



Guilherme Santana Mendes

Avaliação por ancoragem molecular de novos ligantes para a ligase COI1 baseados na estrutura química de um secoiridoide: Uma possível porta para a modulação do sistema Ubiquitina-Proteassoma regulado por SCF^{COI1}.

Trabalho apresentado a Universidade de Brasília,
Campus Darcy Ribeiro, como requisito para
obtenção do título de Bacharel em Química

Orientador: Prof. Dr. Ângelo Henrique de Lira
Machado

Dedico este trabalho à minha querida e falecida mãe, Lucilene Alves Santana Mendes e minhas irmãs, que me apoiaram e incentivaram durante todo esse trajeto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, de antemão a Deus que me deu sabedoria e resiliência para passar por todo esse período difícil, e por proporcionar essa experiência na minha vida. Em seguida, gostaria de agradecer a minha amada e falecida mãe que sempre esteve ao meu lado quando pensei em desistir durante essa trajetória e que sem o seu apoio nada disso seria possível. Eu não consigo expressar em palavras a gratidão e amor eterno que tenho por ti. Você estará sempre no meu coração e nas minhas orações, obrigado por todos os momentos felizes que passamos juntos.

Gostaria de agradecer também a toda minha família e as minhas estimadas irmãs, Érika Santana Mendes e Lorrane Santana Mendes, que estiveram comigo nos momentos mais sombrios e dolorosos, e que trouxeram luz e esperança a minha vida, espero ainda compartilhar muitos momentos felizes como este, ao lado de vocês.

Ao meu professor e orientador Dr. Ângelo Henrique de Lira Machado pelo incentivo, apoio e sabedoria para lidar comigo ao longo desta jornada. Guardarei com muito carinho suas valiosas lições. Minha gratidão também à banca avaliadora que dedicou seu tempo para apreciar e contribuir com este trabalho.

Aos meus queridos amigos, que fiz durante o curso, pelo carinho e companhia do início até o fim dessa caminhada. Um agradecimento especial a Maria Eduarda Nunes Lacerda, Keven Ferreira Fragoso e Sara Gomes Sampaio, que sempre me auxiliaram ao longo do curso e contribuíram com meu amadurecimento profissional e espiritual.

Meus agradecimentos também à Universidade de Brasília e ao Instituto de Química, por me acolher e proporcionar a oportunidade de conhecer tantas pessoas incríveis e especiais que transformaram minha vida. Ademais, gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para que eu chegassem aqui hoje, essa conquista é fruto de muito trabalho duro, lágrimas e persistência. Essa conquista não é só minha, mas de todos que tornaram isto possível.

“Viver sem sonhar é existência sem propósito; amar sem viver é perder a essência do seu ser.”

(Guilherme Santana Mendes)

Resumo

O sistema ubiquitina proteassoma 26S (UPS) regula diversos processos fisiológicos em plantas, dentre eles mecanismos de defesa e desenvolvimento desses organismos. Esse sistema é composto de 3 enzimas: enzima E1 ativadora de ubiquitina, enzima E2 conjugadora de ubiquitina e enzima E3 ligase de ubiquitina. O conjunto de enzimas que constituem o UPS marcam as proteínas que serão degradadas pelo complexo enzimático proteassoma 26S. Logo, a atuação do UPS se dá em proteínas que apresentam algum tipo de mutação ou erro transcrecional prejudicial ao ser vivo bem como proteínas cuja concentração regula o funcionamento de importantes atividades biológicas.

Vários fitormônios atuam ativando esse sistema, de maneira a regular a concentração de repressores transpcionais. Os jasmonatos são moléculas baseadas na estrutura de ácido jasmônico (JA) que atuam como fitormônios modulando um sistema UPS. Dentre essas moléculas, o JA-Ile, formado pela conjugação entre JA e o aminoácido isoleucina (Ile), tem a maior capacidade moduladora dentre as moléculas que apresentam o JA em sua estrutura.

Em meio aos fitormônios moduladores de UPS, cada uma delas se liga especificamente a um determinado correceptor que compõe uma E3 ligase, que no caso de JA-Ile é a Coronatina Insensitiva 1 (COI1). Ela pertence a classe de proteínas conhecidas como F box, uma família de proteínas envolvidas na degradação de proteínas via ubiquitinação, de modo que estão presentes na maioria dos seres vivos, formando um complexo com outras duas proteínas, ASK1 (SKP1) e Culina (Cul) gerando um complexo enzimático denominado SCF, que atua no reconhecimento e ubiquitinação das proteínas JAZ.

Nesse contexto, esse trabalho buscou avaliar, com o auxílio da ferramenta computacional denominada ancoragem molecular (*docking molecular*) se análogos estruturais de JA-Ile baseados no ácido floribundanóico B (AFB), um secoiridóide com estrutura química semelhante à do ácido jasmônico (JA), interagem com COI1 no domínio de ligação do JA-Ile.

Os experimentos de ancoragem molecular foram validados por *redocking* do complexo COI1-JA-Ile, que resultaram na descoberta de um novo domínio de ligação na qual o fitôrmonio possui afinidade, além de seu sítio de ligação, que foi denominado domínio de ligação 3 (DL3). Os resultados obtidos pelo *docking* direcionado em AFB, e sua forma conjugada à Ile apontaram uma preferência por esta última estrutura, indicando uma energia de ligação próxima a obtida pelo *redocking* de JA-Ile. Ademais, não houve especificidade para um determinado estereoisômero destes secoiridoides. O *blinding docking* desses ligantes apontaram outros domínios de ligação DL5, DL6 e DL7, pelos quais essas estruturas possuem afinidade.

Palavras chave: Sistema ubiquitina proteassoma 26S, secoiridoides, jasmonatos, E3 ligase, COI1, docking molecular, SCF, ácido floribundanóico B.

Abstract

The ubiquitin-proteasome system 26S (UPS) regulates various physiological processes in plants, including defense mechanisms and development. This system is composed of three enzymes: E1 ubiquitin-activating enzyme, E2 ubiquitin-conjugating enzyme, and E3 ubiquitin ligase. The set of enzymes that constitute the UPS marks proteins for degradation by the 26S proteasome enzymatic complex. Therefore, the UPS acts on proteins that present some type of mutation or transcriptional error harmful to the organism, as well as proteins whose concentration regulates the functioning of important biological activities.

Several phytohormones activate this system to regulate the concentration of transcriptional repressors. Jasmonates are molecules based on the jasmonic acid (JA) structure that function as phytohormones modulating the UPS system. Among these molecules, JA-Ile, formed by the conjugation of JA and the amino acid isoleucine (Ile), has the highest modulatory capacity among the molecules that effectively contain a JA residue in their structure.

Among the known UPS-modulating phytohormone classes, each one binds specifically to a co-receptor that is part of E3 ligase. In the case of JA-Ile, this co-receptor is Coronatine Insensitive 1 (COI1). COI1 belongs to a class of proteins known as F-box, a family of proteins involved in the degradation of proteins via ubiquination, so that they are present in most living beings and form a complex with two other proteins, ASK1 (SKP1) and Cullin (Cul), generating an SCF enzymatic complex that acts in the recognition and ubiquitination of JAZ proteins.

In this context, this study aimed to evaluate, with the aid of the computational docking tool (molecular docking), whether structural analogs of JA-Ile based on floribundanoic acid B (AFB), a secoiridoid with a chemical structure similar to JA, interact with COI1 at the JA-Ile binding domain.

The molecular docking experiments were validated by redocking the COI1-JA-Ile complex, which led to the discovery of a new binding domain where the phytohormone has affinity, in addition to its known binding site. This new domain was named binding domain 3 (BD3). The results obtained from targeted docking with AFB and its Ile conjugated form indicated a preference for the latter structure, showing a binding energy close to that obtained from JA-Ile redocking. Moreover, no specificity was observed for a particular stereoisomer of these secoiridoids. The blind docking of these ligands revealed additional binding domains BD5, BD6, and BD7 where these structures showed affinity.

Keywords: Ubiquitin-proteasome system 26S, secoiridoids, jasmonates, E3 ligase, COI1, molecular docking, SCF, floribundanoic acid B.

Acrônimos e abreviaturas

- A: Alanina (Ala)
- Å: Angstrom
- ACX: Acil CoA Oxidase
- AFB: Ácido Floribundanóico
- AFB-Ile: Floribundanato de Isoleucina
- AI: Inteligência Artificial
- AMP: Adenosina Monofosfato
- AOC: Aleno Óxido Ciclase
- AOS: Aleno Óxido Sintase
- ASK1: Quinase reguladora do sinal de Apoptose 1
- ATP: Adenosina Trifosfato
- C: Cisteína (Cys)
- C7: Carbono 7
- C8: Carbono 8
- Cul: Culina
- CCDC: Cambridge Crystallographic Data Centre
- CEPEA: Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada
- Cmd: Command Prompt
- CNA: Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil
- Co: Coronatina
- COI1: Coronatina Insensitiva 1
- Config.txt: Arquivo de configuração
- D: Ácido Aspártico (Asp)
- DL1: Domínio de ligação 1
- DL2: Domínio de ligação 2
- DL3: Domínio de ligação 3
- DL4: Domínio de ligação 4
- DL5: Domínio de ligação 5
- DL6: Domínio de ligação 6
- DL7: Domínio de ligação 7
- DLN: Domínio de ligação nativo

- **DMAPP: Dimetilalil Difosfato**
- **DUB: Enzima Desubiquitinase**
- **E: Ácido Glutâmico (Glu)**
- **E1: Enzima ativadora de ubiquitina.**
- **E2: Enzima conjugadora de ubiquitina.**
- **E3: Enzima ligase de ubiquitina.**
- **F: Fenilalanina (Phe)**
- **FA: Floribundano A**
- **FB: Floribundano B**
- **G: Glicina (Gly)**
- **GGA: Algoritmo Genético de Busca Local baseado em Gradiente**
- **GH3: Gretchen Hagen 3**
- **GPP: Geranil Pirofosfato**
- **H: Histidina (His)**
- **HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana**
- **I: Isoleucina (Ile)**
- **IP5: Inositol pentacisfosfato**
- **IPP: Isopentenil Pirofosfato**
- **JA: Ácido Jasmônico**
- **JA-Ile: Jasmonato de L-isoleucina**
- **JAZ: Proteínas pertencentes a classe dos jasmonatos**
- **JAZ1: Jasmonate-Zim Domain Protein 1**
- **K: Lisina (Lys)**
- **KAT: L-3 Cetoacil Tiolase**
- **Kcal/mol: quilocalorias por mol**
- **L: Leucina (Leu)**
- **LGA: Algoritmo Genético Lamarckiano**
- **LOX: Lipoxigenase**
- **LRR: Repetições ricas em leucina**
- **M: Metionina (Met)**
- **MeJA: Jasmonato de Metila**
- **MFP: Proteína Multifuncional 19**
- **N: Asparagina (Asn)**

- **NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato**
- **ns: Nanosegundos**
- **Num_modes: Número de modos de ligação**
- **OG: 10-Oxogeranial**
- **OMS: Organização Mundial da Saúde.**
- **ONU: Organização das Nações Unidas**
- **OPDA: Ácido 12-oxo-fitodienoico**
- **OPR3: OPDA Redutase 3**
- **P: Prolina (Pro)**
- **PDB: Protein Data Bank**
- **PDBQT: Protein Data Bank Partial Charge**
- **PIB: Produto Interno Bruto**
- **PLDs: Fosfolipases**
- **PPi: Fosfato Inorgânico**
- **Q: Glutamina (Gln)**
- **R: Arginina (Arg)**
- **ROS: Radicais Livres de Oxigênio**
- **S: Serina (Ser)**
- **SCF: SKP1-Culina-F-box**
- **SCF^{COI1}: Skp1/Culina/F-box**Coronatina Insensitiva 1
- **SKP1: S-fase quinase associada a proteína 1**
- **T: Treonina (Thr)**
- **Ub: Ubiquitina**
- **UK: Reino Unido**
- **UPS: Sistema ubiquitina-proteassoma 26S**
- **V: Valina (Val)**
- **W: Triptofano (Trp)**
- **Y: Tirosina (Tyr)**
- **ΔG: Variação da energia livre**

Sumário

1. Introdução -----	11
2. Objetivos -----	14
3. Revisão Bibliográfica -----	15
3.1 História e aplicação do docking molecular -----	15
3.2 Importância das plantas e produtos naturais -----	21
3.3 Proteínas F-box, COI1 e o complexo SCF ^{COI1} -----	24
3.4 Sistema ubiquitina proteassoma 26S -----	28
3.5 Atuação de ácido jasmônico (JA), jasmonato de isoleucina (JA-Ile) e coronatina (CO) no sistema ubiquitina-proteassoma 26S -----	30
3.6 Biossíntese do ácido jasmônico e ácido jasmônico conjugado a isoleucina -----	33
3.7 Ácido Floribundanóico B, Floribundanato de isoleucina e Floribundano B -----	37
4. Metodologia-----	43
4.1 Preparação dos arquivos de entrada para a realização dos experimentos de docking molecular-----	43
4.2 Preparação do arquivo config.txt -----	46
4.3 Redocking e docking molecular -----	49
5. Resultados e discussão -----	52
5.1 Redocking molecular do complexo ASK1-COI1-JA-Ile-JAZ1-----	52
5.2 Docking molecular entre as formas enantioméricas de ácido floribundanóico B, (3R)-AFB e (3S)-AFB, com o complexo SCF ^{COI1} -----	54
5.3 Docking molecular entre as formas diastereoisoméricas de floribundanato de isoleucina AFB-Ile, (3R)-AFB-L-Ile e (3S)-AFB-L-Ile, com o complexo SCF ^{COI1} -----	62
5.4 Análise comparativa dos resultados obtidos pelo docking de AFB e AFB-Ile com JA-Ile em sua estrutura cristalográfica -----	71
6. Conclusão -----	74
7. Referências -----	77

1. Introdução

Atualmente, o setor de agronegócio representa um dos pilares que sustentam a economia brasileira. Dados divulgados em 2023 pela Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA) apontaram que o Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro, que indica a soma total de todos os bens e serviços produzidos por um país cresceu 15,1% em relação a 2022, com alta de 2,9% comparado ao ano anterior, de modo que esse foi o maior resultado da série histórica.[1] Outro estudo realizado no primeiro trimestre de 2024 pelo Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA) indicou que o PIB do agronegócio brasileiro foi de R\$ 2,45 trilhões em 2024, sendo 1,65 trilhão no ramo agrícola e 801 bilhões no ramo pecuário.[2] Contudo, apesar da grande contribuição do setor agrícola na economia, a insegurança alimentar no Brasil permanece sendo um desafio a ser superado nos próximos anos, haja vista o último relatório realizado pela Organização das Nações Unidas (ONU) que estabeleceu que, no ano de 2022, 70,3 milhões de brasileiros se encontravam em estado de insegurança alimentar moderado, situação na qual há dificuldade na alimentação. Os dados também apontaram que 21,1 milhões de pessoas no país vivenciaram insegurança alimentar grave caracterizada por estado de fome.

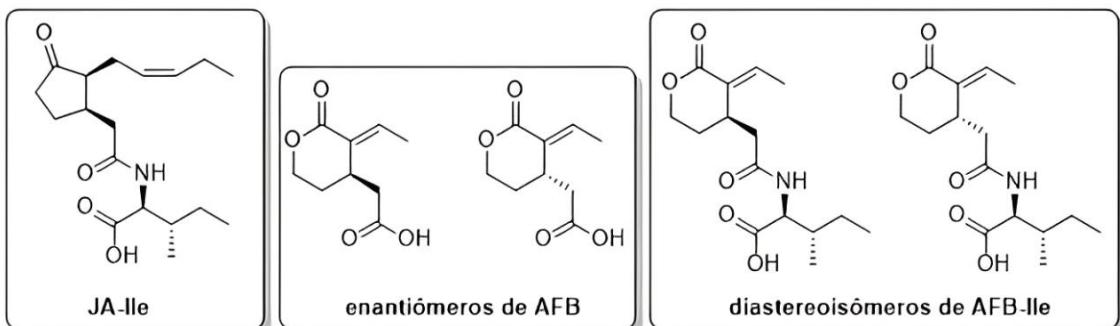
A utilização de novas tecnologias de cultivo agrícola e o desenvolvimento de produtos químicos que contribuem para o crescimento das plantas ou que atuam no controle de pragas contribuem para um melhor desempenho na produção agrícola. Nesta perspectiva, a compreensão da fisiologia das plantas, e dos processos bioquímicos envolvidos no seu crescimento e nos seus mecanismos de defesa contra predadores é fundamental. Os produtos fitossanitários são os produtos, processos e tecnologias destinados à sanidade vegetal, ou seja, ao controle de pragas e doenças. Dentro dessa categoria se encontram os herbicidas, que atuam erradicando ervas daninhas.[3] Os hormônios vegetais, que são compostos produzidos naturalmente pelas plantas, tem um papel vital no processo de desenvolvimento destes organismos. Com a capacidade de atuar como herbicida, inibindo o crescimento de determinadas espécies, a auxina, por exemplo, é um fitormônio utilizado para controle de ervas daninhas que possuem folhas largas denominadas dicotiledôneas.[4]

O mecanismo de ação dos fitormônios é bem documentado, inclusive em nível molecular, e com muitos dos bioreceptores dessas substâncias já bem descritos, inclusive do ponto de vista estrutural. Nesse contexto, a ancoragem molecular ou *docking molecular*, apresenta-se como uma ferramenta computacional com grande potencial para o desenvolvimento de novos herbicidas baseados em hormônios de plantas. Esse tipo de abordagem, em comparação a outros métodos *in vitro* e *in vivo* apresenta um melhor custo-benefício, sendo amplamente utilizada na descoberta de novas drogas e na indicação de sua bioatividade.[5]

De forma geral, o *docking molecular*, ou ancoragem molecular pode ser compreendido como uma ferramenta computacional que realiza simulações envolvendo um bioreceptor e um ligante. Essa técnica efetua buscas através do algoritmo de um *software*, por posições ou conformações do ligante que possuam o menor valor de energia de ligação entre o ligante e bioreceptor em estudo. Cada posição é avaliada individualmente, com base em seu formato e características estruturais, de modo a encontrar a área ou sítio de ligação mais apropriado.[5]

Nesse trabalho de conclusão de curso, foram exploradas e avaliadas as interações existentes entre o correceptor Coronatina Insensitiva 1 (COI1) e dois grupos de ligantes: 1) os enantiômeros do ácido floribundanóico B (AFB); 2) os diastereoisômeros do conjugado entre AFB e *L*-isoleucina (AFB-Ile). O AFB é um secoiridóide extraído de azeitonas que tem estrutura química semelhante à do ácido jásmônico (JA). O conjugado de JA com a *L*-isoleucina (JA-Ile) atua como fitormônio que influencia diretamente em processos de regeneração das partes de plantas que sofreram o ataque de predadores. A descoberta de novas substâncias capazes de modular este mecanismo de crescimento dependente de JA-Ile abre o caminho para o desenvolvimento de novos produtos herbicidas. Desta forma, neste trabalho, foi verificado se substâncias com estrutura química baseadas AFB apresentam afinidade com a COI1 semelhante à observada pelo fitormônio JA-Ile.

Figura 1 – Estrutura química do fitormônio JA-Ile, dos enantiômeros do ácido floribundanóico B (AFB) e dos dois diastereoisômeros do conjugado entre o AFB e a *L*-isoleucina (AFB-Ile).



Fonte: Autor

2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho consistiu em explorar, por ancoragem molecular *in silico*, através de docking flexível e utilizando o algoritmo estocástico *Autodock Vina* se o ácido floribundanóico B (AFB) e o seu conjugado com isoleucina (AFB-Ile) podem formar complexo com a COI1 de maneira semelhante ao JA-Ile no complexo SCF^{COI1}.

Os objetivos específicos foram:

1. Validar o estudo de ancoragem molecular do complexo SCF^{COI1} com AFB e AFB-Ile por meio do *redocking* do complexo COI1-JA-Ile.
2. Realizar experimentos de ancoragem molecular do sistema COI1 e as estruturas baseadas em AFB e AFB-Ile
3. Comparar os dados energéticos obtidos e as interações entre os resíduos de aminoácidos no complexo SCF^{COI1} e os ligantes baseados no AFB, AFB-Ile e JA-Ile
4. Verificar quais ligantes baseados em AFB apresentam maior interação com a COI1

3. Revisão Bibliográfica

3.1 História e aplicação do docking molecular

Durante as últimas décadas, a comunidade científica gradualmente tem demonstrado um aumento no interesse em métodos baseados em *docking molecular*, ilustrado pelo elevado número de referências e publicações nesse campo. Além disso, trabalhos e estudos relacionados ao *docking* tem gerado cada vez mais interesse por parte da indústria farmacêutica, levando em consideração que o mercado da ciência e da tecnologia da informação na descoberta de novas drogas teve um valor estimado de 713,4 milhões de dólares em 2016.[6] Alguns exemplos de fármacos utilizados atualmente, cuja descoberta se deu através desta técnica são os inibidores de acetilcolinaesterases, donezepil e rivastigmina, empregados no tratamento da doença de Alzheimer.[7,8]

Estruturas químicas computacionalmente propostas com base no *design* de drogas tem uma longa história, que data desde o início dos anos 1970. Logo após à primeira estrutura cristalográfica de uma proteína ser resolvida em 1958 por John Kendrew, percebeu-se que a utilização dessa descoberta abriria o caminho para o *design* racional das drogas, uma vez que a modulação da atividade natural de enzimas e proteína poderia ser observada pela complexação de ligantes racionalmente desenhados a alvos proteicos em nível tridimensional e com a possibilidade de classificar a qualidade desta interação com base na energia de estabilização deste complexo. No estudo de *docking*, a conformação que o ligante adota ao complexar com receptor biológico e a posição que este ligante ocupa no receptor são fatores fundamentais na busca e classificação dos resultados. Ou seja, estudos em *docking* geralmente utilizam ligantes flexíveis e um receptor proteico rígido, contudo estudos de *docking* recentes foram realizados com estruturas cristalinas proteicas estáticas e ligantes rígidos, sendo observado que esse método foi bem sucedido em alguns casos, como na descoberta de antivirais para HIV e influenza.[9,10,11]

O surgimento da cristalografia de proteínas se deu em 1958, após 22 anos de trabalho de John Kendrew do laboratório Cavendish em Cambridge (UK) que utilizou a difração por raios X para determinar a estrutura em 3 dimensões da mioglobina extraída dos músculos de baleia cachalote.[12] Sendo a primeira

proteína a ter sua estrutura determinada. Por esta descoberta Kendrew e Max Perutz receberam em 1962 o prêmio Nobel de Química pelo seu trabalho na determinação de estruturas de proteínas. Porém, nas décadas seguintes, com o surgimento de novas estruturas cristalográficas proteicas, houve a necessidade da criação de um banco de dados que reunisse essas informações. Para isto, em 1971, foi estabelecido o *Protein Data Bank (PDB)*, que reunia todos os modelos descobertos até o momento e hoje é a fonte mais comum para modelagem *in silico* abrigando mais de 200.000 modelos 3D provados experimentalmente.[13]

O advento da Química Computacional e da Mecânica Quântica permitiu vários avanços na compreensão de estruturas moleculares proteicas. Dessa forma, a ancoragem molecular ou *docking molecular* como ferramenta de avaliação de interação entre ligantes e receptores foi um marco, que permitiu o progresso na área de *drug design* e o estudo de candidatos a fármacos, reduzindo o custo e tempo de pesquisas, haja vista que dependendo da complexidade envolvida, pesquisas completas para desenvolvimento de novos fármacos podem levar cerca décadas para serem completadas, isso levando em consideração as etapas de pesquisa *in vitro*, fases pré-clínicas e clínicas. Trata-se de investimentos em torno de milhões a bilhões de dólares, e a abordagem *in silico*, neste cenário, diminui significativamente esses custos. Entretanto, vale destacar que métodos *in silico* não substituem métodos *in vitro*. O que ocorre é que muitas vezes essas metodologias são utilizadas em conjunto, pois ambas têm suas vantagens e desvantagens. A abordagem computacional *in silico* precisa ser validada experimentalmente *in vitro*, pois este método não aborda toda a complexidade química e biológica de um ser vivo. [6,14,15]

O processo de ancoragem molecular envolve 2 passos básicos: predição da conformação do ligante, como sua posição e orientação dentro dos sítios de ligação (geralmente referidos como pose), avaliando sua afinidade de ligação com o bioreceptor de interesse [13]. O primeiro algoritmo de *docking molecular* foi desenvolvido em 1980 por Kunz et al (1982); nesse modelo, o receptor era aproximado por uma série de esferas preenchendo suas fendas, e o ligante por outro conjunto de esferas que definiam seu volume. Uma busca era realizada para encontrar a melhor sobreposição estérica entre o sítio de ligação e as esferas receptoras, negligenciando qualquer tipo de movimento

conformacional.[16] A partir de 1990, houve o aumento do poder computacional e desenvolvimento de *hardwares* e *softwares* mais sofisticados que possibilitaram a disseminação e utilização do *docking* flexível, no qual o ligante e proteína não são mais tratados como estruturas rígidas. Esse método leva em consideração os graus de liberdade disponíveis entre o receptor e ligante, de modo que, no geral, se assemelha mais ao comportamento e à dinâmica observados para as biomoléculas nos seres vivos. Como a capacidade computacional em períodos anteriores era mais limitada, tal abordagem ainda não era possível.[6]

Ainda na década de 1990, o *AutoDock*, desenvolvido por Arthur J. Olson e sua equipe no *Scripps Research Institute*, emergiu como um dos métodos de ancoragem molecular mais amplamente adotados na área. Ele utiliza um algoritmo chamado Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA), que permanece sendo muito utilizado atualmente. Em seguida, no início do século XXI, o *Cambridge Crystallographic Data Centre* (CCDC) desenvolveu o algoritmo genético do software *GOLD*, que se baseia em teorias evolutivas, dando início a processos de ancoragem molecular de alto desempenho.[17] Posteriormente, em 2009, Oleg Trott e Andrej J. Kosztin desenvolveram o algoritmo *AutoDock Vina*, uma alternativa mais rápida do que *AutoDock*. O *Vina* utiliza um algoritmo de otimização global chamado algoritmo genético de busca local baseado em gradiente (GGA) para prever o modo de ligação de pequenas moléculas aos seus alvos proteicos,[18] Em torno de 2010, também surgiram metodologias que combinavam ancoragem molecular com técnicas de dinâmica molecular para aumentar a exatidão dos resultados obtidos, como a energia de ligação. Um estudo que fez uso dessa abordagem analisou a interação entre inibidores de proteínas quinases responsáveis por condições inflamatórias e oncológicas, em que inicialmente foi empregado *docking* molecular, seguido de 10 ns de dinâmica molecular para refinar a conformação e explorar a estabilidade do complexo ligante-receptor.[19,20]

Os algoritmos do *AutoDock* e do *AutoDock Vina* se baseiam em uma abordagem probabilística aleatória ou estocástica, para seletivamente rejeitar ou aceitar configurações através de um espectro de critérios. A diferença entre estes dois algoritmos se encontra na abordagem utilizada para a busca das melhores poses durante o processo de ancoragem molecular. O *AutoDock* usa

o LGA, que se baseia na teoria evolutiva de Lamarck, de modo que as melhorias no processo de refinamento local ao encontrar as melhores poses são "herdadas" pelas próximas gerações, convergindo para o resultado de menor energia global.[6,21]

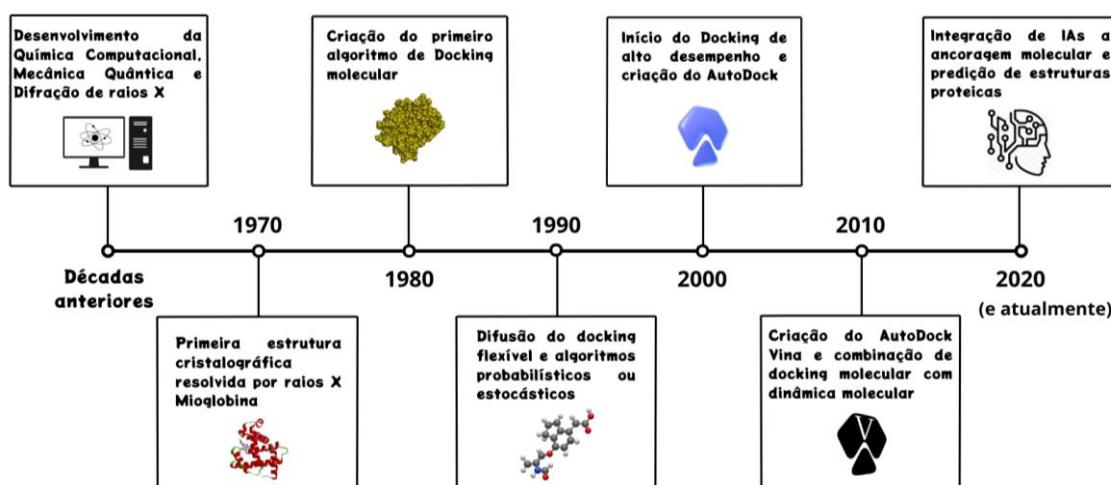
Em relação ao GGA, presente no *AutoDock Vina*, não há a dependência de múltiplas gerações de indivíduos como no LGA. Esse algoritmo realiza uma amostragem mais ampla e rápida das conformações possíveis, o que reduz o tempo gasto na busca das melhores poses, porém comprometendo a qualidade dos resultados. Ademais, o GGA faz uso de uma técnica de otimização local baseada em gradiente, que consiste em refinar poses que já são promissoras, pelo ajuste em parâmetros como interações interespecíficas (interações intermoleculares, interações eletroestáticas e interações hidrofóbicas), ângulos de ligação e distâncias entre o ligante e o receptor. O intuito é aperfeiçoar a energia de ligação de uma pose já existente, dessa forma, otimizando o custo computacional. Em contraste, o LGA do *AutoDock* utiliza um refinamento local computacionalmente mais intenso, contudo, com uma maior precisão.[22]

Vale destacar, que os algoritmos estocásticos como o LGA e GGA mudam aleatoriamente, ao invés de sistematicamente, os valores de graus de liberdade do sistema. Uma desvantagem desses métodos é que eles não garantem uma busca completa do espaço conformacional, então a verdadeira solução pode ter sido desprezada. A falta de convergência é parcialmente resolvida ao aumentar o número de interações do algoritmo, outro modo de superar esse impasse é diminuir o espaço de busca do algoritmo, focando no sítio ativo do bioreceptor aumentando a probabilidade de encontrar a melhor pose. Além disso, também é possível aumentar parâmetros como *Energy range* e *Exhaustiveness*, para o *Autodock Vina*. [6,16] Dentre os algoritmos estocásticos aqueles mais conhecidos e utilizados na atualidade são o Autodock [23], DARWIN [24], Monte Carlo [25] e GOLD [26].

Atualmente, métodos que integram inteligência artificial (IA) com ancoragem molecular estão sendo empregados para aperfeiçoar a previsão das melhores poses do ligante com o receptor. Dessa forma, essa metodologia é capaz de tratar o receptor como dinâmico e completamente flexível, divergindo das técnicas anteriores que operavam com o receptor estático e rígido ou semi-flexível. Assim, aumentando ainda mais a exatidão dos resultados obtidos e

otimizando o processo de ancoragem molecular, claro que isso vem acompanhado de um maior custo computacional.[27] Além disso, no ano de 2024, David Baker, Demis Hassabis e John Jumper receberam o prêmio Nobel de Química por sua significativa e inovadora contribuição sobre o uso de Inteligência Artificial para a previsão da estrutura de proteínas por métodos computacionais. [28] A seguir, a Figura 2 contém uma linha do tempo demonstrando os principais marcos históricos no desenvolvimento e compreensão da ancoragem molecular nas últimas décadas.

Figura 2 – Linha do tempo da ancoragem molecular.



Fonte: Autor

Após o *docking molecular* ter sido realizado, o *software* executa uma busca sistemática no algoritmo, pela qual a conformação do ligante é recorrentemente aproximada até a conformação de energia mínima ser identificada. O resultado final geralmente irá possuir um valor negativo na variação da energia de ligação ΔG (U total em kcal/mol), na qual um número de variáveis de energias eletrostáticas e Van Der Waals irão ser sintetizadas, essas energias relacionam as interações entre o receptor alvo e o ligante. Essa associação resulta em uma função de score ou pontuação, que permite classificar as posições candidatas com base na energia de ligação obtida, tal que valores mais negativos de ΔG indicam uma maior afinidade entre o ligante e receptor.[6]

É importante salientar que, nem todos os algoritmos de ancoragem molecular atuam desse modo, o *Autodock Vina*, por exemplo, utiliza uma combinação de busca global e local, enquanto o *GOLD* utiliza um algoritmo genético (GA) de busca global que age de forma similar ao LGA, porém o *GOLD* se baseia na teoria evolutiva da seleção natural Darwiniana, na qual as melhorias durante o processo de busca das poses não são transmitidas diretamente as próxima gerações, as melhorias ocorrem apenas em um nível populacional, através de processos de mutação e crossover, ou seja, o algoritmo do *GOLD* faz uma busca de forma ampla no espaço conformacional, já o algoritmo do *Autodock Vina* utiliza uma busca global-local combinada, o que permite encontrar poses promissoras mais rapidamente.[26,29]

No campo de descoberta de drogas, vários aspectos-chave devem ser considerados para prever se uma molécula irá se ligar ao receptor alvo, como o formato estrutural, interações eletrostáticas entre proteína e ligante, ligante e ligante, ou proteína e proteína. Nesse sentido, vários parâmetros físico-químicos, incluindo as forças de Van Der Waals, interações de eletroestáticas e formação de ligação de hidrogênio, desempenham papéis relevantes. A combinação de todos esses valores e potencial de ligação é previsto por uma pontuação de *docking*.[6]

Um exemplo recente da utilização do *docking molecular* para acelerar o desenvolvimento de uma abordagem terapêutica urgente está diretamente relacionada à pandemia de COVID-19. Em paralelo aos esforços para o desenvolvimento de uma vacina para SARS-Cov-2, foram realizados ensaios utilizando *docking molecular* para avaliar se os princípios ativos de medicamentos já aprovados e regularmente empregados no tratamento de outras doenças seriam capazes de interagir com as proteases e as proteínas spike do SARS-Cov-2, cujas estruturas cristalográficas já haviam sido resolvidas por difração de raios-x.[10, 11, 30, 31] Os resultados dos testes *in vitro* (culturas celulares) e *in silico* (*docking molecular*), indicaram que os fármacos cloroquina e hidroxicloroquina eram promissores no combate a COVID-19, impedindo que o vírus do SARS-Cov-2 responsável pela COVID-19 adentrasse o meio intracelular.[32,33] Contudo, estudos posteriores e ensaios *in vivo*, demonstraram que estes medicamentos não apresentaram eficiência no tratamento de pacientes que possuíam a doença, em alguns casos, foi

observado que a alta dosagem poderia provocar efeitos colaterais, como problemas cardíacos.[34,35] Paralelamente, ensaios de *docking molecular* permitiram o desenho racional do Nirmatrelvir, um inibidor da protease M^{pro} do SARS-CoV-2, que juntamente com antiretroviral Ritonavir, veio a ser aprovado como componente do Paxlovid, medicamento para tratamento da COVID-19 desenvolvido pela Pfizer.[36]

Antes da utilização do *docking molecular* como ferramenta de avaliação na bioatividade de novas drogas baseados em produtos naturais, a medicina folclórica e a etnofarmacologia desempenhavam um papel fundamental na descoberta de novos candidatos a fármacos. Trata-se da tradição, muito difundida em países em desenvolvimento, na qual ocorre a utilização de ervas, folhas e raízes em preparações tradicionais para tratar várias doenças, tal que esse conhecimento é transmitido às próximas gerações, na maioria dos casos, sem documentação formal.[37] A união deste conhecimento tradicional, com os avanços na Cristalografia e ou biologia estrutural, assim como a Farmacologia de produtos naturais e o *docking molecular* tem se mostrado como uma abordagem eficaz no desenvolvimento de novos fármacos e vacinas. Desse modo, o uso de técnicas como a ancoragem molecular se torna ainda mais necessário, devido à quantidade de estruturas cristalográficas que surgem a cada dia. Para exemplificar isso, basta verificar o número de estruturas proteicas presentes no banco de dados do PDB no ano de 2024, o qual atingiu o número de 219.515 estruturas cristalográficas resolvidas.[38]

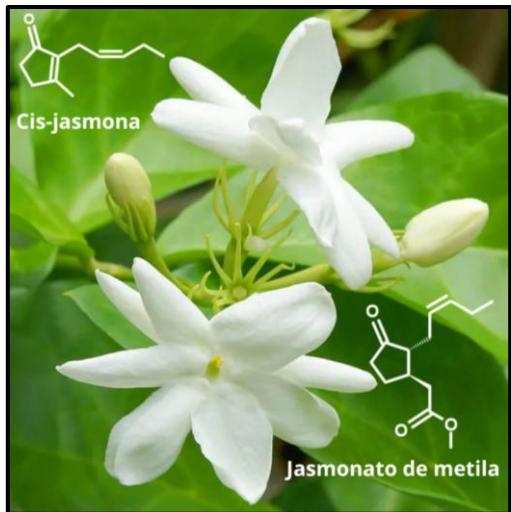
3.2 Importância das plantas e produtos naturais

Há registros arqueológicos, que datam de tempos mais remotos, de que plantas medicinais têm sido utilizadas como forma de tratamento de doenças pelo homem em países como a China, Egito, Índia e outros países em desenvolvimento. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 80% das pessoas ainda dependem de medicamentos tradicionais à base de plantas para cuidados de saúde primários, e 80% dos 122 medicamentos derivados de plantas estavam relacionadas ao seu propósito etnofarmacológico original, um exemplo disto é a utilização da casca de salgueiros na preparação de chás, para tratar dores e inflamações pelos egípcios e sumérios 3500 anos atrás.

Posteriormente foi descoberto que o princípio ativo do salgueiro, o ácido acetilsalicílico possuía de fato atividade anti-inflamatória e analgésica, de modo que a sua primeira síntese ocorreu em 1897 pelo Químico Felix Hoffmann.[39,40] Contudo, o estudo dos princípios ativos em produtos naturais se torna um desafio, devido à dificuldade encontrada na extração e purificação destes compostos, como a baixa concentração dos alvos moleculares e baixa solubilidade dos solventes utilizados durante o processo de extração. Desse modo, os produtos naturais são isolados em pequenas quantidades e, como tal, a realização de bioensaios é limitada ou, por vezes, impossível.[41,42]

Além do campo medicinal e farmacêutico, há um grande interesse econômico pela indústria por compostos orgânicos biosintetizados por esses organismos. Muitos desses compostos estão presentes no nosso cotidiano como óleos, taninos, borracha natural, gomas, ceras, tinturas, flavorizantes e odoríferos.[43] O ácido jasmônico (molécula que será abordada nesse trabalho) e seus derivados, são obtidos a partir dos ácidos graxos linolênico e linoleico, sendo denominados oxilipinas e pertencem a uma classe de fitormônios produzidos por uma ampla variedade de plantas, alguns dos quais são conhecidos como componentes odoríferos de óleos essenciais. De modo que a primeira substância isolada, a cis-jasmona, foi identificada como constituinte de uma fragrância, cuja origem é o óleo essencial de Jasmim (*Jasminum grandflorum*) Figura 3, e assim teve sua estrutura química elucidada. Em seguida, em 1962, o jasmonato de metila (MeJA) foi isolado da mesma origem.[44]

Figura 3 – Fotografia da flor do *Jasminum grandflorum*, e estrutura química da cis-jasmona e jasmonato de metila



Fonte: <https://www.plumerya.com/oleos-essenciais/oleo-absoluto-jasmim-5ml-jasminum-grandiflorum-diluido-a-10> - adaptado

Apesar da utilização de produtos naturais bioativos como agentes fitoterápicos datar de milhares de anos atrás, seu desenvolvimento e aplicação como compostos isolados e caracterizados para descoberta de drogas modernas começou somente no século XIX.[45] Desde essa época, um dos principais desafios encontrados na extração e isolamento desses compostos era a diversidade e complexidade existente entre as diversas espécies e famílias de plantas. Dado que um percentual muito baixo da biodiversidade mundial foi avaliada quanto à sua potencial atividade biológica, muitos compostos naturais úteis ainda estão por serem descobertos, o principal desafio é como acessar essa diversidade química natural.[39]

O conjunto de reações enzimáticas produzidas por cada ser vivo como anabolismo (síntese) ou catabolismo (degradação) é conhecido como metabolismo e, de acordo com essa classificação, ocorre a produção de substâncias denominadas metabólitos primários e secundários. Dentro dessa categoria, encontram-se os produtos naturais que são conhecidos pelos químicos como metabólitos secundários, para distingui-los daqueles compostos que tradicionalmente tem sido domínio dos bioquímicos (açúcares, lipídeos, ácidos nucléicos e peptídeos). Esses compostos são mais característicos de fontes botânicas específicas (ou seja, uma família ou gênero e às vezes uma única espécie de planta), contudo esses compostos não se restringem somente a esses organismos, sendo encontrados em bactérias, fungos e animais.[46] Os metabólitos secundários das plantas desempenham uma variedade de funções,

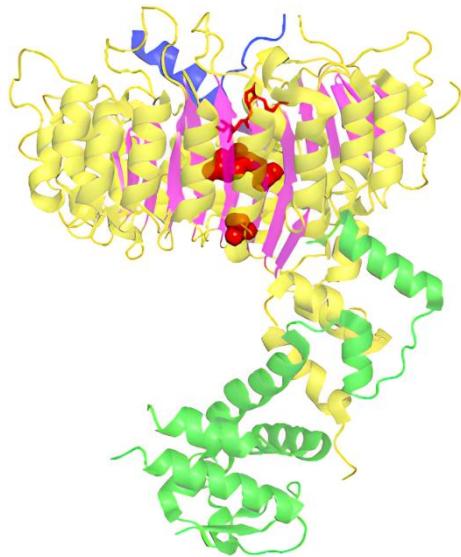
atuando nos processos de crescimento, desenvolvimento e imunidade nata das plantas, na sinalização de resposta de defesa e na resposta a estresses ambientais.[47,48, 49]

3.3 Proteínas F-box, COI1 e o complexo SCF^{COI1}

A coronatina insensitiva 1 (COI1) é um correceptor proteico que pertence à superfamília de proteínas denominada F-Box, com membros encontrados em organismos eucariotos como leveduras, plantas e mamíferos. O primeiro motivo F-box foi identificado no nitrogênio terminal da proteína SCON2, em 1995, mas o nome só foi atribuído em 1996, quando um motivo semelhante foi descoberto no nitrogênio terminal de um grupo de proteínas denominadas Ciclina F.[51] Nas próximas décadas, muitas proteínas F-box foram descobertas em diferentes organismos. Por exemplo, em genoma de nematóides que contém 326 genes codificadores de proteínas F-box, o maior número entre todas as espécies animais. Já o genoma humano possui 38 genes, e o da mosca da fruta apresenta 22 genes. Em contraste, a maioria das espécies de plantas possui um número surpreendentemente elevado de genes F-box, como *Arabidopsis* e *Medicago* apresentando 694 e 972 genes em seus genomas, respectivamente.[51]

As proteínas F-box estão diretamente envolvidas na degradação proteica promovida pelo sistema ubiquitina proteassoma 26S (UPS), que regula diversas funções fisiológicas nos seres vivos como a resposta imune nata e processos de desenvolvimento. O termo “F-box” se origina do fato que essas proteínas compartilham um domínio em comum entre si contendo de 40-50 aminoácidos, denominado domínio F-box. Essa porção será a responsável por interagir com a proteína SKP1, que se coordena à proteína Culina para formar um complexo enzimático denominado SKP1-Culina-F-box (SCF). O complexo que tem COI1 como a sua F-Box é denominado SCF^{COI1} (Figura 4) e atua como a E3 ligase de ubiquitina (E3) no sistema ubiquitina proteassoma 26S (UPS).[51]

Figura 4 – Estrutura de uma unidade do complexo COI1-ASK1-JA-Ile que compõe a SCF^{COI1} e degron JAZ1; COI1 a hélices (**amarelo**) e folhas β (**rosa**), ASK1 (**verde**), degron JAZ – JAZ1 (**azul**), JA-Ile e pentacisfosfato de inositol (**vermelho**)



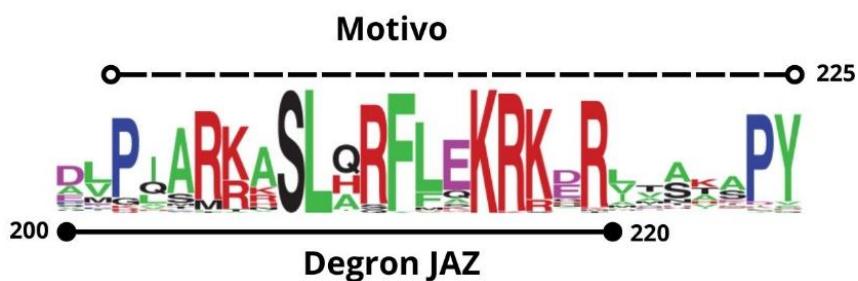
Fonte: Protein Data Bank (2024) - adaptado

A COI1 é a unidade proteica da SCF^{COI1} que desempenha o papel de reconhecer proteínas pertencentes à classe JAZ, que são repressoras da transcrição de genes de crescimento de plantas. Este reconhecimento, aproxima uma proteína JAZ do complexo E1:E2, respectivamente uma enzima ativadora de ubiquitina e uma enzima conjugadora de ubiquitina, e que é responsável por ligar unidades de ubiquitina à proteína JAZ, sinalizando ao proteassoma que a proteína JAZ ubiquitinilizada deve ser degradada. É importante destacar que a COI1 não atua, por conta própria, como E3 no UPS, sendo, portanto, necessária a sua conjugação à SKP1 e à Culina, para que o complexo SCF^{COI1} desempenhe seu papel de marcação no UPS.

As proteínas JAZ apresentam, em comum, uma sequência peptídica muito conservada, denominada como motivo ou *degron*, que é fundamental para que a COI1 as reconheça e aproxime a JAZ do complexo E1:E2, para que ocorra sua ubiquitinação. O degron JAZ1 é uma sequência de 20 aminoácidos localizada entre Glu200 e Val220 que é necessária para interagir com a COI1, além disso há uma sequência de resíduos de aminoácidos (motivo) entre os resíduos 200-225 como evidenciado na Figura 5. Estruturalmente, o *degron* de proteínas JAZ é constituído de uma α hélice conservada utilizada para *docking* com a COI1 e uma região de loop para aprisionar o hormônio em seu sítio de ligação.[52] O *degron* das proteínas JAZ desempenha papel fundamental no processo de degradação proteica, de modo que uma pequena alteração em sua

sequência pode impactar profundamente o tempo de vida de cada proteína JAZ na célula da planta.[53]

Figura 5 – Sequência de resíduos de aminoácido que compõe o motivo(---); Degron JAZ1(—). Tamanho das letras indicam o nível de conservação dos resíduos de aminoácido na estrutura primária das proteínas JAZ.

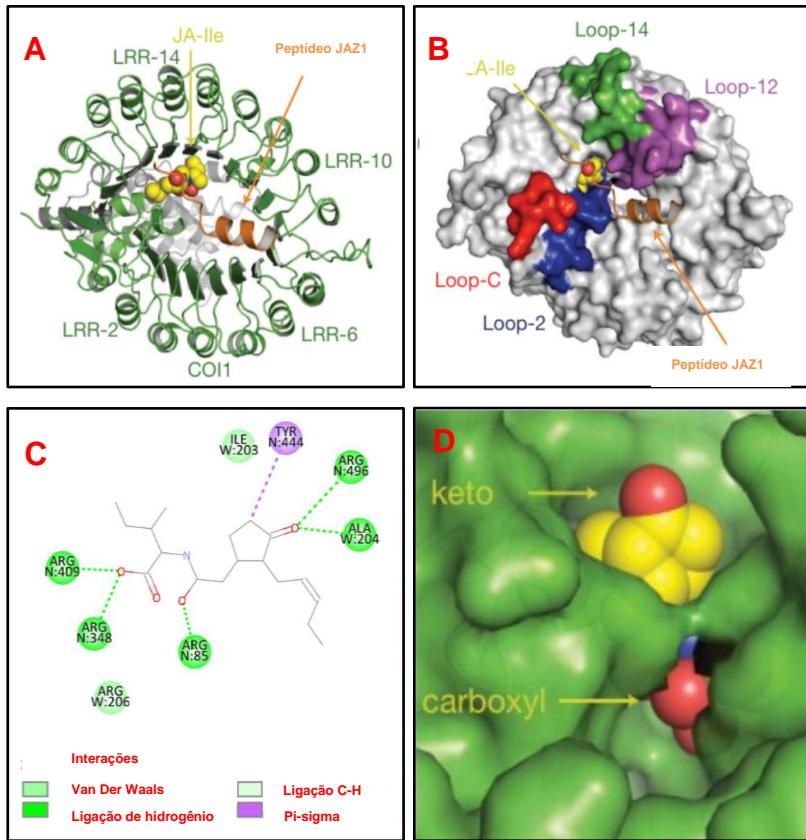


Fonte: Sheard (2010) - adaptado

Observa-se que a COI1 apresenta maior atividade no processo de marcação das proteínas JAZ quando coordenada ao (3R,7S)-jasmonato de *L*-isoleucina (JA-Ile) ou à coronatina (CO). Além disso, foi identificado que o pentacisfosfato de inositol (IP₅) presente no complexo SCF^{COI1} também desempenha um papel fundamental na recepção do JA-Ile. Vale destacar, que JA-Ile atua como uma espécie de adesivo molecular entre o COI1 e a região do *degron* de uma proteína JAZ.[54,52]

Os ligantes JA-Ile e CO adquirem uma posição vertical no sítio de ligação da proteína, com o grupo cetona do anel ciclopentanona apontando para a região mais externa do domínio de ligação do jasmonato, e estabelecendo uma rede de ligação de hidrogênio triangular com Arg496 e Tyr444 da COI1, na entrada deste sítio de ligação. De maneira que, na ausência da ligação peptídica com o *degron* de uma proteína JAZ, os grupos cetona e carboxilato do ligante se tornam acessível aos solventes, como indicado na Figura 6.[52]

Figura 6 – a) Domínios de repetições ricas em leucina (LRR) b) Loops na superfície da COI1 c) interações de JA-Ile em COI1 d) Grupos cetona e carboxila no sítio de ligação da proteína.



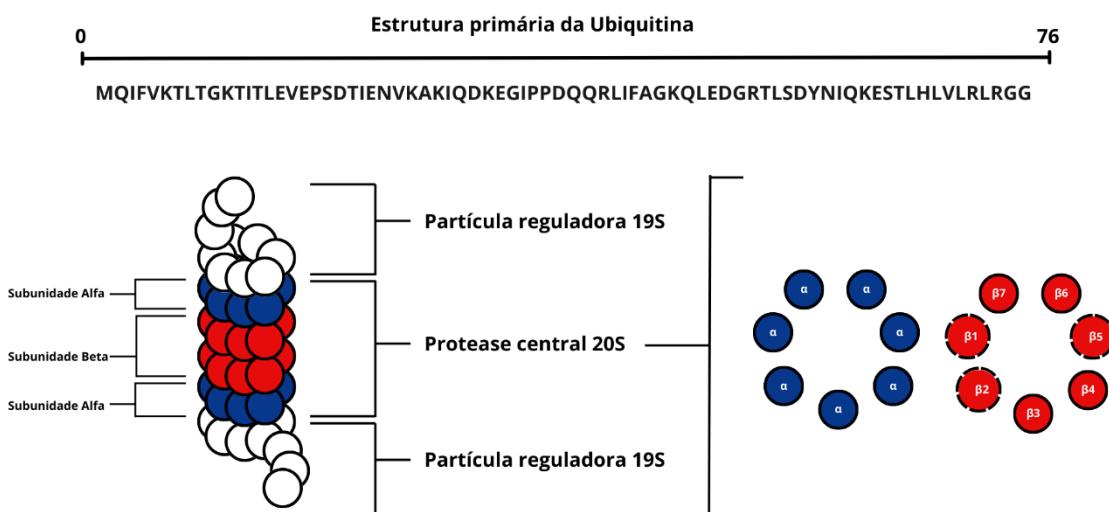
Fonte: Sheard (2010) - adaptado

3.4 Sistema ubiquitina proteassoma 26S

Para tratar sobre o sistema ubiquitina proteassoma 26S (UPS) é necessário definir, inicialmente, o que é a ubiquitina o que é o proteassoma. A ubiquitina é uma proteína pequena, composta de 76 aminoácidos, altamente conservada e expressa, de forma geral, em organismos do reino eucariótico. O proteassoma 26S é um complexo enzimático composto de 2 multisubunidades, a protease central 20S e 2 partículas reguladoras 19S que atuam no desdobramento e inserção da proteína a ser degradada. A protease central 20S é constituída de 2 anéis periféricos contendo 7 subunidades alfas (azul) e 2 anéis centrais com 7 subunidades beta (vermelho), como demonstrado na Figura 7. Os sítios proteolíticos residentes dentro da câmara estão localizados em 3 subunidades de cada anel beta, com atividade semelhante à da caspase ($\beta 1$), da tripsina ($\beta 2$) e da quimotripsina ($\beta 5$), que preferencialmente clivam peptídeos após resíduos de aminoácidos ácidos e básicos, respectivamente. Dito isso, o UPS regula as vias proteolíticas que integram o organismo dos eucariotos. A degradação de proteínas por ubiquitinação, assim como a correção de mutações no DNA são processos essenciais para manutenção da vida destes organismos,

pois defeitos na tradução e transcrição de proteínas podem gerar mutações indesejadas, o que interfere diretamente na homeostase destes seres.[55,56]

Figura 7 – Estrutura primária da ubiquitina e representação esquemática da estrutura quaternária do proteassoma 26S.



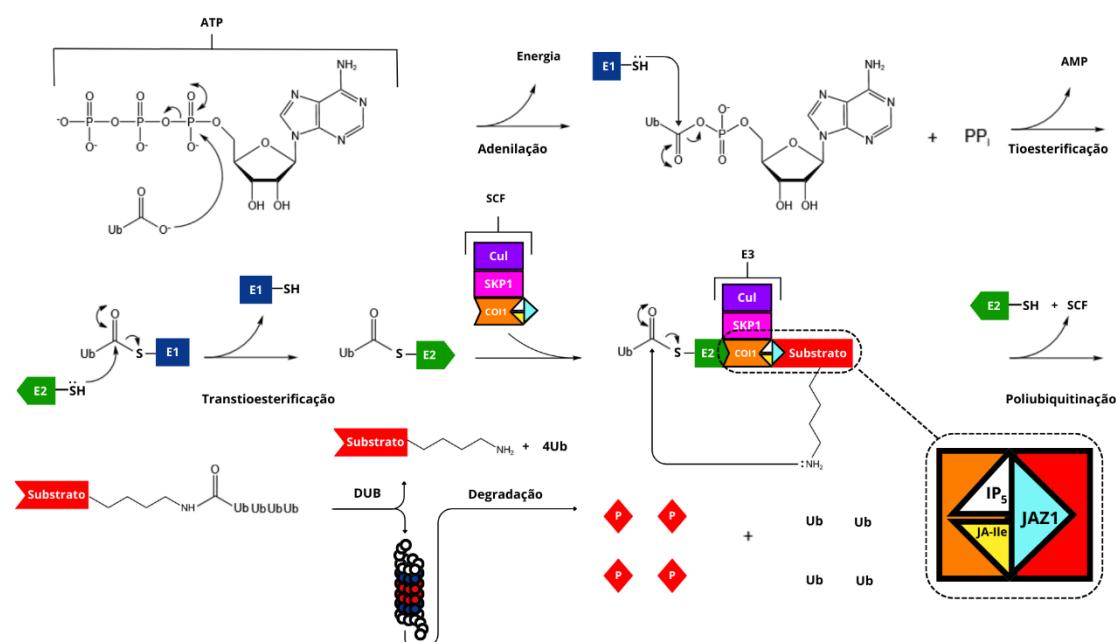
Fonte: LÜ, Shuqing et al. (2013) adaptado

As plantas utilizam vias de transdução de sinais para integrar os estímulos de estresse percebidos e as mudanças na expressão genética requeridas para montar uma resposta coordenada. Em resposta a um estímulo ambiental, a ubiquitinação de proteínas reguladoras, como fatores de transcrição, pode ser promovida ou inibida, levando a um aumento da degradação ou estabilização dessas proteínas reguladoras, que resulta em alterações e mudanças nos padrões de expressão gênica e na resposta celular necessária. A descoberta da proteólise dependente de ubiquitina no início dos anos 1980 começou com a revelação de que a degradação de proteínas nas células dos mamíferos era dependente de energia [57,58]. A função geral da via de ubiquitinação é conjugar ubiquitina ao resíduo Lys contido no substrato proteico alvo, os marcando para degradação pelo proteassoma 26S.[56,59]

Para que ocorra a ubiquitinação de proteínas, é necessária a ação de 3 enzimas E1, E2 e E3. O processo começa com a ativação dependente de energia utilizando adenosa trifosfato (ATP), em uma reação do tipo adenilação, pela qual o carboxilato ligado à ubiquitina ataca um dos fosfatos do ATP, gerando um fosfoéster com ubiquitina, que será convertido em tioéster, por tioesterificação, com o auxílio da E1, formando um complexo enzimático tioéster

de ubiquitina-E1 e fosfato inorgânico (PP_i) e adenosina monofosfato (AMP). A ubiquitina é então transferida da E1 para um resíduo conservado de cisteína no sítio ativo da E2, por meio de uma reação de transtioesterificação, formando o intermediário E2-ubiquitina ligado ao tioéster.[56] O complexo enzimático E2-ubiquitina pode então se ligar diretamente a uma E3, para transferir ubiquitina ao substrato proteico que tem afinidade por essa enzima e que, por este motivo, será degradado. Vale ressaltar que, o correceptor COI1 que integra a E3 SCF é substrato-específica, ou seja, ela se liga a um grupo muito específico de proteínas alvo, as proteínas JAZ, e atua às aproximando da ubiquitina ligada na E2. Para que ocorra a degradação da proteína-alvo pelo proteasoma 26S, se faz necessária a poliubiquinatação da proteína-alvo, pois a ligação de uma única ubiquitina a um substrato proteíco pode modificar a localização ou atividade da proteína [60]. A cadeia de poliubiquitina também pode ser desagregada pela atividade da DUB (enzima desubiquitinadora) para liberar ubiquitina que será reutilizada no próximo ciclo de ubiquitinação Figura 8.[58]

Figura 8 – Esquema do processo de degradação de um substrato polipeptídico a peptídeos (P), através do sistema UPS que tem como sistema E3 ligase o complexo SCF^{COI1} , cujos ativadores de reconhecimento das proteínas alvo JAZ são o jasmonato de isoleucina (JA-Ile), o fosfato de inositol (IP₅). O degron JAZ1 é a região comum às proteínas-alvo JAZ que é reconhecido pela SCF^{COI1} .



Fonte: Autor

É essencial destacar que além de fornecer a energia necessária para dar início a reação no UPS, o ATP é necessário para a atividade das chaperonas, macromoléculas responsáveis pelo desdobramento correto das proteínas antes de serem introduzidos no proteassoma 26S. Além disso, diferenças na concentração de ATP podem afetar a atividade do proteassoma e, consequentemente, interferir na taxa de degradação proteica, resultando no acúmulo de proteínas disfuncionais, o que impacta o ciclo celular dependente de ubiquitinação.[61]

A via UPS regula quase todos os aspectos do crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo, porém não se limitando, a percepção e a sinalização hormonal. Outros exemplos da atuação desse sistema incluem resposta à luz, desenvolvimento florífero, autoincompatibilidade (incapacidade de autofecundação pela planta), regulação epigenética para controle da expressão de genes, e a patogênese de plantas, processo no qual doenças se desenvolvem, dessa forma, atuando no combate a doenças geradas no organismo. Os fitormônios são uma coleção estruturalmente não relacionada de pequenas moléculas que controlam e integram uma ampla variedade de processos fisiológicos das plantas. Entre os fitormônios, a auxina foi o primeiro a ser descoberto, seguida pelas giberelinas, citocininas, ácido abscísico, etileno, jasmonatos, brassinosteroides e estrigolactona.[62]

O fitormônio JA-Ile pertencente aos jasmonatos, nesse contexto, e possui função sinalizadora no UPS. Devido à necessidade de seletividade das proteínas que serão marcadas por ubiquitina e degradadas, E3 ligases como SCF^{COI1} adaptaram uma parte de sua estrutura para o reconhecimento desses substratos proteolíticos, esta região é denominada *degron* e entre as proteínas pertencentes a classe dos jasmonatos é conhecida como JAZ1.[63]

3.5 Atuação de ácido jasmônico, jasmonato de isoleucina e coronatina no sistema ubiquitina-proteassoma 26S

O ácido jasmônico (JA) é uma molécula sinalizadora intimamente associada com a resistência a plantas aos estresses abióticos, usualmente envolvido em respostas fisiológicas e moleculares. Tal que essas respostas

fisiológicas incluem a ativação do sistema antioxidante (radical ânion superóxido, peroxidase, NADPH-oxidase), acúmulo de aminoácidos (isoleucina e metionina) e açúcares solúveis. Já as respostas moleculares no geral envolvem a expressão de genes associados a JA (JAZ, AOS1, AOC, LOX2 e COI1).[64] O primeiro relato do isolamento de ácido jasmônico ocorreu em 1971, a partir de uma cultura de fungos *Botryodiplodia theobromae* (*Lasiodiplodia theobroma*), como um inibidor no crescimento de plantas, quando a sua estrutura também foi desvendada.[65] Esta foi a primeira descrição dos efeitos fisiológicos de JA e compostos relacionados como fitormônios de crescimento de plantas. Uma década depois, jasmonato de metila (MeJA) e JA foram isolados e identificados como substâncias promotoras senescentes de diferentes espécies de plantas. Devido à relevância e atuação desses compostos no processo de desenvolvimento desses organismos, foi cunhado o termo Jasmonato para descrever as substâncias biologicamente relacionadas a este fitormônio.[65]

Posteriormente, em 1997, várias formas livres de ácido jasmônico e compostos relacionados foram encontrados em fungos, plantas superiores e inferiores. Foi observado que em geral, as concentrações de ácido jasmônico e compostos relacionados nos tecidos das plantas são relativamente baixos, de modo análogo a outros fitormônios. [44,64]

As plantas muitas vezes sofrem de estresse biótico (patógenos, herbívoros ou microrganismos parasíticos) e estresse abiótico (frio, seca, salinidade, luz ou ferida). Logo, para sobreviver e se reproduzir, esses organismos desenvolveram mecanismos para se adaptar a esses diversos tipos de perturbações no meio que se encontram. Neste cenário fitormônios como o JA, JA-Ile e seus derivados desempenham funções vitais no crescimento e desenvolvimento das plantas.[64]

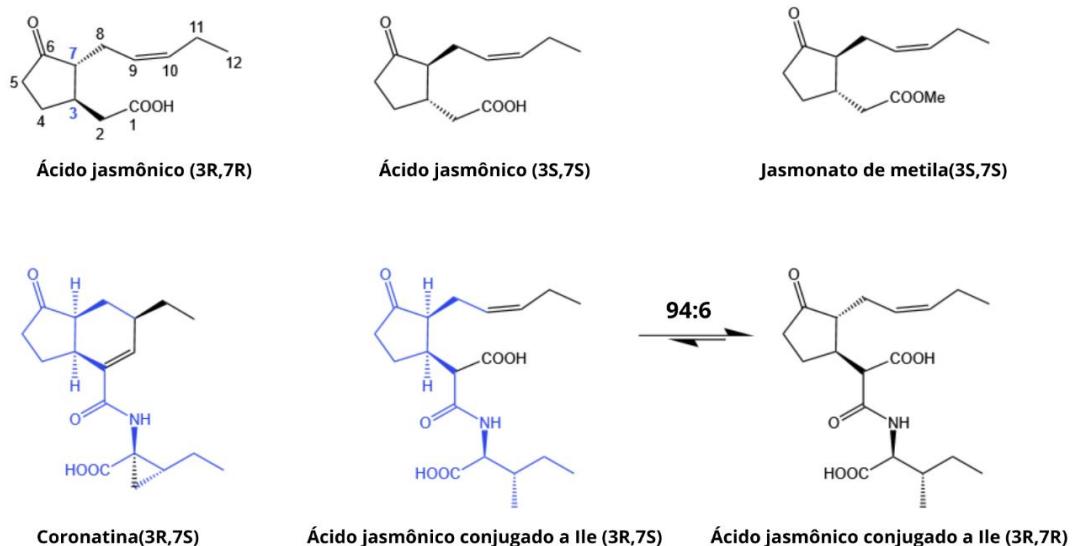
Como dito anteriormente, a concentração endógena de JA-Ile em condições normais é baixa, porém pode rapidamente aumentar na presença de um dado estímulo, como a ação de um predador. Esse aumento na concentração de JA-Ile favorece a formação de um complexo deste fitormônio com a COI1 que é o componente fundamental do complexo enzimático SCFCOI1. A formação deste complexo favorece a complexação da unidade COI1 com as proteínas JAZ, favorecendo a ubiquitinação e degradação desses substratos através da via do proteassoma 26S.[66] Cabe destacar que as proteínas JAZ são repressoras de vias de transcrição de genes relacionados ao mecanismo de

defesa. Desta forma, quando não há nenhum tipo de estresse ambiental sob as plantas, há baixa concentração intracelular de JA-Ile, o que inibe a degradação das proteínas JAZ, ocasionando na repressão da transcrição de genes relacionados ao mecanismo de defesa. Este mecanismo é importante, pois a expressão de fenótipos relacionados aos mecanismos de defesa das plantas requer ATP, e com o intuito de otimizar o custo energético, essa energia é redirecionada para o desenvolvimento da planta.[64]

Devido à presença de centros quirais nas posições C3 e C7 do JA, o conjugado JA-Ile apresenta-se como uma mistura de diasteroisômeros. Na natureza, a forma bioativa de JA-Ile no UPS é a que tem a estereoquímica absoluta (3R,7S) no ácido jasmônico. Esta está em equilíbrio com o epímero (3R,7R), que é termodinamicamente mais estável e encontra-se majoritariamente no meio celular, na proporção de 94:6 em relação ao diasteroisômero bioativo. Vale ressaltar que, esse processo de epimerização ocorre no meio intracelular. [44,67]

Uma importante substância relacionada ao JA-Ile é a coronatina (CO), uma toxina produzida pela bactéria *Pseudomonas syringae*, que mimetiza a atividade de (3R, 7S)-JA-Ile, Figura 9.[68,69] Ela apresenta grande semelhança estrutural com o (3R, 7S)-JA-Ile, possuindo um arranjo espacial *cis* dos grupos ligados aos carbonos C3 e C7. Contudo, o grupo ciclopropano fundido ao anel ciclohexeno presente em CO concedem uma maior hidrofobicidade e rigidez estrutural a este ligante, o tornando configuracionalmente mais estável do que o (3R,7S)-JA-Ile.[70] Isso o torna um ativador mais eficiente do processo de ubiquitinação das proteínas JAZ em relação a JA-Ile.

Figura 9 – Estrutura e estereoquímica de ácido jasmônico e derivados – em azul as semelhanças estruturais entre CO e JA-Ile.



Fonte: autor

A epimerização entre os diastereoisômeros (3*R*,7*S*) e (3*R*,7*R*) envolve um equilíbrio ceto-enólico na ciclopentanona de JA-Ile e depende de fatores como o pH do meio e temperatura. Contudo, a estrutura com estereoquímica (3*R*,7*R*) é favorecida por posicionar os grupos conectados à ciclopentanona de forma *trans*, diminuindo o impedimento estérico entre esses grupos.

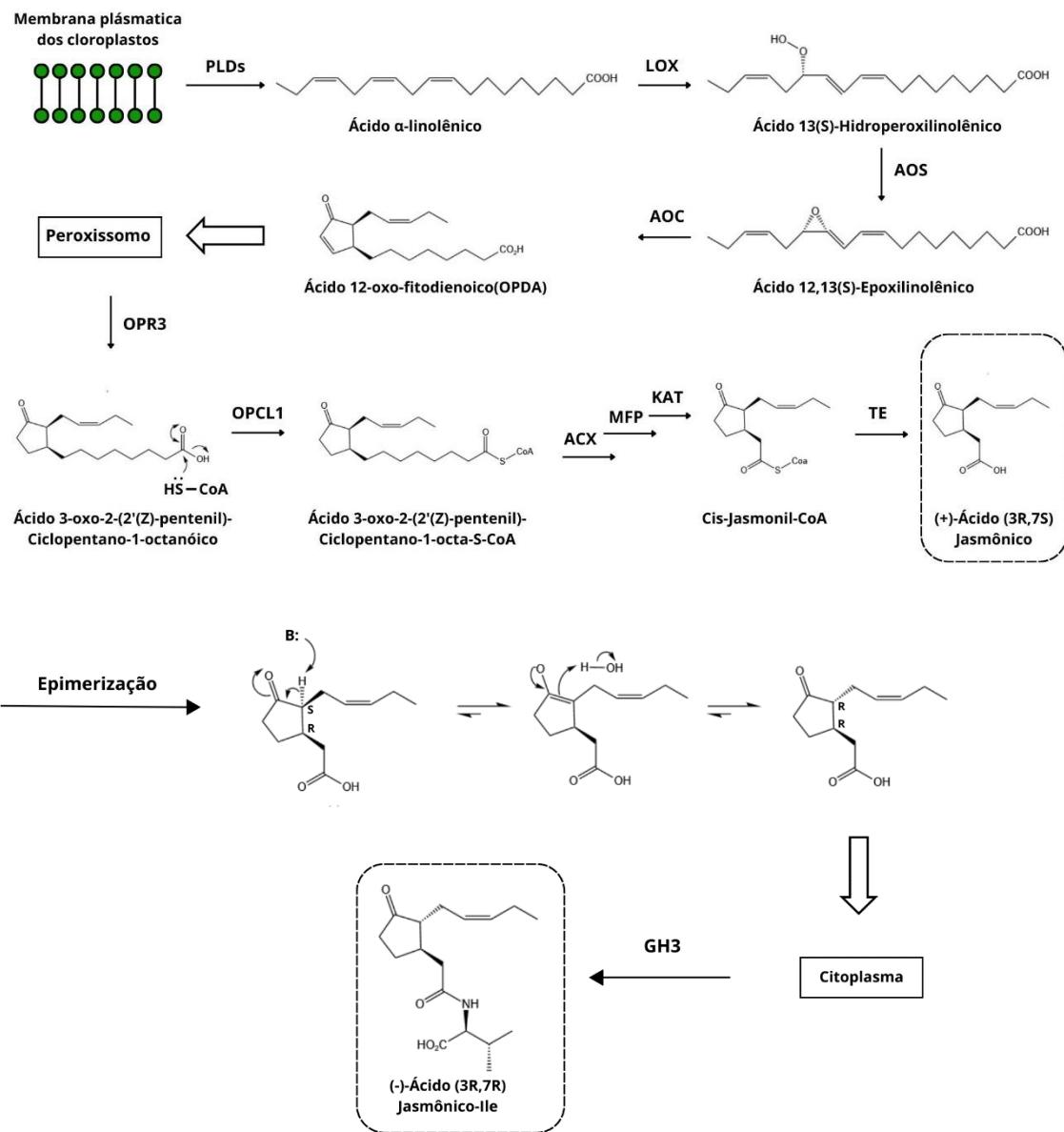
3.6 Biossíntese de Ácido Jasmônico e Ácido Jasmônico conjugado a isoleucina

A biossíntese de JA nas plantas, se inicia através de processos bióticos com o rompimento da parede celular da planta por predadores como insetos, liberando fosfolipídios no meio intracelular que passam por uma série de reações enzimáticas até a produção dessa substância.[71] Com relação ao estresse abiótico, a produção deste fitormônio é iniciada através da expressão de genes biossintéticos de JA, devido à variação de fatores como salinidade, seca e temperaturas extremas que são capazes de afetar a atividade de diferentes enzimas relacionadas a produção desse composto. Outros produtos desse processo biossintético têm potencial para se acumular, gerando espécies tóxicas, que podem comprometer a sobrevivência e longevidade do ciclo celular destes seres. Dentre os compostos secundários produzidos durante o estresse abiótico, os mais comuns são as espécies reativas de oxigênio (ROS) que provocam estresse oxidativo e danos as membranas celulares e DNA.[64]

Os fosfolipídios são moléculas responsáveis por manter a integridade estrutural da membrana plasmática, sendo encontrados na superfície da membrana dos cloroplastos, uma organela celular que atua no processo de fotossíntese.[71] A reação começa quando as enzimas fosfolipases (PLDs) são ativadas e separam os fosfolipídios ácido linoleico e ácido α -linolênico das membranas dos cloroplastos, em seguida, o ácido α -linolênico é convertido no ácido 13(S)-hidroperoxilinolênico, pela enzima 13-lipoxigenase (LOX), através de uma reação de esterificação seguida de uma reação de peroxilação (Figura 10).[72]

Após isso, a aleno óxido sintase (AOS) atua convertendo o composto produzido em um óxido de aleno instável, o ácido 12,13(S)-epoxilinolênico, cuja instabilidade provocada pela tensão no anel epóxido favorece o rompimento da ligação C-O, e possibilita a ação da enzima aleno óxido ciclase (AOC), que promove a ciclização da cadeia carbônica, formando o anel ciclopentenona do ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA), o principal precursor de JA. Ressalta-se que a forma enantiomérica favorecida desse composto é a (9S,13S)-cis-(+)-OPDA e que este pode agir como uma molécula sinalizadora, assim como JA e seus precursores. Estudos sugerem que esta característica está associada ao grupo carbonila α,β -insaturado eletrofílico do anel ciclopentenona que é altamente reativo.[72,73]

Figura 10 – Biossíntese de ácido jasmônico, com suas respectivas reações enzimáticas e epimerização de C7 para o diastereoisômero mais estável.



Fonte: Delker, C.; Stenzel, I.; Hause, B.; et al. (2006) - adaptado

As reações descritas anteriormente ocorrem todas no meio intracelular, mas especificamente na organela celular cloroplasto. A próxima etapa consiste no transporte do *cis*-OPDA ao peroxissomo, no qual ocorre a redução da insaturação do anel ciclopentenona, através da enzima OPDA redutase 3 (OPR3) que sofre ativação pela enzima OPC8:CoA ligase (OPCL1), para então ser submetido a 3 reações de β oxidação pela acil CoA oxidase (ACX), seguida das enzimas proteína multifuncional 19 (MFP) e L-3 cetoacil

tiolase (KAT) que resulta no Jasmonil-CoA que é clivado a JA pela enzima tioesterase (TE). O JA formado sofre então epimerização e permanece em equilíbrio com sua forma diasteroisomérica.[74] Após a formação do produto, O JA é exposto ao citoplasma celular, no qual, com o auxílio da enzima Gretchen Hagen (GH3), ocorre a conversão do ácido (+)-7-iso-jasmônico em JA-Ile pela sua conjugação com o aminoácido Ile. Outros aminoácidos como valina, leucina e fenilalanina raramente são conjugados ao JA.[75]

Várias evidências indicam que 3 diferentes mecanismos estão envolvidos na regulação de sua biossíntese:

- (i) Disponibilidade do substrato, já que plantas transgênicas que superexpressam a enzima AOS não mostraram níveis elevados de JA, mas geraram uma concentração maior desse fitormônio em comparação ao tipo selvagem de *Arabidopsis* quando feridas. Ademais, nos cloroplastos dos tecidos das folhas de *Arabidopsis* totalmente desenvolvida, as enzimas LOX, AOS e AOC ocorrem abundantemente, porém JA e OPDA são formados apenas após estímulos externos, como ferimentos. Este aumento transitório de ácido jasmônico ocorre antes do acúmulo dos genes de transcrição responsáveis pela sua biossíntese;
- (ii) Feedback positivo, pois o tratamento de folhas de *Arabidopsis thaliana* com esse composto ativa a expressão de todos os genes biossintéticos de JA e;
- (iii) Especificidade do tecido, devido às distintas atividades do promotor de AOS, há uma forte evidência na regulação da biossíntese deste fitômonio por especificidade do tecido.[76]

Após o surgimento das feridas nas plantas, o nível de AOS aumenta drasticamente e transientemente, o que indica que a AOS é uma enzima essencial na regulação da biossíntese dessa substância. Além disso, a etapa catalisada por AOC é de especial importância regulatória, devido ao estabelecimento da estrutura enantiomérica final do composto que ocorre naturalmente. A capacidade alterada de sintetizar essa molécula em organismos mutantes parece ser causada, ao menos em partes, por uma falha na regulação por feedback positivo da biossíntese de JA. No caso da COI1, a insensibilidade a esse fitormônio pode levar a uma expressão menor dos genes associados a sua biossíntese, já que todos eles são sensíveis a JA.[76]

3.7 Ácido floribundanóico B, Floribundanato de isoleucina e Floribundano B

A descoberta de novas substâncias químicas que atuem como ativadores da proteólise UPS mediada de repressores de crescimento de plantas é um possível caminho para o desenvolvimento de novos herbicidas, bem como de promotores de crescimento de plantas. Visto que, devido à atuação de fitormônios como JA-Ile no processo de maturação destes organismos, se torna possível regular o crescimento e proliferação de ervas daninhas, favorecendo o plantio de diversas culturas, desse modo auxiliando o agronegócio, mais especificamente o setor econômico da agricultura. Haja vista que, muitos herbicidas tradicionais a base de compostos sintéticos como o glifosato, um dos defensivos agrícolas mais comuns atualmente, não são seletivos, ou seja, eliminam tanto ervas daninhas quanto as culturas de interesse, divergindo de herbicidas à base de fitormônios como auxinas que são seletivos.[4] Ademais, o uso incorreto desses produtos pode gerar contaminação de solos e lençóis freáticos, além de bioacumulação por parte de insetos polinizadores, o que prejudica seu sistema imunológico, e consequentemente provocando queda na população desses indivíduos afetando a colheita em plantações.[77]

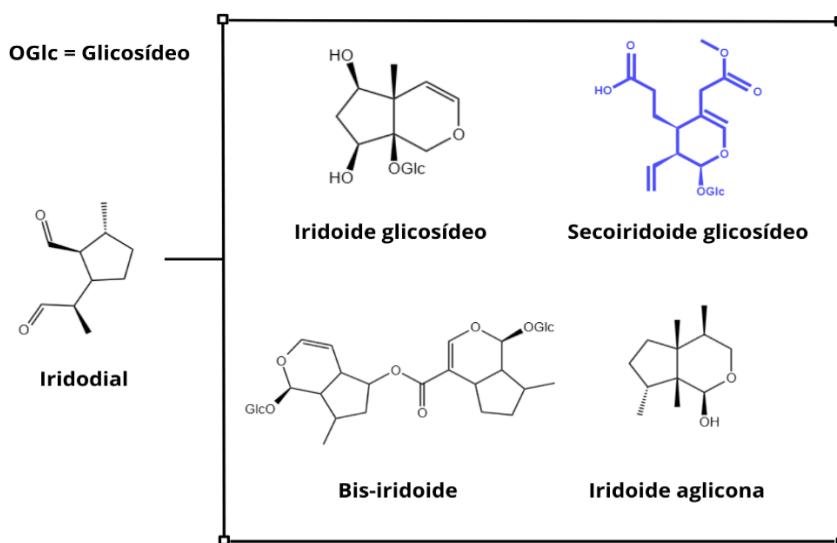
Outro aspecto a ser levado em consideração, é a propriedade biodegradável desses hormônios produzidos naturalmente pelas plantas, por meio da ação de microrganismos presentes no solo. Além do menor potencial bioacumulativo, desses compostos, pois estes são mais suscetíveis a sofrer reações químicas como hidrólise e oxidação no interior destes organismos.[77] Nesta perspectiva, a busca por produtos naturais que tem semelhança estrutural com o JA pode levar ao desenvolvimento de produtos biodegradáveis, com menor impacto de longo prazo ao Ambiente.

O floribundano B (FB), ácido floribundanóico B (AFB) constituem compostos estruturalmente semelhantes ao JA. Elas são moléculas que pertencem a uma classe de compostos denominados iridoides, que compreende monoterpenos amplamente distribuídos em 22 espécies de plantas pertencentes ao filo das angiospermas.[78]

Os iridóides são metabólitos secundários geralmente encontrados na natureza como glicosídeos.[78] Eles são distribuídos de forma ampla no reino

das plantas, especialmente nas *dicotyledonous* da *Scrophulariaceae*, *Pyrolaceae*, *Oleaceae*, *Labiatae*, *Rubiaceae* e *Gentianaceae*, e são subdivididos em 4 grupos distintos: iridoides glicosídeos, secoiridoide glicosídeos, iridoides agliconas e bis-iridoides.[79] De modo geral, a estrutura química dos iridóides possui um anel de 6 membros heterocíclico fundido a um anel ciclopentano (Figura 11).[80]

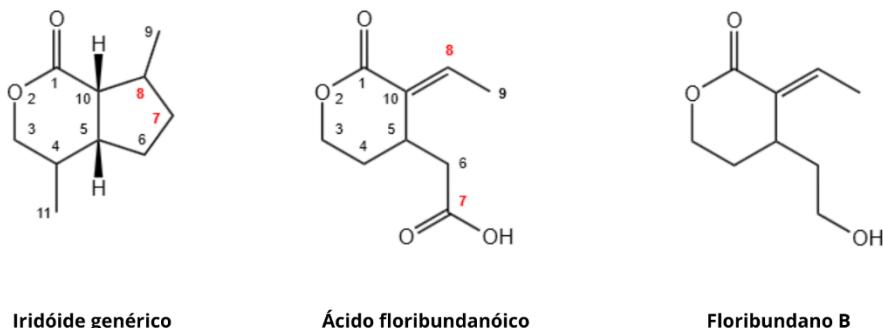
Figura 11 – Estrutura química do Iridodial e de exemplos de substâncias que pertencem a cada uma das quatro classes de iridóides.



Fonte: Autor

Os secoiridóides são compostos que possuem atividades anti-inflamatórias, anti-carcinogênicas e neuroprotetivas, como a oleuropeína um secoiridoide extraído de oliveiras da espécie *Olea europaea*.[81] Apesar de possuir os mesmos 10 átomos de carbono do iridóides, os secoirdóides não possuem a ciclopantanona em sua estrutura, em virtude da ausência da ligação química entre os carbonos 7 e 8, o que permite a observação de porções carboxílicas e olefínicas em suas estruturas, como pode ser observado na Figura 12. [6,69,82] Eles se encontram mais abundantes na forma glicosídica na natureza, mas também se apresentam com agliconas, dímeros (junção de dois secoiridoides) e derivados (quando há a conjugação a grupos funcionais como fenóis e ésteres).[81] De acordo com esta subclassificação, o FB, e o AFB são secoiridoides agliconas.

Figura 12 – Estrutura geral de um iridoide e dos secoiridoides FB e AFB

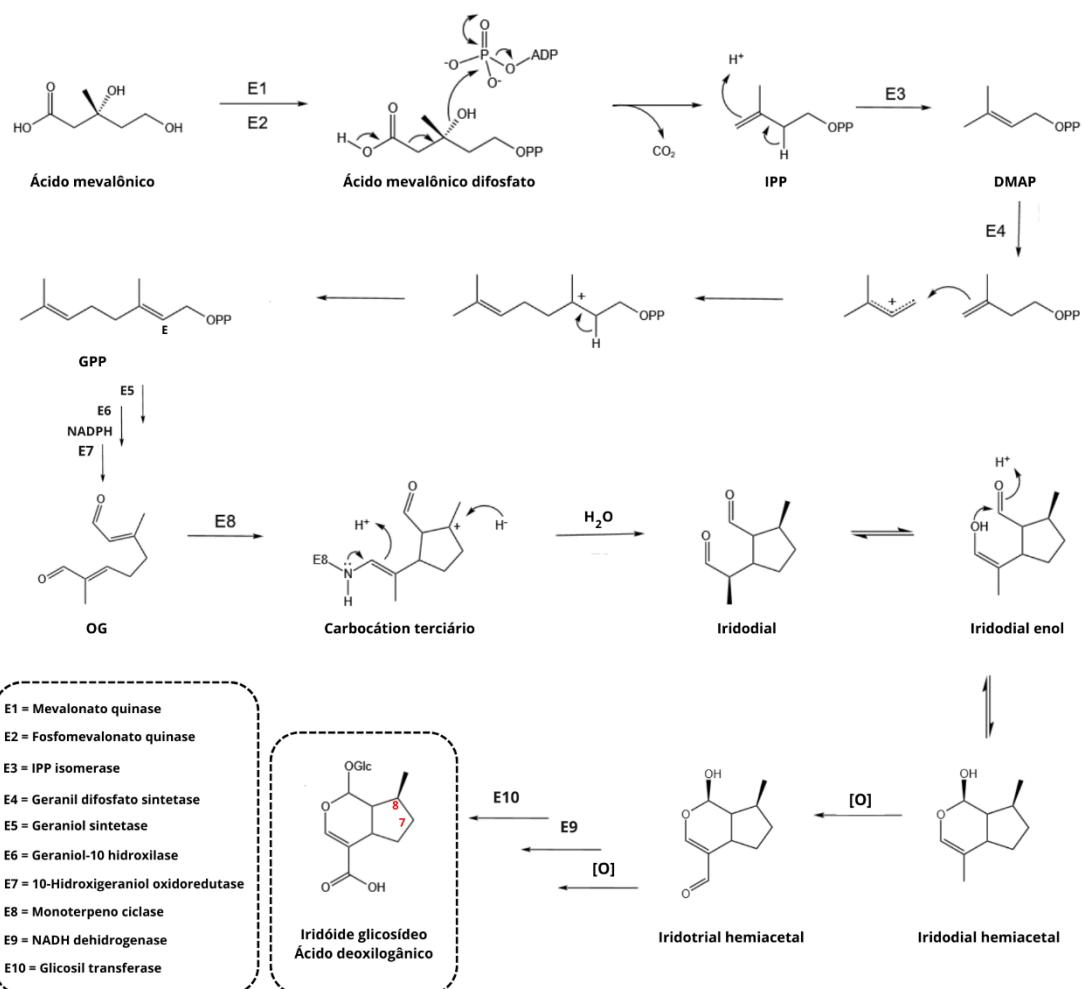


Fonte: Autor

A via biossintética dos secoiridoides está intimamente relacionada com a dos iridoides, pois a abertura do anel ciclopentano na estrutura dessas moléculas geram os secoiridoides. O intermediário chave na produção desses monoterpenóides é o ácido mevalônico, que se converte nos isoprenos isopentenil pirofosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP), através de um conjunto de reações catalisadas por enzimas dependentes de ATP, para dar origem ao geranil pirofosfato (GPP), um precursor comum aos monoterpenos. O GPP, então, sofre outra série de reações enzimáticas com o auxílio do NADPH e difosfato (OPP), se convertendo em álcool que é oxidado ao monoterpeno dialdeído 10-oxogeranial (OG), um dos principais precursores dos iridoides. Em seguida, a enzima monoterpeno ciclase (E8) forma um intermediário imina, que realizará uma reação de ciclização eletrofílica em OG.[86]

Posteriormente, na presença de NADPH, ocorre a inserção de um hidreto ao carbocáton terciário formado anteriormente, seguida de uma reação de hidrólise, e o produto desta série de reações é a molécula iridodial. Esta, por sua vez, sofre tautomerização, gerando o hemiacetal heterocíclico de 6 membros, que é oxidado ao iridotrial hemiacetal. Por fim, através de reações mediadas por enzimas, ocorre a oxidação e glicosilação desta molécula para originar o iridoide glicosídeo ácido deoxilogânicos, o precursor da maioria dos secoiridoides ao se clivar a ligação em C7 e C8.[86] A Figura 13 abaixo indica as reações descritas anteriormente e as enzimas que atuam em cada etapa deste processo.

Figura 13 – Reações da biossíntese do iridóide glicosídeo ácido deoxilogânicos, precursor da maioria dos secoiridoides.



Fonte: SOUZA, A. C. B (2024) - adaptado

O primeiro e único relato de isolamento do floribundano B se deu pela sua extração da casca do tronco da planta *Hymenodictyon floribundum* B. L. Rob Figura 14, comumente denominada *NDambi Yov'olwi* na Angola, um dos locais em que é utilizada como planta medicinal para o tratamento dos sintomas de febre. É distribuída por toda África tropical, desde a Guiné à Etiópia e ao sul até o Zimbábue. Na natureza, se apresenta na forma de arbusto ou árvore que atinge cerca de 6 m, se destacando pelas suas folhas de coloração escarlate no outono.[83] Outro secridoide aglicona extraído dessa planta por Mendonça e colaboradores em 2010 foi o floribundano A.[84] Do ponto de vista sintético, o FB tem apenas uma síntese total relatada para a sua forma racêmica, mas que permitiu a confirmação da estrutura química proposta com base nos dados espectrométricos, por ocasião do seu isolamento.[85]

Figura 14 – Fotografia de um exemplar da *Hymenodictyon floribundum*



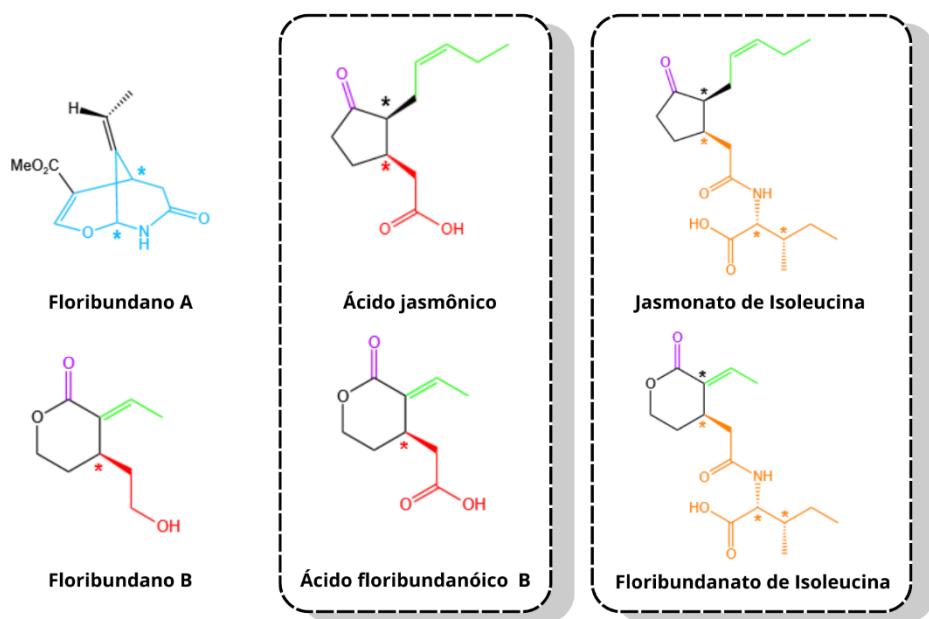
Fonte: Flora of Zimbabwe - species information

Em relação ao ácido floribundanóico B (AFB), há relatos de sua extração do suco de azeitonas provenientes de diferentes regiões da Espanha.[88] Durante sua extração, foram observados 3 compostos cristalinos que foram purificados a partir do ácido elenólico. Até o momento, há apenas um relato da síntese do AFB, que ocorreu por ocasião de esta molécula ser um intermediário na síntese do FB.[85] Os secoiridóides como o AFB são distribuídos por todos os tecidos das oliveiras, contudo as concentrações destas substâncias variam em diferentes partes da planta. Além disso, a dificuldade encontrada em quantificar essas substâncias bioativas se baseia no fato delas sofrerem transformações biossintéticas e químicas em diferentes fases do desenvolvimento, outros fatores que impactam essa quantificação são o local de cultivo e processos e condições utilizados durante a etapa de extração.[86]

Devido à semelhança estrutural do FB Figura 15 com o ácido jasmônico (JA) foi sugerida por Sousa (2021) a hipótese de que este secoiridoide poderia mimetizar as interações supramoleculares que o JA-Ile estabelece com SCF^{COI1} no sistema de marcação das proteínas JAZ para degradação mediada pelo sistema ubiquitina-proteassoma 26S. Ele verificou, por meio de estudos de ancoragem molecular não direcionado *in silico*, que as formas enantioméricas (3R)-FB e (3S)-FB tem afinidade pelo domínio de ligação do JA-Ile na COI1, interagindo com resíduos de aminoácidos que originalmente interagem com JA-

Ile e com energia de ligação razoavelmente próxima à observada para o complexo COI1-JA-Ile.[88] Desse modo, este trabalho de conclusão de curso tem por objetivo realizar um novo estudo de *docking* molecular, agora para avaliar se o AFB, nas suas duas formas enantioméricas, e o conjugado AFB-Ile, em duas formas diastereoisoméricas têm afinidade com a COI1 semelhante à observada para o FB, verificando em quais domínios da COI1 ocorre a interação dessas moléculas com a proteína de interesse, e qual a energia de ligação desses complexos em relação à do complexo COI1-JA-Ile.

Figura 15 – Semelhanças e diferenças entre JA, JA-Ile, FA, FB e seus derivados AFB e AFB-Ile em destaque na segunda e terceira coluna: Carbonilas dos anéis (roxo); cadeia insaturada (verde); cadeia alifática (vermelho); isoleucina (laranja) diferenças entre os anéis do FA e FB (azul) e centros quirais(*)



Fonte: autor

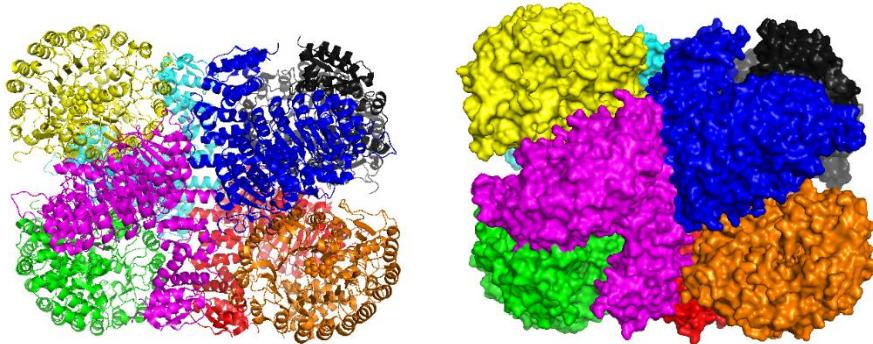
4. Metodologia

4.1 Preparação dos arquivos de entrada para a realização dos experimentos de docking molecular.

A primeira etapa deste trabalho consistiu no download do arquivo 3OGL.pdb no website do banco de dados *Protein Data Bank*(PDB). Este arquivo contém as coordenadas cristalográficas do retículo cristalino que possui 8 unidades do complexo ASK1-COI1-JA-Ile-JAZ1, que tem o complexo proteico ASK1-COI1 coordenado ao JA-Ile e ao JAZ1, este último sendo um peptídeo com estrutura primária coincidente com a da região *degron* conservada das proteínas JAZ, Figura 16.

Com o auxílio do software PyMOL, foi possível identificar cada uma das 8 unidades ASK1-COI1-JA-Ile-JAZ1, selecionar uma delas e apagar as demais. Em seguida, foram removidas as moléculas de águas da estrutura cristalográfica que estão naturalmente incorporadas no complexo proteico, e foram incluídos os hidrogênios polares nos resíduos de aminoácido, pois dessa forma nenhum tipo de interação de hidrogênio intermolecular entre o ligante e o receptor seriam desprezadas. Por fim, a carga formal da estrutura proteica foi incluída e o arquivo que contém as coordenadas atômicas de uma unidade do complexo protéico ASK1-COI1-JA-Ile-JAZ1, que para fins de simplificação será denominado daqui em diante de SCF^{COI1}, e foi salvo com o nome COI1-JA-Ile.pdb. Em seguida, ainda com o auxílio do PyMOL, foi possível remover as coordenadas do ligante JA-Ile e salvar o arquivo COI1.pdb, que contém apenas as coordenadas do complexo ASK1-COI1-JAZ1. A remoção das moléculas de água, a adição dos hidrogênios polares e da carga formal é uma etapa indispensável para o funcionamento correto do *software e algoritmo* que irão realizar o *redocking e docking molecular* que serão abordados na próxima etapa. Ambos os dois arquivos .pdb foram convertidos em arquivos com extensão “*Protein Data Bank Partial charge (.pdbqt)*” por meio do software AutoDock Tools.

Figura 16 – Estrutura quaternária e topologia superficial do retículo cristalográfico que contém as 8 unidades de ASK1-COI1-JA-Ile-JAZ1 visualizada a partir do arquivo 3OGL.pdb no software PyMOL.

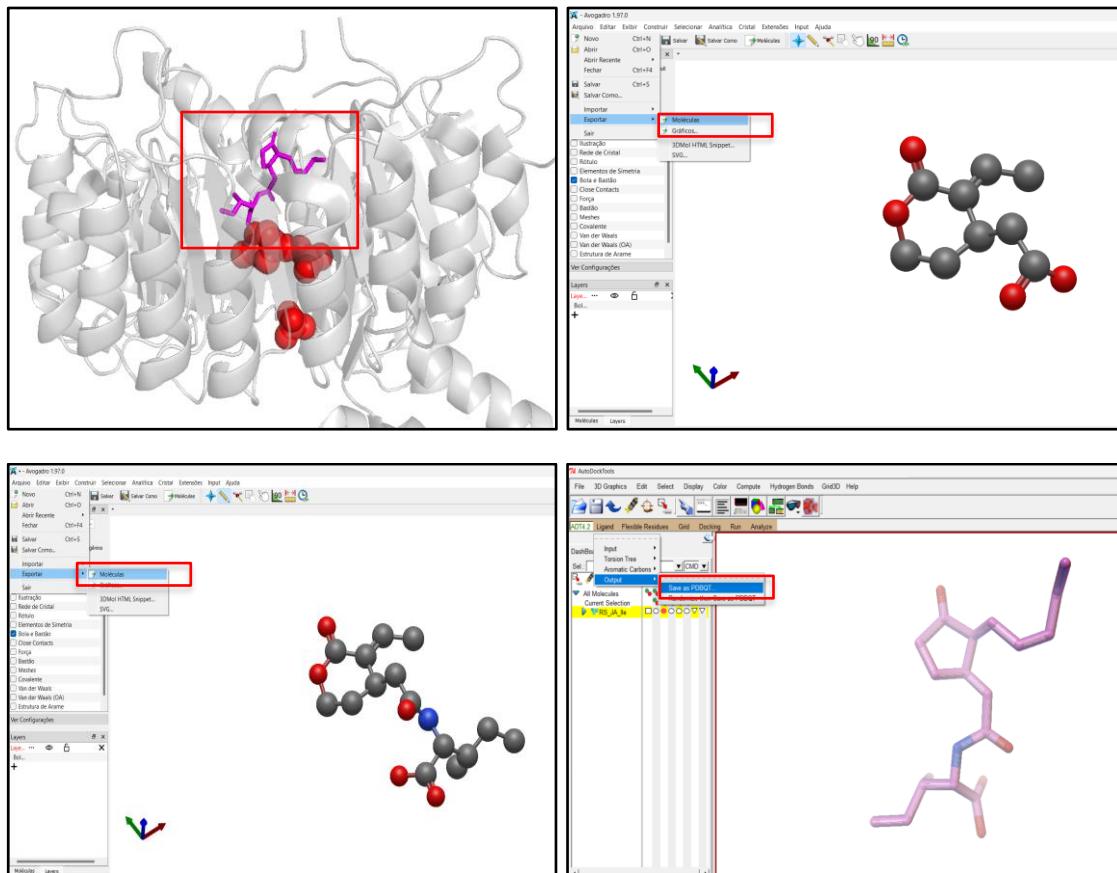


Fonte: Protein Data Bank (adaptado)

O próximo passo consistiu na preparação de um arquivo .pdbqt contendo as coordenadas atômicas do ligante JA-Ile, por meio do software PyMOL. Onde o ligante foi separado de uma das unidades de SCF^{COI1}, vale destacar que a estereoquímica do JA-Ile observado na estrutura cristalográfica do complexo SCF^{COI1} foi a da sua forma bioativa (3R,7S). Em seguida, foram preparadas as estruturas moleculares dos ligantes AFB e AFB-Ile no avogadro Figura 17, que foram salvas no formato .pdb tal qual RS-JA-Ile.pdb. Esses arquivos foram então convertidos em .pdbqt, assim como o arquivo COI1.pdb com o auxílio do software *AutoDock Tools*.

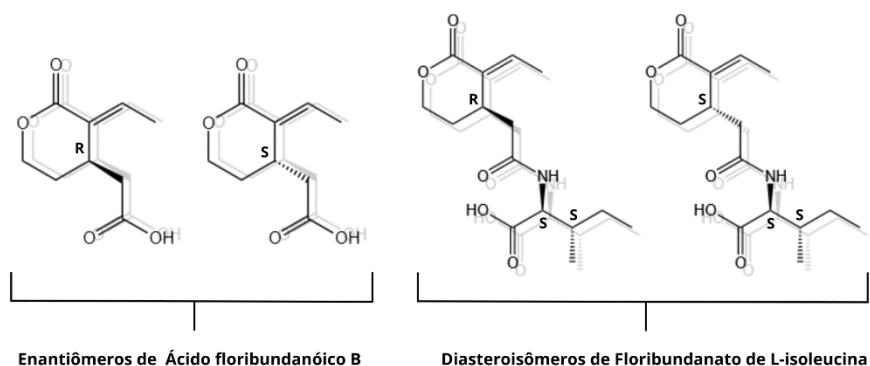
Os arquivos .pdbtq dos ligantes enantioméricos (3S)-AFB e (3R)-AFB, e dos ligantes diastereoisoméricos do Floribundanato de L-isoleucina (3R)-AFB-L-Ile e (3S)-AFB-L-Ile foram preparados de forma semelhante à descrita para o ligante RS-JA-Ile.pdbqt, com o auxílio dos softwares *Avogadro* e *AutoDock Tools*, Figura 18.

Figura 17 – Preparação dos arquivos RS-JA-Ile.pdb através do PyMOL e AFB.pdb e AFB-Ile.pdb pelo avogrado e conversão para o formato .pdbqt com o AutoDock Tools.



Fonte: Avogadro e Autodock Tools

Figura 18 – Estruturas enantioméricas de AFB e formas diastereoisoméricas de AFB-Ile.



Fonte: Autor

4.2 Preparação do arquivo config.txt .

Para a realização do *docking* molecular, além dos arquivos .pdbqt com as coordenadas atômicas do complexo ASK1-COI1-JAZ1 e com as coordenadas dos ligantes, também foi necessária a preparação do arquivo config.txt, que contém parâmetros de operação necessários para que o *Autodock Vina* realize adequadamente os cálculos de *docking*. Para validar esses parâmetros, foram realizados cálculos de *docking* utilizando os arquivos COI1.pdbqt (receptor) e RS-JA-Ile.pdbqt (ligante) em busca de se reproduzir a pose do JA-Ile no seu sítio de ligação na COI1, procedimento denominado de *redocking*.

Do ponto de vista prático, o primeiro passo foi a criação de uma pasta de trabalho no computador que continha todos os arquivos necessários para que o *Autodock Vina* realize adequadamente os cálculos de *redocking* molecular: config.txt, COI1.pdbqt, RS-JA-Ile.pdbqt, e o executável do programa *Autodock Vina*.

O arquivo config.txt contém a definição do arquivo com as informações do ligante, do arquivo com as informações do receptor, e dos parâmetros: *grid box* (tamanho da *grid box* e centro da *grid box*), *Energy range*, *exhaustiveness*, *num_modes*. A definição desses valores possibilita que o algoritmo do programa busque por soluções com a menor energia interação entre ligante e receptor e consequentemente maior afinidade. Ou seja, permite definir a quantidade de conformações e limite energético desejados, além do tempo consumido durante esse processo. A seguir, são apresentadas e discutidos em mais detalhes as definições de cada um destes parâmetros:

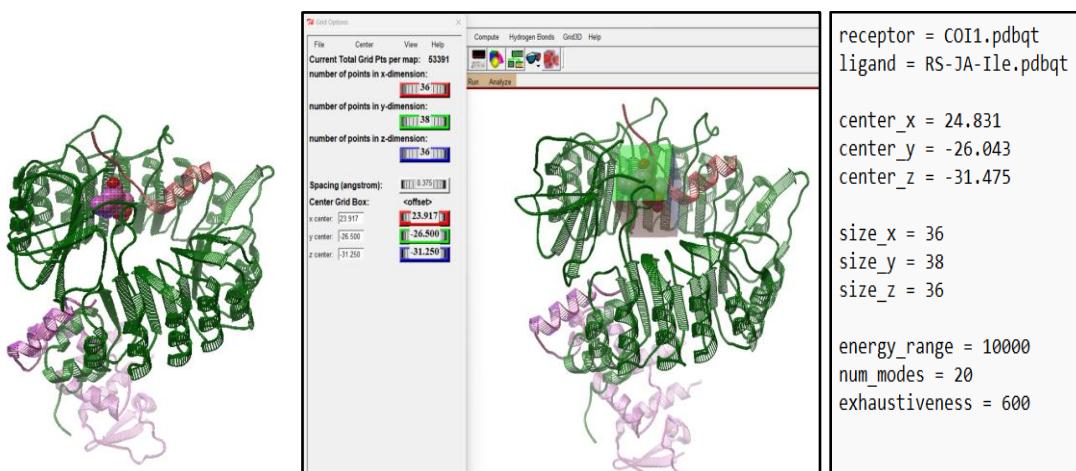
- *Energy Range*: Trata-se da faixa de trabalho energético adotada pelo programa para as conformações obtidas, ou seja, é o valor máximo de energia de ligação que o algoritmo irá buscar. Os valores mais comuns para a seleção de possíveis candidatos a droga que são atualmente aceitos em *drug design* são valores menores que -9,0 kcal/mol (em alguns casos menores que -12,0 kcal/mol). Entretanto, ainda não há um consenso em quais valores de *energy range* devem ser definidos para avaliação de compostos biologicamente ativos.[90] Ressalta-se que dependendo do valor definido o resultado encontrado pode estar em um intervalo ainda menor de energia.

- *Exhaustiveness*: Esse parâmetro irá definir o tempo que o algoritmo busca pelo resultado ou conformação (pose) de menor energia. De modo que quanto maior a complexidade do cálculo a ser realizado, maior será o tempo gasto. Valores elevados de *Exhaustiveness* tem uma maior chance de encontrar o menor valor de energia de ligação, contudo isso requer um custo computacional maior. A complexidade do cálculo está diretamente relacionada com a estrutura molecular fatores como graus de liberdade, tamanho e flexibilidade molecular interferem este processo.
- *Num_modes*: O número de modos (*num_modes*) é o parâmetro no qual o algoritmo busca modos de ligação do ligante em cada conformação com o receptor proteico. De forma similar a *Exhaustiveness*, a inserção de maiores valores indica uma probabilidade aumentada de encontrar uma pose de menor energia global no sistema, requerendo um custo computacional maior, porém com maior precisão. Vale ressaltar que, um modo de ligação não necessariamente será o de menor energia a depender dos valores definidos neste e em outros parâmetros como *Energy range* e *Exhaustiveness*.
- *Grid box*: É a região da ASK1-COI1 na qual o algoritmo irá realizar a busca por modos de ligação entre este receptor e o ligante JA-Ile, que simulam aquele modo observado na estrutura cristalográfica ASK1-COI1-JA-Ile-JAZ1. A definição do tamanho da caixa em Angstrom (Å), e das coordenadas que centralizam a *grid box* foi feita utilizando o programa *Autodock Tools*. Quanto maior for a *grid box* mais tempo é necessário para o programa fornecer os resultados de *docking* e *redocking molecular*, logo esse parâmetro reflete diretamente na *exhaustiveness* do sistema. Em contraste, espaços menores de *grid box* facilitam o algoritmo de *docking* explorar a região de interesse na proteína, contudo ele não será capaz de explorar posições do ligante e cadeias laterais flexíveis fora deste espaço de busca.[91]

Os parâmetros de coordenadas da *grid box* foram definidos no arquivo config.txt Figura 12, além da seleção dos arquivos receptor e ligante .pdbqt, o correceptor COI1 e RS-JA-Ile e os valores dos parâmetros supracitados acima. Vale destacar que, nesta etapa de *redocking*, foram adotadas 2 regiões para a *gridbox*, a primeira continha apenas a região do sítio de ligação de JA-Ile com a

COI1 e o *degron* JAZ1, Figura 19, e a segunda compreendeu todo complexo proteico SCF^{COI1}. Isso foi feito desta forma para verificar se o JA-Ile tem afinidade por outras regiões do complexo ASK1-COI1-JAZ1 que não sejam o sítio nativo deste ligante evidenciado na estrutura cristalográfica registrada no arquivo 3OGL.pdb. Ademais, normalmente os valores inseridos em num_modes variam entre 9 e 20 poses, e com o intuito de se obter um resultado energético e conformacional mais preciso e próximo da forma nativa de JA-Ile no complexo SCF^{COI1}, esse parâmetro foi fixado em 20. Os valores inseridos nos outros parâmetros como *energy range* e *exhaustiveness* não foram tão elevados, devido às limitações do *hardware* utilizados.

Figura 19 – JA-Ile no sítio de ligação, *Grid box* e arquivo config.txt contendo os parâmetros que serão utilizados no *redocking*

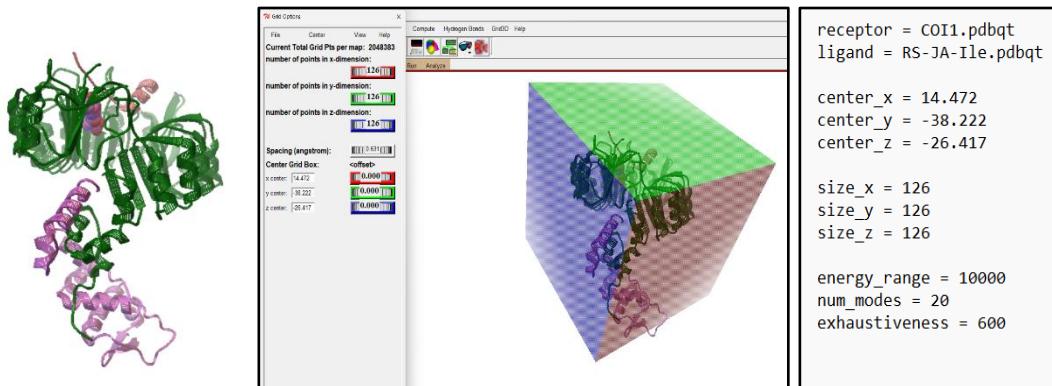


Fonte: Autor

É importante destacar que estudos de *docking* geralmente envolvem uma região específica da proteína, onde já se sabe previamente ser o sítio ativo da proteína com o ligante. No caso deste trabalho, cujo objetivo foi avaliar se os ligantes baseados nos secoiridoides seriam capazes de mimetizar o modo de ligação de JA-Ile na estrutura cristalográfica do complexo SCF^{COI1}, optamos por também englobar todo o receptor na *Grid Box*, procedimento de *docking* é conhecido como *blinding docking* ou ancoragem às cegas.

Outro aspecto que foi ser levado em consideração foi o parâmetro de *spacing* que é definido automaticamente através do tamanho da gridbox pelo algoritmo do Autodock Vina. Os parâmetros inseridos na gridbox contemplando todo o complexo proteico (*blinding redocking*) estão indicados na Figura 20.

Figura 20 - Grid box contemplando todo o complexo SCF^{COI1} e arquivo config.txt contendo os parâmetros que serão utilizados no *redocking*



Fonte: Autor

4.3 Redocking e docking molecular

Para execução do redocking de JA-Ile na região do sítio de ligação e *blinding redocking* em todo complexo protéico foi utilizado o *prompt* de comando do Windows (cmd), que foi ser acessado através do diretório que contêm a pasta *redocking JA-Ile*. Ao acessar a pasta o algoritmo do *Autodock Vina* foi executado, pelo comando abaixo indicado na Figura 21. Em seguida, os resultados de energia de ligação em kcal/mol e *Root Mean Square Deviation* (RMSD) foram obtidos e organizados em uma tabela, gerando um arquivo denominado output.pdbqt, que foi separado ainda no “cmd” utilizando o comando *vina_split* que gerou arquivos individuais para cada uma das 20 soluções de *docking* contidas output.pdbqt.

Com o intuito de se obter melhores sobreposições do fitôrmonio na estrutura cristalográfica, foram adotadas duas metodologias no *docking* direcionado ao sítio de ligação. Uma na qual tratou o ligante completamente rígido, enquanto a outra considerou a flexibilidade em torno das ligações. Os experimentos de *docking* com cada um dos ligantes baseados no AFB e no AFB-Ile foi realizado de forma semelhante à descrita para o *redocking*. A seguir é apresentado um resumo da metodologia realizada no formato de um fluxograma, Figura 22, contendo as etapas adotadas neste trabalho. A etapa de realização de ensaios biológicos em vermelho não foi abordada neste trabalho, mas está sendo apresentada como perspectiva para a continuidade deste projeto.

Figura 21 – Execução do redocking e resultados obtidos no sítio de ligação (A) e *blinding redocking* (B) pelo algoritmo do *AutoDock Vina*, através do *prompt* de comando do *Windows* e separação dos resultados com o comando *vina_split*.

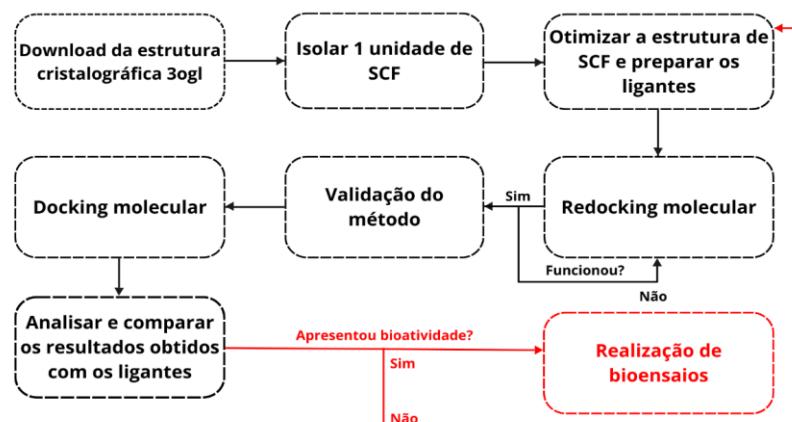
mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode rmsd l.b.	rmsd u.b.
A 1	-8.8	0.000	0.000
2	-8.8	1.026	1.244
3	-8.7	1.231	1.643
4	-8.6	1.164	1.350
5	-8.5	1.643	2.193
6	-8.3	1.561	2.166
7	-8.3	1.650	7.673
8	-8.2	1.687	2.109
9	-8.0	1.216	3.502
10	-8.0	1.456	2.204
11	-7.8	1.756	7.310
12	-7.4	1.899	7.444
13	-7.3	2.747	6.591
14	-7.2	1.722	7.139
15	-7.0	14.370	16.215
16	-6.9	14.128	16.144
17	-6.9	14.295	16.268
18	-6.8	14.585	16.049
19	-6.8	1.645	3.812
20	-6.7	14.403	17.484

mode	affinity (kcal/mol)	dist from best mode rmsd l.b.	rmsd u.b.
B 1	-8.7	0.000	0.000
2	-7.7	1.678	2.575
3	-7.3	1.777	2.229
4	-6.9	14.293	16.125
5	-6.8	1.727	2.162
6	-6.8	14.550	15.994
7	-6.8	14.922	16.411
8	-6.8	14.148	16.146
9	-6.7	14.716	16.451
10	-6.7	26.029	28.621
11	-6.6	13.774	15.734
12	-6.5	14.355	16.087
13	-6.4	14.137	16.136
14	-6.4	14.820	16.770
15	-6.4	14.662	16.187
16	-6.4	15.234	18.167
17	-6.4	25.499	28.530
18	-6.4	14.199	15.929
19	-6.4	14.563	16.222
20	-6.3	14.778	16.169

```
C:\Users\guilh\Desktop\TCC\Redocking JA-Ile (verdadeiro)>vina_split --input output.pdbqt
```

Fonte: Autor

Figura 22 – Fluxograma com as etapas adotadas neste trabalho.



Fonte: Autor

5 Resultados e discussão

5.1 Redocking molecular do complexo ASK1-COI1-JA-Ile-JAZ1

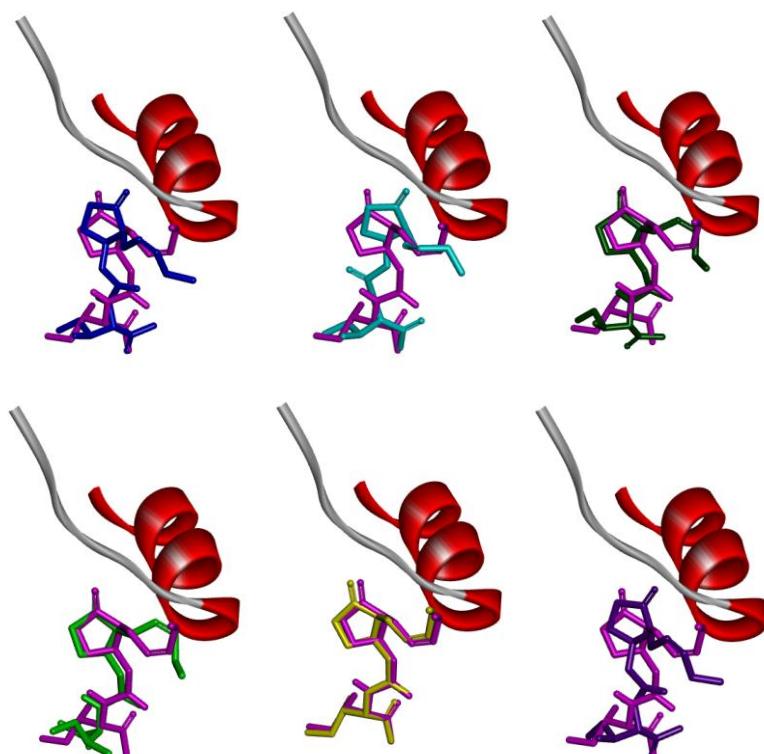
Os resultados obtidos no redocking do complexo ASK1-COI1-JA-Ile-JAZ1 direcionado no sítio de ligação do JA-Ile e realizado com a flexibilidade estrutural do ligante JA-Ile revelaram as duas poses mais estáveis com energias de ligação de -8,8 kcal/mol. Todavia, as poses 4^a e 6^a menor energia apresentaram uma melhor sobreposição da estrutura do ligante obtido pelo *redocking* com a estrutura do ligante reportado cristograficamente. Em contrapartida, o *redocking* realizado com a estrutura do ligante rígido, que imita a conformação do ligante reportado cristograficamente teve como resultado mais estável o ligante em uma pose com sobreposição quase completa com aquele observada cristograficamente e com energia de interação igual a -11,2 kcal/mol. Logo, é possível afirmar que o *redocking* realizado foi bem-sucedido, haja vista que estas as poses encontradas se sobrepuiseram muito bem ao ligante cristografado e coordenado ao degron JAZ1.

Já os resultados obtidos pelo *blinding redocking* não indicaram uma boa sobreposição com o ligante, apesar das poses encontradas se encontrarem no mesmo local da estrutura nativa. A Figura 23 abaixo indica as sobreposições das poses supracitadas com JA-Ile em sua estrutura cristalográfica, considerando a flexibilidade e rigidez na estrutura.

É possível observar, nas pose 1 e 2 do *redocking* flexível direcionado, que não há uma boa sobreposição com o anel ciclopentanona do ligante nativo, porém na porção do resíduo de isoleucina verificou-se uma melhor equivalência em comparação as poses 4 e 6. As principais divergência entre estas duas poses se encontram no grupo carbonila da amida na pose 1 que está mais próximo a estrutura nativa, enquanto na pose 2 este grupo está localizado em uma direção oposta. Em relação às poses 4 e 6, é possível visualizar uma maior sobreposição entre os anéis das estruturas, além das cadeias insaturada e alifáticas ligadas ao carbono alfa e beta, contudo a posição dos grupos metilas nas estruturas estão invertidas, além de não haver uma boa proximidade com os grupos carboxílicos do aminoácido. Mas a orientação dessa cadeia insaturada

permanece, ou seja, mantendo intacto o seu posicionamento na cavidade hidrofóbica inicialmente observada para este grupo no ligante nativo na estrutura cristalográfica, dessa forma mantendo a interação com os resíduos de aminoácidos observados estrutura cristalográfica.

Figura 23 – Comparação dos resultados obtidos com a estrutura nativa de JA-Ile no complexo proteico SCF^{COI1} e *redocking* no sítio de ligação. Degron (vermelho) e estrutura nativa de JA-Ile (rosa). *Redocking* flexível - pose 1 (azul), pose 2 (azul claro), pose 4 (verde) e pose 6 (verde claro). *Redocking* rígido – pose 1 (amarelo) e blinding *redocking* pose 1 (roxo).

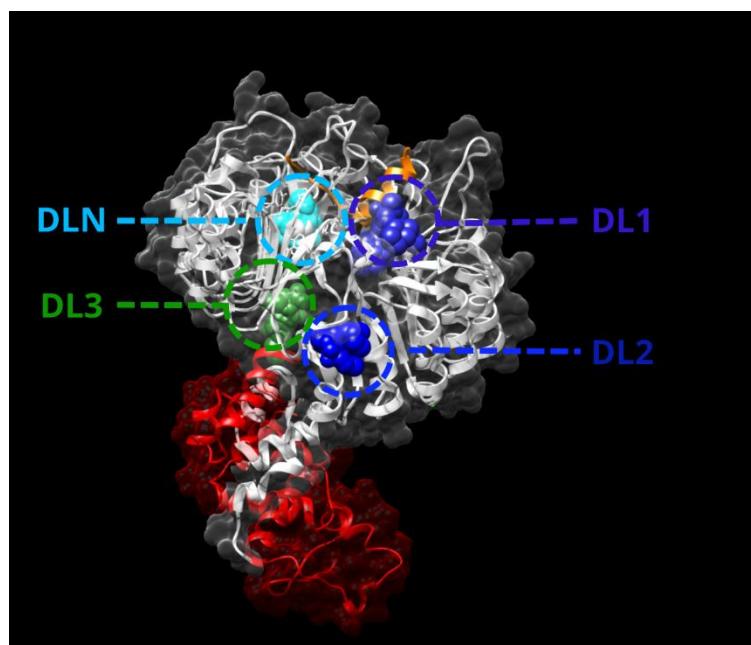


Fonte: Autor

Ao realizar o *blinding redocking* com a gridbox contendo todo o complexo SCF^{COI1} foram verificados 4 domínios de ligação do fitormônio JA-Ile. O primeiro denominado domínio de ligação nativo (DLN), onde o ligante está coordenado na estrutura cristalográfica, posicionado no loop da alfa hélice do *degron*. As outras regiões denominadas domínio de ligação 1 e 2 (DL1) e (DL2), em que o ligante é localizado na região próxima ao centro da alfa hélice de JAZ1 e na porção lateral do correceptor COI1 entre as folhas beta e hélices alfa respectivamente. Vale destacar, que essas regiões já foram identificadas no

trabalho realizado por Souza.[88] Contudo, foi descoberta uma nova e quarta região em que posiciona JA-Ile na porção inferior entre COI1 e ASK1 que será denominado domínio de ligação 3 (DL3), os resultados do *blinding redocking* com as regiões de interação identificadas estão indicadas na Figura 24.

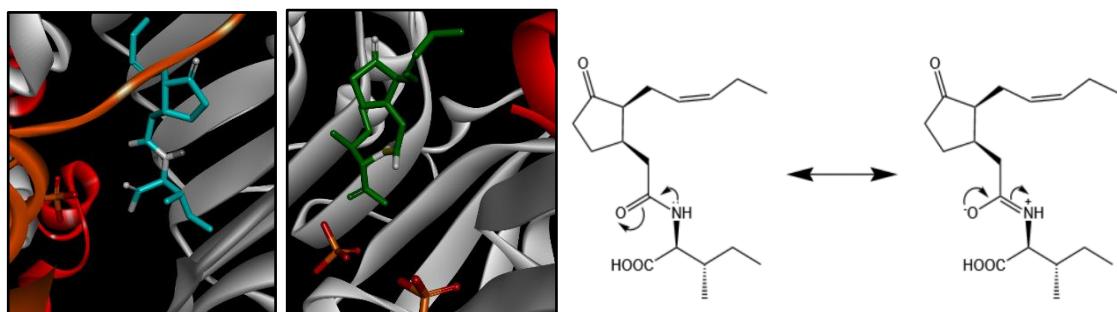
Figura 24 - Topologia superficial do complexo SCF^{COI1} e domínios de ligação identificados através do *blinding redocking*. O degron JAZ1 (laranja), ASK1 (vermelho), domínio de ligação nativo DLN (azul claro), domínio de ligação 1 DL1 (roxo), domínio de ligação 2 (azul) e domínio de ligação 3 (verde).



Fonte: Autor

Este domínio promove a rotação em torno da ligação peptídica que une JA e Ile. Contudo, a rotação nesta ligação não é favorável, pois ela possui um caráter de ligação dupla, com limitada liberdade conformacional. Tal propriedade está relacionada à estrutura de ressonância do grupo amida, portanto, a interação em torno desta região pode não ser favorável. A Figura 25 abaixo indica a conformação de JA-Ile em seu DLN, em que não há rotação em torno da ligação σ, enquanto observa-se esse fenômeno no ligante posicionado em DL3.

Figura 25 – JA-Ile nos domínios de ligação nativo DLN, domínio de ligação 3 e estrutura de ressonância de JA-Ile.



Fonte: Autor

5.2 Docking molecular entre as formas enantioméricas de ácido floribundanóico B (*3R*)-AFB e (*3S*)-AFB

Essa etapa consistiu na análise dos resultados obtidos entre as formas enantioméricas (*3R*)-AFB e (*3S*)-AFB com o complexo proteico SCF^{COI1}. Esta análise buscou verificar, através do *blinding docking*, por quais regiões do complexo ASK1-COI1-JAZ1 estes ligantes têm mais afinidade. Também foi realizado o docking direcionado no domínio de ligação de JA-Ile no complexo ASK1-COI1-JAZ1, de forma a se buscar uma melhor compreensão das interações desses ligantes nesta região especificamente.

Os resultados obtidos nesta etapa foram comparados com os obtidos para o redocking do complexo ASK1-COI1-JA-Ile-JAZ1 e com o docking entre o (*3R,7S*)-JA, pois a estrutura desse composto é estruturalmente mais semelhante à dos enantiômeros do AFB, do que à do JA-Ile. Outro aspecto que foi levado em consideração, foi que os parâmetros dos arquivos config.txt destes experimentos foram baseados naqueles utilizados para o *blinding redocking* e para o *redocking* no sítio de ligação de JA-Ile. A seguir, na tabela 1 é apresentado os resultados do docking no sítio de ligação para os enantiômeros do AFB e para o (*3R,7S*)-JA, permitindo-se a flexibilidade estrutural destas estruturas no cálculo. Os valores de afinidade (kcal/mol) e RMSD que indica o quão distante as poses estão da melhor pose encontrada.

Tabela 1 – Resultados obtidos para os estereoisômeros de AFB e JA no *docking* direcionado ao sítio de ligação.

(3S)-AFB				(3R)-AFB				(3R,7S)-JÁ			
Poses	Afinidade (kcal/mol)	RMSD I.b	RMSD u.b	Poses	Afinidade (kcal/mol)	RMSD I.b	RMSD u.b	Poses	Afinidade (kcal/mol)	RMSD I.b	RMSD u.b
1	-6.9	0.000	0.000	1	-7.1	0.000	0.000	1	-7.6	0.000	0.000
2	-6.7	1.314	4.318	2	-6.7	2.342	4.101	2	-7.2	0.983	1.394
3	-6.7	2.409	5.036	3	-6.4	2.051	3.562	3	-7.1	1.357	3.853
4	-6.4	1.940	3.449	4	-6.3	12.348	13.554	4	-7.0	2.822	5.323
5	-6.4	1.440	4.048	5	-6.3	12.154	14.097	5	-7.0	2.152	5.191
6	-6.4	1.458	4.311	6	-6.2	1.594	4.858	6	-6.9	2.695	4.934
7	-6.4	12.403	13.093	7	-6.2	1.111	5.017	7	-6.7	2.709	5.238
8	-6.3	12.529	13.958	8	-6.1	12.456	13.912	8	-6.7	2.287	5.236
9	-6.2	12.315	13.364	9	-6.0	12.451	14.202	9	-6.7	2.414	4.605
10	-6.2	2.235	3.286	10	-6.0	12.155	13.862	10	-6.4	13.104	14.538
11	-6.1	12.651	13.928	11	-5.9	12.414	14.164	11	-6.3	13.140	14.798
12	-6.1	12.452	13.708	12	-5.9	12.274	13.751	12	-6.2	1.825	4.355
13	-6.0	12.893	14.082	13	-5.9	12.160	13.362	13	-6.1	13.574	15.225
14	-6.0	1.827	3.880	14	-5.9	12.875	14.662	14	-6.1	13.343	15.133
15	-6.0	12.289	13.780	15	-5.9	1.237	4.397	15	-6.0	13.939	15.291
16	-6.0	12.713	14.110	16	-5.8	12.334	13.191	16	-6.0	12.920	14.494
17	-5.9	12.538	13.631	17	-5.8	12.178	13.641	17	-6.0	1.997	4.050
18	-5.9	12.005	12.970	18	-5.8	2.303	4.690	18	-5.9	13.315	14.837
19	-5.7	12.957	14.401	19	-5.8	12.174	13.656	19	-5.8	12.948	14.581
20	-5.7	12.681	13.803	20	-5.7	12.371	14.093	-	-	-	-

Fonte: Autor

Pode-se verificar que as formas enantioméricas do AFB apresentam energia de ligação muito semelhante, diferindo em apenas 0,2 kcal/mol, sendo o (3R)-AFB o mais estável. O que faz sentido, pois esta é a estereoquímica na qual o carbono 3 de JA-Ile é bioativo. Ademais, foi observado que ambas as estruturas interagem com os mesmos resíduos de aminoácido no complexo SCF^{COI1}, tal que foram identificadas ligações de hidrogênio do carboxilato de AFB com o grupo amina de Ala204 de uma distância de 2,1 Å, e outra com o grupo carbonílico de Ala204 do *degron* em uma distância de 2,0 Å, de modo que estas interações também são observadas na estrutura cristalográfica do complexo ASK1-COI1-JA-Ile-JAZ1. Além disso, foram identificadas outras ligações de

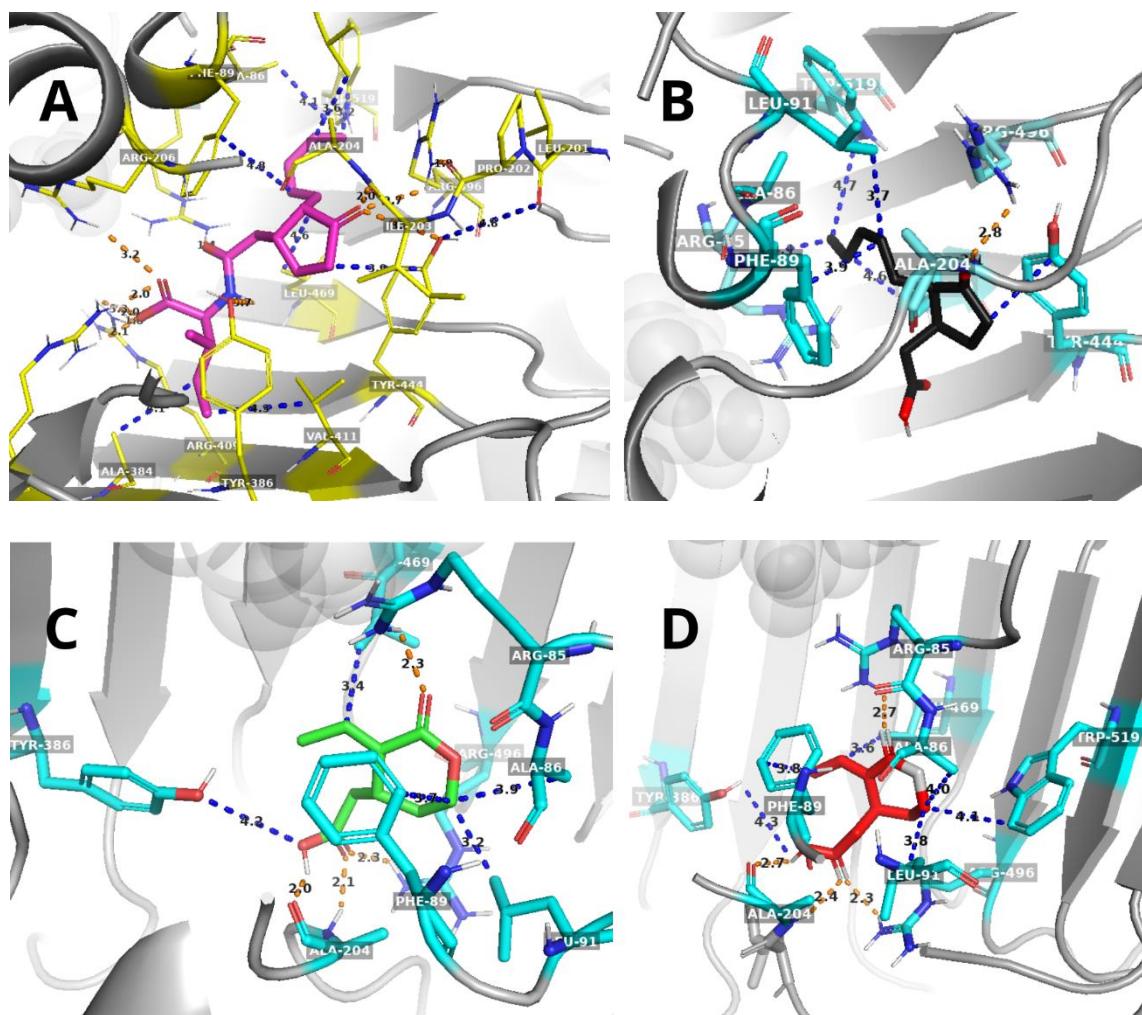
hidrogênio com outros resíduos de aminoácido, como a Arg85, em uma distância de 2,3 Å, e a Arg496, com uma distância de 2,3 Å, ambas são parte do correceptor COI1, fundamentais para a interação hormônio dependente de COI1-JAZ1. Em relação ao isômero (3S)-AFB, foram observadas as mesmas interações com os resíduos de aminoácidos identificadas em seu enantiômero. As principais diferenças estão nas distâncias das ligações de hidrogênio e nas forças de Van der Waals entre o ligante e o complexo SCF^{COI1}. Por exemplo, a interação entre o carboxilato de (3S)-AFB e a carbonila de Ala204 apresenta uma distância de 2,7 Å, enquanto para esta mesma interação para (3R)-AFB, essa distância é de 2,0 Å.

Ao comparar esses resultados com a forma (3R,7S)-JA, verificou-se que as formas enantioméricas de AFB possuem menor afinidade de ligação ao COI1 em relação ao (3R,7S)-JA. Essa discrepância pode ser explicada pela cadeia lateral insaturada do monoterpenoide, que é mais curta e menos hidrofóbica em comparação à da oxilipina. Essa característica dificulta sua coordenação na cavidade hidrofóbica e reduz interações importantes, como, por exemplo, com as com os resíduos de aminoácidos Trp519 e Ala86. Um fator que reforça essa hipótese é a preferência do COI1 por conjugados de jasmonato com aminoácidos de tamanho moderado e propriedades hidrofóbicas em suas cadeias laterais.[53]

Adicionalmente, ao comparar a forma não conjugada de JA à forma conjugada à isoleucina (Ile), pode-se confirmar o que é relatado pela literatura, a conjugação com Ile promove maior afinidade desse jasmonato com a COI1. Isso se deve à ausência da amida de JA-Ile, grupo que é fundamental para a formação da ligação de hidrogênio com o resíduo de COI1 Tyr386, que é uma interação chave para estabilização do complexo ligante e correceptor. Outro aspecto relevante, é a formação de ligações de hidrogênio do grupo carboxílico de Ile com três resíduos básicos de COI1: Arg85, Arg348 e Arg409. Esses resíduos constituem o chão carregado do bolso de ligação, que é uma região onde o ligante se encontra ligado, ou seja, o grupo carboxilato com carga negativa e interagindo com os grupos iminas protonados com carga positiva de Arg348 e Arg409.[53] Outra interação essencial é o empacotamento hidrofóbico do anel ciclopentanona entre os resíduos Phe89 e Tyr444. Dessa forma, o JA e o

secoiridoide AFB não conseguem estabelecer todas essas interações estabilizadoras, afetando sua atividade no UPS, essas características indicam a preferência do correceptor por JA-Ile ao invés de AFB e JA. As interações descritas anteriormente estão representadas na Figura 26 abaixo.

Figura 26 – Interações dos ligantes no sítio de ligação de SCF^{COI1}: interações de hidrogênio (laranja), interações de Van Der Waals (azul), resíduos de aminoácido semelhantes (azul claro). A – interações de JA-Ile (rosa) em SCF^{COI1}, B – Interações de JA em SCF^{COI1}, C – interações de (3R)-AFB (verde) em SCF^{COI1} e D – interações de (3S)-AFB (vermelho) em SCF^{COI1}.

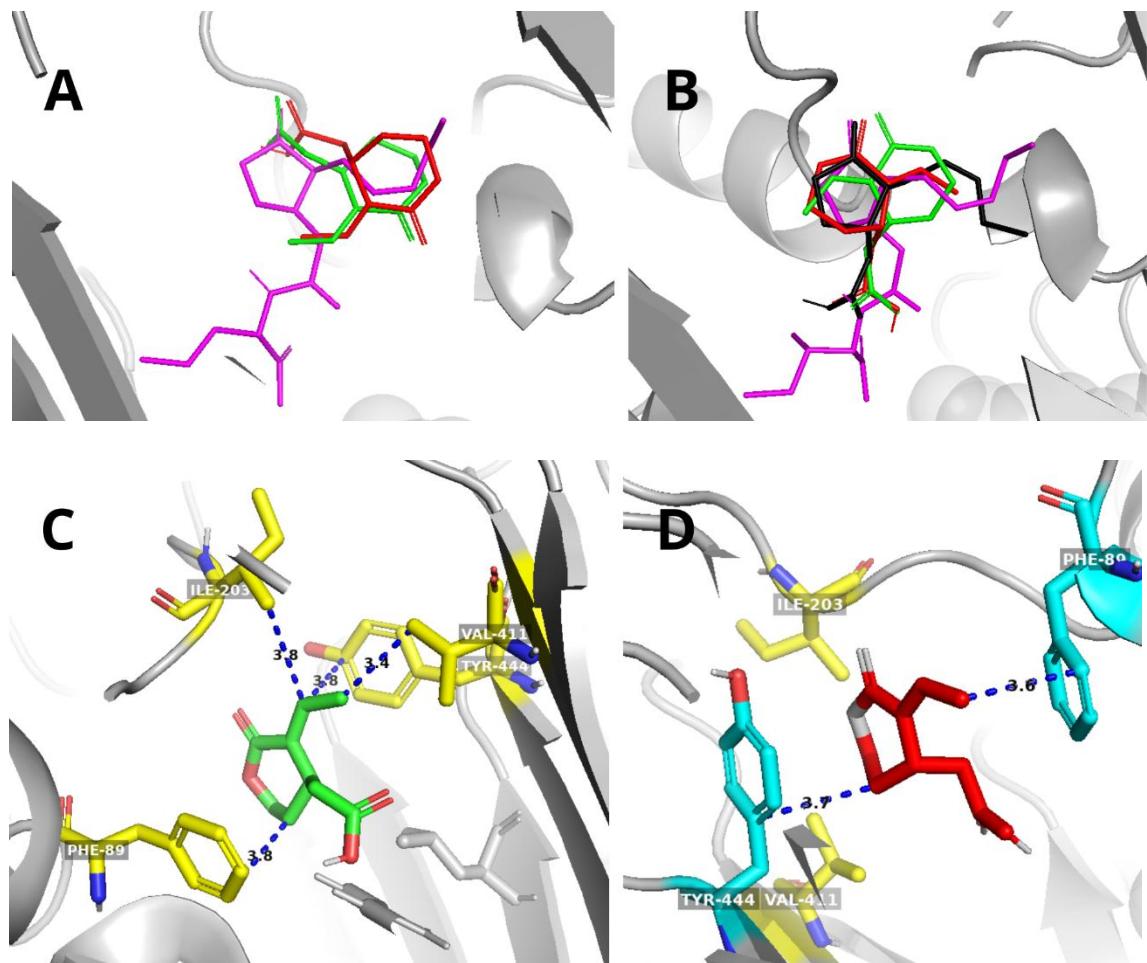


Fonte: Autor

Os arquivos com os resultados foram comparados para verificar o quanto sobrepostas as poses estão com relação ao ligante coordenado a estrutura cristalográfica, essa característica em conjunto com a afinidade de ligação são alguns dos fatores que indicam o quanto AFB será eficiente no processo de

marcação proteica pelo UPS. A pose de menor energia de ligação das formas enantioméricas de AFB não apresentaram uma boa sobreposição com o ligante cristalografado. Além disso, foi identificado que as duas estruturas posicionaram o grupo carboxílico da cadeia lateral interagindo com o resíduo Ala204 do *degron*, que diverge da estrutura em SCF^{COI1}, na qual posiciona a porção cetona do anel de cinco membros interagindo com este resíduo. A análise também revelou os grupos lactonas dos secoiridóides com orientação invertida e interagindo com Arg85, de modo que tal interação em JA-Ile é realizada com a porção amida de Ile. O docking com JA obteve uma sobreposição maior com o ligante na estrutura cristalográfica, porém como discutido anteriormente, as interações estabilizadoras com Ile estão ausentes. Dessa forma, as poses que apresentaram maior sobreposição com as orientações dos anéis corretas foram as poses 2 e 3 de (3S)-AFB e (3R)-AFB respectivamente, com energia de ligação igual à -6,7 kcal/mol. Ademais, na pose 2 de (3R)-AFB foram observadas interações adicionais com os resíduos Val411 e Tyr444, que, em conjunto com Phe89, estabilizam o ligante em DLN, além da interação com Ile203 do *degron* JAZ1. Por outro lado, na pose 3 do isômero S, a disposição invertida da cadeia lateral insaturada impediu as interações com Val411 e Tyr444. O docking realizado com a estrutura do JA não conjugado à Ile revelou uma boa sobreposição entre os grupos ciclopentanona e a estrutura cristalográfica. A Figura 27 ilustra a sobreposição entre as poses obtidas no docking molecular no sítio de ligação e o ligante presente na estrutura cristalográfica, e as interações adicionais que as poses mais sobrepostas realizam.

Figura 27 – Sobreposição entre as estruturas e ligante cristalografado A - pose 1 (3R)-AFB e (3S)-AFB; B - pose 2 (3R)-AFB, pose 3 (3S)-AFB e pose 1 (3R,7S)-JA (preto); C – interações adicionais da pose 2 de (3R)-AFB; D – interações adicionais da pose 3 de (3S)-AFB.



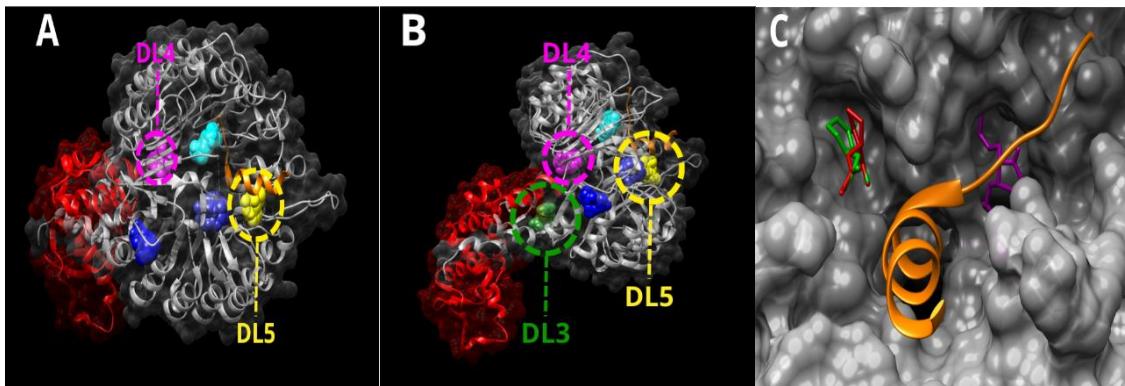
Fonte: Autor

É notável que as poses com melhor sobreposição indicaram o mesmo valor de energia de ligação -6,7kcal/mol, porém ao contrário do que era esperado a pose 3 de (3S)-AFB apresentou uma melhor sobreposição com a estrutura cristalográfica e com o docking de JA, esse resultado se opõe à estereoquímica *R* no carbono 3 do composto mais bioativo, tal que este era o cenário esperado. Assim, é válido ressaltar que o fato de o algoritmo encontrar um arranjo espacial do grupo carboxílico na cadeia lateral do enantiomero *S* para fora do plano, ele reproduz a mesma disposição deste grupo no enantiomero *R*, o que confirma que na verdade, o secoiridoide com esta estereoquímica pode ser o favorecido pela natureza.

Em relação ao *blinding docking* realizado com (3*R*)-AFB e (3*S*)-AFB foram encontradas poses em que posicionam AFB nos domínios de ligação identificados pelo *redocking* de JA-Ile. A maioria das poses obtidas estão localizadas em DL1, em uma região onde há uma cavidade hidrofóbica maior do que em DLN, o que favorece interações estabilizadoras do ligante nesta região. As poses obtidas foram analisadas, de tal modo que foi verificado um domínio de ligação DL4 logo acima de DL3 identificado pelo *redocking* de JA-Ile. Ademais, os resultados com a forma enantiomérica *R* indicaram um novo domínio de ligação que se encontra em uma cavidade logo abaixo do *degron* JAZ1, no centro da alfa hélice, que será denominado domínio de ligação 5 (DL5). A pose 1 em que dispõe (3*R*)-AFB em DLN indicou uma energia de ligação de -7,0 kcal/mol ligeiramente maior em comparação a obtida pelo *docking* no sítio de ligação -7,1 kcal/mol, enquanto para (3*S*)-AFB a pose 1 indicou a mesma energia de ligação pelo *blinding docking* e *docking* direcionado -6,9 kcal/mol. A divergência entre os resultados em *R* pode ser explicada pelo tamanho da *gridbox* adotado pelo *docking* direcionado, que favorece a busca por resultados de menor energia de ligação em espaços menores.

Vale destacar que, DLN, DL1, DL2 e DL4 já foram identificados por Souza (2019) no trabalho em que se utilizou *blinding docking* com os enantiômeros de floribundano B, um análogo de ácido floribundanóico B. Os domínios citados foram observados para a forma *R* deste composto.[88] Já os resultados adquiridos com a configuração absoluta (3*S*)-AFB foram bastante similares ao seu estereoisômero (3*R*)-AFB, contudo o algoritmo encontrou para esta estrutura poses em DL4. Além disso, o *blinding docking* realizado com JA indicou os mesmos domínios de ligação adquiridos através do *redocking* com JA-Ile. A Figura 28 apresenta as poses encontradas pelo *blinding docking* das estruturas de AFB em seus respectivos domínios de ligação e a cavidade hidrofóbica em DL1 em que foram encontradas a maioria das poses.

Figura 28 – *Blinding docking* com os enantiômeros de AFB. A – domínios de ligação identificados em (3R)-AFB; B – Domínios de ligação de (3S)-AFB e C – cavidade hidrofóbica que favorece interações em DL1.



Fonte: Autor

As soluções encontradas através do *blinding docking* para (3R)-AFB foram as seguintes: três vezes em DLN, nove em DL1, seis em DL2, três em DLN e uma em DL4 e 1DL5. Os resultados que a posicionaram no domínio de ligação nativo, variaram entre -7,0 e -6,7 kcal/mol, enquanto para (3S)-AFB obteve-se valores em um intervalo de -6,9 e -6,7 kcal/mol. Os resultados para o estereoisômero S revelaram resultados semelhantes ao seu enantiômero como evidenciado na tabela 4 abaixo. Ademais, as 80 soluções obtidas para os enantiômeros de AFB que consideram os pares de 20 soluções no sítio de ligação e o complexo SCF^{COI1} variaram em um intervalo de -7,1 a -5,7 kcal/mol, apresentando um $\Delta E_{\text{docking}} = 1,4$ kcal/mol , a tabela 2 evidencia as energias encontradas em seus respectivos domínios de ligação através do *blinding docking*.

Tabela 2 – Energias de ligação das soluções obtidas pelo *blinding docking* em seus respectivos domínios para os estereoisômeros de AFB.

(3S)-AFB			(3R)-AFB		
Pose	Afinidade (kcal/mol)	Domínios	Pose	Afinidade (kcal/mol)	Domínios
1	-6.9	DLN	1	-7.0	DLN
2	-6.7	DLN	2	-6.7	DLN
3	-6.5	DL5	3	-6.3	DL1
4	-6.3	DL1	4	-6.2	DL1
5	-6.3	DL1	5	-6.1	DL1
6	-6.3	DL1	6	-6.0	DL1
7	-6.1	DL5	7	-6.0	DL2
8	-6.0	DL1	8	-5.9	DL1
9	-6.0	DL2	9	-5.9	DL1
10	-5.9	DL2	10	-5.9	DL2
11	-5.9	DL1	11	-5.8	DLN
12	-5.9	DL1	12	-5.8	DL1
13	-5.8	DL2	13	-5.8	DL2
14	-5.7	DL3	14	-5.8	DL2
15	-5.6	DL4	15	-5.7	DL5
16	-5.6	DL1	16	-5.7	DL1
17	-5.6	DL2	17	-5.7	DL1
18	-5.6	DL2	18	-5.7	DL4
19	-5.5	DL4	19	-5.6	DL2
20	-5.5	DL1	20	-5.5	DL2

Fonte: autor

5.3 Docking molecular entre as formas diastereoisoméricas de floribundanato de isoleucina (3R)-AFB-L-Ile e (3S)-AFB-L-Ile com o complexo SCF^{COI}

O docking realizado com as formas diastereoisoméricas de AFB-Ile seguiu os mesmos procedimentos adotados com ácido floribundanóico B. Contudo, nessa análise os resultados serão comparados somente com JA-Ile e não JA,

pois esta estrutura se assemelha mais com ligante em estudo, além disso o composto encontrado na estrutura cristalográfica é o fitôrmonio jasmonato conjugado ao aminoácido isoleucina. Os arquivos config.txt utilizados no *docking* do monoterpenóide serão os mesmos utilizados para AFB-Ile, ademais assim como na etapa anterior é esperado a partir desses resultados que o diastereoisômero R apresente maior afinidade pelo domínio de ligação nativo, de modo que isso será verificado através do *docking* no sítio de ligação e *blinding docking*. Os resultados obtidos no sítio de ligação estão dispostos na tabela 3 abaixo, de antemão é possível verificar que os dois diastereoisômeros de floribundanato de isoleucina avaliados possuem uma energia de ligação menor em comparação ao secoiridoide AFB

Tabela 3 - Resultados obtidos para os estereoisômeros de AFB-Ile no *docking* direcionado ao sítio de ligação.

(3S)-AFB-L-Ile				(3R)-AFB-L-Ile			
Poses	Afinidade (kcal/mol)	RMSD I.b	RMSD u.b	Poses	Afinidade (kcal/mol)	RMSD I.b	RMSD u.b
1	-8.3	0.000	0.000	1	-8.1	0.000	0.000
2	-7.6	1.314	4.318	2	-8.0	1.951	3.331
3	-7.6	2.409	5.036	3	-7.8	1.352	2.557
4	-7.5	1.940	3.449	4	-7.6	1.039	1.467
5	-7.5	1.440	4.048	5	-7.4	1.959	7.205
6	-7.4	1.458	4.311	6	-7.3	13.930	16.002
7	-7.1	12.403	13.093	7	-7.3	1.597	6.957
8	-7.1	12.529	13.958	8	-7.3	1.165	1.521
9	-7.0	12.315	13.364	9	-7.2	2.086	3.329
10	-7.0	2.235	3.286	10	-7.2	1.918	6.841
11	-6.9	12.651	13.928	11	-7.2	1.517	2.328
12	-6.9	12.452	13.708	12	-7.1	2.026	3.404
13	-6.7	12.893	14.082	13	-7.1	14.436	16.201
14	-6.7	1.827	3.880	14	-7.1	14.667	16.332
15	-6.7	12.289	13.780	15	-7.1	14.307	16.072
16	-6.7	12.713	14.110	16	-7.1	2.279	6.743

17	-6.7	12.538	13.631	17	-6.9	14.546	16.243
18	-6.6	12.005	12.970	18	-6.8	14.508	16.296
19	-6.6	12.957	14.401	19	-6.8	14.122	16.224
20	-6.6	12.681	13.803	20	-6.8	14.344	16.178

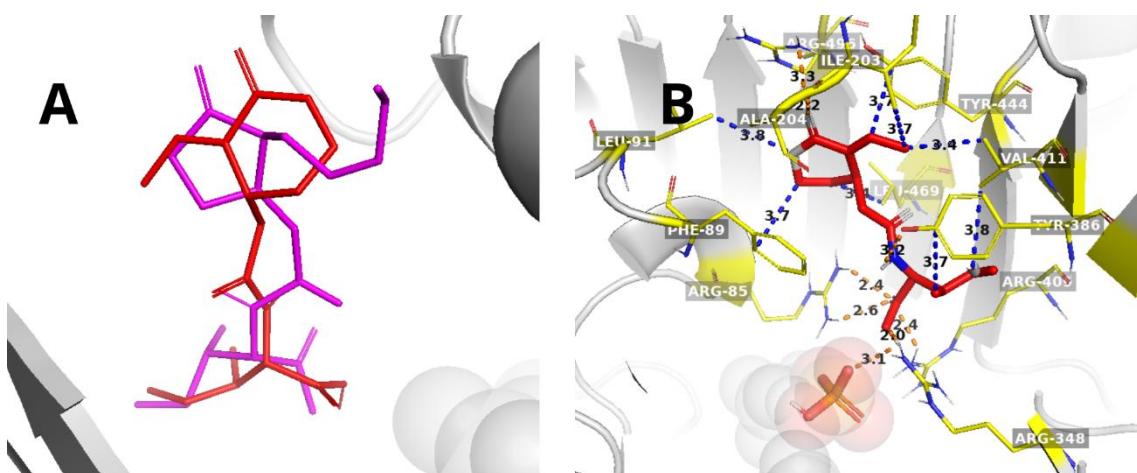
Fonte: autor

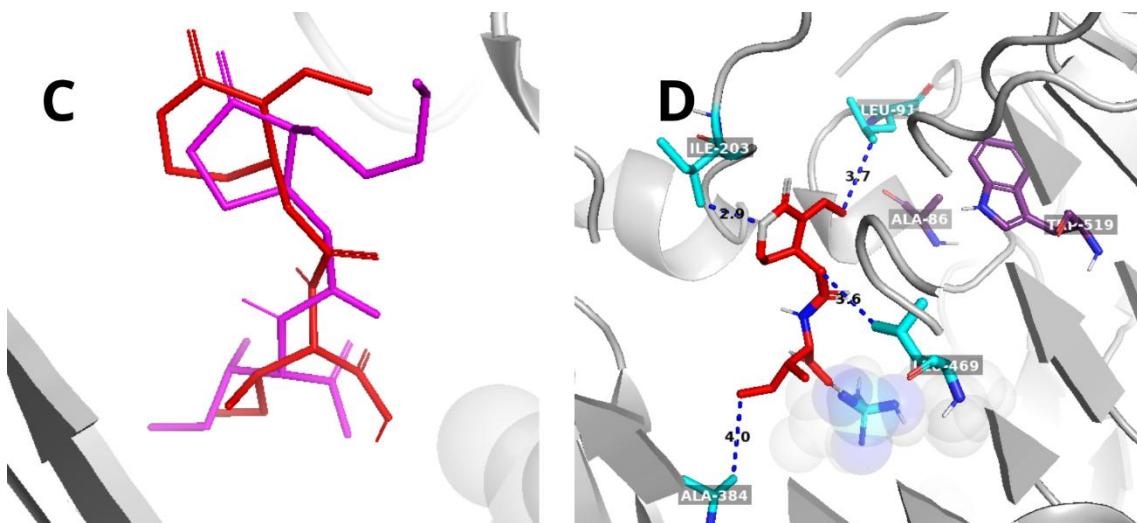
Os resultados indicam que o isômero S possui uma afinidade de ligação ligeiramente menor pelo DLN em comparação ao composto de configuração absoluta R. Porém, novamente essa discrepância não é significativa ao ponto de favorecer a complexação de um desses diastereoisômeros com o complexo ASK1-COI1-JAZ1. Vale destacar que, avaliar somente o menor valor de energia de ligação encontrado pelo algoritmo é equivocado, haja vista que o sistema em análise é dinâmico, portanto, embora esse parâmetro seja importante, ele não considera a complexidade do ambiente químico e biológico encontrado na natureza. Dessa forma, é fundamental complementar a análise com outras informações, como a frequência e duração das interações identificadas, a acessibilidade ao sítio de ligação e o impacto conformacional na estabilidade do complexo formado. Nesse contexto, a pose 1 de (3S)-AFB-L-Ile apresentou interações π stacking entre os grupos aromáticos dos resíduos de aminoácidos Phe89 e Tyr444 do correceptor COI1 com o anel lactona, em distâncias de 3,7 Å. Isso evidencia a importância da interação com esses resíduos para a estabilização do ligante no complexo SCF^{COI1}. Ademais, foi observado uma interação do tipo dipolo induzido com o resíduo Leu469 em uma distância de 3,4 Å que faz parte da cavidade hidrofóbica de COI1 e que acomoda a cadeia lateral pentenil de JA-Ile. Além desse resíduo, essa cavidade é formada por Ala86, Leu91 e Trp519, o algoritmo, porém, não identificou interações com os resíduos Ala86 e Trp519. Ademais foram identificadas interações estabilizantes com os resíduos de aminoácidos do *degron* JAZ1 como uma ligação de hidrogênio com Ala204 a uma distância de 2,2 Å e uma dipolo induzido com Ile203 a uma distância de 3,7 Å com a cadeia lateral insaturada para a solução de menor energia. Além disso, foi observado que este resultado posicionou as cadeias laterais alquênica e isoleucina em uma orientação oposta à de JA-Ile na estrutura do complexo SCF^{COI1}. Vale destacar que, esta solução em conjunto com a pose

4, dentre as 20 encontradas, foram as que apresentaram maior sobreposição com o ligante cristalografado.

A pose 4 apresentou uma interação adicional ao aproximar o grupo metila da cadeia alifática do aminoácido Ile ao resíduo Ala384 do correceptor, a uma distância de 4,0 Å. Essa interação, combinada com Val411 e Arg409, é essencial para a inserção da isoleucina na cavidade hidrofóbica.[53] Diferentemente da pose 1, a quarta solução posicionou o ligante de forma a permitir que a cadeia insaturada interagisse com o resíduo de Leu91 por meio de uma interação do tipo dipolo induzido. Na pose de menor energia, o oxigênio do heterociclo é responsável por essa interação, enquanto, na pose 4, esse oxigênio interage com Ile203 do *degron* JAZ1. Além disso, na pose 4, o grupo alifático da isoleucina interage com Leu469, o que contrasta com a pose 1, na qual o anel lactona é o responsável por essa interação. Um aspecto adicional é que a ligação de hidrogênio com um dos fosfatos presente na estrutura cristalográfica, observada na solução menos energética, não é detectada na quarta solução. A Figura 29 ilustra as interações identificadas no docking molecular e as sobreposições das poses com a estrutura cristalográfica.

Figura 29 – Sobreposição de (3S)-AFB-L-Ile (vermelho) e da estrutura cristalográfica de JA-Ile no complexo SCF^{COI1} (rosa), exibida à esquerda, e as interações com os resíduos de aminoácidos, à direita. A e B correspondem à pose 1, enquanto C e D representam a pose 4.





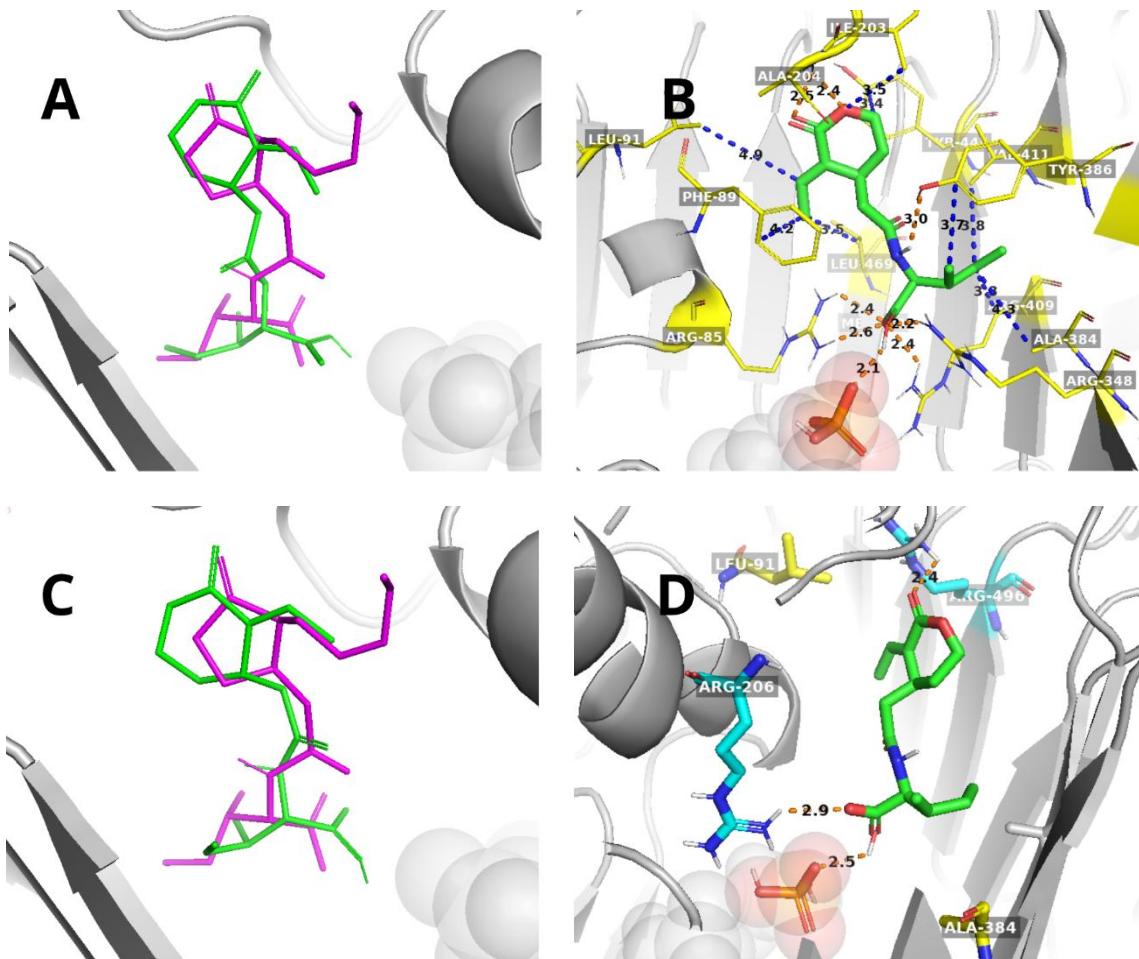
Fonte: Autor

Referente ao isômero *R*, a solução de menor energia indicou interações com os resíduos de aminoácido do correceptor COI1, de modo que foram identificadas as mesmas interações com os resíduos de aminoácido hidrofóbicos da porção Ile de JA-Ile na estrutura cristalográfica para a pose 1, incluindo Val411, Ala384 e a cadeia alifática lateral de Arg409. Além disso, foram identificadas as interações estabilizantes com o anel lactona entre Phe89 e Tyr444, típicas da ciclopentanona presente na estrutura do jasmonato de isoleucina. Outro aspecto observado é a ligação de hidrogênio com um dos grupos fosfatos presentes no complexo SCF^{COI1} cristalizado e o grupo carboxílico de (3*R*)-AFB-L-Ile. Assim como verificado em seu enantiômero, houve interações com o *degron* JAZ1 com os resíduos de aminoácido Ala204 e Ile203 em distâncias que variaram entre 2,5 e 3,5 Å respectivamente, que são fundamentais para o reconhecimento das proteínas que serão degradadas.

Dentre as soluções obtidas, as poses 1 e 8 apresentaram maior sobreposição com a estrutura cristalográfica, sendo a pose 8 a que demonstrou melhor equivalência com a cadeia lateral de isoleucina presente no JA-Ile. Diferentemente da solução de menor energia, essa pose exibiu ligações de hidrogênio entre o grupo carboxílico do secoiridóide e o grupo amina de Arg206 do *degron*, a uma distância de 4,86 Å, além da interação entre a carbonila da lactona e a amina de Arg296 de COI1, a uma distância de 2,4 Å, o que favorece a estabilização do ligante em DLN. Essa estabilização ocorre porque, no interior do *degron* JAZ1, dois resíduos básicos conservados, Arg205 e Arg206, desempenham um papel crucial no favorecimento da ligação entre o *degron*, o

hormônio e COI1.[53] A oitava solução também indicou uma ligação de hidrogênio com um dos grupos fosfatos cristalografados, entretanto, não apresentou as interações com os resíduos Ala384 e Leu91 do correceptor em comparação à solução de menor energia. Outro aspecto observado é que nenhuma das formas diastereoisoméricas interagiu com Trp519 e Ala86, os quais se associam à cadeia lateral insaturada do JA-Ile. Essas características são evidenciadas na Figura 30, na qual apresenta a sobreposição entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos em que (3*R*)-AFB-L-Ile interage.

Figura 30 - Sobreposição de (3*R*)-AFB-L-Ile (verde) e da estrutura cristalográfica de JA-Ile no complexo SCF^{COI1} (rosa), exibida à esquerda, e as interações com os resíduos de aminoácidos, à direita. A e B correspondem à pose 1, enquanto C e D representam a pose 8.



Fonte: Pymol

A etapa de *blinding docking* para o estereoisômero *S* revelou duas novas regiões em que este interage com COI1, denominados domínio de ligação 6 (DL6) e domínio de ligação 7 (DL7). O primeiro posiciona o (3*S*)-AFB-L-Ile na porção terminal do loop de JAZ1, em uma região mais externa do complexo SCF^{COI1}. Logo, em um ambiente dinâmico e fluído como o interior das plantas, o ligante pode ser facilmente deslocado desse domínio de ligação por moléculas de água, que promovem sua remoção por arraste. Já em DL7, o ligante é posicionado mais próximo de ASK1, e interagindo com as folhas beta do correceptor adjacentes ao DL3. Devido à proximidade com ASK1, a afinidade por COI1 é reduzida, fazendo com que a energia de ligação da solução de menor

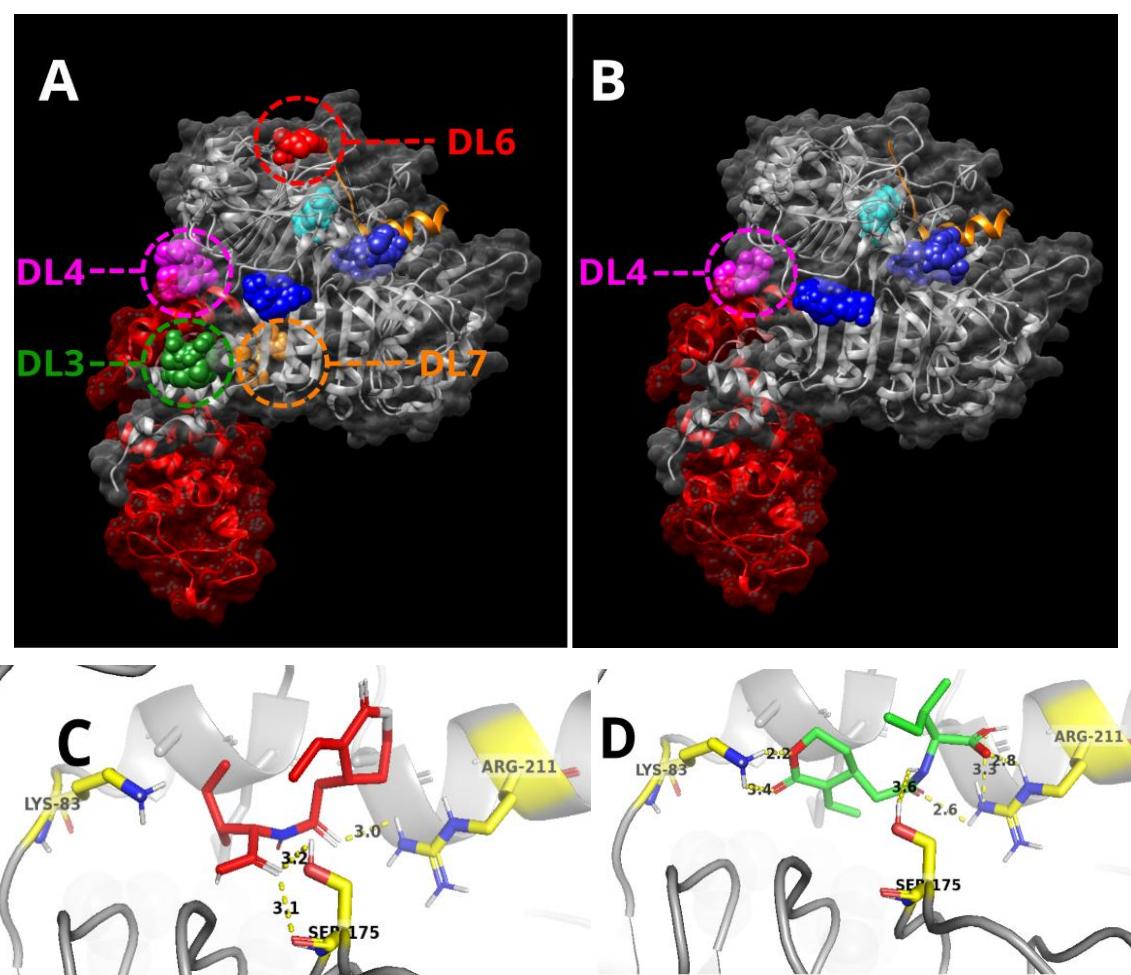
energia, inicialmente a -7,9 kcal/mol, aumente para -6,3 kcal/mol. Essa alteração compromete a estabilidade do ligante ao adotar essa conformação nessa região, o que pode impactar negativamente sua atividade no sistema UPS. Esse efeito está relacionado ao domínio DLN, que desempenha um papel crucial na promoção da especificidade para as proteínas JAZ, destinadas à degradação pelo proteassoma. As demais soluções posicionaram (3S)-AFB-L-Ile seis vezes em DL1 e DL2, e duas em DL3 e DL4. Semelhante ao observado para o AFB, foi constatada uma concentração significativa de resultados na cavidade hidrofóbica do domínio DL1, o que indica uma alta afinidade de conjugados deste secoiridóide por esta região.

Os resultados obtidos para (3R)-AFB-L-Ile foram bastante similares ao seu diastereoisômero, contudo foi identificada uma maior quantidade de soluções que posicionaram o ligante dez vezes em DL1. Uma possível explicação para a preferência deste isômero por esse domínio, se deve as interações extras exercidas nesta região, o ligante na pose de menor energia neste domínio, por exemplo, interage com os resíduos de aminoácido Arg211 do *degron* e realiza ligações de hidrogênio com Lys83 e Ser175 do correceptor, que promovem a sua estabilidade. Enquanto (3S)-AFB-L-Ile se coordena somente aos resíduos Arg211 e Ser175 nesta região. Além disso, o fato do grupo isoleucina estar arranjado para fora do plano na configuração *R*, e estar invertido com o anel heterocíclico pelo algoritmo, favorece a proximidade com JAZ1 auxiliando a inserção do ligante em DL1. A Figura 31 evidencia os domínios de ligação obtidos pelo *blinding redocking* para os diastereoisômeros de AFB-L-Ile e as diferenças entre os resultados de menor energia no domínio de ligação 1.

A comparação dos resultados com o *docking* no sítio de ligação e *blinding docking* evidencia um valor energético levemente maior de 0,4 kcal/mol para a solução de menor energia para o estereoisômero S, tal divergência pode novamente ser explicado pelo tamanho da gridbox adotado no docking direcionado. Isso ocorre porque, o tamanho reduzido deste parâmetro favorece a busca por resultados com valores menores de energia quando todo o complexo SCF^{COI1} é contemplado. Em relação a (3R)-AFB-L-Ile, verificou-se que o valor de energia de ligação para a melhor solução encontrada de -8,1 kcal/mol foi igual a obtida pelo docking focado em DLN. Todas estas 80 soluções dos isômeros R e S que consideram o par de 20 resultados no sítio de ligação e 20 contendo

o complexo proteico, variaram em um intervalo de -8,3 a -6,1 kcal/mol para a melhor solução encontrada que foi (3R)-AFB-L-Ile, apresentando um $\Delta E_{docking} = 2,2$ kcal/mol, a tabela 4 evidencia as energias encontradas para os isômeros de AFB-Ile, através do *blinding docking* em seus respectivos domínios de ligação.

Figura 31 – Domínios de ligação identificados para (3S)-AFB-L-Ile (A) e (3R)-AFB-L-Ile (B). Soluções de menor energia em DL1 para o isômero S (C) e para o isômero R (D).



Fonte: UCSF Chimera e Pymol

Tabela 4 - Energias de ligação das soluções obtidas pelo *blinding docking* em seus respectivos domínios para os estereoisômeros de AFB-Ile.

(3R)-AFB-L-Ile			(3S)-AFB-L-Ile		
pose	Afinidade (kcal/mol)	Domínios	pose	Afinidade (kcal/mol)	Domínios
1	-8.1	DLN	1	-7.9	DLN
2	-7.9	DLN	2	-7.0	DLN
3	-7.5	DLN	3	-7.0	DL2
4	-7.3	DL1	4	-6.8	DL2
5	-7.1	DL1	5	-6.7	DL1
6	-7.1	DL1	6	-6.7	DL1
7	-6.8	DL1	7	-6.7	DL2
8	-6.8	DL1	8	-6.5	DL2
9	-6.7	DL1	9	-6.5	DL4
10	-6.6	DL2	10	-6.5	DL2
11	-6.6	DL2	11	-6.5	DL3
12	-6.6	DL1	12	-6.3	DL4
13	-6.5	DL4	13	-6.3	DL1
14	-6.5	DL1	14	-6.3	DL1
15	-6.5	DL2	15	-6.3	DL7
16	-6.5	DLN	16	-6.3	DL2
17	-6.5	DL1	17	-6.3	DL6
18	-6.5	DL1	18	-6.2	DL3
19	-6.5	DL2	19	-6.2	DL1
20	-6.4	DL2	20	-6.1	DL1

Fonte: autor

5.4 Análise comparativa dos resultados obtidos pelo docking de AFB e AFB-Ile com JA-Ile em sua estrutura cristalográfica

A análise comparativa do docking no sítio de ligação entre as estruturas de AFB e de AFB-Ile com a do jasmonato de isoleucina na estrutura cristalográfica SCF^{COI1} revelou que o floribundanato de isoleucina possui uma afinidade de ligação aproximadamente 1,0 kcal/mol menor em comparação à sua estrutura não conjugada, o ácido floribundanóico B. Essa diferença pode ser

atribuída à cadeia lateral isoleucina de AFB-Ile, que promove interações adicionais estabilizadoras, como ligações de hidrogênio extras com os grupos amida e ácido carboxílico. Entretanto, a solução de menor energia obtida para o isômero S do secoiridóide conjugado ao aminoácido foi de -8,3 kcal/mol, valor superior à energia adquirida no *redocking* de JA-Ile no sítio de ligação, que apresentou afinidade de -8,8 kcal/mol. Comparando esses resultados com a estrutura mais sobreposta de JA-Ile obtida pelo *redocking* rígido, que apresentou uma afinidade de -11,2 kcal/mol, a diferença energética torna-se ainda mais evidente. Isso sugere que os valores de afinidade obtidos no sítio de ligação podem ser ainda menores ao realizar o *docking* de AFB-Ile considerando-se uma estrutura rígida.

Outro aspecto relevante é que, conforme mencionado anteriormente, não foi observada uma diferença significativa entre as afinidades dos enantiômeros de AFB e os diastereoisômeros de AFB-Ile. Dessa forma, em um equilíbrio conformacional, não haverá o predomínio de um isômero sobre o outro, haja vista que a diferença energética mínima para haver o favorecimento de um estereoisômero sobre o outro é de 1 kcal/mol, logo isso não ocorre considerando as diferenças de energia entre os *dockings* foram de 1,4 e 2,2 kcal/mol, respectivamente. Esses valores estão próximos do $\Delta E_{\text{redocking}} = 2,5$ kcal/mol do *redocking* flexível de JA-Ile, que considera a solução de menor energia de -8,8 kcal/mol e -6,3 kcal/mol. Vale destacar que, esses resultados têm origem da expressão $\Delta G^\circ = -RT \ln K$, que relaciona a constante de equilíbrio (K) com a energia livre (ΔG°), e considerando T = 298 K e R = 0,001987 kcal.mol⁻¹.K⁻¹. Para verificar se há preferência pela complexação de isômero em detrimento de outro em um equilíbrio conformacional, será utilizada a equação indicada abaixo que relaciona a distribuição entre dois estados energéticos.

$$\frac{[R]}{[S]} = e^{-\frac{\Delta \Delta G}{R.T}}$$

Portanto, ao substituir nessa equação os melhores resultados encontrados para as estruturas com configuração R e S de AFB que correspondem a -7,1 kcal/mol e -6,9 kcal/mol respectivamente, tal qual para AFB-

Ile com valores de -8,3 kcal/mol e -8,1 kcal/mol obtemos a porcentagem do complexo desses estereoisômeros com COI1 em um equilíbrio conformacional. Logo, para ambos AFB e AFB-Ile o $\Delta\Delta G$ que se refere a diferença de energia entre os isômeros é -0,2 kcal/mol. Substituindo esses valores na expressão acima, obtemos uma razão de 1,402 entre as estruturas enantioméricas, ou seja, isso significa que para cada 1 molécula do enantiômero *R*, há 1,402 moléculas do enantiômero *S*. Ademais, o percentual dos isômeros é dada pela expressão abaixo, onde relaciona o valor de razão encontrado pela equação anterior com o percentual do isômero *R*.

$$\%R = \frac{[R]}{[R]+[S]} \cdot 100$$

Utilizando $[R] = 1,402$ e $[S] = 1$, obtêm-se uma porcentagem de 58,4% do isômero *R* e 41,6% do *S* para AFB em contraste a sua estrutura conjugada ao aminoácido isoleucina, na qual determina 58,4% do estereoisômero *S* e 41,6% de *R*. Esses valores indicam novamente que o favorecimento de um determinado estereoisômero em um equilíbrio conformacional é muito baixo, dessa forma a preferência para uma determinada estrutura em relação a outra no UPS é ínfima.

6 Conclusão e perspectivas

Através do redocking de JA-Ile no complexo SCF^{COI1}, foi possível validar os estudos de *docking* no sítio de ligação e *blinding docking* com as formas enantioméricas de AFB e diastereoisoméricas de AFB-Ile. O redocking de JA-Ile, considerando a estrutura flexível, apresentou uma boa sobreposição com a estrutura cristalografada, enquanto o redocking rígido mostrou uma sobreposição quase total com JA-Ile. Os resultados indicaram que AFB-Ile possui uma afinidade de ligação semelhante à observada para o ligante jasmonato de isoleucina pelo sítio de ligação, utilizando como referência o redocking flexível de JA-Ile. Além disso, não foi identificada seletividade para um diastereoisômero específico desse composto. Por outro lado, sua forma não conjugada, AFB, apresentou uma afinidade de ligação semelhante à observada no docking de ácido jasmônico. Esses dados sugerem uma preferência do sítio de ligação do complexo proteico por AFB-Ile em vez de AFB, em linha com a literatura para JA e seu conjugado com Ile, o que resulta, no caso de JA-Ile, em maior atividade no sistema UPS.

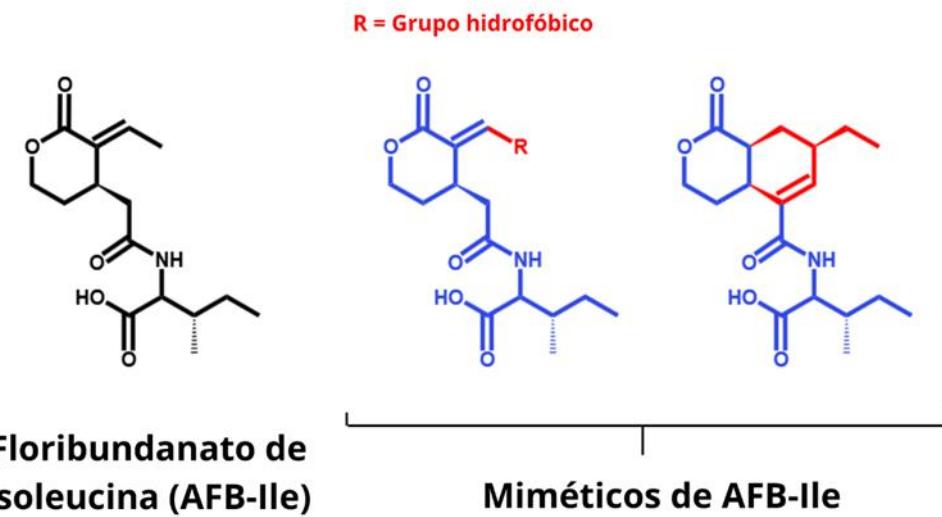
O *blinding docking* revelou outras regiões de interação do jasmonato além do sítio de ligação (DLN). Por meio dessa abordagem, foi identificado um novo domínio de ligação com afinidade pela oxilipina, denominado domínio de ligação 3 (DL3). Os resultados obtidos para AFB indicaram que este se coordena com os mesmos domínios de JA-Ile. Entretanto, foi identificada uma nova região, na qual AFB é localizado entre o *degron* JAZ1 e o correceptor COI1 denominada DL5. O AFB-Ile, por sua vez também se coordenou as mesmas regiões que JA-Ile, mas foram identificadas duas novas regiões em que este tem afinidade denominadas DL6 e DL7, esta primeira não é um região muito favorável devido sua localização externa na porção terminal do loop do *degron* JAZ1, pois nesta disposição espacial ele está mais sujeito a arraste e remoção desta localização por moléculas como água. Já DL7 posiciona o ligante na porção central inferior do complexo SCF^{COI1}. Logo, dentre os novos domínios encontrados aqueles que são mais favoráveis para a coordenação do ligante seriam DL5 e DL7.

A maioria das soluções encontradas posicionou AFB e AFB-Ile no domínio de ligação 1, o que pode indicar uma preferência por análogos deste secoiridóide

por essa região, devido ao tamanho dessa cavidade hidrofóbica em comparação à cavidade presente em DLN. A discrepância nas afinidades de JA e JA-Ile pelo DLN em relação a AFB e AFB-Ile também pode ser explicada pela maior tensão torsional do anel de cinco membros desses compostos, que confere maior rigidez à estrutura. Essa rigidez estrutural diminui a flexibilidade em torno das ligações do anel, o que pode aumentar a especificidade do ligante, já que uma maior flexibilidade favorece a interconversão entre diferentes conformações, levando a interações inespecíficas e a um aumento da entropia no sistema, o que compromete a estabilidade em um domínio de ligação. Ademais, o tamanho reduzido da cadeia lateral hidrofóbica e insaturada dificulta a inserção dos monoterpenóides no sítio de ligação, pela ausência de interações estabilizadoras adicionais com os resíduos Ala86 e Trp519. Apesar disso, a maioria das poses obtidas está localizada no interior do complexo SCF^{COI1} e próxima ao DLN, o que sugere que esses ligantes têm potencial para atuar no sistema UPS. Vale destacar que, por se tratar de um estudo *in silico* e considerando um sistema estático, que difere do comportamento dinâmico observado nos organismos, os resultados obtidos por essa metodologia devem ser confirmados por meio de ensaios adicionais, incluindo estudos *in vivo* e *in vitro*.

Considerando os fatores mencionados anteriormente, sugere-se um estudo de *docking* que introduza na cadeia lateral de AFB-Ile um grupo mais hidrofóbico ou com uma cadeia lateral insaturada similar à de JA-Ile, ou ainda a inserção de um grupo que proporcione maior rigidez estrutural a esse secoiridóide, como o grupo ciclohexeno presente na coronatina, que apresenta alta bioatividade no sistema UPS. As estruturas propostas estão descritas na Figura 32 abaixo.

Figura 32 – Estruturas propostas para aumentar a bioatividade de AFB-Ile no sistema UPS.



Fonte: autor

Referências

- [1] **Puxado pelo crescimento recorde de 15,1% da agropecuária, PIB brasileiro fecha 2023 com alta de 2,9%**. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA). Disponível em: <<https://www.cnabrasil.org.br/>>. Acesso em: 30 jun. 2024.
- [2] TECNOLOGIA, Imagenet. **PIB do Agronegócio Brasileiro**. Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada - CEPEA-Esalq/USP. Disponível em: <<https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>>. Acesso em: 2 out. 2024.
- [3] SHAHID, Mohammad; SHAFI, Zaryab; ILYAS, Talat; et al. Crosstalk between phytohormones and pesticides: Insights into unravelling the crucial roles of plant growth regulators in improving crop resilience to pesticide stress. **Scientia Horticulturae**, v. 338, p. 113663, 2024. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304423824008161>>. Acesso em: 5 out. 2024.
- [4] GROSSMANN, Klaus. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. **Pest Management Science**, v. 66, n. 2, p. 113–120, 2010. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.1860>>. Acesso em: 5 out. 2024.
- [5] KHOLILA, Berliana N; SOESILO, Tri E B; HERDIANSYAH, Herdis. The potential of in-silico approach to support government programs to achieve eco-

friendly agriculture: Studies on urban agriculture. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 716, n. 1, p. 012007, 2021. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/716/1/012007>>. Acesso em: 30 jun. 2024.

[6] MEZA MENCHACA, Thuluz; JUÁREZ-PORTILLA, Claudia; C. ZEPEDA, Rossana. Past, Present, and Future of Molecular Docking. In: GAITONDE, Vishwanath; KARMAKAR, Partha; TRIVEDI, Ashit (Orgs.). **Drug Discovery and Development - New Advances**. [s.l.]: IntechOpen, 2020. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/drug-discovery-and-development-new-advances/past-present-and-future-of-molecular-docking>>. Acesso em: 30 jun. 2024.

[7] POLINSKY, Ronald J. Clinical pharmacology of rivastigmine: a new-generation acetylcholinesterase inhibitor for the treatment of alzheimer's disease. **Clinical Therapeutics**, v. 20, n. 4, p. 634–647, 1998. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149291898801276>>. Acesso em: 11 out. 2024.

[8] SUGIMOTO, Hachiro; OGURA, Hiroo; ARAI, Yasuo; et al. Research and Development of Donepezil Hydrochloride, a New Type of Acetylcholinesterase Inhibitor. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 89, n. 1, p. 7–20, 2002. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021519819301428>>. Acesso em: 11 out. 2024.

[9] AMARO, Rommie E.; BAUDRY, Jerome; CHODERA, John; et al. Ensemble Docking in Drug Discovery. **Biophysical Journal**, v. 114, n. 10, p. 2271–2278, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349518303242>>. Acesso em: 30 jun. 2024.

[10] YAN, Carol H.; FARAJI, Farhoud; PRAJAPATI, Divya P.; et al. Association of chemosensory dysfunction and COVID-19 in patients presenting with influenza-like symptoms. **International Forum of Allergy & Rhinology**, v. 10, n. 7, p. 806–813, 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/alr.22579>>. Acesso em: 11 ago. 2024.

- [11] AL-KARMAHALWY, Ahmed A.; DAHAB, Mohammed A.; METWALY, Ahmed M.; *et al.* Molecular Docking and Dynamics Simulation Revealed the Potential Inhibitory Activity of ACEIs Against SARS-CoV-2 Targeting the hACE2 Receptor. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 661230, 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8129187/>>. Acesso em: 10 ago. 2024.
- [12] KENDREW, J. C.; BODO, G.; DINTZIS, H. M.; *et al.* A Three-Dimensional Model of the Myoglobin Molecule Obtained by X-Ray Analysis. **Nature**, v. 181, n. 4610, p. 662–666, 1958. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/181662a0>>. Acesso em: 30 jun. 2024.
- [13] **Protein Data Bank - Chronology**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3151162/>>. Acesso em: 30 jun. 2024.
- [14] **Modernizing Drug Discovery Development and Approval**. Disponível em: <<https://phrma.org/resource-center/Topics/Research-and-Development/Modernizing-Drug-Discovery-Development-and-Approval>>. Acesso em: 6 out. 2024.
- [15] MENG, Xuan-Yu; ZHANG, Hong-Xing; MEZEI, Mihaly; *et al.* Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. **Current computer-aided drug design**, v. 7, n. 2, p. 146–157, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3151162/>>. Acesso em: 30 jun. 2024.
- [16] SALMASO, Veronica; MORO, Stefano. Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 923, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2018.00923/full>>. Acesso em: 1 jul. 2024.
- [17] **Advancing Structural Science | CCDC**. Disponível em: <<https://www.ccdc.cam.ac.uk/>>. Acesso em: 12 out. 2024.
- [18] SARKAR, Arkadeep; CONCILIO, Simona; SESSA, Lucia; *et al.* Advancements and novel approaches in modified AutoDock Vina algorithms for enhanced molecular docking. **Results in Chemistry**, v. 7, p. 101319, 2024. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211715624000158>>. Acesso em: 6 out. 2024.

- [19] **Molecular Dynamics Simulations Service - Creative Proteomics.** Disponível em: <https://www.iaanalysis.com/molecular-dynamics-simulations-service.html?gad_source=1&gclid=CjwKCAjw3624BhBAEiwAkxgTOjADrIJp7gz87C6_ETnpuW00PNUccYN9b-vtK4KXb6r6Ebxx8oJ2hoC3isQAvD_BwE>. Acesso em: 13 out. 2024.
- [20] BAJUSZ, David; FERENCZY, Gyorgy G.; KESERU, Gyorgy M. Structure-based Virtual Screening Approaches in Kinase-directed Drug Discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 20, 2017. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/150418/article>>. Acesso em: 13 out. 2024.
- [21] MORRIS, Garrett M.; GOODSELL, David S.; HALLIDAY, Robert S.; *et al.* Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639–1662, 1998. Disponível em: <[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B)>. Acesso em: 6 out. 2024.
- [22] TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.21334>>. Acesso em: 7 out. 2024.
- [23] MORRIS, Garrett M.; HUEY, Ruth; LINDSTROM, William; *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.21256>>. Acesso em: 1 jul. 2024.
- [24] TAYLOR, J. S.; BURNETT, R. M. DARWIN: a program for docking flexible molecules. **Proteins**, v. 41, n. 2, p. 173–191, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10966571/>. Acesso em: 1 jul 2024.
- [25] LIU, Ming; WANG, Shaomeng. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 13, n. 5, p. 435–451, 1999. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/A:1008005918983>>. Acesso em: 1 jul. 2024.

- [26] JONES, Gareth; WILLETT, Peter; GLEN, Robert C; *et al.* Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking 1 1Edited by F. E. Cohen. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727–748, 1997. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283696908979>>. Acesso em: 1 jul. 2024.
- [27] JIMÉNEZ, José; ŠKALIČ, Miha; MARTÍNEZ-ROSELL, Gerard; *et al.* *K_{DEEP}*: Protein–Ligand Absolute Binding Affinity Prediction via 3D-Convolutional Neural Networks. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 58, n. 2, p. 287–296, 2018. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jcim.7b00650>>. Acesso em: 13 out. 2024.
- [28] **The Nobel Prize in Chemistry 2024**. NobelPrize.org. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2024/press-release/>>. Acesso em: 13 out. 2024.
- [29] EIBEN, A. E.; SMITH, J. E. **Introduction to Evolutionary Computing**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2003. (Natural Computing Series). Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-05094-1>>. Acesso em: 10 out. 2024.
- [30] BAILDYA, Nabajyoti; GHOSH, Narendra Nath; CHATTOPADHYAY, Asoke P. Inhibitory activity of hydroxychloroquine on COVID-19 main protease: An insight from MD-simulation studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 1219, p. 128595, 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022286020309200>>. Acesso em: 8 maio 2024.
- [31] CHRISTOFORIDIS, J.; CHANG, S. Quinine. *In: Encyclopedia of Toxicology*: Elsevier, 2014, p. 19–22. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123864543000567>>. Acesso em: 8 maio 2024.
- [32] YAO, Xueling; YE, Fei; ZHANG, Miao; *et al.* In Vitro Antiviral Activity and Projection of Optimized Dosing Design of Hydroxychloroquine for the Treatment of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 15, p. 732–739, 2020. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article/71/15/732/5801998>>. Acesso em: 11 out. 2024.

- [33] WANG, Manli; CAO, Ruiyuan; ZHANG, Leike; *et al.* Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. **Cell Research**, v. 30, n. 3, p. 269–271, 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41422-020-0282-0>>. Acesso em: 11 out. 2024.
- [34] BORBA, Mayla Gabriela Silva; VAL, Fernando Fonseca Almeida; SAMPAIO, Vanderson Souza; *et al.* Effect of High vs Low Doses of Chloroquine Diphosphate as Adjunctive Therapy for Patients Hospitalized With Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection: A Randomized Clinical Trial. **JAMA Network Open**, v. 3, n. 4, p. e208857, 2020. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jamanetworkopen/fullarticle/2765499>>. Acesso em: 11 out. 2024.
- [35] MERCURO, Nicholas J.; YEN, Christina F.; SHIM, David J.; *et al.* Risk of QT Interval Prolongation Associated With Use of Hydroxychloroquine With or Without Concomitant Azithromycin Among Hospitalized Patients Testing Positive for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **JAMA Cardiology**, v. 5, n. 9, p. 1036, 2020. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jamacardiology/fullarticle/2765631>>. Acesso em: 11 out. 2024.
- [36] OWEN, Dafydd R.; ALLERTON, Charlotte M. N.; ANDERSON, Annaliesa S.; *et al.* An oral SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19. **Science**, v. 374, n. 6575, p. 1586–1593, 2021. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.abl4784>>. Acesso em: 4 fev. 2025.
- [37] ASIAMAH, Isaac; OBIRI, Samuel Asiamah; TAMEKLOE, Woasiedem; *et al.* Applications of molecular docking in natural products-based drug discovery. **Scientific African**, v. 20, p. e01593, 2023. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468227623000510>>. Acesso em: 8 maio 2024.
- [38] BANK, RCSB Protein Data. PDB Statistics: Overall Growth of Released Structures Per Year. Disponível em: <<https://www.rcsb.org/stats/growth/growth-released-structures>>. Acesso em: 8 maio 2024.
- [39] DIAS, Daniel A.; URBAN, Sylvia; ROESSNER, Ute. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303–336, 2012.

Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2218-1989/2/2/303>>. Acesso em: 30 jun. 2024.

[40] **Traditional medicine has a long history of contributing to conventional medicine and continues to hold promise.** Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/traditional-medicine-has-a-long-history-of-contributing-to-conventional-medicine-and-continues-to-hold-promise>>. Acesso em: 5 out. 2024.

[41] DEWICK, Paul M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach.** 1. ed. [s.l.]: Wiley, 2001. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/0470846275>>. Acesso em: 11 ago. 2024.

[42] CROZIER, Alan; CLIFFORD, Michael N.; ASHIHARA, Hiroshi (Orgs.). **Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet.** 1. ed. [s.l.]: Wiley, 2006. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9780470988558>>. Acesso em: 11 ago. 2024.

[43] BALANDRIN, Manuel F.; KLOCKE, James A.; WURTELE, Eve Syrkin; et al. Natural Plant Chemicals: Sources of Industrial and Medicinal Materials. **Science**, v. 228, n. 4704, p. 1154–1160, 1985. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.3890182>>. Acesso em: 30 jun. 2024.

[44] MUROFUSHI, Noboru; YAMANE, Hisakazu; SAKAGAMI, Youji; et al. Plant Hormones. In: **Comprehensive Natural Products Chemistry.** [s.l.]: Elsevier, 1999, p. 19–136. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080912837000503>>. Acesso em: 30 jun. 2024.

[45] VEERESHAM, Ciddi. Natural products derived from plants as a source of drugs. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 3, n. 4, p. 200, 2012. Disponível em: <<https://journals.lww.com/10.4103/2231-4040.104709>>. Acesso em: 30 jun. 2024.

[46] TALAPATRA, Sunil Kumar; TALAPATRA, Bani. **Chemistry of Plant Natural Products: Stereochemistry, Conformation, Synthesis, Biology, and Medicine.** Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015. Disponível em:

<<https://link.springer.com/10.1007/978-3-642-45410-3>>. Acesso em: 30 jun. 2024.

[47] PIASECKA, Anna; JEDRZEJCZAK-REY, Nicolas; BEDNAREK, Paweł. Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. **New Phytologist**, v. 206, n. 3, p. 948–964, 2015. Disponível em: <<https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nph.13325>>. Acesso em: 11 ago. 2024.

[48] ISAH, Tasiu. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. **Biological Research**, v. 52, n. 1, p. 39, 2019. Disponível em: <<https://biolres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40659-019-0246-3>>.

Acesso em: 11 ago. 2024.

[49] YANG, Yongqing; GUO, Yan. Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses. **New Phytologist**, v. 217, n. 2, p. 523–539, 2018. Disponível em: <<https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nph.14920>>. Acesso em: 11 ago. 2024.

[50] WU, Guoyao. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. **Amino Acids**, v. 37, n. 1, p. 1–17, 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00726-009-0269-0>>. Acesso em: 11 ago. 2024.

[51] ZHANG, Xuebin; GONZALEZ-CARRANZA, Zinnia H.; ZHANG, Shulin; et al. F -Box Proteins in Plants. In: ROBERTS, Jeremy A. (Org.). **Annual Plant Reviews online**. 1. ed. [s.l.]: Wiley, 2019, p. 307–328. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119312994.apr0701>>. Acesso em: 14 out. 2024.

[52] SHEARD, Laura B.; TAN, Xu; MAO, Haibin; et al. Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1–JAZ co-receptor. **Nature**, v. 468, n. 7322, p. 400–405, 2010. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nature09430>>. Acesso em: 16 maio 2024.

[53] TIAN, Jiaqi; CAO, Lichun; CHEN, Xiaofei; et al. The OsJAZ1 degron modulates jasmonate sensitivity during rice development. **Development**, p. 1-13, dev.173419, 2019. Disponível em: <<https://journals.biologists.com/dev/article/doi/10.1242/dev.173419/264809/The-OsJAZ1-degron-modulates-jasmonate-signaling>>. Acesso em: 20 maio 2024.

- [54] LARRIEU, Antoine; VERNOUX, Teva. Q&A: How does jasmonate signaling enable plants to adapt and survive? **BMC Biology**, v. 14, n. 1, p. 79, 2016. Disponível em: <<http://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-016-0308-8>>. Acesso em: 15 maio 2024.
- [55] TU, Yaqin; CHEN, Cai; PAN, Junru; *et al.* The Ubiquitin Proteasome Pathway (UPP) in the regulation of cell cycle control and DNA damage repair and its implication in tumorigenesis. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 5, n. 8, p. 726–738, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3466981/>>. Acesso em: 5 jun. 2024.
- [56] STONE, Sophia L. Role of the Ubiquitin Proteasome System in Plant Response to Abiotic Stress. In: **International Review of Cell and Molecular Biology**. [s.l.]: Elsevier, 2019, v. 343, p. 65–110. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1937644818300625>>. Acesso em: 5 jun. 2024.
- [57] ETLINGER, J D; GOLDBERG, A L. A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 1, p. 54–58, 1977. Disponível em: <<https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.74.1.54>>. Acesso em: 11 ago. 2024.
- [58] WILKINSON, Keith D. The discovery of ubiquitin-dependent proteolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 43, p. 15280–15282, 2005. Disponível em: <<https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0504842102>>. Acesso em: 11 ago. 2024.
- [59] MOON, Jennifer; PARRY, Geraint; ESTELLE, Mark. The Ubiquitin-Proteasome Pathway and Plant Development. **The Plant Cell**, v. 16, n. 12, p. 3181–3195, 2004. Disponível em: <<https://academic.oup.com/plcell/article/16/12/3181-3195/6010268>>. Acesso em: 11 jun. 2024.
- [60] MUKHOPADHYAY, Debdyuti; RIEZMAN, Howard. Proteasome-Independent Functions of Ubiquitin in Endocytosis and Signaling. **Science**, v. 315, n. 5809, p. 201–205, 2007. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1127085>>. Acesso em: 11 ago. 2024.

- [61] CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 24, p. 7151–7160, 1998. Disponível em: <<http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/17.24.7151>>. Acesso em: 15 out. 2024.
- [62] WANG, Feng; DENG, Xing Wang. Plant ubiquitin-proteasome pathway and its role in gibberellin signaling. **Cell Research**, v. 21, n. 9, p. 1286–1294, 2011. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/cr2011118>>. Acesso em: 14 jun. 2024.
- [63] VARSHAVSKY, Alexander. N-degron and C-degron pathways of protein degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 2, p. 358–366, 2019. Disponível em: <<https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1816596116>>. Acesso em: 10 ago. 2024.
- [64] WANG, Jia; SONG, Li; GONG, Xue; et al. Functions of Jasmonic Acid in Plant Regulation and Response to Abiotic Stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, p. 1446, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/21/4/1446>>. Acesso em: 15 jun. 2024.
- [65] **Jasmonic Acid - an overview | ScienceDirect Topics**. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/jasmonic-acid>>. Acesso em: 16 jun. 2024.
- [66] GHORBEL, Mouna; BRINI, Faiçal; SHARMA, Anket; et al. Role of jasmonic acid in plants: the molecular point of view. **Plant Cell Reports**, v. 40, n. 8, p. 1471–1494, 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s00299-021-02687-4>>. Acesso em: 16 jun. 2024.
- [67] KOO, Abraham J.K.; HOWE, Gregg A. The wound hormone jasmonate. **Phytochemistry**, v. 70, n. 13–14, p. 1571–1580, 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942209002933>>. Acesso em: 18 jun. 2024.
- [68] HUANG, Yan-Li; OPPONG, Mahmood Brobbey; GUO, Ying; et al. The Oleaceae family: A source of secoiridoids with multiple biological activities. **Fitoterapia**, v. 136, p. 104155, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0367326X19305325>>. Acesso em: 1 jul. 2024.
- [69] MELOTTO, Maeli; UNDERWOOD, William; HE, Sheng Yang. Role of Stomata in Plant Innate Immunity and Foliar Bacterial Diseases. **Annual Review**

of **Phytopathology**, v. 46, n. 1, p. 101–122, 2008. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.phyto.121107.104959>>.

Acesso em: 16 jun. 2024.

[70] KODA, Yasunori; TAKAHASHI, Kiyoshi; KIKUTA, Yosio; et al. Similarities of the biological activities of coronatine and coronafacic acid to those of jasmonic acid. **Phytochemistry**, v. 41, n. 1, p. 93–96, 1996. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/003194229500517X>>. Acesso em: 25 jun. 2024.

[71] BARGMANN, Bastiaan O. R.; LAXALT, Ana M.; RIET, Bas Ter; et al. Reassessing the role of phospholipase D in the *Arabidopsis* wounding response. **Plant, Cell & Environment**, v. 32, n. 7, p. 837–850, 2009. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3040.2009.01962.x>>. Acesso em: 11 ago. 2024.

[72] LEÓN, José; SÁNCHEZ-SERRANO, José J. Molecular biology of jasmonic acid biosynthesis in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 373–380, 1999. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942899800436>>. Acesso em: 25 jun. 2024.

[73] JIMENEZ ALEMAN, Guillermo H.; THIRUMALAIKUMAR, Venkatesh P.; JANDER, Georg; et al. OPDA, more than just a jasmonate precursor. **Phytochemistry**, v. 204, p. 113432, 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003194222200348X>>. Acesso em: 25 jun. 2024.

[74] SECATTO, Marcelo. Desenvolvimento da síntese total do (\pm)-ácido jasmônico visando aplicação em escala industrial. 2013. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/6650>>. Acesso em: 11 ago. 2024.

[75] MACIOSZEK, Violetta Katarzyna; JĘCZ, Tomasz; CIERESZKO, Iwona; et al. Jasmonic Acid as a Mediator in Plant Response to Necrotrophic Fungi. **Cells**, v. 12, n. 7, p. 1027, 2023. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4409/12/7/1027>>. Acesso em: 11 ago. 2024.

[76] DELKER, C.; STENZEL, I.; HAUSE, B.; et al. Jasmonate Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* - Enzymes, Products, Regulation. **Plant Biology**, v. 8, n. 3, p. 297–306, 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1055/s-2006-923935>>. Acesso em: 30 jun. 2024.

- [77] RICHMOND, Martha E. Glyphosate: A review of its global use, environmental impact, and potential health effects on humans and other species. **Journal of Environmental Studies and Sciences**, v. 8, n. 4, p. 416–434, 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13412-018-0517-2>>. Acesso em: 17 out. 2024.
- [78] DINDA, Biswanath. **Pharmacology and Applications of Naturally Occurring Iridoids**. Cham: Springer International Publishing, 2019. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-05575-2>>. Acesso em: 30 jun. 2024.
- [79] WANG, Congcong; GONG, Xue; BO, Agula; et al. Iridoids: Research Advances in Their Phytochemistry, Biological Activities, and Pharmacokinetics. **Molecules**, v. 25, n. 2, p. 287, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/25/2/287>>. Acesso em: 30 jun. 2024.
- [80] YOON, Seung K. Oleuropein as an Antioxidant and Liver Protect. In: **The Liver**. [s.l.]: Elsevier, 2018, p. 323–335. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128039519000276>>. Acesso em: 9 maio 2024.
- [81] CASTEJÓN, María Luisa; MONTOYA, Tatiana; ALARCÓN-DE-LA-LASTRA, Catalina; et al. Potential Protective Role Exerted by Secoiridoids from *Olea europaea* L. in Cancer, Cardiovascular, Neurodegenerative, Aging-Related, and Immunoinflammatory Diseases. **Antioxidants**, v. 9, n. 2, p. 149, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-3921/9/2/149>>. Acesso em: 18 out. 2024.
- [82] JENSEN, S. Chemotaxonomy of the Oleaceae: iridoids as taxonomic markers. **Phytochemistry**, v. 60, n. 3, p. 213–231, 2002. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031942202001024>>. Acesso em: 1 jul. 2024.
- [83] Disponível em: <<https://treesociety.org.zw/tree-life/132/>>. Acesso em: 1 jul. 2024.
<<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00304947209458270>>. Acesso em: 13 maio 2024.
- [84] BORGES, Cristina M. P.; DIAKANAWMA, Carlos; MENDONÇA, Dina I. M. D. De. Iridoids from *Hymenodictyon floribundum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 6, p. 1121–1125, 2010. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010350532010000600023&lng=en&nrm=iso&tlang=en>. Acesso em: 13 maio 2024.

[85] SOUZA, Diana Meneses; MACHADO, Luciana Lucas; MACHADO, Angelo Henrique Lira. First total synthesis of (\pm)-floribundane B: An approach based on Johnson-Claisen rearrangement of a Morita-Baylis-Hillman adduct. **Tetrahedron Letters**, v. 60, n. 28, p. 1811–1813, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040403919305283>>. Acesso em: 13 maio 2024.

[86] **SOUZA, A. C. B.** *Estudos visando a síntese estereosseletiva de secoiridóides*. 2024. 335 f. Dissertação (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade de Brasília, Instituto de Química, Brasília

[87] FORD, J. H.; MACKELLAR, F. A.; MEULMAN, P. A.; et al. Preparation of calcium elenolate from olive press juice. **Organic Preparations and Procedures International**, v. 4, n. 2, p. 97–104, 1972. Disponível em:

[88] SOUZA, Lucas Soares de. Uso de ancoragem molecular para o entendimento de interações ligante/receptor: investigando o complexo COI1-FB. 2021. Disponível em: <<https://bdm.unb.br/handle/10483/31013>>. Acesso em: 10 maio 2024.

[89] NGUYEN, Tiep; HALLO, Leonie; CHILESHE, Nicholas; et al. Towards a sustainable integrated management approach to uncertainty surrounding COVID-19. **Systems Research and Behavioral Science**, v. 40, n. 6, p. 819–835, 2023. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/sres.2936>>. Acesso em: 11 ago. 2024.

[90] IVANOVA, Larisa; KARELSON, Mati. The Impact of Software Used and the Type of Target Protein on Molecular Docking Accuracy. **Molecules**, v. 27, n. 24, p. 9041, 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/27/24/9041>>. Acesso em: 11 jul. 2024.

[91] **Frequently Asked Questions — Autodock Vina 1.2.0 documentation**. Disponível em: <<https://autodock-vina.readthedocs.io/en/latest/faq.html>>. Acesso em: 12 jul. 2024.