE et al., 1997).

Em função da quantidade de mutações ocorridas no decorrer dessa evolução, as sequências de aminoácidos de proteínas homólogas podem ser idênticas, semelhantes ou diferentes e, conseqüentemente, a semelhança entre as sequências de aminoácidos em proteínas homólogas, expressa pelo percentual de identidade, é menos preservada do que a semelhança de estruturas tridimensionais. Pode-se, portanto, concluir que as estruturas

tridimensionais de proteínas homólogas tendem a se conservar porque a estrutura ancestral comum é crucial para a manutenção da função das proteínas (HÖLTJE et al., 1997).

A conservação de resíduos em proteínas homólogas é um fenômeno notável. Sequências de resíduos de aminoácidos de proteínas com cerca de 30% de identidade (apenas), podem ter sobreposição das cadeias principais de ótima qualidade ("*protein backbone*"), com desvios de mínimos quadrados ("*rmsd*") da ordem de 2 Å, comparáveis aos valores de "*rmsd*" da ordem de 0,7 Å encontrados em proteínas idênticas em diferentes formas cristalinas (CHOTHIA et al., 1986) e da ordem da resolução da estrutura cristalográfica de muitas das proteínas que estão disponíveis no PDB, o principal banco de dados de estruturas terciárias de proteínas (SANTOS FILHO et al., 2003). As estruturas terciárias de proteínas estão profundamente relacionadas à função das moléculas, de forma que, sua determinação é parte fundamental no estudo das proteínas (SOUZA, 2008).

É importante enfatizar que a conservação da estrutura terciária de proteínas homólogas não é um fenômeno intrínseco das proteínas, mas sim uma consequência da evolução, regida por restrições funcionais, o que levaria, por exemplo, à mudança randômica de 70% dos aminoácidos constituintes de uma proteína certamente a uma mudança conformacional e possível perda da função (BENNER et al., 1997).

A Modelagem Molecular caracteriza-se como uma importante e necessária ferramenta para a compreensão da química, oferecendo recursos que permitem investigar, interpretar, explicar, descobrir e disseminar novos fenômenos desta ciência. O software atualmente disponível para execução desta ferramenta denota facilidade de utilização, entretanto, tal fato não implica que um usuário sem embasamento teórico e prático adequado na área conseguirá executá-lo de forma efetiva, visto que a obtenção do modelo correto, assim como uma interpretação apropriada do mesmo, remete eminente dificuldade (NADENDLA, 2004).

De forma geral e sinóptica, a Modelagem Molecular descreve o emprego de computadores na construção de moléculas, concomitantemente com a predição de suas características químicas e do seu comportamento, através da execução de uma variedade de cálculos. Esta concepção genérica comumente acarreta na utilização deste termo como sinônimo da Química Computacional, no entanto, este último detém uma utilização mais ampla e remete-se a qualquer utilização de computadores para o estudo de sistemas químicos (NADENDLA, 2004).

Esta importante ferramenta da bioinformática possui disseminada aplicação, principalmente nos campos da química computacional, ciência dos materiais e biologia, sendo empregada para análise computacional de sistemas moleculares, sejam estes pequenos ou

grandes, conforme os sistemas químicos. As efetuações dos cálculos mais simples poderiam ser de forma manual, mas é evidente que para modelagem molecular de qualquer sistema de tamanho razoável, a utilização de computadores é imprescindível. Em contraposto à química quântica, que permite a descrição dos sistemas moleculares em nível de elétrons, a Modelagem Molecular limita-se à descrição do nível atômico destes sistemas, que por sua vez implica em redução da complexidade dos mesmos, conseqüentemente permitindo que um número maior de partículas seja considerado durante as simulações (MUKESH; RAKESH, 2011).

A elucidação estrutural tridimensional (3D) de proteínas em seu estado terciário, pode ser feita por meio de métodos experimentais convencionais, como cristalografia de raio-x e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), entretanto esses métodos possuem limitações técnicas. A Bioinformática apresenta ferramentas alternativas para que estruturas protéicas possam ser preditas por meio de homologia entre a sequência alvo de interesse e sequências protéicas com estruturas terciárias conhecidas que servirão de modelos (template) (SOUZA, 2008).

2.4 DOCKING MOLECULAR

Uma vez concebidas as estruturas de determinada proteína e de seu respectivo ligante, o *docking* molecular é utilizado como instrumento de predição estrutural do complexo final, resultante da ligação proteína-ligante (Figura 5). O maior desafio para esta ferramenta é o estabelecimento de uma estrutura geometricamente próxima ao complexo nativo, cuja ligação apresente termodinâmica estável, de modo que o programa faz uso de cálculos heurísticos, objetivando tornar o problema solucionável dentro de um prazo razoável. Assim, o *docking* molecular detêm como propósito estabelecer premissas corretas e simplificações aceitáveis, que forneçam uma predição adequada e precisa de um modelo para interação proteína-ligante em estudo (ABRAHAM, 1998).

Figura 5- Formação Complexo Proteína- Ligante.



Fonte: Adaptado de Mukesh e Rakesh (2011).

Na esfera da modelagem molecular, o *docking* caracteriza-se, conceitualmente, como um método que possibilita o prenúncio da orientação espacial mais propícia de uma molécula durante a interação com seu respectivo ligante, para obtenção de um complexo estável. Tal conhecimento, por sua vez, permite prever a resistência da associação, revelando a afinidade apresentada entre as duas moléculas. As associações entre biomoléculas importantes, assim como proteínas, ácidos nucleicos, lipídios, entre outros, denotam um papel crítico durante a transdução de sinal e é evidente que a orientação da interação entre estas moléculas com seus concernentes ligantes podem resultar em alterações no tipo de sinal produzido. Em concordância com o relatado, torna-se nítido que a utilização do *docking* molecular permite prever tanto a força da ligação do complexo, quanto o tipo de sinal que será produzido (MUKESH e RAKESH, 2011).

Segundo Jorgensen (1991), o *docking* molecular pode ser comparado analogamente a um esquema de chave fechadura, no qual se está interessado em descobrir a orientação correta da chave, que proporcionará o encaixe mais favorável e efetivo. Assim, esta técnica pode ser definida como um método de otimização, que visa descrever a melhor posição de orientação da molécula ao seu ligante. Entretanto, ponderando-se que ambas as moléculas podem moldar-se durante a interação, a analogia mão-em-luva é mais adequada que chave-fechadura.

A ferramenta de *Docking* molecular foi desenvolvida com o intento de obter estruturas que predigam a geometria mais favorável de interação durante a formação do complexo ligante-receptor, sendo que tal fator está intimamente relacionado à mínima energia de interação. Desta forma, ela permite analisar esta característica através de diferentes funções que pontuam a avaliação eletrostática da vizinhança, soma de choques estéricos, além de outros parâmetros de campo de força, calculando a energia das conformações e interações, através de métodos que abrangem desde mecânica quântica até outras funções totalmente empíricas. Este instrumento dispõe de vários compostos para aquisição do complexo com melhor geometria e segundo Mukesh e Rakesh (2011), de forma geral, o acoplamento dos compostos pode ocorrer basicamente de três formas, conforme se enumera a seguir:

- ***Docking Rígido*** = A geometria mais favorável de ligação é encontrada mantendo-se a rigidez de ambos os compostos, ou seja, sem a necessidade de alterações estruturais em alguma das moléculas;
- ***Docking Semirígido/Semiflexível*** = O sítio ativo do receptor não sofre alterações, no entanto, o ligante é modificado através de torções internas, ocasionadas pelas forças de interação

- **Docking Flexível** = Tanto o ligante quanto o sítio ativo do receptor sofrem modificações estruturais para obtenção de uma geometria mais favorável;

A simulação do processo de *docking* é consideravelmente complexa. Sucintamente, o procedimento consiste em posicionar o ligante e seu receptor separados por certa distância física e, por conseguinte, provocar certo número de movimentos como translações, rotações e alterações na estrutura interna, assim como rotações de ângulo de torção, são provocados para incorporar transformações no corpo rígido das moléculas. Os movimentos promovidos acarretam em custo energético, que infere na energia total do sistema, requerendo, por sua vez, serem calculados ao término do processo. As nítidas vantagens do método remetem-se a relativa facilidade, quando comparado a outras técnicas, em incorporar flexibilidade ao ligante durante a modelagem. Além disto, o processo imita muito bem o que acontece na realidade quando o ligante e o receptor se aproximam após o reconhecimento molecular. Em contraposto, a desvantagem pertinente desta técnica é o tempo requerido para avaliar a ligação, visto que necessita explorar o panorama energético, no entanto este problema já vêm sendo contornado por métodos de otimização (MUKESH e RAKESH, 2011).

2.5 DINÂMICA MOLECULAR

Simulação de Dinâmica Molecular (DM) é uma das técnicas computacionais mais versáteis para o estudo de macromoléculas biológicas (HANSSON et al., 2002; KARPLUS et al., 2002; NORBERG et al., 2003; ALONSO et al., 2006).

A metodologia da DM é fundamentada nos princípios da Mecânica Clássica e fornece informações sobre o comportamento dinâmico microscópico, dependente do tempo, dos átomos individuais que compõem o sistema (BURKERT, et al. 1982; HÖLTJE, et al. 2003).

Segundo Leach, (1991), a metodologia da dinâmica molecular (DM) consegue descrever movimentos atômicos em um sistema molecular e permite reproduzir propriedades médias de sistemas líquidos e sólidos.

Com base na Mecânica Molecular (MM), as moléculas são tratadas como uma coleção de átomos que pode ser descrita por forças newtonianas, ou seja, são tratadas como uma coleção de partículas mantidas unidas por forças harmônicas ou elásticas. Um conjunto completo dos potenciais de interação entre as partículas é referido como “campo de força” (BROOKS III et al, 1988; GUNSTEREN et al, 1990). Para a promoção de cálculos de

movimentos de um sistema de “N” átomos em função do tempo. A força é então obtida a partir da derivação da energia potencial, conforme se mostra a seguir:

$$\bar{F} = - \frac{dV(TOTAL)}{\bar{r} i} \quad (1.0)$$

Onde $i = 1...N$, é o índice dos N átomos no sistema.

Conhecendo-se, portanto, a força e a massa m_i é possível calcular a sua aceleração \bar{a} , usando a segunda Lei de Newton, apresentada a seguir:

$$\bar{F} i = m_i \cdot \bar{a} i, \quad (2.0)$$

Onde a aceleração \bar{a} é definida como a derivada da velocidade em função do tempo, ou seja:

$$\bar{a} i = \frac{d\bar{V} i}{dt} \quad (3.0)$$

Por sua vez, a velocidade é dada pela derivada do deslocamento (posição) em relação ao tempo, como se mostra a seguir:

$$\bar{V} i = \frac{d\bar{r} i}{dt} \quad (4.0)$$

Onde $\bar{r} i$ designa a posição do átomo i .

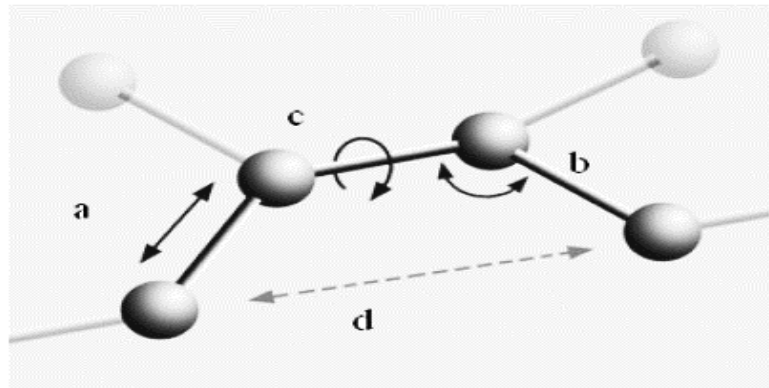
Considerando as definições de velocidade e aceleração demonstradas acima, pode-se deduzir a equação da força, em que a aceleração é dada pela derivada segunda do deslocamento em relação ao tempo, da seguinte forma:

$$\bar{F} i = m_i \frac{\partial^2 \bar{r} i}{\partial t^2}, \quad (5.0)$$

As soluções das equações de movimentos da dinâmica molecular clássica precisam de utilização de campos de forças, que consistem de um conjunto de parâmetros que descrevem as forças atuantes nos átomos da molécula em questão. Um campo de força empírico tal como é conhecido como uma função energia potencial, permite que a energia potencial total do sistema seja calculada a partir da estrutura tridimensional (3D) do sistema. O campo de forças

é descrito como a soma de vários termos de energia e geralmente abrange a energia potencial dos termos para átomos ligados (comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedros) e dos termos para átomos não ligados (interações de van der Waals e de Coulomb). A representação dos termos dos campos de força são expressos na Figura 6.

Figura 6- Representação dos termos dos campos de forças utilizados em dinâmica molecular clássica. Em (a): energia potencial da distância de ligação, (b): energia potencial das flexões angulares, (c): energia potencial das torsões, (d): interações não-ligantes.



Fonte: MAIA (2013).

Este campo de forças é descrito pela seguinte equação:

$$E_{CF} = E\beta + E\theta + E\omega + E\varphi + E_{vdw} + E_{el} + E_{acl} \quad (5.0)$$

Onde,

$E\beta$ = Termo da energia potencial de ligação.

$E\theta$ = Termo da energia potencial angular.

$E\omega$ = Termo da energia potencial dos diedros impróprios.

$E\varphi$ = Termo da energia potencial torsional.

E_{vdw} = Termo da energia potencial de van der Waals.

E_{el} = Termo da energia potencial eletrostática.

E_{acl} = Termo de acoplamento entre os potenciais dos átomos ligados.

Detalhando todos os termos, respectivamente a equação pode ser descrita da seguinte forma:

$$\begin{aligned}
 E_{CF} = & \frac{1}{2} \sum_{n=1}^N k_{\beta n} (rn - ron)^2 + \frac{1}{2} \sum_{n=1}^N k_{\theta n} (\theta_n - \theta_{on})^2 \\
 & + \frac{1}{2} \sum_{n=1}^N k_{\omega n} (\omega_n - \omega_{on})^2 \\
 & + \sum_{n=1}^N k_{\varphi n} [1 + \cos(m_n \varphi_n - \delta_n)] + \sum_{n<1}^N k \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \\
 & + \sum_{n<1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon\epsilon_0 r_{ij}}
 \end{aligned} \tag{6.0}$$

3 METODOLOGIA

3.1 CONSTRUÇÃO DO MODELO TRIDIMENSIONAL

Inicialmente obteve-se a sequência primária da OsGSTU4 foi obtida na base de dados do NCBI (nº de acesso: AAQ02686.1).

Na sequência, fez-se um alinhamento local contra a base de dados do PDB (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/>) através do algoritmo de alinhamento local “BLAST” (*Basic Local Alignment Tool*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), obtendo-se a sequência AtGSTU4 (PDB ID: 1GWC) (THOM, 2002) que foi utilizada como *template*, por apresentar alta identidade (56%) e similaridade (71%) e boa resolução (2.25Å).

As coordenadas atômicas do *template* foram salvas em arquivo PDB e utilizou-se a ferramenta Automated Mode do servidor SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) para geração do modelo (ARNOLD et al, 2006; KIEFER et al 2009).

3.2 REFINAMENTO E VALIDAÇÃO DO MODELO

Para a validação do modelo foram analisados os Diagramas de Ramachandran, que foram obtidos através do programa PROCHECK (LASKOWSKI *et al*, 1993; LASKOWSKI *et al* 1996) para verificar a qualidade estereoquímica da estrutura. Foi calculado valores para o ANOLEA (MELO, 1998) e o GROMOS (<http://www.gromos.net/>).

O ANOLEA avalia a qualidade de estruturas de proteínas com uma energia de interação atômica não-local. O processo é feito por meio da análise de ambiente dos átomos pesados por meio de cálculos de energia, sendo possível zonear regiões de alta energia na proteína, as quais estão relacionadas a erros pontuais ou regiões de interação. O ANOLEA sumariza os resultados, quantificando aminoácidos situados em zonas de maior energia (em número e porcentagem) e identificando quais são eles (MELO et al, 1998).

O programa GROMOS (GRONIGEN MOLECULAR SIMULATION) descreve no eixo Y a representação do campo de forças empíricos para cada aminoácido da cadeia de proteínas (VAN GUNSTEREN et al, 1996).

A visualização da molécula modelada foi através do VMD - Visual Molecular Dynamics (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>).

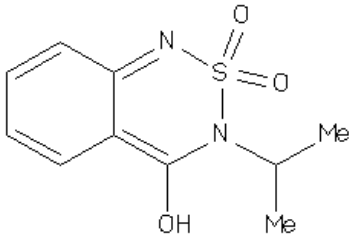
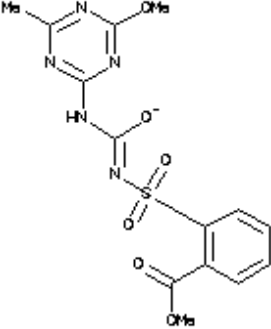
O modelo validado e refinado teve sua estrutura depositada no PMDB-- Protein Model DataBase (<https://bioinformatics.cineca.it/PMDB/>) e encontra-se disponível para acesso público através do código *PM0079277*.

3.3 DOCKING MOLECULAR

3.3.1 Mineração e preparação dos ligantes e da estrutura do receptor

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.

Quadro 2- Moléculas ligantes utilizadas no experimento de *docking* molecular.

Herbicida	Estrutura	Código de acesso
Bentazone		ZINC05442053
Metsulfuron		ZINC01532069

Fonte: Zinc database (<http://zinc.docking.org/>)

Os arquivos 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 glutathione foi tratada como co-fator.

3.3.2 Simulação de docking

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).

O Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA) é uma ferramenta computacional apropriada para busca diante de uma vasta variedade de parâmetros, ou seja, combinações que resultem em soluções representativas para um problema pré-determinado, encontradas a partir de princípios de genética, seleção natural e evolução (MORRIS, 1998).

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).

Neste âmbito, a iniciação é dada por meio de uma população inicial, em que cada indivíduo é constituído por uma conformação específica. Com o objetivo de conduzir a seleção, existem funções de avaliação sobre a população que permitem a escolha de indivíduos mais aptos. Torna-se perceptível que esses indivíduos apresentam uma maior probabilidade de se reproduzirem ao serem submetidos a um processo evolucionário, por meios computacionais, onde são trocados dados (material) genéticos entre si mediante os processos de recombinação e mutação.

Este processo dá início a uma segunda geração de indivíduos e, dessa forma, pelas gerações seguintes, o ciclo se repete sucessivas vezes, promovendo a simulação de um longo tempo evolucionário, tal que os indivíduos mais aptos resultantes terminam por compor a solução do problema (MORRIS, 2009).

Se comparado a métodos usados tradicionalmente em buscas conformacionais, como o “*Simulated Annealing*” e o “*Monte Carlo*”, o algoritmo genético permite convergência com maior celeridade e eficiência entre coordenadas iniciais do ligante, escolhidas aleatoriamente, e coordenadas cristalográficas.

Nesta metodologia há ainda o uso de grid, recurso que calcula mapas de afinidade previamente para cada átomo do ligante que interage com o receptor, imersos em uma caixa de pontos reticulados (uma grade de energia).

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. Portanto, por definição, entende-se que os grids são descritores tridimensionais da posição dos diferentes grupos químicos no receptor sendo por fim o tamanho do grid estabelecido em 126 x 126 x 126 angstroms pelo programa Autogrid (<http://autodock.scripps.edu/wiki/AutoGrid>) e centrado no receptor (GST).

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/>).

3.4 ANÁLISE DE MODOS NORMAIS

As coordenadas atômicas da OsGSTU4 foram obtidas a partir do modelo construído neste trabalho. Para a análise de modos normais (NMA-Normal Modes Analysis) foi utilizado o servidor Élnemo (<http://www.sciences.univ-nantes.fr/elnemo/>) para a identificação de potenciais mudanças conformacionais na enzima (TIRION, 1996). *Normal mode analysis* (NMA) é um método eficiente, simples (Friendly User) e rápido para cálculo de vibração e flexibilidade de uma proteína. Geralmente o NMA fixa somente átomos C α , de forma que o restante dos átomos é modelado como massas pontuais ligadas por “molas”, que representam os campos de força interatômicas.

Um tipo particular de NMA é o modelo de rede elástica. Neste modelo, as molas que ligam cada nó para todos os outros nós vizinhos são de igual força, e apenas os pares de átomos dentro de uma distância de corte são considerados (ALEXANDROV, 2015).

Todas as técnicas de NMA têm limitações comuns, resultantes da utilização da aproximação harmônica, deve-se a negligência do relaxamento do solvente, e a ausência de

informações sobre barreiras energéticas e mínimos múltiplos na superfície energia potencial (ELBER e KARPLUS, 1987; FRAUENFELDER et al. 1988; HONG et al. 1990).

As coordenadas atômicas da OsGSTU4 foram obtidas a partir do modelo construído neste trabalho. Para a análise de modos normais (NMA-Normal Modes Analysis) foi utilizado o servidor Élnemo (<http://www.sciences.univ-nantes.fr/elnemo/>) para a identificação de potenciais mudanças conformacionais na enzima (TIRION, 1996). O NMA *Normal mode analysis* (NMA) é um método eficiente, simples (Friendly User) e rápido para cálculo de vibração e flexibilidade de uma proteína. Geralmente o NMA fixa somente átomos Ca, de forma que o restante dos átomos é modelado (são modeladas) como massas pontuais ligadas por “molas”, que representam os campos de força interatômicas.

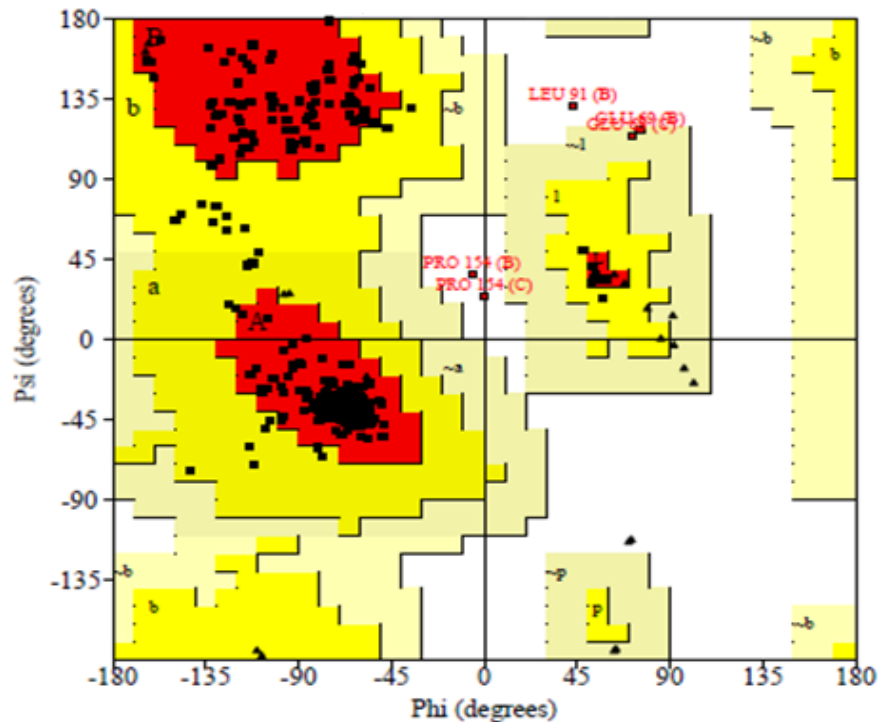
Um tipo particular de NMA é o modelo de rede elástica. Neste modelo, as molas que ligam cada nó para todos os outros nós vizinhos são de igual força, e apenas os pares de átomos dentro de uma distância de corte são considerados (ALEXANDROV, 2015). Todas as técnicas de NMA têm limitações comuns existentes resultantes da utilização da aproximação harmônica, deve-se a negligência do relaxamento do solvente, e a ausência de informações sobre barreiras energéticas e mínimos múltiplos na superfície energia potencial (ELBER E KARPLUS 1987; FRAUENFELDER et al. 1988; HONG et al. 1990).

3.5 SIMULAÇÕES DE DINÂMICA MOLECULAR

O sistema foi construído em uma caixa cúbica de 10,0 x 10,0 x 10,0 nm³ e solvatado através da adição de moléculas de solvente explícito (modelo SPC). A carga geral do sistema foi neutralizada com a adição de íons. Antes da simulação, o sistema foi submetido a uma minimização de energia, onde foi utilizado o algoritmo *steepest descendent* que utiliza a derivada primeira para determinação da direção para o mínimo (ARFKEN, 1985; MORSE; FESHBACH, 1953). O campo de forças GROMOS (VAN GUNSTEREN et al, 1996) com o conjunto de parâmetros G53A6 (OOSTENBRINK et al, 2004) e o modelo SPC de água (BERENDSEN et al, 1987) foram escolhidos para descrever as interações inter-atômicas do sistema. O sistema foi simulado no pacote GROMACS por 45 nanossegundos. Os vídeos das trajetórias foram observados no VMD. Foram calculados o RMSD, o RMSF, o Raio de Giro e o SASA do sistema.

permitidas (amarelo), 0,5% em regiões generosamente permitidas (creme) e 0,3% em regiões proibidas (branco).

Figura 8- Diagrama de Ramachandran mostrando as regiões de agrupamento de resíduos, classificadas com: vermelho - regiões mais favoráveis (91,9%); amarelo - regiões permitidas (7,3%); creme - regiões generosamente permitidas (0,5%) e branco - regiões proibidas (0,3%).



Fonte: Construído com dados da pesquisa.

Este resultado se mostra satisfatório, considerando a observação de Laskowski et al. (1993), que afirmam que um bom modelo requer mais de 90% de seus resíduos de aminoácidos situados em regiões favoráveis do Diagrama de Ramachandran (A, B e L), desconsiderando-se os resíduos que estiverem diferenciados em vermelho nas extremidades demarcadas como desfavoráveis pelo Diagrama. Estes apresentarem padrões estereoquímicos diferentes dos demais resíduos, sendo, assim, considerados irrelevantes para a pontuação final da avaliação termodinâmica-estrutural.

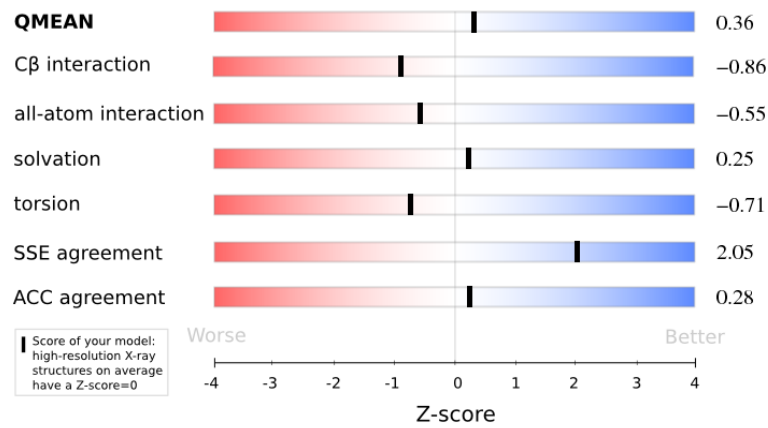
Desta forma, pode-se exemplificar resíduos como leucina, glicina e prolina, ilustrados de forma diferenciada no Diagrama de Ramachandran, visto que estes apresentam estruturas de natureza termodinamicamente instável em sua cadeia. Embora estes previsivelmente se apresentem de forma desfavorável à estrutura da proteína, estas constituem regiões fundamentais para a estabilidade conformacional da proteína, a exemplo de regiões de alça, que desempenham importante papel para fluidez no processo de enovelamento (folding) proteico.

Paralelamente ao Diagrama de Ramachandram, os resultados do ANOLEA e do GROMOS foram em geral negativos, revelando um modelo com valores energéticos estáveis, conforme explicam Melo et al (1998) e van Gunsteren et al (1996).

O modelo validado foi submetido à base de dados do PMDB (Protein Model DataBase) e está disponível através do código de acesso PM0079227, sendo este modelo a primeira proposta de estrutura tridimensional para a OsGSTU4.

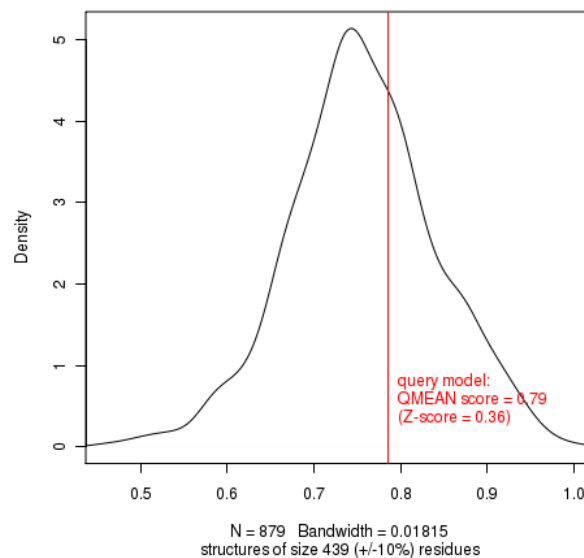
Na Figura 9, apresenta-se o Qmean (Quality Mean Score) para 6 parâmetros da proteína OsGSTU4, com valor de 0,786, enquanto a Figura 10 mostra o gráfico de Z-score e QMEAN para a mesma proteína.

Figura 9- Quality Mean Score para 6 parâmetros da proteína OsGSTU4.



Fonte: Construído com dados da pesquisa.

Figura 10- Gráfico do Z-score e QMEAN para a OsGSTU4.



Fonte: Construído com dados da pesquisa.

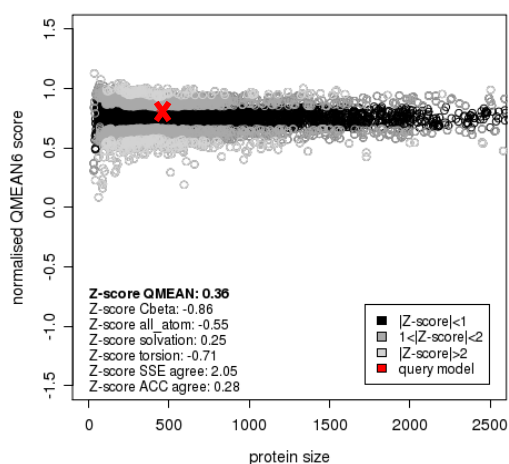
Este valor (0,786) pode ser considerado bom, tomando como base informações de Benkert (2008, 2009a, 2009b e 2011) que afirma que um modelo de melhor qualidade é aquele que apresenta Qmean próximo de 1,0.

A Figura 10 mostra o gráfico de Z-score e QMEAN para a OsGSTU4. Analisando esta figura é possível afirmar que, de acordo com o *Qmean* e o *Z-Score* encontrados, o modelo da OsGSTU4 apresenta alta qualidade estrutural quando comparado a outros modelos do banco de dados (BENKERT, 2008, 2009a, 2009b, 2011)

A distribuição do Z-score apresentada na Figura 11, na qual os círculos em escala de cinza representam scores do QMEAN para outras estruturas de tamanhos similares depositadas no PDB, complementa a discussão.

Nesta distribuição, visualiza-se o desvio padrão do *score* em relação aos valores esperados das estruturas experimentais. Neste âmbito, o Z-score do QMEAN indica quantos desvios padrões o *score* difere dos valores esperados das estruturas experimentais. Neste caso, quanto mais próximo da faixa preta melhor, pois implica em menor desvio padrão. Logo, o Z-score do QMEAN encontrado (0,786) pode ser considerado um bom valor, pois, como se pode deduzir, encontra-se próximo à faixa preta (BENKERT, 2008, 2009a, 2009b, 2011).

Figura 11- Distribuição do Z-score.



Fonte: Construído com dados da pesquisa.

Buscando o Apêndice A, verifica-se que fica explícito no gráfico do erro residual, que há resíduos da proteína que estão desfavoráveis, principalmente os resíduos localizados nas posições 50 e 300, ambos situados em cadeias diferentes do homodímero, revelando-se ambos em um padrão gráfico previsível devido à repetitividade, dada a natureza de proteínas homodiméricas.

4.2 DOCKING MOLECULAR

O resultado do docking, realizado para o herbicida Metsulfuron, executado no programa autodock, foi o ranqueamento de dez possíveis complexos, conforme se observa na Tabela 6. 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).

Tabela 6- Resultados dos complexos ranqueados pelo autodock no docking do Metsulfuron

Complexo	Energia de ligação Kcal/mol	Energia intermolecular Kcal/mol	Ligações de hidrogênio
1	-3.74	-5.53	B:LYS 111 HZ1 – O2 C: GTX1226 H11-N3 B:LYS 111 HZ2 – O6 C:LYS 56 HZ1 – O2
2	-3.68	-5.47	B:LYS 111 HZ1 – O2 C:HIS 54 HD1 – O5 C:LYS 56 HZ1 – O3, O2
3	-2.78	-4.57	B:LYS 111 HZ1 – O5 C:LYS 56 HZ1 – N5 C:LYS 56 HZ1 – O6
4	-3.09	-4.88	C:LYS 56 HZ1 – O2 C: GTX1226 H11-N3, O1 B:LYS 111 HZ2 – O6
5	-3.15	-4.94	B:LYS 111 HZ1 – O2 C:LYS 56 HZ1 – O2 B:LYS 111 HZ2 – O5, O6 C:HIS 54 HD1 – O1
6	-3.78	-5.57	C:LYS 56 HZ1 – O3, O2 C: GTX1226 H3-O5 B:LYS 111 HZ2 – O3
7	-1.03	-2.82	H7-B:ASP148 OD2 B:LYS 151 HZ1 – O3
8	-3.7	-5.49	B:LYS 111 HZ2 – O2 C:LYS 56 HZ1 – O4 B:LYS 111 HZ3 – N3 C:HIS 54 HD1 – O1 C:LYS 56 HZ2 – O6
9	-1.74	-3.53	C:LYS147 HZ1 – O5 C:LYS147 HZ3 – O2
10	-2.91	-4.7	B:LYS 111 HZ2 – O2 C:LYS 56 HZ1 – O2 C:LYS 56 HZ1 – O6

Fonte: Construído com dados da pesquisa.

No Metsulfuron, as energias de ligação foram mais baixas do que as do Bentazon. Ligações de hidrogênio com o glutathion indicam conjugação entre as moléculas, como mostra a Tabela 6.

Os resultados revelados pelo docking do Metsulfuron, mostram repetições de alguns resíduos (LYS 111, LYS 56, GTX1226) que se apresentaram extremamente favoráveis, sendo estes possivelmente resíduos âncora para a ligação, combinando com os resultados evidenciado por Rigo (2011).

A identificação da molécula GTX1226 como resíduo âncora, é evidência de um possível processo de conjugação (KILILI, 2004) entre o Metsulfuron e a glutathion, que evidencia a possibilidade de desintoxicação do Metsulfuron pela OsGSTU4.

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 7 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).

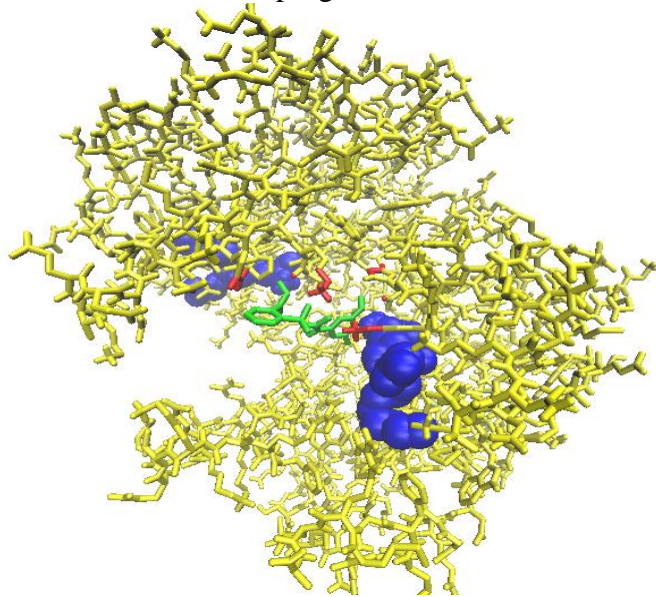
Tabela 7- Resultados dos complexos ranqueados pelo autodock no docking do Bentazon

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: Construído com dados da pesquisa.

O primeiro dos resultados ranqueados pelo autodock para o metsulfuron pode ser visualizado na Figura 12.

Figura 12- Visualização e caracterização do primeiro resultado para o metsulfuron obtido por meio do programa autodock

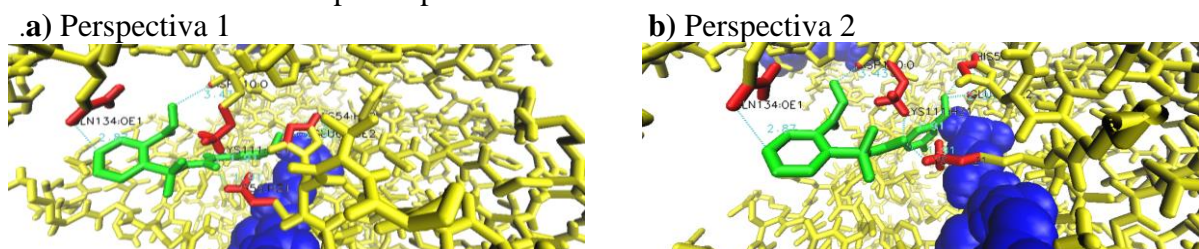


Fonte: Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa.

De maneira geral, na Figura 12 pode-se observar a seguinte sequência: em amarelo, sob representação gráfica de bastões, a estrutura da glutathione S transferase; em azul, sob representação gráfica VDW (Van Der Waals), as moléculas de glutathione; em vermelho encontram-se os mais átomos mais próximos de resíduos de aminoácidos que circundam o ligante a uma distância de 4 ângstroms (4 Å), que por sua vez está representado em verde.

Desta forma, por meio de ferramentas do programa *Visual Molecular Dynamics*, caracterizaram-se átomos dos resíduos sob a referida distância de 4 Å, que podem ser observados em detalhe nas Figuras 13 (“a” e “b”).

Figura 13- Representação do sítio ativo, com identificação dos resíduos e suas respectivas distâncias até o ligante, em duas perspectivas diferentes sobre o mesmo ponto (“a” e “b”), para o primeiro resultado com o metsulfuron.



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

Complementando as informações da Figura, a Tabela 8 apresenta os átomos de resíduos de aminoácidos circunvizinhos a distâncias menores de 4 Å e suas respectivas distâncias até átomos do ligante.

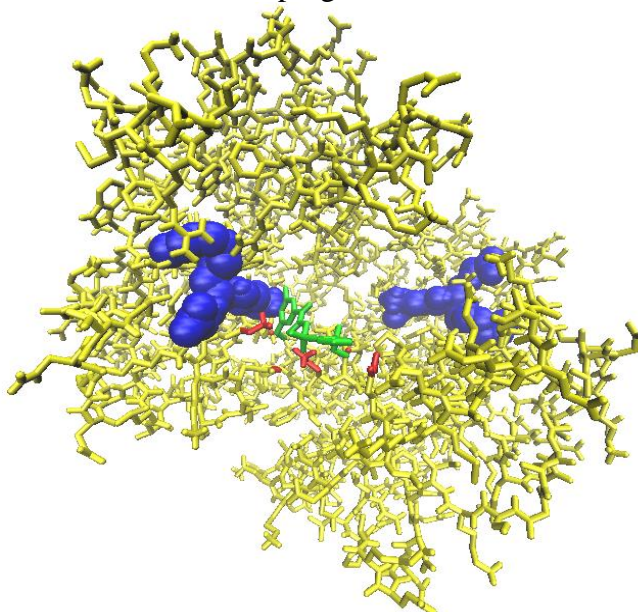
Tabela 8- Representação de átomos de resíduos próximos pertencentes ao metsulfuron, átomos usados como correspondentes no ligante e suas respectivas distâncias em ângstroms no output número um.

Átomos de resíduos próximos	Átomo usado de referência (ligante)	Distâncias respectiva (Å)
ASP110:O	<0>0:C14	3.43
GLU69:OE2	<0>0:C5	2.95
LYS56:HZ1	<0>0:O2	1.91
LYS111:HZ1	<0>0:O2	1.91
GLN134:OE	<0>0:C10	2.87
HIS54:HE2	<0>0:C5	3.91

Fonte: Construído com dados da pesquisa.

O segundo dos resultados ranqueados pelo autodock pode ser visualizado na Figura 14, onde se pode observar, igualmente ao que ocorreu com o primeiro resultado ranqueado pelo programa, a seguinte sequência: em amarelo, sob representação gráfica de bastões, a estrutura da glutathione S transferase; em azul, o sob representação gráfica VDW (Van Der Waals) as moléculas de glutathione; em vermelho encontram-se os átomos mais próximos de resíduos de aminoácidos que circundam o ligante a uma distância de 4 Å, que por sua vez está representado em verde.

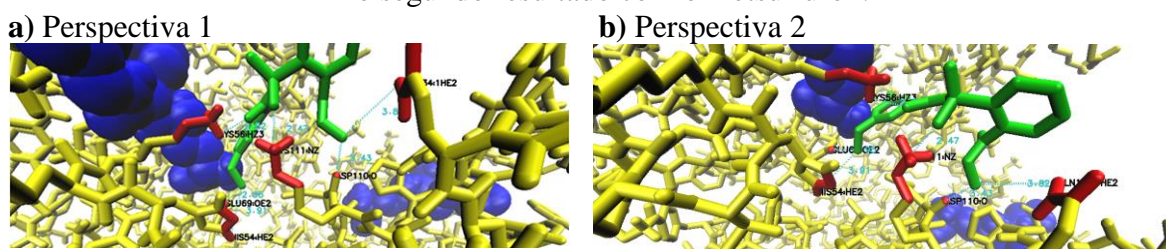
Figura 14- Visualização e caracterização do segundo resultado para o metsulfuron obtido por meio do programa autodock



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

Como no primeiro resultado, por meio de ferramentas do programa Visual Molecular Dynamics, caracterizaram-se átomos dos resíduos sob a referida distância de 4Å que podem ser observados em detalhe nas Figuras 15 (“a” e “b”).

Figura 15- Representação do sítio ativo, com identificação dos resíduos e suas respectivas distâncias até o ligante, em duas perspectivas diferentes sobre o mesmo ponto (“a” e “b”) para o segundo resultado com o metsulfuron.



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

Complementando as informações da Figura 15, a Tabela 9 apresenta os átomos de resíduos de aminoácidos circunvizinhos a distâncias menores de 4 Å e suas respectivas distâncias até átomos do ligante.

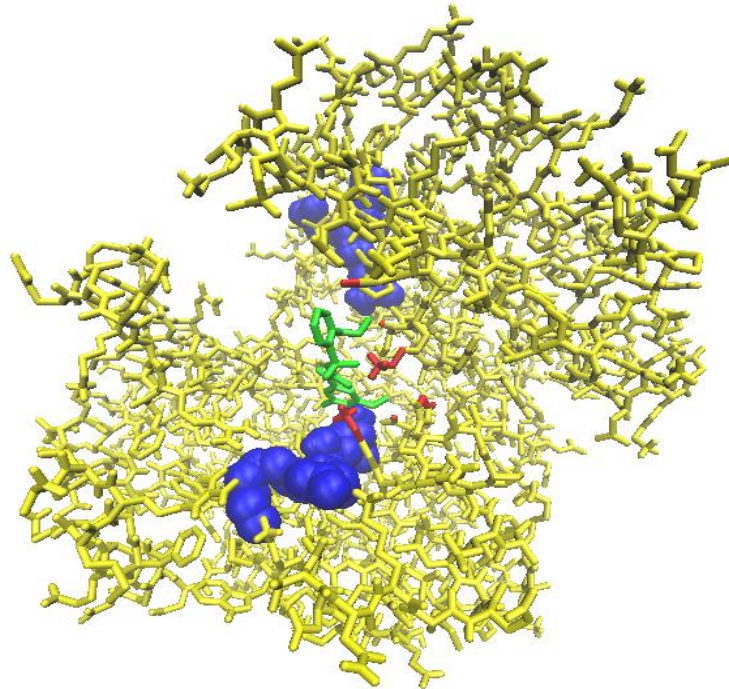
Tabela 9- Representação de átomos de resíduos próximos pertencentes ao metsulfuron, átomos usados como correspondentes no ligante e suas respectivas distâncias em ângstroms no output número dois.

Átomos de resíduos próximos	Átomo usado de referência (ligante)	Distâncias respectiva (Å)
GLU69:OE2	<0>0:C5	2.95
ASP110:O	<0>0:C14	3.43
LYS111:NZ	<0>0:O4	2.47
LYS56:HZ3	<0>0:O2	2.52
HIS54:HE2	<0>0:C5	3.91
GLN134:1HE	<0>0:C14	3.82

Fonte: Construído com dados da pesquisa.

O terceiro dos resultados ranqueados pelo autodock pode ser visualizado na Figura 16, onde pode ser observada, de maneira semelhante ao que ocorreu com o primeiro e o segundo resultado, a seguinte sequência: em amarelo, sob representação gráfica de bastões, a estrutura da glutathione S transferase; em azul, sob representação gráfica VDW (Van Der Waals) as moléculas de glutathione; em vermelho encontram-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.

Figura 16- Visualização e caracterização do terceiro resultado obtido para o metsulfuron por meio do programa autodock.

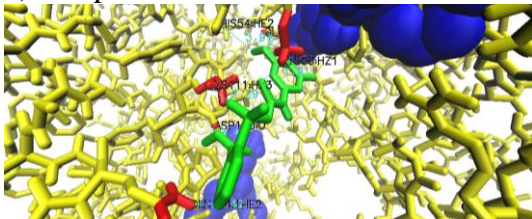


Fonte: Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa.

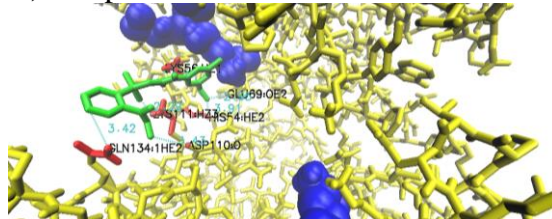
Como nos primeiro e segundo resultados, por meio de ferramentas do programa *Visual Molecular Dynamics*, caracterizaram-se átomos dos resíduos sob a referida distância de 4Å, que podem ser observados em detalhe nas Figuras 17 (“a” e “b”):

Figura 17- Representação do sítio ativo, com identificação dos resíduos e suas respectivas distâncias até o ligante, em duas perspectivas diferentes sobre o mesmo ponto (“a” e “b”) para o terceiro resultado com o metsulfuron.

a) Perspectiva 1



b) Perspectiva 2



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

Para complementar as informações da Figura 17, listaram-se na Tabela 10 os átomos de resíduos de aminoácidos circunvizinhos a distâncias menores de 4 Å e suas respectivas distâncias até átomos do ligante.

Tabela 10- Representação de átomos de resíduos próximos pertencentes ao metsulfuron, átomos usados como correspondentes no ligante e suas respectivas distâncias em ângstroms no output número três.

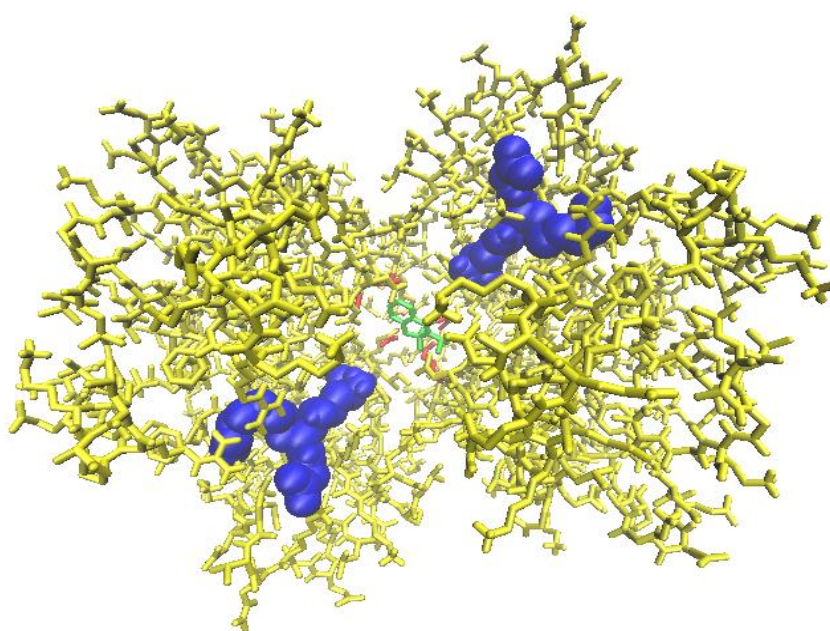
Átomos de resíduos próximos	Átomo usado de referência (ligante)	Distâncias respectiva (Å)
LYS56:HZ1	<0>0:O2	1.91
LYS111:HZ3	<0>0:O4	2.29
ASP110:O	<0>0:C14	3.43
GLU69:OE2	<0>0:C5	2.95
HIS54:HE2	<0>0:C5	3.91
GLN134:1HE	<0>0:C10	3.42

Fonte: Construído com dados da pesquisa.

O mesmo procedimento foi realizado para os demais outputs obtidos pelo autodock, os quais estão listados no APÊNDICE B (B.01 a B.21).

Com relação ao herbicida bentazon, o primeiro dos resultados ranqueados pelo autodock pode ser visualizado na Figura 18. Da mesma forma que no caso do metsulfuron, pode-se observar a seguinte sequência: em amarelo, sob representação gráfica de bastões, a estrutura da gultationa S transferase; em azul, sob representação gráfica VDW (Van Der Waals) as moléculas de glutaciona; 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.

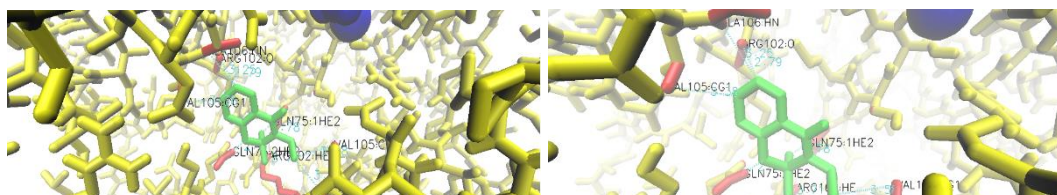
Figura 18- Visualização e caracterização do primeiro resultado para o bentazon obtido por meio do programa autodock.



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

Da mesma forma que se tratou o herbicida metsulfuron, por meio de ferramentas do programa Visual Molecular Dynamics, caracterizaram-se átomos dos resíduos sob a referida distância de 4Å, que podem ser observados em detalhe nas Figuras 19 (“a” e “b”).

Figura 19- 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”).
a) Perspectiva 1 **b) Perspectiva 2**



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

Para complementar as informações da Figura 19, listaram-se na Tabela 11 os átomos de resíduos de aminoácidos circunvizinhos a distâncias menores de 4 Å e suas respectivas distâncias até átomos do ligante.

Tabela 11- Representação 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: Construído com dados da pesquisa.

Na Figura 20, visualiza o segundo dos resultados ranqueados pelo autodock quanto ao bentazon. Nesta figura, de maneira geral, pode-se observar a seguinte sequência: em amarelo, sob representação gráfica de bastões, a estrutura da glutathione S transferase; em azul, sob representação gráfica VDW (Van Der Waals) as moléculas de glutathione; em vermelho encontram-se os átomos mais próximos de resíduos de aminoácidos que circundam o ligante a uma distância de 4 Å, que por sua vez está representado em verde:

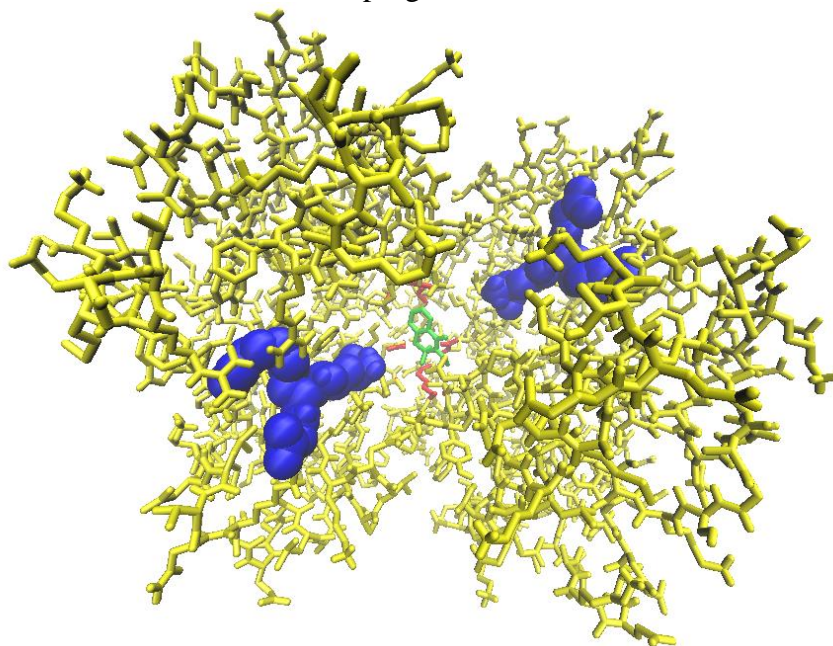
Tabela 12- Representação de átomos de resíduos próximos pertencentes ao bentazon, átomos usados como correspondentes no ligante e suas respectivas distâncias em ângstroms, no output número dois.

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: Construído com dados da pesquisa.

A Figura 22 apresenta o terceiro dos resultados ranqueados pelo autodock quanto ao bentazon, na qual se pode visualizar a seguinte sequência: em amarelo, sob representação gráfica de bastões, a estrutura da glutathione S transferase; em azul, sob representação gráfica VDW (Van Der Waals) as moléculas de glutathione; em vermelho encontram-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.

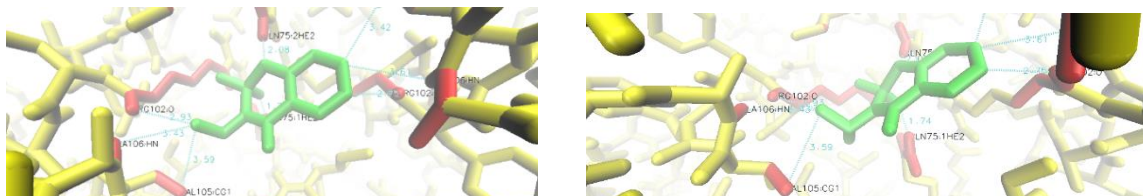
Figura 22- Visualização e caracterização do terceiro resultado para o bentazon obtido por meio do programa autodock.



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

Na Figura 23 (“a e b”), vê-se, em detalhes, a caracterização de átomos dos resíduos sob a distância de 4 Å, obtida por meio de ferramentas do programa Visual Molecular Dynamics:

Figura 23- 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”).
a) Perspectiva 1 **b) Perspectiva 2**



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

Como complemento às informações da Figura 23, Tabela 13 relaciona os átomos de resíduos de aminoácidos circunvizinhos a distâncias menores de 4 Å e suas respectivas distâncias até átomos do ligante.

Tabela 13- Representação de átomos de resíduos próximos pertencentes ao bentazon, átomos usados como correspondentes no ligante e suas respectivas distâncias em ângstroms . no output número três.

Átomos de resíduos próximos	Átomo usado de referência (ligante)	Distâncias respectiva (Å)
VAL105:CG'	<0>0:C8	3.42
ALA106:HN	<0>0:C8	3.43
ARG102:O	<0>0:C7	2.93
GLN75:2HE2	<0>0:N2	2.08
ALA106:HN	<0>0:C1	3.61
VAL105:CG'	<0>0:C1	3.59
GLN75:1HE2	<0>0:O3	1.74
ARG102:O	<0>0:C1	2.75

Fonte: Construído com dados da pesquisa.

O mesmo procedimento foi realizado para os demais outputs obtidos pelo autodock em função do ligante bentazon, estes estão listados no APÊNDICE C (C.01 a C.21)..

4.3 DINÂMICA MOLECULAR

4.3.1 Análise de modos normais (NMA)

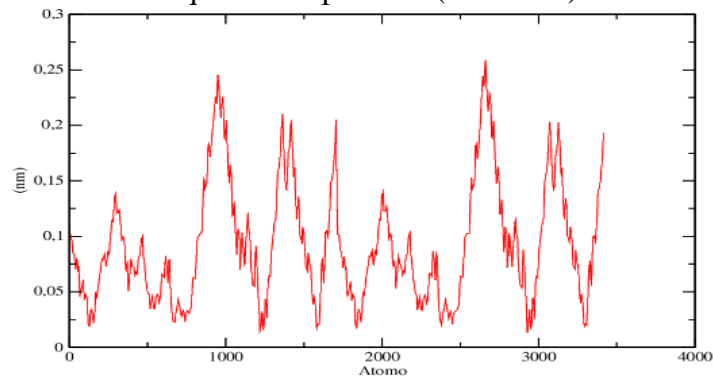
Para a análise de modos normais, foi usado o servidor online Élnémo, permitindo, dessa forma, a predição de mudanças conformacionais em potencial da proteína (SUHRE,

2004). Os principais resultados obtidos pro meio do servidor são expressos pelos gráficos das Figuras 24, 25 e 26.

A Figura 24 mostra o *root-mean square fluctuation* (RMSF) para o primeiro autovetor obtido no Élnemo. O RMSF expressa dinâmica dos átomos pertencentes às regiões que mais flutuaram na proteína, sendo esta flutuação medida em nanômetros. Para o seu cálculo foi usado o pacote do programa GROMACS.

Observando a Figura 24 é possível perceber ainda a existência de um padrão de flutuação, revelando uma repetição de comportamento nas duas subunidades do homodímero.

Figura 24- RMSF para o primeiro autovetor obtido no *Élnemo*, calculado para átomos do esqueleto da proteína (*backbone*).



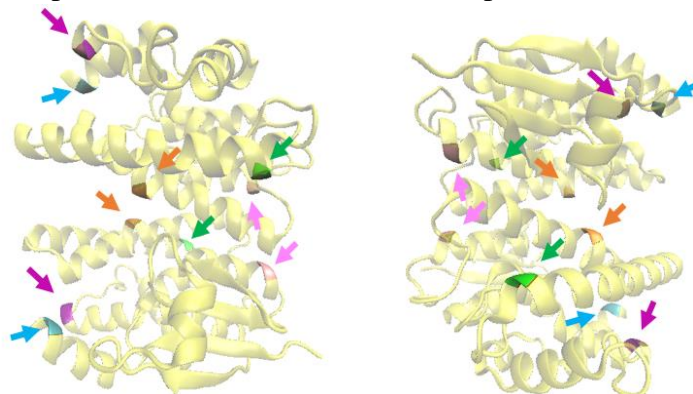
Fonte: Construído com dados da pesquisa.

É possível observar que certas regiões da AsGSTE2 apresentam maior flutuação atômica que outras. Estas regiões estão identificadas na Figura 25 e são compostas por resíduos previamente identificados em uma tabela (APÊNDICE D), onde receberam uma identificação por cor. É possível perceber ainda, que os resíduos estão principalmente situados em regiões de alça que são reconhecidas como regiões de alto coeficiente cinético.

Figura 25- Representação dos resíduos de maior flutuação em duas perspectivas diferentes sobre o mesmo ponto (“a” e “b”).

a) Perspectiva 1

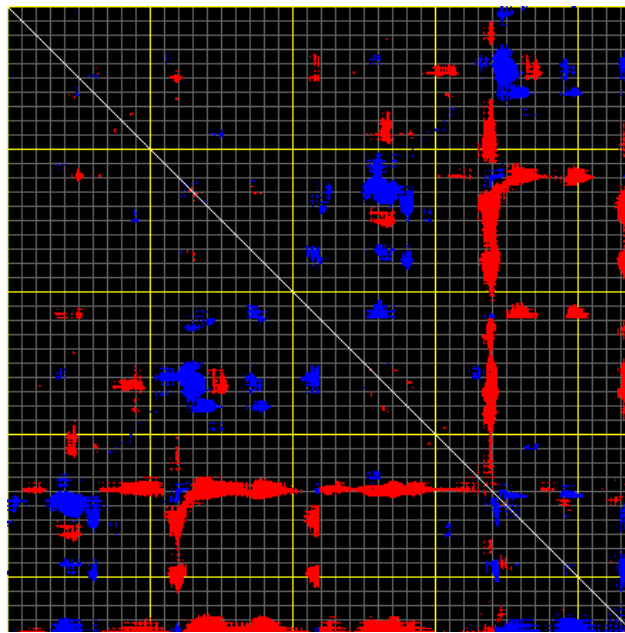
b) Perspectiva 2



Nota: Imagem feita no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa.

A Figura 26 é a matriz de flutuações obtida pelo *Élnemo*. Esta matriz revela a distância entre os átomos de carbono alfa de cada par de resíduos (representado por cada pixel da figura) pertencentes à proteína. Nesta figura é possível ainda identificar padrões de cor, indicando o movimento feito por cada resíduo, sendo o azul para distanciamento e vermelho para aproximação.

Figura 26- Matriz de flutuações das distâncias entre átomos do Carbono alfa entre todos os pares de resíduos, obtida pelo *Élnemo*.



Fonte: Construído com dados da pesquisa.

O gráfico é acompanhado de uma tabela (APÊNDICE E) detalhada que expressa o distanciamento dos carbonos alfa de cada resíduo a seu respectivo par (indicando pelas cores azul e vermelha, par distanciamento e aproximação, respectivamente). Neste gráfico é possível observar o mesmo padrão homodimérico expresso pelo RMSF.

4.3.2 Simulação de dinâmica molecular atomística

A simulação de dinâmica molecular atomística objetiva maior precisão usando o nível atomístico de profundidade. Neste procedimento, efetuam-se cálculos através do pacote de programa GROMACS, com o campo de forças GROMOS 53A6, usando simplificação *united atom* (SPOEL, 2005).

A simulação de dinâmica molecular de proteínas usa duas grandezas para avaliar a estabilidade conformacional em função do tempo, quais sejam: os desvios quadráticos médios (RMSD) e o raio de giro (RG).

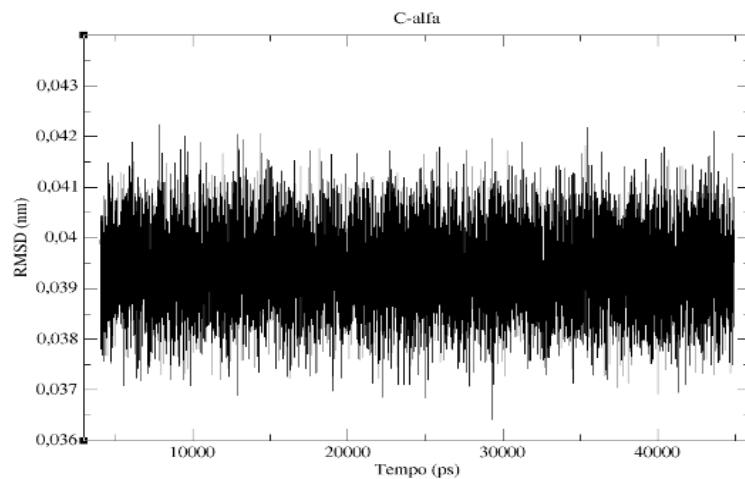
Dessa forma, foi plotado o *root-mean square deviation* (RMSD) para átomos de carbono alfa (Figura 27). Por sua vez, o cálculo deste parâmetro é executado pela seguinte fórmula:

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

onde $r_i(t)$ e $r_i(0)$ representam as coordenadas do i -ésimo átomo no tempo t e 0 , respectivamente, e N é o número de átomos no domínio de interesse ($C\alpha$).

Na Figura 27 pode-se observar, de forma global, a soma dos desvios dos carbonos alfa em relação a posição inicial.

Figura 27- RMSD para átomos do carbono alfa.



Fonte: Construído com dados da pesquisa.

O gráfico da Figura 27 revela, portanto, que há estabilidade, o que é evidenciado pelo comportamento distorsivo linear expresso pela imagem.

Outro dado a ser observado é o gráfico do raio de giro (Figura 28) que avalia a distância do centro de massa até os extremos da molécula, com a finalidade de observar processos de expansão ou compactação das enzimas durante a simulação.

O cálculo deste parâmetro é executado pela seguinte fórmula:

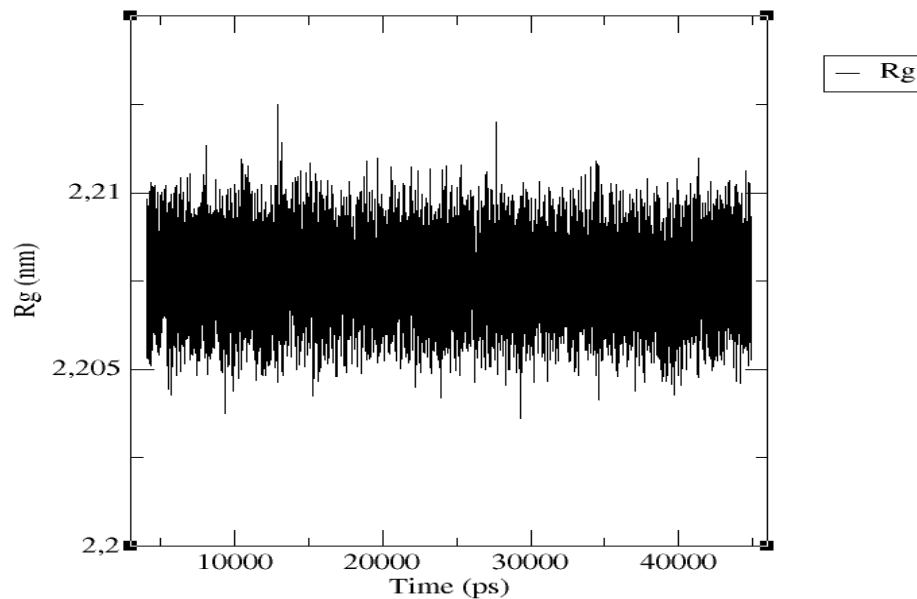
$$R_g^{2def} = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N (r_k - r_{mean})^2$$

onde r_{mean} é a posição média dos monômeros.

O raio de giro revela o quão compacta é a estrutura de uma proteína.

O gráfico de raio de giro observado na Figura 28 revela um comportamento linear, comportamento este que implica em um modelo estável.

Figura 28- Raio de giro para a GST



Fonte: Construído com dados da pesquisa.

Importante também é o gráfico de acessibilidade da superfície do solvente (Figura 29), cujo propósito é avaliar a natureza hidrofóbica superficial da molécula, analisando a proteína de forma particulada.

O cálculo para este parâmetro segue a seguinte fórmula:

$$SAS = \sum^{N_{atoms}} A_i$$

Tal que:

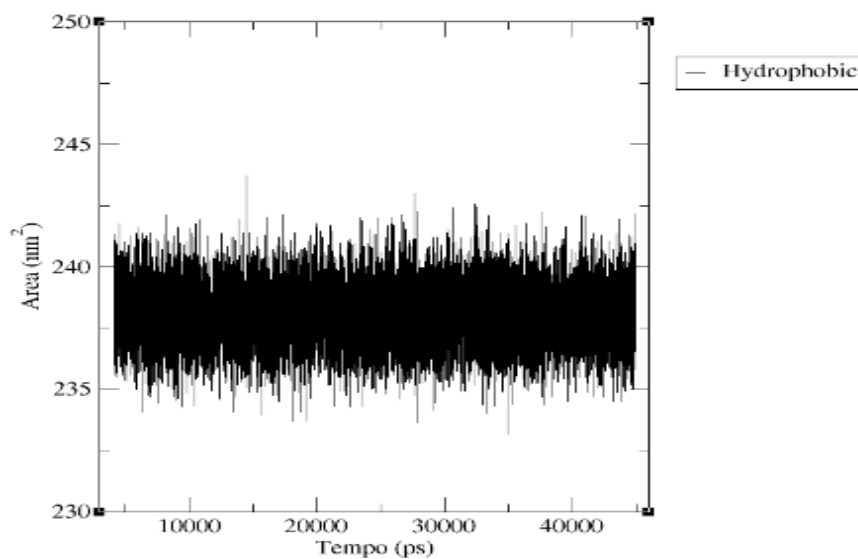
$$A_i(r^N) = S \prod_{i=l}^{N_{atoms}} \left(1 - \frac{p_i p_{ij} b_{ij}(r_{ij})}{S_i} \right)$$

Sendo $S_i = 4\pi (R_i + R_{solv})^2$ a SAS do átomo isolado i de raio R_i e um solvente de raio R_{solv} . O termo $b_{ij}(r_{ij})$ representa a SAS removida S_i pela sobreposição dos átomos i e j , a uma distância $r_{ij} = |r_i - r_j|$. O parâmetro empírico p_i depende do tipo de átomo, enquanto o

parâmetro empírico p_{ij} serve como um fator de adicional discriminação que distingue entre o primeiro e o próximo átomo vizinho ligado covalentemente e os átomos ligados de forma não covalente.

O gráfico de SAS demonstra não haver aumentos ou diminuições significativas na área exposta ao solvente, ficando entre 235 nm² e cerca de 240 nm² ao longo da simulação. Este resultado significa que a hidrofobicidade da proteína é mantida ao longo do tempo, o que reforça a hipótese de que o modelo teórico é estável e confiável.

Figura 29- Gráfico de Superfície de Acessibilidade ao Solvente.



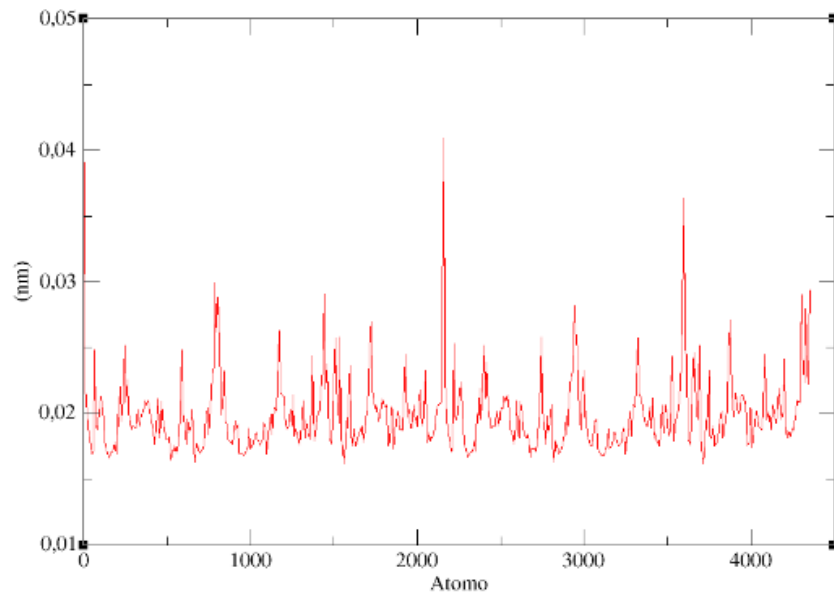
Fonte: Construído com dados da pesquisa.

Finalmente, foi calculado o RMSF que mensura as flutuações atômicas ao longo da proteína, sendo esta flutuação medida em nanômetros, como mostra a Figura 30, enquanto o modelo matemático que representa este cálculo é descrito pela seguinte fórmula:

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

onde $r_i(j)$ são as coordenadas do i -ésimo átomo no passo de tempo j ; \bar{r}_i suas posições médias e \mathfrak{S} é o tempo de simulação, expresso como o número total de passos de tempo (*timesteps*) coletados.

Figura 30- RMSF do backbone da proteína.



Fonte: Construído com dados da pesquisa.

5 CONCLUSÕES

Mediante os dados obtidos neste trabalho, após a sua análise, é possível relacionar as seguintes conclusões:

- Os resultados obtidos para o modelo desenvolvido e estudado neste trabalho são consistentes e permitem confirmar a sua estabilidade físico-química estrutural, muito próxima de sua forma nativa dimérica.
- Com base na confiabilidade dinâmica dos padrões cinéticos de flutuação, pode-se afirmar que o modelo estudado é estável no que diz respeito ao seu comportamento espacial e superficial;
- A OsGSTU4 se liga a ambos os herbicidas (Metsulfuron e Bentazon), havendo formação de complexo com o Metsulfuron.

6 PERSPECTIVAS DO TRABALHO

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.

Mesmo o modelo apresentando alta estabilidade e confiabilidade, tem-se em perspectiva a sua avaliação prática-biológica. Portanto, uma vez que o modelo é teórico-computacional, torna-se necessária a sua reprodutibilidade confirmatória *in-vivo*, ou *in-vitro*.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, D. J. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, Docking and Scoring Functions/Virtual Screening. 1998; 1(06): 281-330.

ALEXANDROV V., et al. Normal modes for predicting protein motions: A comprehensive database assessment and associated Web tool *Protein Science*; 14(3): 633–643. Mar 2005
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2279292/>> Acessado em 30/09/2015

Ally: metsulfuron [bula de herbicida]. Manati: Du Pont Agricultural Caribe Industries, 2014. Bula de herbicida.

ALMEIDA, G. D., BORÉM, A. Desempenho de cultivares de arroz em solos pobres de várzea no noroeste capixaba. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14., 2010, Urbanova. Anais eletrônicos... Urbanova, 2010. Disponível em: <http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2010/anais/arquivos/0318_0802_01.pdf> Acessado em 06/05/2015

ANOLEA: *Atomic Non-Local Environment Assessment* Disponível em: <<http://melolab.org/anolea/>> Acessado em 15/05/2015

ANTIGUA, G.; COLON, C.; GARCIA, J. Utilizacion del herbicida Arrozán en el control de malezas del arroz en Cuba. **Ciencia y Técnica en la Agricultura** – Arroz, La Habana, v. 13, n. 1/2, p. 135- 144, 1990.

ARFKEN, G., 1985, *Mathematical methods for physicists*: Academic Press Inc., San Diego, 3rd edition.

ARNOLD K., BORDOLI L., KOPP J., AND SCHWEDE T. (2006). The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, 22,195-201. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16301204> Acessado em 15/05/2015

Autodock 1.5.6 Disponível em: <<https://www.chpc.utah.edu/documentation/software/autodock.php>> Acessado em 15/05/2015

Autogrid Disponível em: <<http://autodock.scripps.edu/wiki/AutoGrid>> Acessado em 15/05/2015

BALKE, N.E., Herbicide effects on membrane functions. In: Duke, S.O.(Ed.), **Weed Physiology**. Boca Raton, EUA: CRC Press, v. II, p. 113_139, 1985.

BARTELS, P.G., Effects of herbicides on chloroplast and cellular development. In: Duke, S.O. (Ed.), **Weed Physiology**. Boca Raton, EUA: CRC Press, v. II, p. 64_91, 1985.

Basagran: Bentazon [bula de herbicida]. Ludwigshafen: BASF SE. [s.a] Bula de herbicida.

BENKERT, P., BIASINI, M. AND SCHWEDE, T. (2011) Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, 27, 343-350.

BENKERT, P., KUNZLI, M. AND SCHWEDE, T. (2009) QMEAN server for protein model quality estimation. **Nucleic Acids Res**, 37, W510-514.

BENKERT, P., SCHWEDE, T. AND TOSATTO, S.C.E. (2009). "QMEANclust: Estimation of protein model quality by combining a composite scoring function with structural density information." **BMC Struct Biol**. 2009 May 20;9:35.

BENKERT, P., TOSATTO, S.C.E., SCHOMBURG, D. (2008). "QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. " *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 71(1):261-277.

BENNER, S. A., et al. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 2725. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11851479>> Acessado em 20/05/2015

BIASINI M., et al. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**; (1 July 2014) 42 (W1): W252-W258; doi: 10.1093/nar/gku340.

BLAST: *Basic Local Alignment Tool* Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>> Acessado em 15/05/2015

C. L. BROOKS III, M. KARPLUS, B. M. PETTITT, *Proteins: A theoretical perspective of dynamics structure and Thermodynamics*, **Advances in chemical physics**, John Wiley & Sons, New York, 1988.

CARDOSO, G. D. et al. Períodos de interferência das plantas daninhas em algodoeiro de fibra colorida 'BRS Safira', 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1806-66902010000300019&script=sci_arttext> Acessado em: 20/05/2015

CASTRO P. R. C.; KLUGER. C. *Ecofisiologia de cultivos anuais: trigo, milho, soja, arroz, mandioca*. 1.ed. São Paulo: Nobel, 1999, 126 p.

CHAGAS R. M., Alterações fotossintéticas e respostas oxidativas em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) tratadas com paraquat, 2007. Disponível em: <

CHANG e LUH, 1991?

CHOTHIA, C.; LESK, A. M.; **EMBO J**. 1986, 6, 823. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3709526>> Acessado em 20/05/2015

COBUCCI, T. Cultivo de arroz de terras altas no estado de mato grosso. **Sistemas de Produção**, n.7, 2006, Embrapa Arroz e Feijão. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozTerrasAltasMatoGrosso/manejo_plantas_daninhas.htm> Acessado em 09/05/2015.

WANDER A. E. Cultivo do arroz de terras altas no estado de mato grosso. **Sistemas de Produção**, n.7, 2006, Embrapa Arroz e Feijão. Disponível em:

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozTerrasAltasMatoGrosso/>> Acessado em: 24/04/2015.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Estudos de prospecção de mercado: safra 2012/2013. Seção Conab Corporativa. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_09_11_16_41_03_prospeccao_12_13.pdf> Acessado em 24/11/2015.

DAN HESS, F., Mode of action of photosynthesis inhibitors. In: Purdue University, (Ed.), *Herbicide Action Course*. West Lafayette, EUA: CRC Press, p. 85_102, 1994.

DANIELSON U. H., MANNERVIK B. Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat. **Biochem. J.** 1985. 231, 263. Disponível em: <http://www.biochemj.org/bj/231/0263/bj2310263_browse.htm> Acessado em: 14/05/2015.

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 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

DURNER, J.; GAILUS, V. & BÖGER, P., New aspects on inhibition of plant acetolactate synthase depend on flavin adenine dinucleotide. *Plant Physiol*, 95:1144_1149, 1991.

EDWARDS, R. et al. Chemical manipulation of antioxidant defenses in plants. **Advances in Botanical Research**, London, v. 42, p. 1-32, 2005.

ELBER, R., KARPLUS, M. 1987. Multiple conformational states of proteins: A molecular dynamics analysis of myoglobin. *Science* 235 318–321. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3798113>> Acessado em 30/09/2015

elNémo: *The Elastic Network Model* Disponível em: <<http://www.sciences.univ-nantes.fr/elnemo/>> Acessado em 15/05/2015

ENAYATI, A.A.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 14, n.1, p. 3-8, 2005.

FAO. Indicadores econômicos: http://faostat.fao.org/CountryProfiles/Country_Profile/Direct.aspx?lang=en&area=21 08/05/2015.

FAO. International Year of Rice, Rice is life 2005. Disponível em: <<http://www.fao.org/rice2004/en/f-sheet/factsheet3.pdf>> Acessado em 04/05/2015.

FAO/INPhO. Rice in human nutrition. Rome: IRRI, 1993. Disponível em: <[http://www.fao.org/docrep/t0567e/T0567E01.htm#Origin and spread of rice](http://www.fao.org/docrep/t0567e/T0567E01.htm#Origin%20and%20spread%20of%20rice)> Acessado em: 06/05/2015.

FERREIRA, F. B; et al. Consequências da deriva simulada do herbicida Glyphosate sobre a cultura do arroz irrigado (*Oryza sativa* L.), 2006. Disponível em: <<http://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/CAST/article/viewFile/4626/3486> > Acessado em 11/05/2015.

FRAUENFELDER, H., PARAK, F., YOUNG, R.D. 1988. Conformational substates in proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 17 451–479. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3293595>> Acessado em 30/09/2015

FREITAS D. R. J.; JUNIOR, I. S. V.; MASUDA, A. Expressão e Atividade Enzimática de Glutathione S-Transferase em Tecidos de Fêmeas de *Boophilus Microplus*. **Revista Brasileira Parasitol. Vet.**, 17, 2, 99-104, 2008.

FREITAS, R. S. Interferência de plantas daninhas na cultura do algodão, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-83582002000200005&script=sci_arttext > Acessado em: 20/05/2015

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.

GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, M. C., Alguns Aspectos da Utilização do Herbicida Glifosato na Agricultura. ACADCOM, 2005, 67p.

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.

GROMOS: *Groningen Molecular Simulation* Disponível em: <<http://www.gromos.net/>> Acessado em 15/05/2015

GUERX, N., PEITSCH, M.C., SCHWEDE, T. (2009). Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. **Electrophoresis**, 30(S1), S162-S173.

H. ALONSO, A. A. BLIZNYUK, J. E. GREASY, *Med. Res. Rev.* 26(5) (2006) 531. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16758486> Acessado em: 09/07/2015

H. J. C. BERENDSEN; J. R. GRIGERA; T. P. STRAATSMA; "The Missing Term in Effective Pair Potentials", **J. Phys. Chem.** 91 6269-6271 (1987).

H.-D. HÖLTJE, W. SIPPL, D. ROGNAN, G. FOLKERS, *Molecular Modeling: Basic Principles and Applications*, Wiley-VCH, Darmstadt, 2nd ed, 2003.

HÖLTJE, H.-D.; FOLKERS, G. Em *Molecular Modeling: Basic Principles and Applications*; Mannhold, R.; Kubinyi, H.; Timmerman, H., eds.; VCH: Weinheim, 1997, 320p.

HONG, M.K., et al. 1990. Conformational substates and motions in myoglobin. External influences on structure and dynamics. *Biophys. J.* 58 429–436. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2207247>> Acessado em 30/09/2015

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; de FATIMA, A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000500046&lng=en&nrm=iso>. Acessado em 20/05/2015

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

IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: mais de 90% da população comem poucas frutas, legumes e verduras, 2010. Disponível em: <<http://censo2010.ibge.gov.br/noticias-censo?busca=1&id=1&idnoticia=1937&t=pof-20082009-mais-90-populacao-comem-poucas-frutas-legumes-verduras&view=noticia>> Acessado em 13/05/2015. implicações na resistência a inseticidas químicos. 2013. 157 p. Tese (doutorado) – Centro de Ciências Biológicas da UFPE. Pernambuco.

IBGE. 2012. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/>> Acessado em 01/12/2015

J. NORBERG, L. NILSSON, *Quart. Rev. Biophys.* 36 (2003) 257. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15029826> Acessado em: 09/07/2015

JORGENSEN, W. L. Rusting of the lock and key model for protein-ligand binding. *Science* .1991: 254 (5034): 954–5.

K. SUHRE & Y.H. SANEJOUAND, ElNemo: a normal mode web-server for protein movement analysis and the generation of templates for molecular replacement. **Nucleic Acids Research**, 32, W610-W614, 2004.

K. SUHRE & Y.H. SANEJOUAND, On the potential of normal mode analysis for solving difficult molecular replacement problems. **Acta Cryst. D** vol.60, p796-799, 2004 © International Union of Crystallography.

KAMPRANIS, S. C. et al. A novel plant glutathione S-transferase/peroxidase suppresses bax lethality in yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 38, p. 29207-29216, 2000.

KEEN, J. H.; JAKOBY, W. B.; **The Journal of biological chemistry**. 1978, 253, 5654. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/670218?dopt=Abstract>> Acessado em 14/05/2015

KIEFER F, ARNOLD K, KÜNZLI M, BORDOLI L, SCHWEDE T (2009). The SWISS-MODEL Repository and associated resources. **Nucleic Acids Research**. 37, D387-

D392. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2686475/> Acessado em 15/05/2015

KILILI, K.; et al. Differential Roles of Tau Class Glutathione S-Transferases in Oxidative Stress. **The Journal of Biological Chemistry**, 2004.

LASKOWSKI, R. A. *et al.* PROCHECK - a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**. v.26, part 2, p.283-291, 1993.

LASKOWSKI, R.A., et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.*, 26, 283–291. 1993.

LOYALL, L. et al. Glutathione and a UV light-induced glutathione S-transferase are involved in signaling to chalcone synthase in cell cultures. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, n. 10, p. 1393-1950, 2000.

M. KARPLUS, J. A. MCCAMMON, *Nat. Struct. Biol.* 9 646. 2002.

MAIA, RAFAEL TRINDADE. Análise *in silico* e polimorfismo genético das glutathione s-transferases da classe epsilon de *Anopheles gambiae* (diptera: culicidae): possíveis implicações na resistência a inseticidas químicos. Tese (doutorado) – Centro de Ciências Biológicas da UFPE. Pernambuco. 2013. 157 p.

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.

MELO, F.; E. FEYTMANS. "Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy." **Journal of Molecular Biology** 277(5): 1141-1152. 1998.

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.

MORSE, P. M.; FESHACH, H., 1953, *Methods of theoretical physics*: McGraw-Hill, New York.

MUELLER, L. A. et al. AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 123, n. 4, p. 1561-1570, 2000.

MUKESH, B.; RAKESH, K. Molecular Docking: A Review. *IJRAP*, 2011; 2(6): 1746-1751.

NADENDLA, R. R. Molecular Modeling: A Powerful Tool for Drug Design and Molecular Docking. **Resonance**. vol. 9, pag. 51-60, 2004.

NCBI: *National Center for Biotechnology Information* Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acessado em 15/05/2015

OLIVEIRA JR. R. S. CONSTANTIN J. INOUE M. H.. **Biologia e manejo de plantas daninhas**. São Paulo: Omnipax, 2011, 348 p.

OLIVEIRA Jr., R. S. **Mecanismo de ação de herbicidas**. In: OLIVEIRA Jr., R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. (Coord.). *Biologia e Manejo de Plantas Daninhas*. Curitiba, PR: Omnipax, 2011. p. 141-184.

OOSTENBRINK, J. B., BOUWMANS, C. A. M., KOOPMANSCHAP, M. A., et al (2004) *Manual for Costing: Methods and Standard Costs for Economic Evaluations in Health Care* (in Dutch). Diemen: Health Insurance Board.

PDB: *Protein Data Bank* Disponível em: <<http://www.rcsb.org/>> Acessado em 15/05/2015

PMDB: *Protein Model DataBase* Disponível em: <<https://bioinformatics.cineca.it/PMDB/>> Acessado em 15/05/2015

RANSON, H.; PRAPANTHADARA, L.; HEMINGWAY, J. Cloning and characterization of two glutathione S-transferase from a DDT – resistant strain of *Anopheles gambiae*. **The Biochemical Journal**, London, v. 324, p. 97-102, 1997.

RICARDO A.J. ET AL., inventor; Universidade Federal de Minas Gerais UFMG., cessionário. Composições farmacêuticas antineoplásicas contendo compostos nitroaromáticos substituídos. Brasil patente WO2012003563 A1 2012 Jan 12 Disponível em: <http://www.google.com/patents/WO2012003563A1?cl=pt> Acessado em: 06/06/2015

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.

RUEST D. A., inventor ; Monsanto Company., cessionário. Procedimiento para la obtencion de alquiltioalcanoatos. United States patente ES2001007 A4 1988 Ap 16 Disponível em: <http://invenes.oepm.es/InvenesWeb/detalle?referencia=E87870064> Acessado em:06/06/2015

SANTOS JÚNIOR S. R. G. **Arroz em casca natural**: prospecção safra 2014-15. (CONAB, 2015) Disponibilizado em meio digital pelo autor, mediante solicitação via correio eletrônico, maio 2015.

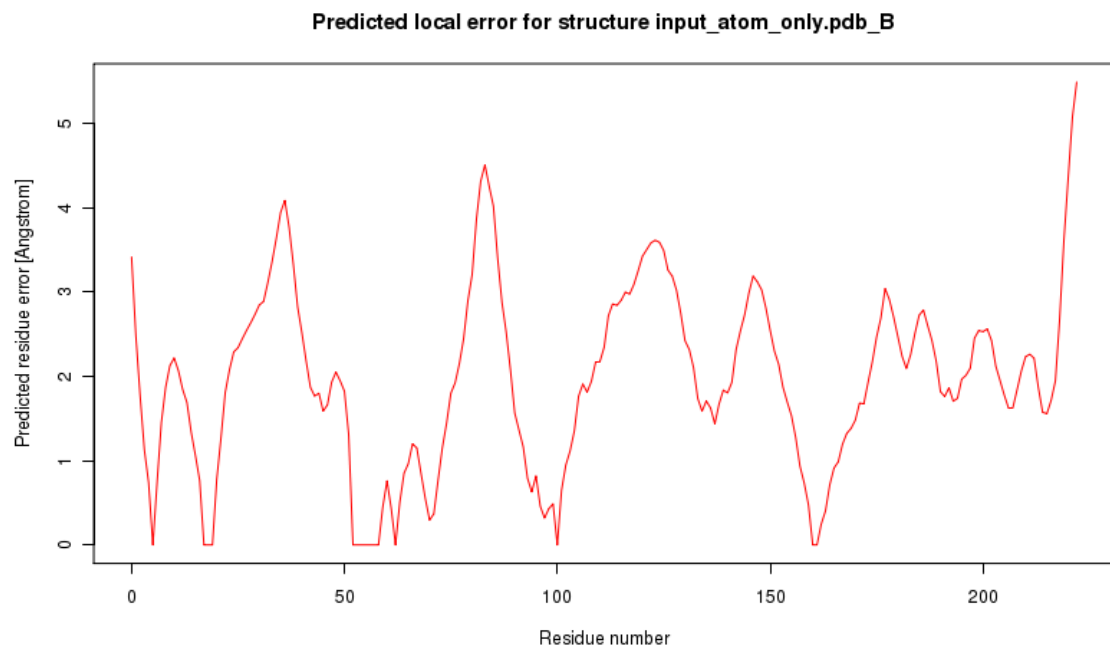
SCHLOSS, J.V., Acetolactate synthase, mechanism of action and its herbicide binding site. *Pestic Sci*, 29:283_292, 1990.

SPOEL, D.; et al. GROMACS: Fast, flexible, and free. Volume 26, Issue 16. 2005 .Pg 1701–1718

SUHRE, K.; SANEJOUAND, Y. ElNémo: a normal mode web server for protein movement analysis and the generation of templates for molecular replacement. *Oxford Journals: Science & Mathematics. Nucleic Acids Research*. Volume 32, Pg 610-614. 2004.

- SHEEHAN, D.; et al.; **Biochem. J.** 2001, *360*, 1. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11695986>> Acessado em 14/05/2015
- HANSSON T., OOSTENBRINK C., VAN GUNSTEREN W., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12 (2002) 190.
- THOM, R.; et al. Structure of a Tau Class Glutathione *S*-Transferase from Wheat Active in Herbicide Detoxification. **Biochemistry**, 2002, *41* (22), **pg** 7008–7020
- TIRION, M.M. Large Amplitude Elastic Motions in Proteins from a Single-Parameter, Atomic Analysis **Phys. Rev. Lett.** vol. 77, p1905-1908, 1996.
- U. BURKERT, N. L. ALLINGER, *Molecular Mechanics*, Molecular Mechanics, ACS Monograph 177, American Chemical Society, Washington, D.C., 1982, 64-72.
- VAN GUNSTEREN, W. F., S. R. BILLETER, et al. (1996). *Biomolecular Simulations: The GROMOS96 Manual and User Guide*. Zürich, VdF Hochschulverlag ETHZ.
- VARGAS, L., et al, Resistência de plantas daninhas à herbicidas. Viçosa, MG: dos autores, 1999. 131 p.
- VIEIRA, E. H. N.; VIEIRA, N. R. de A. Armazenagem. In: STONE, L. F.; MOREIRA, J. A. A.; RABELO, R. R.; BIAVA, M. (Ed.). **Arroz: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p. 223-231. (Coleção 500 perguntas 500 respostas).
- VMD: *Visual Molecular Dynamics* Disponível em: <<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>> Acessado em 15/05/2015
- W. F. van GUNSTEREN, H. J. C. BERENDSEN, *ANGEW. Chem. Int. Ed. Engl.*, 29 (1990) 992.
- WANDER A. E. Cultivo do arroz de terras altas no estado de mato grosso. **Sistemas de Produção**, n.7, 2006, Embrapa Arroz e Feijão. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozTerrasAltasMatoGrosso/>> Acessado em: 24/04/2015.
- WANDER A. E., Perspectivas de mercado para o arroz dentro e fora do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 4; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 26., 2005, Santa Maria, RS. Anais ... : Orium, 2005, v. 2, p. 439-441.
- WEINER S.J., et al. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. **J Am Chem Soc.** 1984; 106: 765-784. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00315a051>> Acessado em 15/05/2015
- ZINC *database* Disponível em: (<<http://zinc.docking.org/>>) Acessado em 15/05/2015

APÊNDICES

APÊNDICE A - Erro Residual para a estrutura 3D da proteína OsGSTU4.

Fonte: Construído com dados da pesquisa

APÊNDICE B – Resultado do Doking Molecular do 4° ao 10° ranque, executado pelo autodock para o Metsulfuron.

B.01 - Visualização geral do 4° ranqueado pelo autodock referente ao Metsulfuron

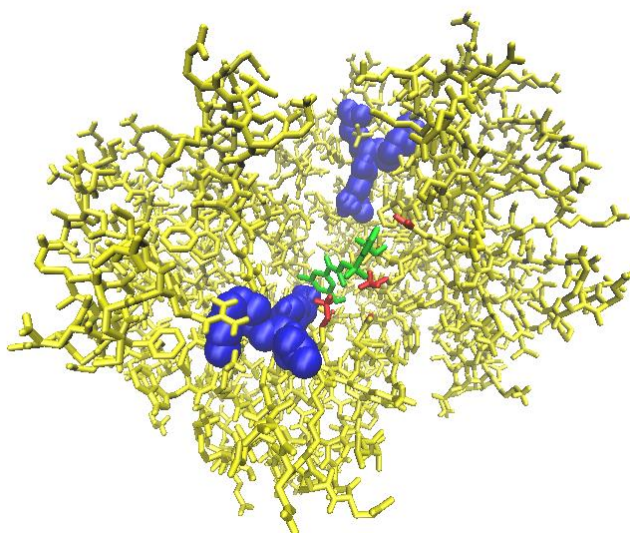


Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa

B.02 - Visualização do 4° ranqueado pelo autodock referente ao Metsulfuron, com zoom de diferentes angulações.

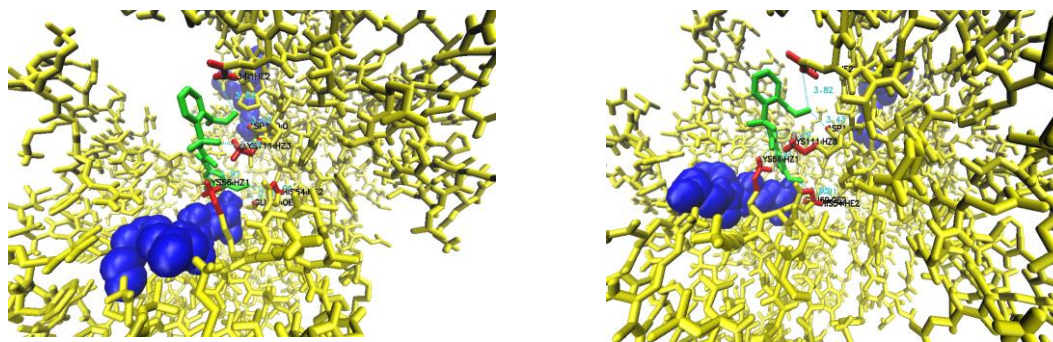


Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa

B.03 - Tabela de distâncias dos átomos do 4° ranqueado pelo autodock referente ao Metsulfuron

Átomos de resíduos próximos	Átomo usado de referência (ligante)	Distâncias respectiva (Å)
ASP110:O	<0>0:C14	3.43
LYS111:HZ3	<0>0:O4	2.29
LYS56:HZ1	<0>0:O2	1.91
GLU69:OE2	<0>0:C5	2.95
HIS54:HE2	<0>0:C5	3.91
GLN134:1HE	<0>0:C14	3.83

Fonte: Construído com dados da pesquisa

B.04 - Visualização geral do 5º ranqueado pelo autodock referente ao Metsulfuron

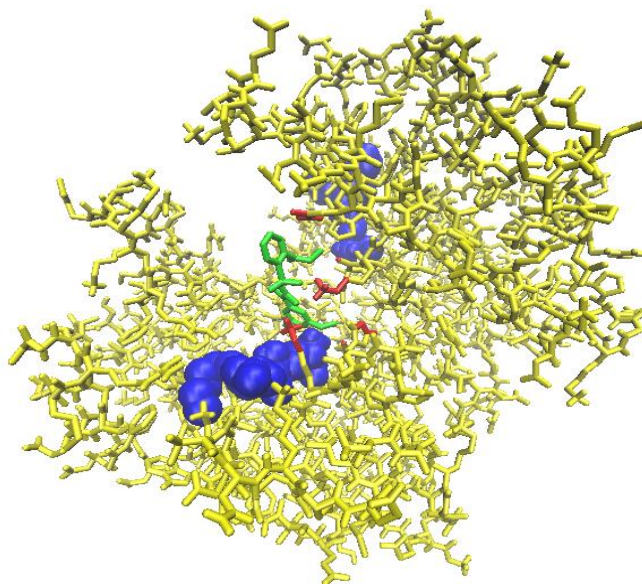


Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa

B.05 - Visualização do 5º ranqueado pelo autodock referente ao Metsulfuron, com zoom de diferentes angulações.

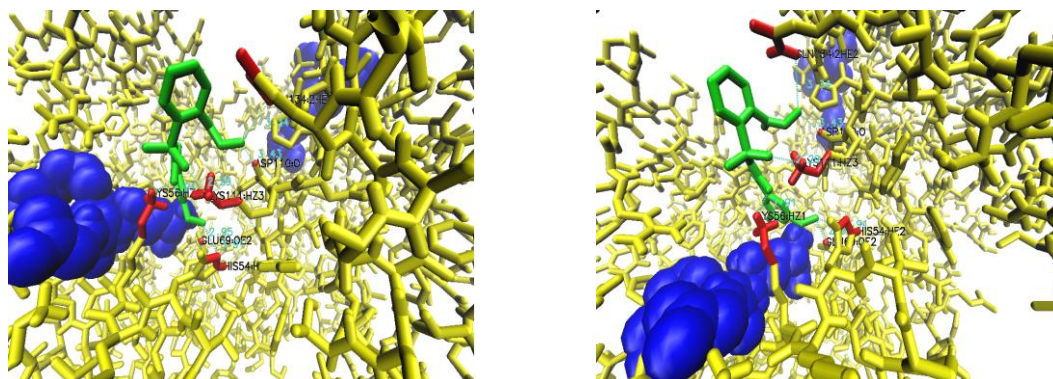


Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa

B.06 - Tabela de distâncias dos átomos do 5º ranqueado pelo autodock referente ao Metsulfuron

Átomos de resíduos próximos	Átomo usado de referência (ligante)	Distâncias respectiva (Å)
GLU69:OE2	<0>0:C5	2.95
LYS56:HZ1	<0>0:O2	1.91
LYS111:HZ3	<0>0:O4	2.29
ASP110:O	<0>0:C14	3.43
GLN134:2HE	<0>0:C14	3.34
HIS54:HE2	<0>0:C5	3.91

Fonte: Construído com dados da pesquisa

B.7 - Visualização geral do 6º ranqueado pelo autodock referente ao Metsulfuron

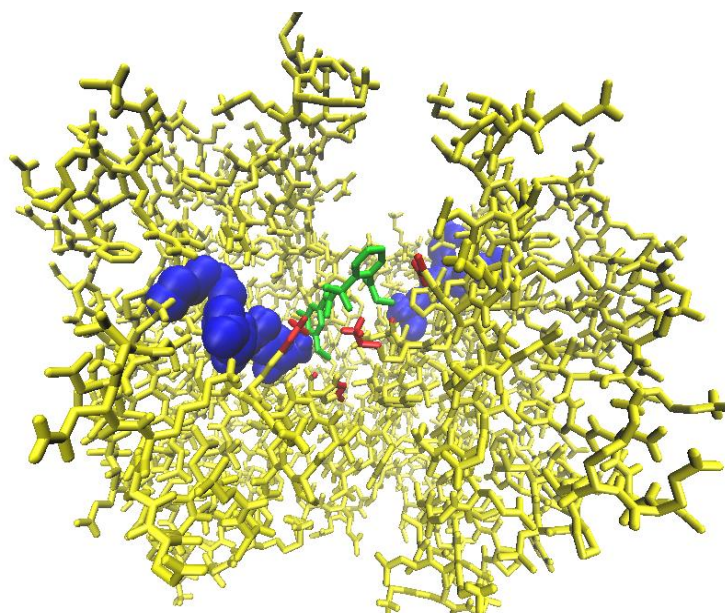


Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa

B.8 - Visualização do 6º ranqueado pelo autodock referente ao Metsulfuron, com zoom de diferentes angulações.

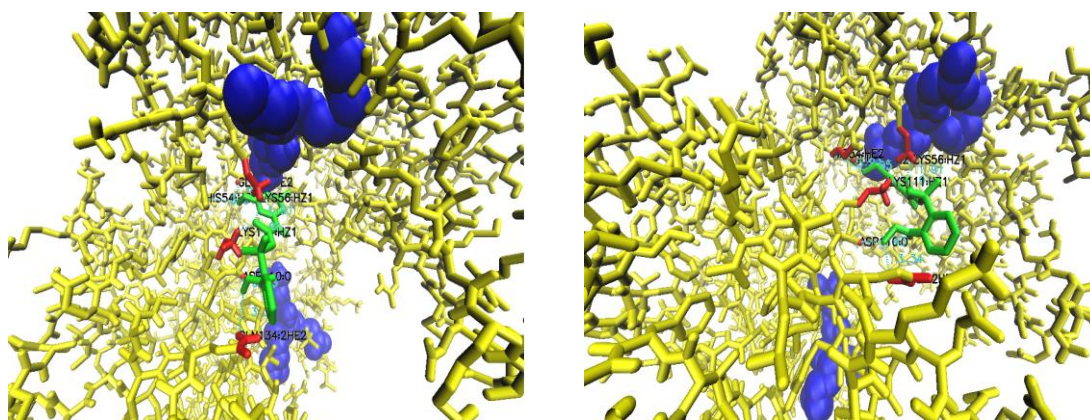


Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa

B.09 - Tabela de distâncias dos átomos do 6º ranqueado pelo autodock referente ao Metsulfuron

Átomos de resíduos próximos	Átomo usado de referência (ligante)	Distâncias respectiva (Å)
LYS111:HZ1	<0>:O2	1.91
GLU69:OE2	<0>:C5	2.95
LYS111:HZ1	<0>:O2	1.91
ASP110:O	<0>:C14	3.43
GLN134:2HE	<0>:C14	3.34
HIS54:HE2	<0>:C5	3.91

Fonte: Construído com dados da pesquisa

B.10 - Visualização geral do 7º ranqueado pelo autodock referente ao Metsulfuron

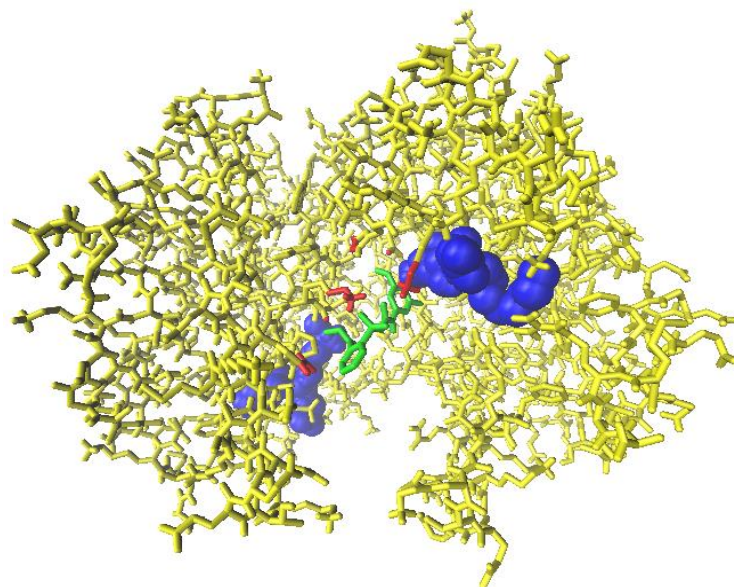


Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa

B.11 - Visualização do 7º ranqueado pelo autodock referente ao Metsulfuron, com zoom de diferentes angulações.

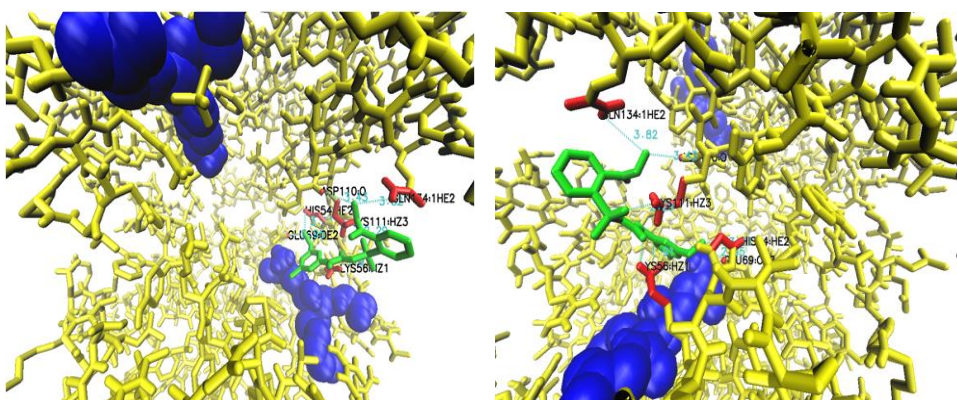


Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa

B.12 - Tabela de distâncias dos átomos do 7º ranqueado pelo autodock referente ao Metsulfuron

Átomos de resíduos próximos	Átomo usado de referência (ligante)	Distâncias respectiva (Å)
LYS111:HZ3	<0>:O4	2.29
LYS56:HZ1	<0>:O2	1.91
HIS54:HE2	<0>:C5	3.91
GLU69:OE2	<0>:C5	2.95
ASP110:O	<0>:C14	3.43
GLN134:1HE	<0>:C14	3.82

Fonte: Construído com dados da pesquisa

B.16 - Visualização geral do 9º ranqueado pelo autodock referente ao Metsulfuron

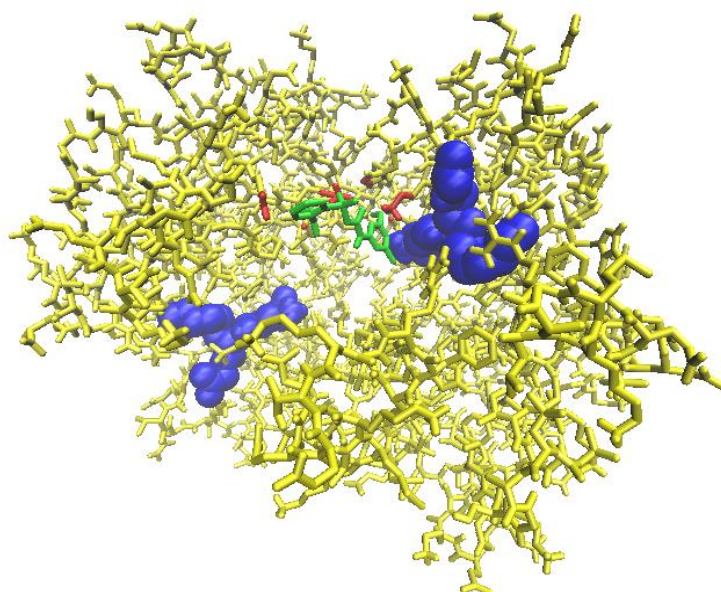


Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa

B.17 - Visualização do 9º ranqueado pelo autodock referente ao Metsulfuron, com zoom de diferentes angulações.

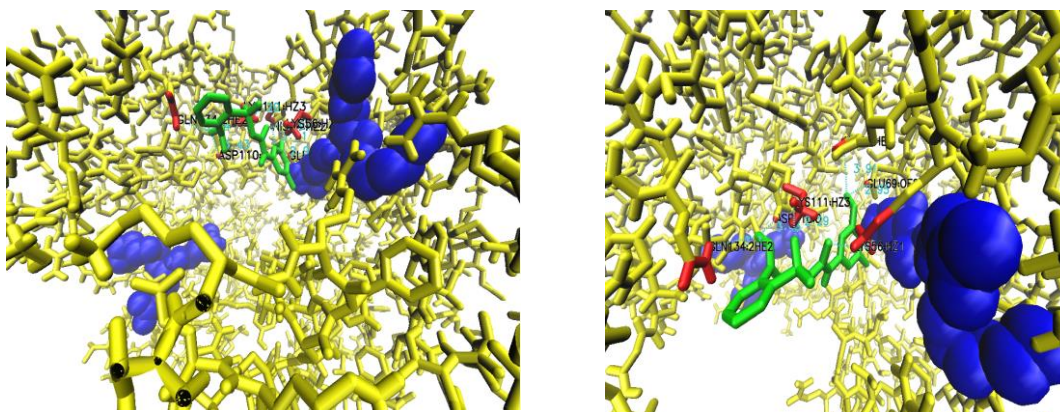


Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa

B.18 - Tabela de distâncias dos átomos do 9º ranqueado pelo autodock referente ao Metsulfuron

Átomos de resíduos próximos	Átomo usado de referência (ligante)	Distâncias respectiva (Å)
LYS56:HZ1	<0>0:O2	1.91
ASP110:O	<0>0:C14	3.43
LYS111:HZ3	<0>0:O4	2.29
HIS54:HE2	<0>0:C5	3.91
GLN134:2HE	<0>0:C14	3.34
GLU69:OE2	<0>0:C5	2.95

Fonte: Construído com dados da pesquisa

B.19 - Visualização geral do 10º ranqueado pelo autodock referente ao Metsulfuron

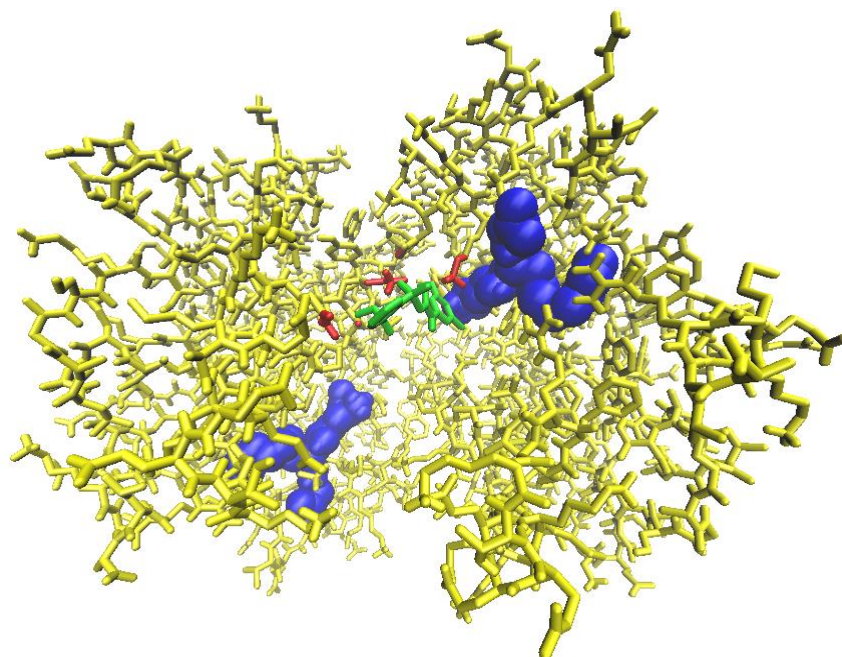


Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa

B.20 - Visualização do 10º ranqueado pelo autodock referente ao Metsulfuron, com zoom de diferentes angulações.

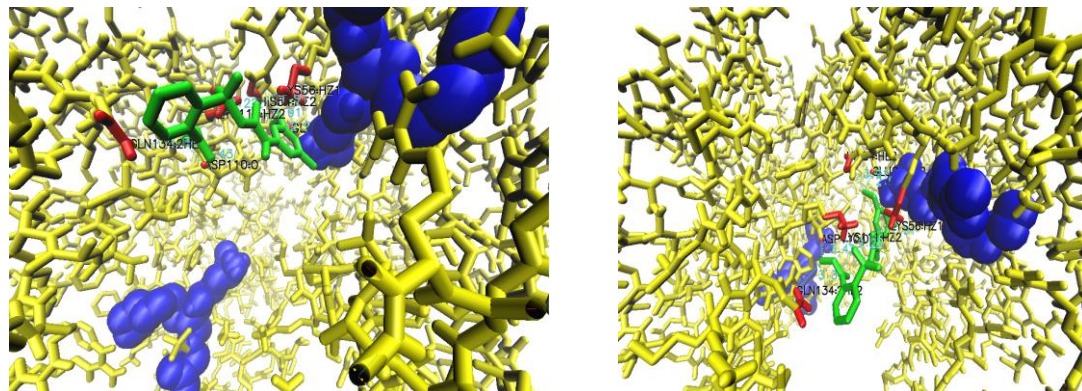


Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa

B.21 - Tabela de distâncias dos átomos do 10º ranqueado pelo autodock referente ao Metsulfuron

Átomos de resíduos próximos	Átomo usado de referência (ligante)	Distâncias respectiva (Å)
LYS111:HZ2	<O>O:O4	2.22
GLU69:OE2	<O>O:C5	2.95
HIS54:HE2	<O>O:C5	3.91
ASP110:O	<O>O:C14	3.43
LYS56:HZ1	<O>O:O2	1.91
GL134:2HE	<O>O:C14	3.34

Fonte: Construído com dados da pesquisa

APÊNDICE C – Resultado do Doking Molecular do 4º ao 10º ranque, executado pelo autodock para o Bentazon.

C.01 - Visualização geral do 4º ranqueado pelo autodock referente ao Bentazon

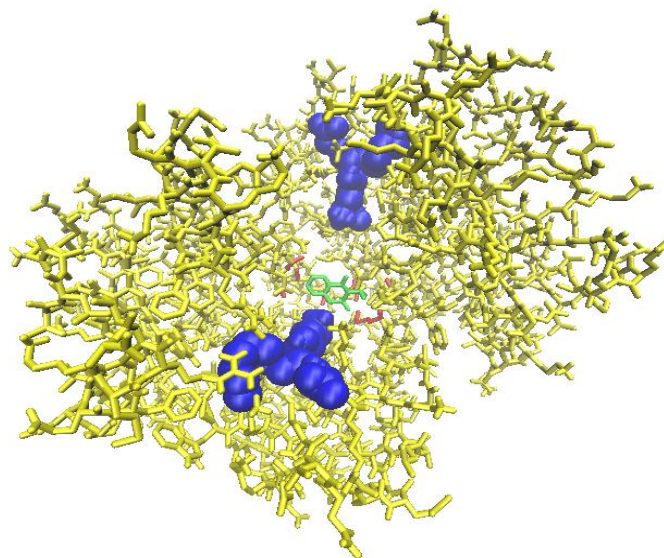


Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa.

C.02 - Visualização do 4º ranqueado pelo autodock referente ao Bentazon, com zoom de diferentes angulações.

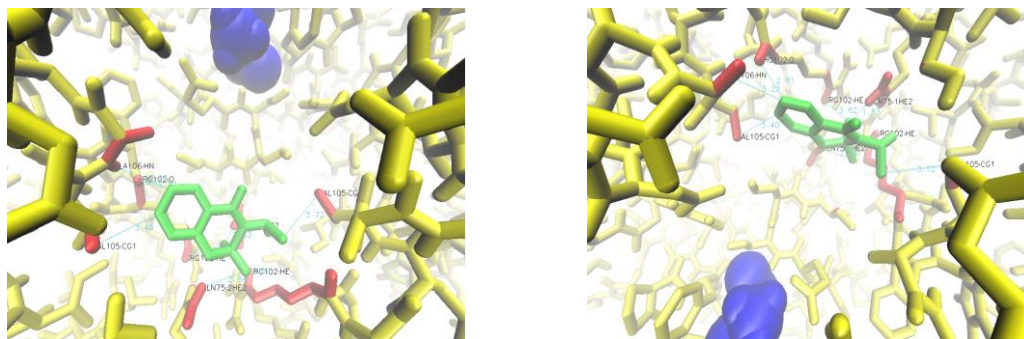


Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa.

C.03 - Tabela de distâncias dos átomos do 4º ranqueado pelo autodock referente ao Bentazon

Átomos de resíduos próximos	Átomo usado de referência (ligante)	Distâncias respectiva (Å)
VAL 105:CG'	<0>0:C1	3.40
GLN75:2HE2	<0>0:O2	2.84
GLN75:1HE2	<0>0:O3	1.83
ARG102:HE	<0>0:O2	3.62
ALA106:HN	<0>0:C7	3.23
ARG102:O	<0>0:C7	2.81
VAL105:CG'	<0>0:C8	3.40

Fonte: Construído com dados da pesquisa

C.04 - Visualização geral do 5º ranqueado pelo autodock referente ao Bentazon

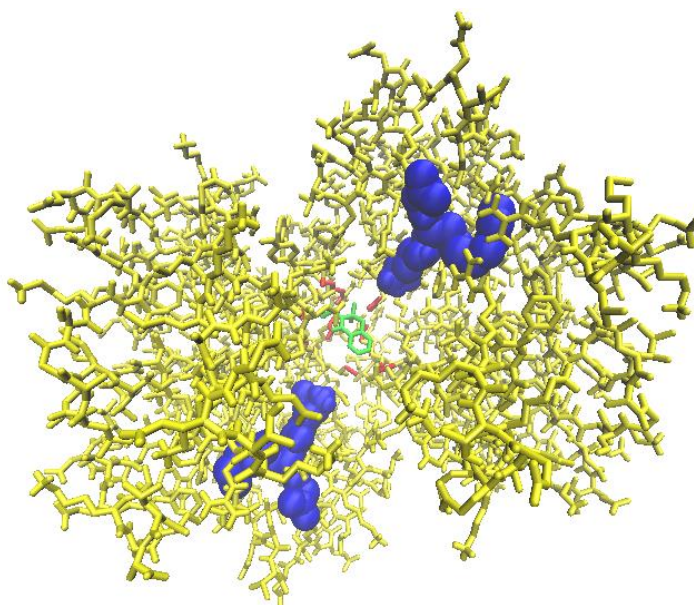


Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa.

C.05 - Visualização do 5º ranqueado pelo autodock referente ao Bentazon, com zoom de diferentes angulações

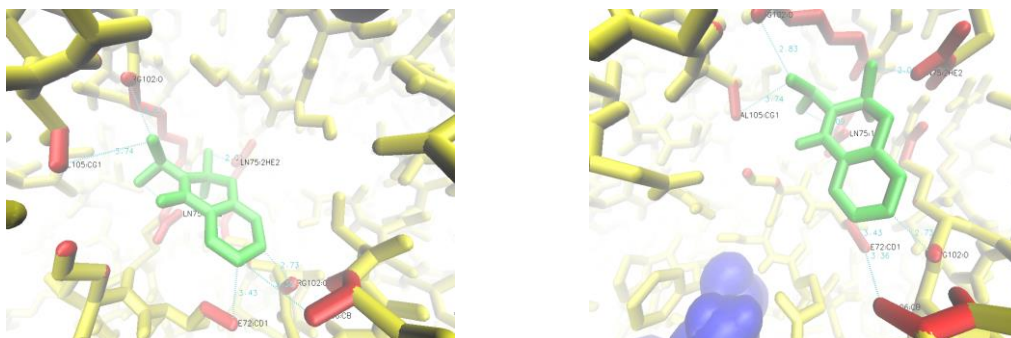


Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa.

C.06 - Tabela de distâncias dos átomos do 5º ranqueado pelo autodock referente ao Bentazon

Átomos de resíduos próximos	Átomo usado de referência (ligante)	Distâncias respectiva (Å)
VAL105:CG'	<0>:C3	3.74
ARG102:O	<0>:C3	2.83
GLN75:1HE2	<0>:C1	3.09
GLN75:2HE2	<0>:O2	2.01
ALA106:CB	<0>:C7	3.36
ILE72:CD1	<0>:C7	3.43
ARG102:O	<0>:C8	2.73

Fonte: Construído com dados da pesquisa

C.07 - Visualização geral do 6º ranqueado pelo autodock referente ao Bentazon

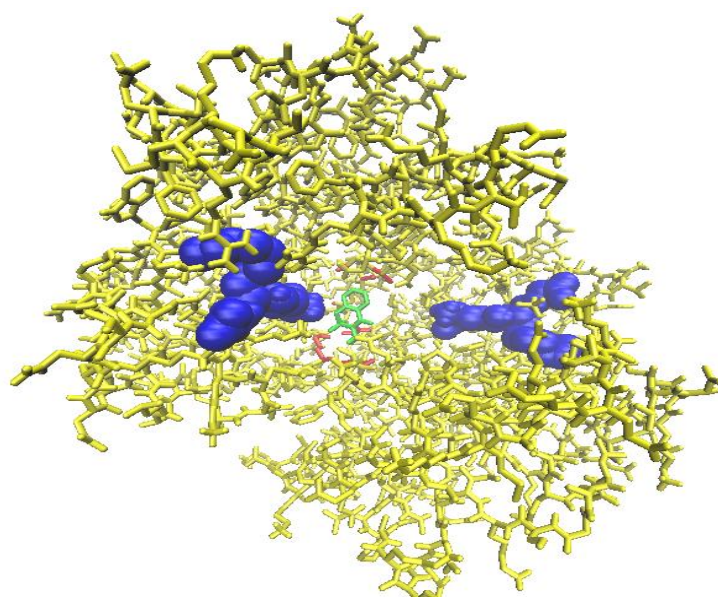


Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa.

C.08 - Visualização do 6º ranqueado pelo autodock referente ao Bentazon, com zoom de diferentes angulações.

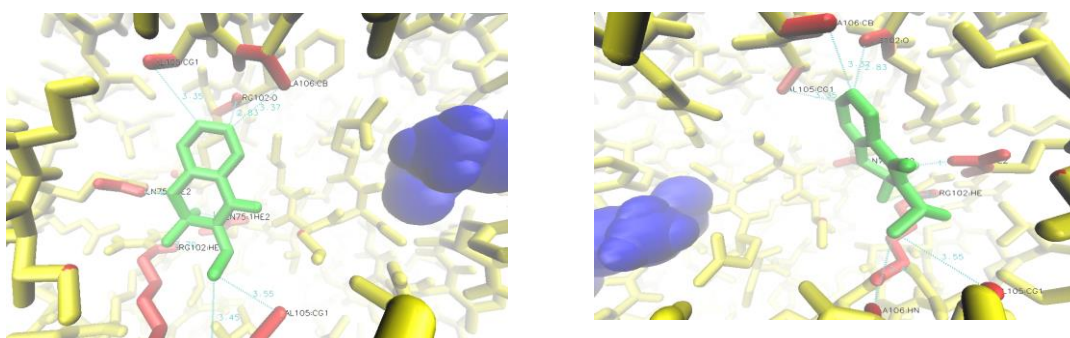


Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa.

C.09 - Tabela de distâncias dos átomos do 6º ranqueado pelo autodock referente ao Bentazon

Átomos de resíduos próximos	Átomo usado de referência (ligante)	Distâncias respectiva (Å)
VAL105:CG'	<0>0:C8	3.35
ALA106:CB	<0>0:C7	3.37
ARG102:O	<0>0:C7	2.83
VAL105:CG'	<0>0:C1	3.55
ALA106:HN	<0>0:C1	3.45
GLN75:1HE2	<0>0:N2	2.12
GLN75:1HE2	<0>0:O3	1.79
ARG102:HE	<0>0:O2	3.70

Fonte: Construído com dados da pesquisa

C.10 - Visualização geral do 7º ranqueado pelo autodock referente ao Bentazon

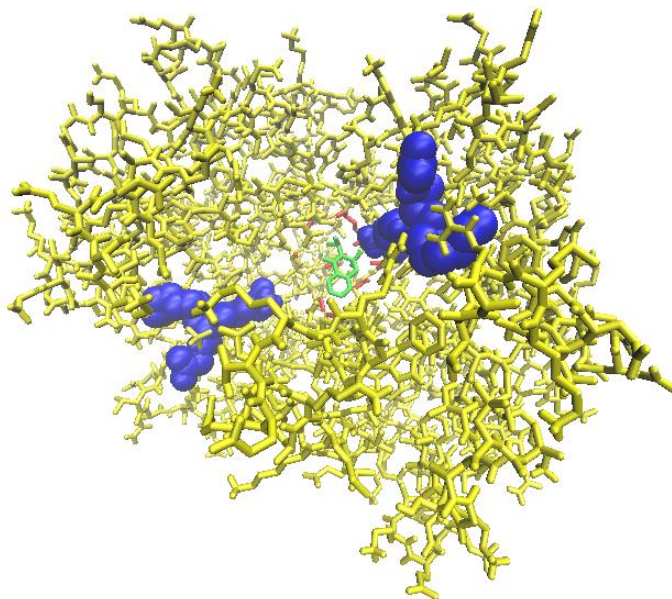


Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa.

C.11 - Visualização do 7º ranqueado pelo autodock referente ao Bentazon, com zoom de diferentes angulações

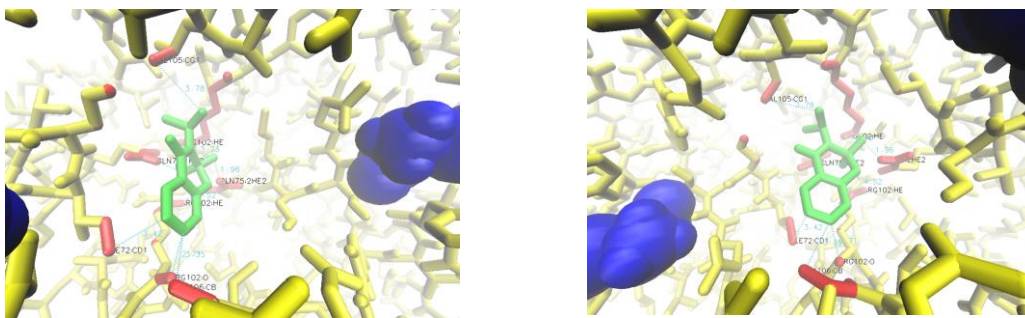


Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa.

C.12 - Tabela de distâncias dos átomos do 7º ranqueado pelo autodock referente ao Bentazon

Átomos de resíduos próximos	Átomo usado de referência (ligante)	Distâncias respectiva (Å)
ALA106:CB	<0>:C8	3.35
ARG102:O	<0>:C8	2.71
ILE72:CD1	<0>:C7	3.42
VAL105:CG'	<0>:C3	3.78
GLN75:1HE2	<0>:O3	1.94
GLN75:2HE2	<0>:O2	1.96
ARG102:HE	<0>:O2	3.73

Fonte: Construído com dados da pesquisa

C.13 - Visualização geral do 8º ranqueado pelo autodock referente ao Bentazon

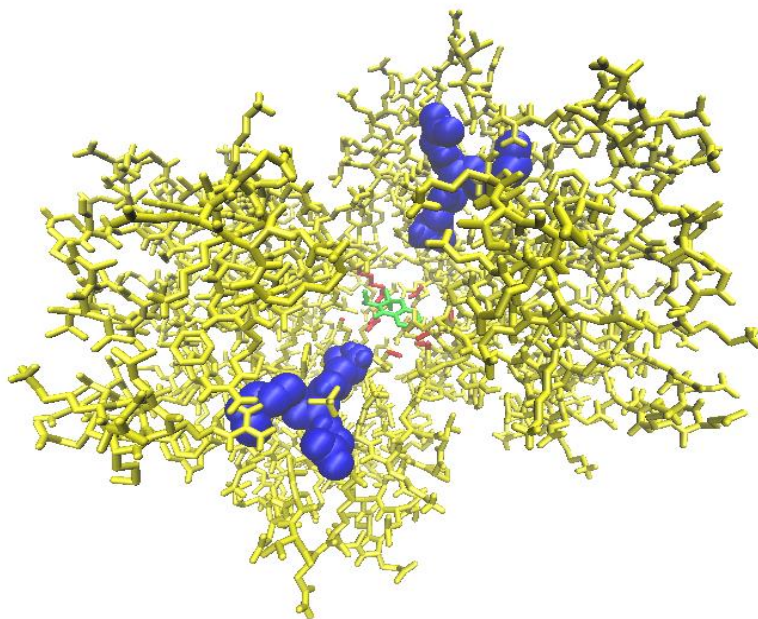


Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa..

C.14 - Visualização do 8º ranqueado pelo autodock referente ao Bentazon, com zoom de diferentes angulações.

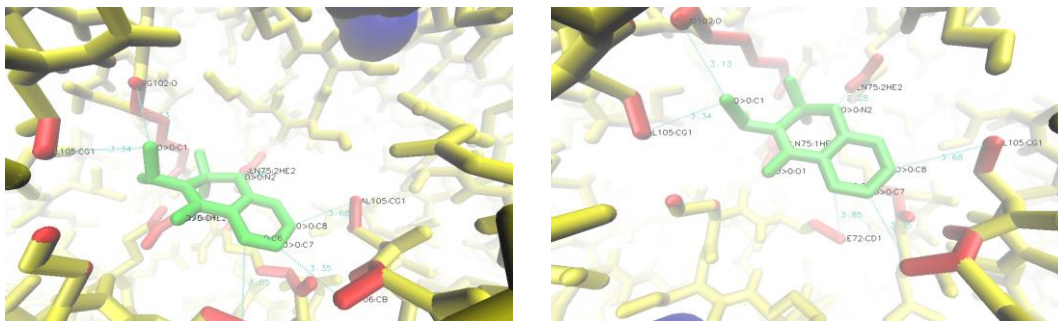


Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa.

C.15 - Tabela de distâncias dos átomos do 8º ranqueado pelo autodock referente ao Bentazon

Átomos de resíduos próximos	Átomo usado de referência (ligante)	Distâncias respectiva (Å)
GLN75:2HE2	<O>:N2	2.28
ARG102:O	<O>:C1	3.13
ALA106:CB	<O>:C7	3.35
VAL105:CG1	<O>:C8	3.68
ILE72:CD1	<O>:C6	3.85
GLN75:1HE2	<O>:O1	3.90
VAL105:CG'	<O>:C1	3.34

Fonte: Construído com dados da pesquisa

C.16 - Visualização geral do 9º ranqueado pelo autodock referente ao Bentazon

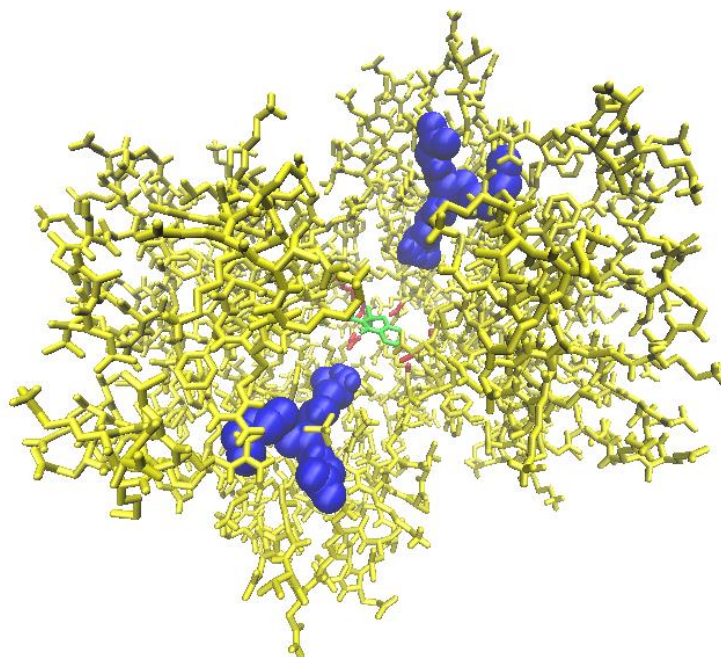


Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa.

C.17 - Visualização do 9º ranqueado pelo autodock referente ao Bentazon, com zoom de diferentes angulações.

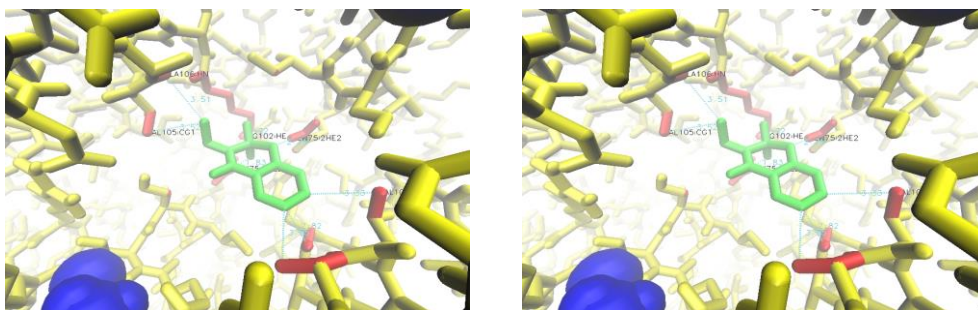


Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa.

C.18 - Tabela de distâncias dos átomos do 9º ranqueado pelo autodock referente ao Bentazon

Átomos de resíduos próximos	Átomo usado de referência (ligante)	Distâncias respectiva (Å)
ALA106:CB	<0>0:C7	3.35
GLN75:2HE2	<0>0:N2	2.15
ALA106:HN	<0>0:C1	3.51
VAL105:CG'	<0>0:C8	3.33
GLN75:1HE2	<0>0:O3	1.83
ARG102:HE	<0>0:O2	2.82
VAL105:CG'	<0>0:C1	3.52

Fonte: Construído com dados da pesquisa

C.19 - Visualização geral do 10º ranqueado pelo autodock referente ao Bentazon

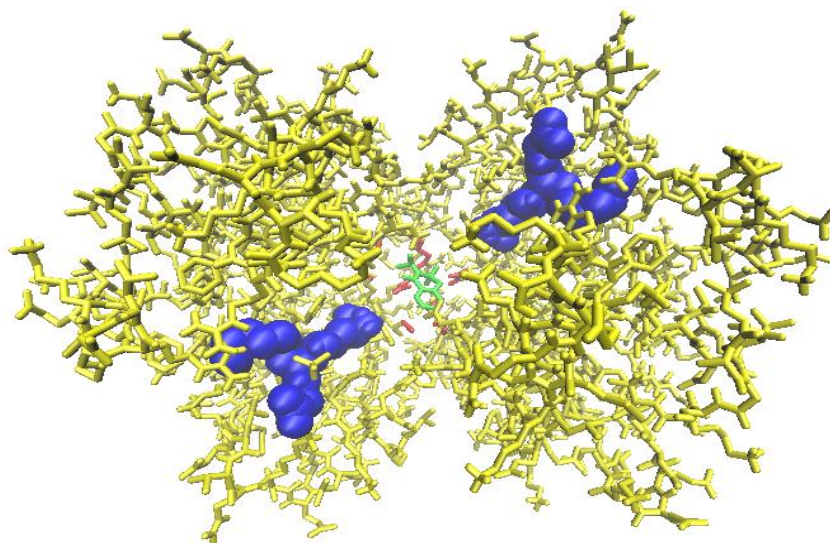


Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa.

C.20 - Visualização do 10º ranqueado pelo autodock referente ao Bentazon, com zoom de diferentes angulação.

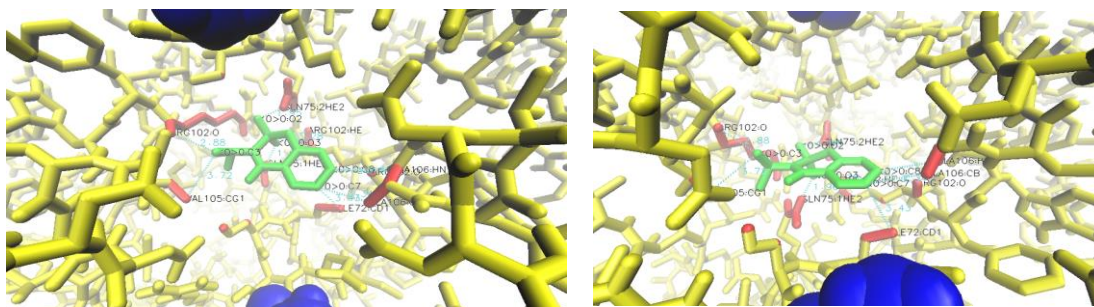


Imagem produzida no programa *Visual Molecular Dynamics* pelo autor da pesquisa.

C.21- Tabela de distâncias dos átomos do 10º ranqueado pelo autodock referente ao Bentazon

Átomos de resíduos próximos	Átomo usado de referência (ligante)	Distâncias respectiva (Å)
VAL105:CG'	<0>:C3	3.72
ARG102:O	<0>:C3	2.88
ILE72:CD1	<0>:C7	3.43
ALA106:CB	<0>:C7	3.34
ARG102:O	<0>:C8	2.88
ALA106:HN	<0>:C8	3.40
GLN75:2HE2	<0>:O2	1.95
GLN75:1HE2	<0>:O3	1.96
ARG102:HE	<0>:O3	3.28

Fonte: Construído com dados da pesquisa

APÊNDICE D – Identificação das regiões de maior flutuação, e respectivos resíduos.

	Helix Number	Start Residue	End Residue	Helix Type	No. of Residues	Sequence
	1	B 17	B 29	α	13	FFVTRVELALGK
	2	B 45	B 50	α	6	ELLAS
	3	B 70	B 80	α	11	SSIVQYDEA
	4	B 95	B 111	α	17	PIERAVARFWVAYVDDK
	5	B 113	B 121	α	9	VPAWVAITR
A	6	B 125	B 149	α	25	EEKAEQMIQLLAAVETLEGALKDC
	7	B 163	B 169	α	7	IVDVALG
B	8	B 172	B 182	α	11	ISWKATEVLA
	9	B 193	B 203	α	11	PLLAAWAQRFQ
	10	B 206	B 211	α	6	DVAEV
D Resíduo 225	11	B 215	B 226	α	12	VDGVVEFASQML
	12	C 17	C 29	α	13	FFVTRVELALGK
	13	C 45	C 50	α	6	ELLAS
F	14	C 70	C 80	α	11	SSIVQYDEA
H	15	C 95	C 111	α	17	PIERAVARFWVAYVDDK
	16	C 113	C 121	α	9	VPAWVAITR
	17	C 125	C 149	α	25	EEKAEQMIQLLAAVETLEGALKDC
	18	C 163	C 169	α	7	IVDVALG
	19	C 172	C 182	α	11	ISWKATEVLA
	20	C 193	C 204	α	12	PLLAAWAQRFQ
	21	C 206	C 211	α	6	DVAEV
	22	C 215	C 226	α	12	VDGVVEFASQML

Fonte: Construído com dados da pesquisa

APÊNDICE E – Tabela de detalhamento para o distanciamento dos carbonos alfa de cada resíduo em relação a seu respectivo par (as cores azul e vermelha indicam, respectivamente, distanciamento e aproximação).

largest increase	ref	largest decrease	largest increase	ref	largest decrease
GLU 351	■ 0.07 THR 1 -0.04 ■	ALA 340	GLU 351	■ 0.09 ASP 58 -0.05 ■	VAL 310
GLU 351	■ 0.07 LYS 2 -0.04 ■	ALA 340	THR 363	■ 0.08 ASP 59 -0.05 ■	LEU 309
GLU 351	■ 0.07 LEU 3 -0.05 ■	ALA 340	VAL 365	■ 0.08 ASN 60 -0.05 ■	GLU 308
GLU 351	■ 0.08 ILE 4 -0.04 ■	ALA 340	ASP 362	■ 0.10 GLY 61 -0.05 ■	GLU 308
GLU 351	■ 0.08 LEU 5 -0.04 ■	ALA 340	VAL 365	■ 0.11 THR 62 -0.08 ■	VAL 310
GLU 351	■ 0.09 TYR 6 -0.04 ■	VAL 310	THR 363	■ 0.12 ILE 63 -0.09 ■	VAL 310
ASP 348	■ 0.09 THR 7 -0.04 ■	LYS 216	THR 363	■ 0.09 VAL 64 -0.07 ■	MET 48
ASP 348	■ 0.09 LEU 8 -0.04 ■	LYS 216	GLU 351	■ 0.08 CYS 65 -0.07 ■	MET 48
ASP 348	■ 0.07 HIS 9 -0.05 ■	GLN 439	GLU 351	■ 0.07 GLU 66 -0.06 ■	PHE 119
ASP 348	■ 0.07 VAL 10 -0.06 ■	GLN 439	GLU 351	■ 0.06 SER 67 -0.08 ■	ALA 340
ASP 348	■ 0.08 SER 11 -0.06 ■	GLN 439	GLU 351	■ 0.04 HIS 68 -0.10 ■	ALA 340
ASP 348	■ 0.05 PRO 12 -0.12 ■	GLN 439	GLU 351	■ 0.05 ALA 69 -0.09 ■	ALA 340
ASP 348	■ 0.06 PRO 13 -0.10 ■	GLN 439	GLU 351	■ 0.06 ILE 70 -0.08 ■	ALA 340
ASP 348	■ 0.07 CYS 14 -0.07 ■	GLN 439	GLU 351	■ 0.04 MET 71 -0.10 ■	GLN 439
ASP 348	■ 0.05 ARG 15 -0.12 ■	GLN 439	ALA 313	■ 0.06 ILE 72 -0.11 ■	GLN 439
ASP 348	■ 0.04 ALA 16 -0.14 ■	GLN 439	ALA 313	■ 0.08 TYR 73 -0.08 ■	ALA 340
ASP 348	■ 0.05 VAL 17 -0.10 ■	GLN 439	THR 363	■ 0.05 LEU 74 -0.09 ■	ALA 340
ASP 348	■ 0.05 GLU 18 -0.11 ■	GLN 439	ALA 313	■ 0.05 VAL 75 -0.12 ■	GLN 439
ASP 348	■ 0.03 LEU 19 -0.15 ■	GLN 439	ALA 313	■ 0.06 SER 76 -0.10 ■	GLN 439
GLU 351	■ 0.03 CYS 20 -0.15 ■	GLN 439	VAL 365	■ 0.07 LYS 77 -0.08 ■	ALA 340
GLU 351	■ 0.04 ALA 21 -0.11 ■	GLN 439	VAL 365	■ 0.06 TYR 78 -0.09 ■	ALA 340
GLU 351	■ 0.04 LYS 22 -0.14 ■	GLN 439	VAL 365	■ 0.05 GLY 79 -0.13 ■	GLN 439
GLU 351	■ 0.03 ALA 23 -0.16 ■	GLN 439	ASN 372	■ 0.05 LYS 80 -0.14 ■	GLN 439
VAL 365	■ 0.04 LEU 24 -0.14 ■	GLN 439	LYS 307	■ 0.06 ASP 81 -0.16 ■	GLN 439
GLU 351	■ 0.04 GLY 25 -0.12 ■	GLN 439	LYS 307	■ 0.07 ASP 82 -0.17 ■	GLN 439
GLU 351	■ 0.05 LEU 26 -0.09 ■	GLN 439	LYS 307	■ 0.05 SER 83 -0.21 ■	GLN 439
GLU 351	■ 0.05 GLU 27 -0.07 ■	GLN 439	LYS 307	■ 0.04 LEU 84 -0.20 ■	GLN 439
GLU 351	■ 0.06 LEU 28 -0.06 ■	ALA 340	LYS 307	■ 0.05 TYR 85 -0.18 ■	GLN 439
ALA 347	■ 0.07 GLU 29 -0.04 ■	ALA 340	ASP 302	■ 0.05 SER 86 -0.19 ■	GLN 439
ALA 347	■ 0.08 GLN 30 -0.04 ■	ALA 340	ASP 302	■ 0.07 LYS 87 -0.16 ■	GLN 439
ALA 347	■ 0.09 LYS 31 -0.04 ■	LYS 216	GLY 151	■ 0.07 GLU 88 -0.19 ■	GLN 439
ALA 347	■ 0.10 THR 32 -0.04 ■	LYS 216	SER 296	■ 0.07 LEU 89 -0.19 ■	GLN 439
ALA 347	■ 0.12 VAL 33 -0.05 ■	LYS 216	GLY 151	■ 0.09 VAL 90 -0.24 ■	GLN 439
ALA 347	■ 0.13 ASN 34 -0.06 ■	LYS 216	GLY 151	■ 0.09 LYS 91 -0.25 ■	GLN 439
ASP 348	■ 0.15 LEU 35 -0.06 ■	LYS 216	GLY 151	■ 0.06 GLN 92 -0.21 ■	GLN 439
ALA 347	■ 0.14 LEU 36 -0.08 ■	LYS 216	VAL 150	■ 0.06 ALA 93 -0.22 ■	GLN 439
ALA 347	■ 0.16 THR 37 -0.08 ■	LYS 216	TYR 293	■ 0.06 LYS 94 -0.27 ■	GLN 439
GLN 439	■ 0.19 LYS 38 -0.07 ■	VAL 365	VAL 150	■ 0.05 LEU 95 -0.24 ■	GLN 439
GLN 439	■ 0.16 GLU 39 -0.06 ■	VAL 365	ASP 302	■ 0.03 ASN 96 -0.20 ■	GLN 439
ALA 347	■ 0.16 HIS 40 -0.07 ■	VAL 365	ALA 289	■ 0.05 ALA 97 -0.25 ■	GLN 439
GLN 439	■ 0.22 LEU 41 -0.10 ■	VAL 365	THR 282	■ 0.04 ALA 98 -0.27 ■	GLN 439
GLN 439	■ 0.22 THR 42 -0.08 ■	VAL 365	THR 282	■ 0.03 LEU 99 -0.20 ■	GLN 439
GLN 439	■ 0.23 PRO 43 -0.10 ■	VAL 365	CYS 285	■ 0.04 HIS 100 -0.19 ■	GLN 439
GLN 439	■ 0.19 GLU 44 -0.09 ■	GLY 371	CYS 285	■ 0.07 PHE 101 -0.27 ■	GLN 439
GLN 439	■ 0.16 PHE 45 -0.08 ■	GLY 371	CYS 285	■ 0.04 GLU 102 -0.23 ■	GLN 439
GLN 439	■ 0.19 MET 46 -0.10 ■	GLY 371	LEU 261	■ 0.04 SER 103 -0.16 ■	GLN 439
GLN 439	■ 0.18 LYS 47 -0.12 ■	GLY 371	LEU 261	■ 0.06 GLY 104 -0.18 ■	GLN 439
GLN 439	■ 0.13 MET 48 -0.11 ■	LYS 314	LEU 261	■ 0.08 VAL 105 -0.26 ■	GLN 439
GLN 439	■ 0.12 ASN 49 -0.10 ■	VAL 370	LEU 261	■ 0.07 LEU 106 -0.26 ■	GLN 439
GLN 439	■ 0.17 PRO 50 -0.11 ■	VAL 365	LEU 261	■ 0.06 PHE 107 -0.17 ■	GLN 439
GLN 439	■ 0.14 GLN 51 -0.12 ■	ALA 120	LEU 261	■ 0.08 ALA 108 -0.13 ■	GLN 439
GLU 351	■ 0.14 HIS 52 -0.11 ■	PHE 119	LEU 261	■ 0.10 ARG 109 -0.20 ■	GLN 439
GLU 351	■ 0.12 THR 53 -0.10 ■	PHE 119	LEU 261	■ 0.09 LEU 110 -0.18 ■	GLN 439
ASP 348	■ 0.10 VAL 54 -0.07 ■	PHE 119	ASP 348	■ 0.12 GLU 115 -0.11 ■	LEU 359
GLU 351	■ 0.09 PRO 55 -0.05 ■	PHE 119	ASP 348	■ 0.09 PRO 116 -0.15 ■	LYS 355
GLU 351	■ 0.09 VAL 56 -0.05 ■	VAL 310	LEU 261	■ 0.09 ILE 117 -0.11 ■	LYS 355
GLU 351	■ 0.08 LEU 57 -0.05 ■	VAL 310	ALA 347	■ 0.08 LEU 118 -0.11 ■	LEU 359

LEU 261	■ 0.06 PHE 209 -0.08 ■	GLN 439	LYS 135	■ 0.11 LYS 267 -0.47 ■	GLN 439
LEU 261	■ 0.08 VAL 210 -0.09 ■	GLN 439	GLU 131	■ 0.09 MET 268 -0.42 ■	GLN 439
PRO 173	■ 0.09 LEU 211 -0.12 ■	GLN 439	LYS 135	■ 0.10 ASN 269 -0.43 ■	GLN 439
LEU 261	■ 0.08 SER 212 -0.08 ■	GLN 358	GLN 138	■ 0.14 PRO 270 -0.48 ■	GLN 439
LEU 261	■ 0.08 GLN 213 -0.09 ■	GLN 358	LYS 135	■ 0.12 GLN 271 -0.46 ■	GLN 439
LEU 261	■ 0.10 LYS 214 -0.09 ■	GLN 358	GLU 131	■ 0.12 HIS 272 -0.48 ■	GLN 439
PRO 173	■ 0.11 GLU 215 -0.09 ■	LYS 398	TYR 132	■ 0.10 THR 273 -0.39 ■	GLN 439
LEU 261	■ 0.09 LYS 216 -0.10 ■	GLN 358	TYR 132	■ 0.09 VAL 274 -0.32 ■	GLN 439
LEU 261	■ 0.09 ASN 217 -0.12 ■	GLN 358	TYR 132	■ 0.07 PRO 275 -0.27 ■	GLN 439
LEU 261	■ 0.11 ALA 218 -0.12 ■	LYS 398	GLU 131	■ 0.08 VAL 276 -0.30 ■	GLN 439
LEU 261	■ 0.10 GLN 219 -0.12 ■	LYS 398	THR 143	■ 0.07 LEU 277 -0.26 ■	GLN 439
VAL 145	■ 0.08 MET 220 -0.20 ■	GLN 439	ASP 142	■ 0.08 ASP 278 -0.28 ■	GLN 439
VAL 145	■ 0.07 THR 221 -0.21 ■	GLN 439	VAL 145	■ 0.08 ASP 279 -0.24 ■	GLN 439
VAL 145	■ 0.06 LYS 222 -0.20 ■	GLN 439	VAL 145	■ 0.09 ASN 280 -0.25 ■	GLN 439
THR 143	■ 0.06 LEU 223 -0.20 ■	GLN 439	VAL 145	■ 0.11 GLY 281 -0.29 ■	GLN 439
GLU 131	■ 0.07 ILE 224 -0.24 ■	GLN 439	VAL 145	■ 0.12 THR 282 -0.28 ■	GLN 439
GLU 131	■ 0.07 LEU 225 -0.25 ■	GLN 439	THR 143	■ 0.11 ILE 283 -0.30 ■	GLN 439
GLU 131	■ 0.08 TYR 226 -0.30 ■	GLN 439	THR 143	■ 0.10 VAL 284 -0.27 ■	GLN 439
GLU 131	■ 0.07 THR 227 -0.27 ■	GLN 439	THR 143	■ 0.08 CYS 285 -0.29 ■	GLN 439
ASP 128	■ 0.07 LEU 228 -0.25 ■	GLN 439	TYR 132	■ 0.05 GLU 286 -0.25 ■	GLN 439
ASP 128	■ 0.05 HIS 229 -0.16 ■	GLN 439	TYR 132	■ 0.04 SER 287 -0.18 ■	GLN 439
ASP 128	■ 0.05 VAL 230 -0.14 ■	GLN 439	TYR 132	■ 0.03 HIS 288 -0.14 ■	GLN 439
ASP 128	■ 0.05 SER 231 -0.17 ■	GLN 439	TYR 132	■ 0.05 GLU 286 -0.25 ■	GLN 439
VAL 253	■ 0.03 PRO 232 -0.12 ■	PHE 339	TYR 132	■ 0.04 SER 287 -0.18 ■	GLN 439
TYR 132	■ 0.04 PRO 233 -0.14 ■	PHE 339	TYR 132	■ 0.03 HIS 288 -0.14 ■	GLN 439
TYR 132	■ 0.05 CYS 234 -0.17 ■	GLN 439	ALA 97	■ 0.05 ALA 289 -0.18 ■	GLN 439
TYR 132	■ 0.03 ARG 235 -0.10 ■	PHE 339	THR 143	■ 0.05 ILE 290 -0.19 ■	GLN 439
TYR 132	■ 0.03 ALA 236 -0.10 ■	PHE 339	THR 143	■ 0.04 MET 291 -0.13 ■	GLN 439
VAL 145	■ 0.04 ILE 292 -0.13 ■	GLN 439	ALA 438	■ 0.04 GLU 322 -0.08 ■	PHE 339
LYS 94	■ 0.06 TYR 293 -0.16 ■	GLN 439	LEU 261	■ 0.04 SER 323 -0.12 ■	ALA 340
VAL 145	■ 0.05 LEU 294 -0.14 ■	GLN 439	LEU 261	■ 0.05 GLY 324 -0.10 ■	ALA 340
GLY 151	■ 0.05 VAL 295 -0.10 ■	GLN 439	LEU 261	■ 0.05 VAL 325 -0.07 ■	ALA 120
LEU 89	■ 0.07 SER 296 -0.11 ■	GLN 439	ALA 438	■ 0.07 LEU 326 -0.07 ■	ALA 120
GLY 151	■ 0.07 LYS 297 -0.14 ■	GLN 439	HIS 260	■ 0.06 PHE 327 -0.09 ■	ALA 340
VAL 145	■ 0.06 TYR 298 -0.12 ■	GLN 439	LEU 261	■ 0.07 ALA 328 -0.10 ■	ALA 340
GLY 151	■ 0.05 GLY 299 -0.08 ■	GLN 439	LEU 41	■ 0.07 ARG 329 -0.04 ■	ALA 136
GLY 151	■ 0.05 LYS 300 -0.07 ■	GLN 439	LYS 258	■ 0.07 LEU 330 -0.05 ■	LEU 139
LYS 87	■ 0.07 ASP 301 -0.08 ■	LYS 47	LYS 255	■ 0.09 ARG 331 -0.12 ■	GLN 439
LYS 87	■ 0.07 ASP 302 -0.08 ■	LYS 47	LYS 258	■ 0.08 PHE 332 -0.10 ■	GLN 439
LYS 87	■ 0.06 SER 303 -0.09 ■	LYS 47	LEU 41	■ 0.09 VAL 333 -0.09 ■	LYS 135
LYS 87	■ 0.05 LEU 304 -0.08 ■	LYS 47	LEU 41	■ 0.07 CYS 334 -0.11 ■	LEU 139
LYS 87	■ 0.06 TYR 305 -0.08 ■	PHE 339	ASP 128	■ 0.09 GLU 335 -0.24 ■	GLN 439
LYS 87	■ 0.06 SER 306 -0.09 ■	MET 48	LYS 258	■ 0.08 PHE 332 -0.10 ■	GLN 439
ASP 82	■ 0.07 LYS 307 -0.08 ■	SER 296	LEU 41	■ 0.09 VAL 333 -0.09 ■	LYS 135
ASN 372	■ 0.07 GLU 308 -0.08 ■	MET 48	LEU 41	■ 0.07 CYS 334 -0.11 ■	LEU 139
GLY 371	■ 0.06 LEU 309 -0.08 ■	MET 48	ASP 128	■ 0.09 GLU 335 -0.24 ■	GLN 439
VAL 365	■ 0.07 VAL 310 -0.10 ■	MET 48	ALA 120	■ 0.09 PRO 336 -0.27 ■	GLN 439
GLY 371	■ 0.09 LYS 311 -0.10 ■	MET 48	VAL 391	■ 0.09 ILE 337 -0.20 ■	LYS 135
GLY 371	■ 0.05 GLN 312 -0.09 ■	MET 48	VAL 391	■ 0.08 LEU 338 -0.26 ■	GLN 439
TYR 73	■ 0.08 ALA 313 -0.09 ■	MET 48	PRO 126	■ 0.10 PHE 339 -0.44 ■	GLN 439
TYR 73	■ 0.06 LYS 314 -0.11 ■	MET 48	PRO 126	■ 0.11 ALA 340 -0.49 ■	GLN 439
VAL 370	■ 0.04 LEU 315 -0.08 ■	MET 48	PRO 346	■ 0.10 GLY 341 -0.48 ■	GLN 439
GLU 351	■ 0.03 ASN 316 -0.09 ■	ALA 340	PRO 346	■ 0.14 GLY 342 -0.27 ■	LYS 135
GLU 351	■ 0.04 ALA 317 -0.07 ■	ALA 340	ASN 437	■ 0.23 SER 343 -0.21 ■	LYS 135
ALA 438	■ 0.05 ALA 318 -0.08 ■	ALA 120	GLN 439	■ 0.24 GLU 344 -0.21 ■	ASP 128
MET 389	■ 0.03 LEU 319 -0.09 ■	PHE 339	ALA 350	■ 0.25 ILE 345 -0.17 ■	ASP 128
GLU 351	■ 0.03 HIS 320 -0.10 ■	ALA 340	GLN 439	■ 0.24 PRO 346 -0.14 ■	ASP 128
GLU 351	■ 0.04 PHE 321 -0.08 ■	ALA 120			

GLN 439	0.33	ALA 347	-0.12	ILE 392	GLN 439	0.19	TRP 405	-0.10	ALA 120
GLN 439	0.19	ASP 348	-0.12	PRO 126	GLN 439	0.20	LEU 406	-0.09	ALA 120
GLN 439	0.15	ARG 349	-0.09	ASP 128	GLN 439	0.22	ASP 407	-0.08	ALA 120
GLN 439	0.30	ALA 350	-0.11	ILE 392	GLN 439	0.17	ARG 408	-0.08	ALA 120
GLN 439	0.28	GLU 351	-0.11	GLY 122	GLN 439	0.13	LEU 409	-0.07	ALA 120
GLN 439	0.17	TYR 352	-0.12	GLY 122	GLN 439	0.15	LYS 410	-0.07	ALA 120
GLN 439	0.19	VAL 353	-0.09	GLY 122	GLN 439	0.15	ALA 411	-0.07	ALA 120
GLN 439	0.29	GLN 354	-0.11	GLY 122	GLN 439	0.09	LEU 412	-0.06	ALA 120
GLN 439	0.23	LYS 355	-0.18	ALA 120	GLN 439	0.08	PRO 413	-0.05	ALA 120
GLN 439	0.16	ALA 356	-0.14	ALA 120	ALA 438	0.04	TYR 414	-0.05	ALA 120
GLN 439	0.23	TYR 357	-0.13	ALA 120	GLN 439	0.06	TYR 415	-0.05	ALA 120
GLN 439	0.25	GLN 358	-0.17	ALA 120	GLN 439	0.08	GLU 416	-0.05	ALA 347
GLN 439	0.18	LEU 359	-0.16	ALA 120					
GLN 439	0.16	LEU 360	-0.13	ALA 120	GLN 439	0.25	LYS 401	-0.12	ALA 120
GLN 439	0.22	GLU 361	-0.14	ALA 120	GLN 439	0.24	ILE 402	-0.11	ALA 120
GLN 439	0.20	ASP 362	-0.15	ALA 120	GLN 439	0.28	TYR 403	-0.10	ALA 120
GLN 439	0.14	THR 363	-0.13	ALA 120	GLN 439	0.25	GLY 404	-0.10	ALA 120
GLN 439	0.17	LEU 364	-0.12	ALA 120	GLN 439	0.19	TRP 405	-0.10	ALA 120
GLN 439	0.17	VAL 365	-0.12	ALA 120	GLN 439	0.20	LEU 406	-0.09	ALA 120
GLN 439	0.15	ASP 366	-0.11	ALA 120	GLN 439	0.22	ASP 407	-0.08	ALA 120
GLN 439	0.16	ASP 367	-0.10	ALA 120	GLN 439	0.17	ARG 408	-0.08	ALA 120
GLN 439	0.12	TYR 368	-0.09	ALA 120	GLN 439	0.13	LEU 409	-0.07	ALA 120
GLN 439	0.10	ILE 369	-0.10	ALA 120	GLN 439	0.15	LYS 410	-0.07	ALA 120
LYS 311	0.08	VAL 370	-0.11	LYS 47	GLN 439	0.15	ALA 411	-0.07	ALA 120
GLN 439	0.09	GLY 371	-0.12	LYS 47	GLN 439	0.09	LEU 412	-0.06	ALA 120
GLN 439	0.10	ASN 372	-0.11	LYS 47	GLN 439	0.08	PRO 413	-0.05	ALA 120
GLN 439	0.07	SER 373	-0.10	LYS 47	ALA 438	0.04	TYR 414	-0.05	ALA 120
ALA 438	0.06	LEU 374	-0.08	LYS 47	GLN 439	0.06	TYR 415	-0.05	ALA 120
LYS 87	0.04	THR 375	-0.07	LYS 47	GLN 439	0.08	GLU 416	-0.05	ALA 347
LYS 87	0.03	ILE 376	-0.08	PHE 339	ALA 438	0.04	ALA 417	-0.04	ALA 347
GLU 435	0.04	ALA 377	-0.08	PHE 339	LEU 431	0.03	ALA 418	-0.06	PHE 339
ALA 438	0.06	ASP 378	-0.08	ALA 120	ALA 438	0.04	ASN 419	-0.05	PHE 339
GLU 435	0.04	PHE 379	-0.07	PHE 339	GLN 439	0.09	GLY 420	-0.05	ALA 347
GLU 435	0.03	SER 380	-0.09	PHE 339	GLN 439	0.07	SER 421	-0.06	ALA 347
ALA 438	0.06	CYS 381	-0.07	ALA 120	ALA 438	0.04	GLY 422	-0.06	ALA 347
ALA 438	0.08	VAL 382	-0.07	ALA 120	ALA 438	0.08	ALA 423	-0.07	ALA 347
ALA 438	0.05	SER 383	-0.07	PHE 339	GLN 439	0.14	GLU 424	-0.09	ALA 347
ALA 438	0.06	SER 384	-0.07	PHE 339	ALA 438	0.06	GLN 425	-0.07	ALA 347
GLN 439	0.13	VAL 385	-0.07	ALA 120	LEU 41	0.04	VAL 426	-0.07	ALA 347
GLN 439	0.14	SER 386	-0.06	ALA 120	GLN 439	0.12	ALA 427	-0.10	ALA 347
ALA 438	0.10	SER 387	-0.07	ALA 347	GLN 439	0.15	GLN 428	-0.09	ALA 347
GLN 439	0.15	ILE 388	-0.07	ALA 347	LEU 41	0.05	PHE 429	-0.08	VAL 230
GLN 439	0.26	MET 389	-0.08	ALA 347	VAL 391	0.10	VAL 430	-0.10	LEU 139
GLN 439	0.28	GLY 390	-0.09	ALA 347	GLY 390	0.20	LEU 431	-0.10	LYS 135
GLN 439	0.25	VAL 391	-0.11	ALA 347	GLY 390	0.13	SER 432	-0.14	THR 257
GLN 439	0.34	ILE 392	-0.12	ALA 347	VAL 391	0.12	GLN 433	-0.21	LEU 256
GLN 439	0.42	PRO 393	-0.09	ALA 347	PRO 393	0.19	LYS 434	-0.17	LYS 135
GLN 439	0.38	MET 394	-0.09	ALA 120	GLN 439	0.25	GLU 435	-0.18	THR 257
GLN 439	0.44	ASP 395	-0.11	ALA 120	PRO 393	0.19	LYS 436	-0.29	THR 257
GLN 439	0.40	LYS 396	-0.11	ALA 120	SER 343	0.23	ASN 437	-0.31	THR 257
GLN 439	0.40	GLU 397	-0.12	ALA 120	PRO 393	0.29	ALA 438	-0.25	LYS 178
GLN 439	0.40	LYS 398	-0.14	ALA 120	ASP 395	0.44	GLN 439	-0.60	LYS 258
GLN 439	0.33	PHE 399	-0.13	ALA 120					
GLN 439	0.32	PRO 400	-0.12	ALA 120					
GLN 439	0.25	LYS 401	-0.12	ALA 120					
GLN 439	0.24	ILE 402	-0.11	ALA 120					
GLN 439	0.28	TYR 403	-0.10	ALA 120					
GLN 439	0.25	GLY 404	-0.10	ALA 120					

Fonte: Construído com dados da pesquisa