



# Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular)

**CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA 5-ENOLPIRUVILSHIKIMATO-3-  
FOSFATO SINTASE PARA DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR PARA  
DETECÇÃO DE GLIFOSATO**

**DANIEL VIEIRA NEVES**

Brasília, DF

2024



# Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Biologia Celular

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Molecular)

## **Caracterização da enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase para desenvolvimento de biossensor para detecção de glifosato**

**Daniel Vieira Neves**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia Molecular.

**Orientador:** João Alexandre Ribeiro  
Gonçalves Barbosa

Brasília, DF

2024

“... tenho em mim todos os sonhos do mundo.”

Fernando Pessoa

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. João Alexandre Ribeiro Gonçalves Barbosa, pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Também gostaria de fazer um agradecimento especial à Dra. Renata Bueno Vieira, por sua participação durante todas etapas do projeto.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal, agradeço pela liberação de recursos para o desenvolvimento do projeto.

Deixo todo meu respeito e admiração à equipe do Laboratório de Biofísica Molecular, que estiveram presentes na minha construção como cientista desde a minha graduação em Biotecnologia. Também agradeço à parceria criada com a equipe do Laboratório de Estruturas de Micro-ondas e Ondas Milimétricas para desenvolvimento da parte de engenharia do biossensor aqui proposto.

Aos meus amigos e família, pelo incentivo e apoio emocional, saibam que esta etapa não seria possível sem vocês.

Por fim, à minha gata de estimação, que embora não saiba ler, quero deixar registrado que nem seus miados me acordando às 4 da manhã para sair do quarto me impedem de te amar incondicionalmente.

## RESUMO

A 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase (EPSPS, EC 2.5.1.19) é a enzima que catalisa a sexta etapa da via do shikimato, cujo produto final, corismato, é precursor da biossíntese dos aminoácidos aromáticos e, por consequência, da produção de diversos metabólitos secundários necessários às plantas e microrganismos. O glifosato, inibidor da EPSPS, é atualmente o herbicida mais utilizado no Brasil, o que causa um acúmulo deste agroquímico em corpos de água. Embora não haja consenso pelas agências reguladoras, o glifosato é classificado como provável carcinógeno humano pela Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer, além de existirem outros estudos que o sugerem como agente causador de outras comorbidades humanas. Assim, este trabalho se propõe a caracterizar a EPSPS de *Escherichia coli* (*Ec*-EPSPS) para desenvolvimento de um biossensor por ressonância plasmônica de superfície (SPR), visando a detecção do glifosato presente na água. O gene da *Ec*-EPSPS foi clonado em vetores pET-M11 e pET-SUMO, que foram inseridos em bactérias *E. coli* BL21 (DE3) e Rosetta por transformação de choque térmico. Foram realizados testes de expressão da *Ec*-EPSPS em meio LB e ZYM-5052. O clone BL21 (DE3) transformado com pET-M11 expressou a proteína solúvel em meio ZYM-5052. A purificação da proteína foi realizada em duas etapas: cromatografia de afinidade a metal imobilizado, e cromatografia de exclusão molecular. Dados de dicroísmo circular apontam que a *Ec*-EPSPS mantém seu conteúdo de estruturas secundárias entre os pH 4,0 e 9,0, e é termoestável entre 10 °C e 50 °C em pH 7,5. Ensaio de atividade mostram que a *Ec*-EPSPS obtida neste estudo está ativa, apresentando  $K_m$  para shikimato-3-fosfato e fosfoenolpiruvato em  $0,055 \pm 0,018$  mM e  $0,148 \pm 0,023$  mM, respectivamente. A *Ec*-EPSPS é classificada como classe I entre as EPSPS, ou seja, é inibida em concentrações micromolares de glifosato. Isso foi demonstrado por ensaio de inibição, onde o  $IC_{50}$  foi determinado em  $0,016 \pm 0,006$  mM. Todos os dados aqui apresentados quanto à afinidade da *Ec*-EPSPS por seus substratos e inibidor estão de acordo com os encontrados na literatura. Em relação às análises por SPR, foi observado um deslocamento de  $0,75^\circ$  entre os pontos mínimos das curvas de ressonância, que representam o sistema antes e depois da aplicação de *Ec*-EPSPS. Esse deslocamento pode estar relacionado à imobilização da proteína à superfície dos *chips*, através da sua cauda de histidina. Porém, o sistema empregado até então não é capaz de verificar a presença de glifosato em solução, mesmo em concentrações altas. Outros trabalhos publicados na literatura, que utilizaram equipamentos já estabelecidos no mercado, obtiveram resultados mais satisfatórios quanto ao uso de SPR para detecção de glifosato. Os resultados destes são discutidos neste trabalho, a fim de ressaltar o potencial da técnica de SPR para análises ambientais.

**Palavras-chave:** 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase de *Escherichia coli*; glifosato; ressonância plasmônica de superfície; biossensor.

## ABSTRACT

The 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS, EC 2.5.1.19) is the enzyme that catalyzes the sixth step of the shikimate pathway, whose final product, chorismate, is a precursor to the biosynthesis of aromatic amino acids and, consequently, to the production of several secondary metabolites necessary for plants and microorganisms. Glyphosate, an EPSPS inhibitor, is currently the most widely used herbicide in Brazil, leading to an accumulation of this agrochemical in water sources. Although there is no consensus among regulatory agencies, glyphosate is classified as a probable human carcinogen by the International Agency for Research on Cancer, in addition to other studies suggesting its involvement in other human comorbidities. Thus, this work aims to characterize the EPSPS of *Escherichia coli* (*Ec*-EPSPS) for the development of a biosensor by surface plasmon resonance (SPR), targeting the detection of glyphosate present in water. The gene of *Ec*-EPSPS was cloned into pET-M11 and pET-SUMO vectors, which were inserted into *E. coli* BL21 (DE3) and Rosetta bacteria through thermal shock transformation. Expression tests of *Ec*-EPSPS were conducted in LB and ZYM-5052 media. The BL21 (DE3) clone transformed with pET-M11 expressed the soluble protein in ZYM-5052 medium. The protein purification was carried out in two steps: immobilized metal affinity chromatography and size exclusion chromatography. Circular dichroism data indicate that *Ec*-EPSPS maintains its content of secondary structures between pH 4.0 and 9.0, and it is thermostable between 10 °C and 50 °C, at pH 7.5. Activity assays show that the *Ec*-EPSPS obtained in this study is active, presenting  $K_m$  values for shikimate-3-phosphate and phosphoenolpyruvate of  $0.055 \pm 0.018$  mM and  $0.148 \pm 0.023$  mM, respectively. *Ec*-EPSPS is classified as class I among EPSPS enzymes, meaning it is inhibited at micromolar concentrations of glyphosate. This was demonstrated by inhibition assay, where the  $IC_{50}$  was  $0.016 \pm 0.006$  mM. All data presented here regarding the affinity of *Ec*-EPSPS for its substrates and inhibitor are in accordance with those found in the literature. Regarding the SPR analyses, a displacement of  $0.75^\circ$  was observed between the minimum points of the resonance curves, which represent the system before and after the application of *Ec*-EPSPS. This displacement may be related to the immobilization of the protein on the chip surface, through its his-tag. However, the system used so far is not capable of detecting the presence of glyphosate in solution, even at high concentrations. Other works published in the literature, which utilized equipments already established in the market, achieved more satisfactory results regarding the use of SPR for glyphosate detection. The results of these studies are discussed in this work in order to highlight the potential use of the SPR technique for environmental analysis.

**Keywords:** 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*; glyphosate; surface plasmon resonance; biosensor.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Reação catalisada pela EPSPS. Fonte: adaptada de Funke et al. (2009). ..... 19

**Figura 2** – Representação da via do shikimato (setas verdes), e subsequente produção dos aminoácidos aromáticos em plantas: triptofano (Trp) - em azul; tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe) – em vermelho. Abreviações de enzimas, por ordem alfabética: ADH, arogenato dehidrogenase; ADT, arogenato desidratase; As $\alpha$ , subunidade alfa da antranilato sintase; As $\beta$ , subunidade beta da antranilato sintase; CdRP, 1-(o-carboxifenilamino)-1-deoxirribulose 5-fosfato; CM, corismato mutase; CS, corismato sintase; DAHP sintase, 3-deoxi-d-arabino-heptulose 7-fosfato sintase; DHD, 3-dehidroquinato desidratase; DHQS, 3-dehidroquinato sintase; EPSP sintase, 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintase; HPP-AT, 4-hidroxifenilpiruvato aminotransferase; IGPS, indol-3-glicerol fosfato sintase; PAI, fosforribosil antranilato isomerase; PAT, fosforribosil antranilato transferase; PDH, pefenato dehidrogenase; PDT, pefenato desidratase; PPA-AT, pefenato aminotransferase; PPY-AT, fenilpiruvato aminotransferase; SDH, shikimato dehidrogenase; SK, shikimato quinase; TS $\alpha$ , subunidade  $\alpha$  da triptofano sintase; TS $\beta$ , subunidade  $\beta$  da triptofano sintase. Outras abreviações: CdRP, 1-(o-carboxifenilamino)-1-deoxirribulose 5-fosfato; EP4, eritrose 4-fosfato; Gln, glicina; Glu, glutamato; G3P, gliceraldeído-3-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; Pi, fosfato inorgânico; PPi, pirofosfato inorgânico;  $\alpha$ -KG,  $\alpha$ -cetoglutarato. Fonte: adaptada de Maeda & Dudareva (2012). ..... 20

**Figura 3** – Representação de densidade eletrônica de duas possíveis conformações da molécula de glifosato. Ao interagir com a CP4-EPSPS com mutação A100G (direita), o glifosato adota uma conformação idêntica a observada na *Ec*-EPSPS. Já na estrutura de CP4-EPSPS “selvagem” (esquerda), a molécula de glifosato é encurtada em aproximadamente 0,6 Å, devido à rotação em torno da ligação C-N ao lado do grupo carboxila. Fonte: Funke et al. (2006). ..... 22

**Figura 4** – Representação da *Ec*-EPSPS em conformação aberta e fechada. **A)** *Ec*-EPSPS livre de ligantes na conformação aberta, obtida por modelagem comparativa a partir da *Kb*-EPSPS. **B)** *Ec*-EPSPS na conformação fechada, interagindo com S3P e glifosato (PDB 1G6S). **C)** Superposição da *Ec*-EPSPS em conformação aberta (A) e fechada (B) – RMSD = 2,26 Å. *Ec*-EPSPS representada em *cartoon*, ciano e verde nas conformações aberta e fechada, respectivamente. S3P e glifosato representados em *sticks*, nas cores

amarelo e vermelho, respectivamente. Imagens feitas no *Pymol* versão 2.2.2. Fonte: elaborada pelo autor..... 24

**Figura 5** - Representação da *Ec*-EPSPS em conformação aberta e fechada. **A)** *Ec*-EPSPS livre de ligantes na conformação aberta obtida por modelagem comparativa a partir da *Kb*-EPSPS. **B)** *Ec*-EPSPS na conformação fechada, interagindo com shikimato, e glifosato (PDB: 2AAY). **C)** Superposição da *Ec*-EPSPS em conformação aberta (A) e fechada (B) – RMSD = 2,30 Å. *Ec*-EPSPS representada em *cartoon*, ciano e verde nas conformações aberta e fechada, respectivamente. Shikimato e glifosato representados em *sticks* nas cores azul e vermelho, respectivamente. Imagens feitas no *Pymol* versão 2.2.2. Fonte: elaborada pelo autor. .... 25

**Figura 6** - Fórmula estrutural do glifosato..... 26

**Figura 7** – Representação esquemática de um sistema de SPR. Nela, observa-se a interação de um analito em solução, ao seu ligante imobilizado na superfície de ouro do chip acoplado a um prisma. Essa interação causa uma queda na intensidade da luz incidente refletida sob TIR. Por sua vez, a queda na intensidade desvia o ângulo ressonância ( $\Theta$ ) para a direita, que é uma representação direta do índice de refração do meio oposto ao da luz incidente. Fonte: adaptada de Hahnefeld et. al. (2004). .... 31

**Figura 8** – **A)** Resultado após digestão dos vetores pET-LIC por BsaI, e amplificação por PCR excluindo o gene de GFP. Da esquerda para a direita do gel: MM) marcador molecular de DNA; M11) digestão do vetor pET-M11; SUMO) digestão do vetor pET-SUMO. **B)** Resultado da amplificação do gene de interesse. Da esquerda para a direita do gel: MM) marcador molecular de DNA; EPSPS) amplificação do gene da EPSPS. Fonte: elaborada pelo autor..... 47

**Figura 9** - **A)** Resultado após anelamento de vetor pET-M11 com gene da *Ec*-EPSPS e transformação em *E. coli* DH5 $\alpha$ . Da esquerda para a direita: MM) marcador molecular de DNA; Cn) colônia n de *E. coli* DH5 $\alpha$ , sendo “n” um número designado para cada colônia encontrada. **B)** Resultado após anelamento de vetor pET-SUMO com gene da *Ec*-EPSPS e transformação em *E. coli* DH5 $\alpha$ . Da esquerda para a direita: MM) marcador molecular de DNA; Cn) colônia n de *E. coli* DH5 $\alpha$ , sendo “n” um número designado para cada colônia encontrada. Fonte: elaborada pelo autor. .... 48

**Figura 10** - Géis SDS-PAGE 12 % referente às construções de pET-M11 (**A**) e pET-SUMO (**B**) em *E. coli* BL21 (DE3). Da esquerda para a direita temos: MM) marcador molecular de proteínas; 1) fração insolúvel pós-lise celular da expressão em meio LB; 2) fração solúvel pós-lise celular da expressão em meio LB; 3) fração insolúvel pós-lise

celular da expressão em meio ZYM-5052; 4) fração solúvel pós-lise celular da expressão em meio ZYM-5052; 5) fração insolúvel pós-lise celular do grupo controle em meio LB; 6) fração solúvel pós-lise celular do grupo controle em meio LB; 7) fração insolúvel pós-lise celular do grupo controle em meio ZYM-5052; 8) fração solúvel pós-lise celular do grupo controle em meio ZYM-5052. Destacado em vermelho, está a banda referente à *Ec*-EPSPS. Fonte: elaborada pelo autor. .... 49

**Figura 11** - Géis de SDS-PAGE 12 % referentes às construções de pET-M11 (A) e pET-SUMO (B) em *E. coli* Rosetta (DE3). Da esquerda para a direita temos: MM) marcador molecular de proteínas; 1) fração insolúvel pós-lise celular da expressão em meio LB; 2) fração solúvel pós-lise celular da expressão em meio LB; 3) fração insolúvel pós-lise celular da expressão em meio ZYM-5052; 4) fração solúvel pós-lise celular da expressão em meio ZYM-5052; 5) fração insolúvel pós-lise celular do grupo controle em meio LB; 6) fração solúvel pós-lise celular do grupo controle em meio LB; 7) fração insolúvel pós-lise celular do grupo controle em meio ZYM-5052; 8) fração solúvel pós-lise celular do grupo controle em meio ZYM-5052. Destacado em vermelho, está a banda referente à *Ec*-EPSPS. Fonte: elaborada pelo autor. .... 50

**Figura 12** - Cromatografia de afinidade a metal imobilizado ( $\text{Ni}^{2+}$ ). No gráfico é possível observar quatro marcações numéricas, representando picos na absorbância em 280 nm: 1) adição de 25 mM de imidazol; 2) adição de 50 mM de imidazol; 3) adição de 100 mM de imidazol; 4) adição de 500 mM de imidazol. Fonte: elaborada pelo autor. .... 51

**Figura 13** - Gel de SDS-PAGE 12 %. No gel temos, da esquerda para a direita: MM) marcador molecular de proteínas; 1) fração insolúvel pós-lise celular; 2) fração solúvel pós-lise celular aplicada na coluna; 3) *flow through* da purificação; 4) pico na absorbância em 280 nm com adição de 25 mM de imidazol; 5) pico na absorbância em 280 nm com adição de 50 mM de imidazol; 6) pico na absorbância em 280 nm com adição de 100 mM de imidazol; 7) pico na absorbância em 280 nm com adição de 250 mM de imidazol; 8) pico na absorbância em 280 nm com adição de 500 mM de imidazol; 9) lavagem da coluna com 500 mM de imidazol. Fonte: elaborada pelo autor. .... 51

**Figura 14** – A) Cromatografia de exclusão molecular referente à amostra eluída em 100 mM de imidazol. No gráfico é possível observar duas marcações numéricas, representando: 1) pico 1 da exclusão molecular eluído entre 45 e 55 mL; 2) pico 2 da exclusão molecular eluído entre 55 e 75 mL. B) Cromatografia de exclusão molecular referente à amostra eluída em 250 mM de imidazol. No gráfico é possível observar duas marcações numéricas, representando: 1) pico 1 da exclusão molecular eluído entre 40 e

55 mL; 2) pico 2 da exclusão molecular eluído entre 55 e 70 mL. Fonte: elaborada pelo autor..... 53

**Figura 15** - No gel de SDS-PAGE 12 % temos, da esquerda para a direita: MM) marcador molecular de proteínas; 1) pico 1 da exclusão molecular referente à amostra eluída em 100 mM de imidazol; 2) pico 2 da exclusão molecular referente à amostra eluída em 100 mM de imidazol; 3) pico 1 da exclusão molecular referente à amostra eluída em 250 mM de imidazol; 4) pico 2 da exclusão molecular referente à amostra eluída em 250 mM de imidazol. Fonte: elaborada pelo autor. .... 54

**Figura 16** – Espectros de CD (260 – 190 nm) a 25 °C em tampão 5 mM: acetato de sódio (pH 4,0); e Tris-HCl (pH 7,5; pH 9,0). Fonte: elaborada pelo autor..... 55

**Figura 17** – Espectros de CD na região do UV distante de: *Ec*-EPSPS sem mutações (1), *Ec*-EPSPS G96A (2), *Ec*-EPSPS A183T (3), e *Ec*-EPSPS G96A/A183T (4). Concentração das proteínas: 0,2 mg/mL. Fonte: adaptada de Haghani et. al. (2008). ... 57

**Figura 18** - Espectros de CD (260 – 190 nm) a 25 °C da concentração hipotética da *Ec*-EPSPS (~ 0,075 mg/mL) em tampão 5 mM: acetato de sódio (pH 4,0); e Tris-HCl (pH 7,5; pH 9,0). Fonte: elaborada pelo autor. .... 57

**Figura 19** - Análises de dicroísmo circular da *Ec*-EPSPS em 5 mM de tampão Tris-HCl pH 7,5, variando-se a temperatura de 10 °C a 90 °C. **A)** Espectros de dicroísmo circular na região distante do UV (190 nm a 260 nm) da *Ec*-EPSPS, sob variação de temperatura. **B)** Medidas de dicroísmo circular a 222 nm da *Ec*-EPSPS, sob variação de temperatura. Fonte: elaborada pelo autor. .... 59

**Figura 20** – Curva de desnaturação térmica a 222 nm da *Ec*-EPSPS, sob variação de temperatura de 10 °C a 90 °C. A temperatura de transição ( $T_m$ ) da *Ec*-EPSPS, estimada a partir das curvas ajustadas, foi de 66,4 °C. Fonte: elaborada pelo autor..... 60

**Figura 21** – Concentração de fosfato inorgânico ( $\mu$ M) liberado pela *Ec*-EPSPS variando-se as concentrações de substrato da *Ec*-EPSPS. **A)** Concentração de S3P variando de 0,00 mM a 0,30 mM. PEP fixado em 0,50 mM. **B)** Concentração de PEP variando de 0,00 mM a 0,50 mM. S3P fixado em 0,30 mM. Dados aplicados à equação 4 gerando  $K_m$  de 0,055 mM (S3P) e 0,148 mM (PEP). Fonte: elaborada pelo autor..... 61

**Figura 22** - Atividade enzimática (U/mg) da *Ec*-EPSPS sem mutações sob variadas concentrações de substrato, PEP a 1 mM (**A**) e S3P a 1 mM (**B**). Dados de  $K_m$  apresentados na Tabela 5. Fonte: adaptada de Eschenburg et. al. (2002). .... 61

**Figura 23** – Porcentagem de inibição da *Ec*-EPSPS por glifosato. *Ec*-EPSPS testada na presença de 0,300 mM de S3P, 0,600 mM de PEP (= 4,05 $\times$  $K_m$ ) e concentrações crescentes

de glifosato. Dados aplicados à equação 7 gerando um $IC_{50}$ de 0,016 mM ( $I(\%)_{max} = 99,07\%$ ; $I(\%)_{min} = 1,50\%$ ). Fonte: elaborada pelo autor. ....	64
<b>Figura 24</b> – Comparação das curvas de inibição da <i>Ec</i> -EPSPS pelo glifosato: <i>Ec</i> -EPSPS sem mutações (•); P101S (○); T97I (▲); TIPS (△). Valores de $IC_{50}$ obtidos (Tabela 9) em condições de saturação de S3P (1 mM) e concentrações de PEP equivalentes aos seus valores de $K_m$ . Fonte: adaptada de Funke et. al. (2009). ....	66
<b>Figura 25</b> – Espectros de ressonância entre as diferentes soluções aplicadas ao sistema de SPR. Seguindo a ordem descrita na legenda da imagem: H <sub>2</sub> O (azul); NiSO <sub>4</sub> (ciano escuro); primeira passagem de tampão HBS-EPS (laranja); <i>Ec</i> -EPSPS a 0,1 mg/mL (ciano); segunda passagem de tampão HBS-EPS (laranja tracejado); glifosato a 50 mM (vermelho). Fonte: elaborada pelo autor.....	68
<b>Figura 26</b> – A) Espectro de ressonância da primeira passagem de tampão HBS-EPS. B) Aproximação da região em que se observa o ponto mínimo de P (mW), em 0,367. O ângulo $\Theta$ correspondente ao ponto mínimo, em 78,00°, está registrado na imagem. Fonte: elaborada pelo autor.....	69
<b>Figura 27</b> – A) Espectro de ressonância da aplicação de <i>Ec</i> -EPSPS a 0,1 mg/mL. B) Aproximação da região em que se observa o ponto mínimo de P (mW), em 0,380. O ângulo $\Theta$ correspondente ao ponto mínimo, em 78,45° ± 0,27°, está registrado na imagem. Fonte: elaborada pelo autor. ....	70
<b>Figura 28</b> – A) Espectro de ressonância da segunda passagem de tampão HBS-EPS. B) Aproximação da região em que se observa o ponto mínimo de P (mW), em 0,362. O ângulo $\Theta$ correspondente ao ponto mínimo, em 78,75°, está registrado na imagem. Fonte: elaborada pelo autor.....	71
<b>Figura 29</b> - A) Espectro de ressonância da aplicação de glifosato a 50 mM. B) Aproximação da região em que se observa o ponto mínimo de P (mW), em 0,379. O ângulo $\Theta$ correspondente ao ponto mínimo, em 78,10° ± 0,12°, está registrado na imagem. Fonte: elaborada pelo autor. ....	72
<b>Figura 30</b> - Representação esquemática da estrutura primária da quitosana, sendo “n” o grau de polimerização. Fonte: adaptada de Assis et. al. (2003). ....	73
<b>Figura 31</b> - Alinhamento da sequência de <i>Ec</i> -EPSPS com a de <i>Kp</i> -EPSPS. Imagem gerada pelo servidor ESPript ( <a href="https://escript.ibcp.fr/">https://escript.ibcp.fr/</a> ).....	87
<b>Figura 32</b> - Gráfico de Ramachandran do modelo de <i>Ec</i> -EPSPS gerado por homologia à <i>Kp</i> -EPSPS, através do software Modeller.....	88

- Figura 33 - A)** Superposição da Ec-EPSPS em conformação aberta (ciano), livre de ligantes, à Ec-EPSPS em conformação fechada (verde), interagindo com S3P e glifosato. **B)** Superposição dos domínios superiores da Ec-EPSPS em conformação aberta e fechada – RMSD = 0,514 Å. **C)** Superposição dos domínios inferiores da Ec-EPSPS em conformação aberta e fechada – RMSD = 0,500 Å. Desenhos feitos no Pymol versão 2.2.2. S3P e glifosato representados em sticks nas cores amarelo e vermelho, respectivamente. Fonte: elaborada pelo autor. .... 89
- Figura 34 - A)** Superposição da Ec-EPSPS em conformação aberta (ciano), livre de ligantes, à Ec-EPSPS em conformação fechada (verde), interagindo com shikimato e glifosato. **B)** Superposição dos domínios superiores da Ec-EPSPS em conformação aberta e fechada – RMSD = 0,491 Å. **C)** Superposição dos domínios inferiores da Ec-EPSPS em conformação aberta e fechada – RMSD = 0,504 Å. Desenhos feitos no Pymol versão 2.2.2. Shikimato e glifosato representados em sticks nas cores azul e vermelho, respectivamente. Fonte: elaborada pelo autor. .... 90
- Figura 35 -** Emissão de fluorescência de *Ec*-EPSPS em água ultrapura (tipo 1) e na presença de 150 mM de NaCl e 0,1 % de tween 20 a 25°C. As marcações numéricas indicam as bandas de emissão para tirosina em aproximadamente 312 nm (1) e triptofano em 330 nm (2). .... 91
- Figura 36 -** Espectro de emissão de lisozima na concentração 0,03 mg/mL em água deionizada, obtido com excitação em 295 nm. A banda em aproximadamente 335 nm corresponde a emissão do triptofano, localizado em ambiente parcialmente exposto ao solvente. .... 92
- Figura 37 -** Curva padrão da absorbância em 620 nm de fosfato inorgânico, variando-se a concentração de 0,0 µM a 40 µM. .... 93

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores de PCR, planejados para amplificação de segmentos gênicos de interesse. Destacados em negrito estão as caudas salientes compatíveis com o sistema LIC empregado. Os códons de início e término estão sublinhados. ....	34
<b>Tabela 2</b> - Parâmetros utilizados para digestão dos vetores de clonagem. ....	35
<b>Tabela 3</b> - Parâmetros utilizados para amplificação dos vetores linearizados. ....	35
<b>Tabela 4</b> - Parâmetros utilizados no tratamento com T4 DNA polimerase. ....	36
<b>Tabela 5</b> - Percentual de estruturas secundárias da <i>Ec</i> -EPSPS variando-se o pH. Dados obtidas pelo programa de deconvolução CDNN. ....	55
<b>Tabela 6</b> - Comparação da porcentagem de estruturas secundárias da <i>Ec</i> -EPSPS em diferentes modelos. ....	56
<b>Tabela 7</b> - Percentual de estruturas secundárias da <i>Ec</i> -EPSPS, com a concentração da proteína corrigida, variando-se o pH. Para fins de comparação, também estão presentes os dados experimentais publicados por Haghani et. al. (2008). Dados obtidas pelo programa de deconvolução CDNN. ....	58
<b>Tabela 8</b> – Dados publicados até 02/03/2024 quanto aos parâmetros enzimáticos da <i>Ec</i> -EPSPS sem mutações, obtidos pelo método de Lanzetta (como descrito neste trabalho). ....	63
<b>Tabela 9</b> – Comparação de parâmetros cinéticos da <i>Ec</i> -EPSPS sem e com mutações na P101. Fonte: Adaptado de Healy-Fried et al. (2007). ....	65
<b>Tabela 10</b> - Comparação de parâmetros cinéticos da <i>Ec</i> -EPSPS sem e com mutações: P101S; T97I; TIPS. Fonte: Adaptado de Funke et. al. (2009). ....	65
<b>Tabela 11</b> – Pontos mínimos dos espectros de ressonância plasmônica de superfície e seus respectivos ângulos. ....	68
<b>Tabela 12</b> – Dados brutos do ensaio de atividade da <i>Ec</i> -EPSPS por seus substratos (S3P e PEP). ....	94
<b>Tabela 13</b> – Dados brutos do ensaio de inibição da <i>Ec</i> -EPSPS pelo glifosato. ....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	Ácido aminometilfosfânico
CD	Dicroísmo Circular, do inglês <i>Circular Dichroism</i>
<i>Chi</i> -SPR	Sensor de glifosato por SPR à base de quitosana
CP4-EPSPS	EPSPS de <i>Agrobacterium</i> CP4
DO <sub>600nm</sub>	Densidade óptica medida a 600 nm
<i>Ec</i> -EPSPS	EPSPS de <i>Escherichia coli</i>
EPSP	5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato
EPSPS	5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase
EU	União Europeia, do inglês <i>European Union</i>
GFP	Proteína fluorescente verde, do inglês <i>Green Fluorescent Protein</i>
HER2	Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano, do inglês “ <i>Human epidermal growth factor receptor 2</i> ”
IARC	Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer
IMAC	Cromatografia de Afinidade a Metal Imobilizado
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
<i>Kp</i> -EPSPS	EPSPS de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
LD	Limite de Detecção
LIC	Sistema de Clonagem de Ligação Independente
NTA-SAM	Monocamadas auto-montadas de ácido nitrilotriacético
<i>Oli</i> -SPR	Sensor de glifosato por SPR à base de oligopeptídeo
P (mW)	Potência Refletida em miliWatts
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEP	Fosfoenolpiruvato
Pi	Fosfato inorgânico
PMSF	Fluoreto de fenilmetanosulfonil
PSA	Antígeno específico da próstata, do inglês “ <i>Prostate specific antigen</i> ”
RCF	Força Centrífuga Relativa

S3P	Shikimato-3-fosfato
SPR	Ressonância Plasmônica de Superfície, do inglês “ <i>Surface plasmon resonance</i> ”
TIR	Reflexão Interna Total
ZnO	Óxido de Zinco

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	18
1.1. 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase (EPSPS)	19
1.2. Glifosato	26
1.3. Ressonância plasmônica de superfície (SPR)	30
<b>2. OBJETIVOS</b>	33
2.1. Objetivo geral	33
2.2. Objetivos específicos	33
<b>3. METODOLOGIA</b>	34
3.1. Clonagem dos fragmentos gênicos codificantes da proteína de interesse	34
3.1.1. Preparo dos vetores	34
3.1.2. Preparo dos fragmentos gênicos de interesse	35
3.1.3. Tratamento com T4 DNA polimerase, transformação em células competentes e extração do DNA plasmidial recombinante	36
3.1.4. Testes de expressão	37
3.2. Purificação da proteína <i>Ec</i> -EPSPS	38
3.2.1. Expressão da <i>Ec</i> -EPSPS e lise celular	38
3.2.2. Cromatografia de afinidade a metal imobilizado ( $\text{Ni}^{2+}$ )	38
3.2.3. Cromatografia de exclusão molecular	39
3.3. Quantificação da proteína	39
3.4. Análise da estrutura secundária e termoestabilidade da <i>Ec</i> -EPSPS por dicroísmo circular	40
3.5. Determinação dos Parâmetros de Atividade da <i>Ec</i> -EPSPS	41
3.5.1. Afinidade da <i>Ec</i> -EPSPS por seus substratos	41
3.5.2. Sensibilidade da <i>Ec</i> -EPSPS pelo glifosato	43
3.6. Experimentos com o sensor de SPR para detecção de glifosato	44
3.6.1. Preparo dos <i>chips</i>	44
3.6.2. Análises no sensor de SPR	45
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	47
4.1. Clonagem dos fragmentos gênicos codificantes da proteína de interesse	47
4.1.1. Preparo dos vetores e fragmentos gênicos de interesse	47
4.1.2. Tratamento com T4 DNA polimerase, transformação em células competentes e extração do DNA plasmidial recombinante	48
4.1.3. Testes de Expressão	48
4.2. Purificação da <i>Ec</i> -EPSPS	50

4.2.1.	Cromatografia de afinidade a metal imobilizado ( $\text{Ni}^{2+}$ ).....	50
4.2.2.	Cromatografia de exclusão molecular .....	52
4.3.	Análise da estrutura secundária e termoestabilidade da <i>Ec</i> -EPSPS por dicroísmo circular .....	54
4.3.1.	Análise da estrutura secundária em diferentes pH.....	54
4.3.2.	Termoestabilidade da <i>Ec</i> -EPSPS.....	58
4.4.	Determinação dos parâmetros de atividade da <i>Ec</i> -EPSPS.....	60
4.4.1.	Afinidade da <i>Ec</i> -EPSPS por seus substratos .....	60
4.4.2.	Sensibilidade da <i>Ec</i> -EPSPS pelo glifosato .....	64
	Análises no sensor de SPR.....	67
5.	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	75
6.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	77
	ANEXO I.....	87
	ANEXO II .....	88
	ANEXO III .....	89
	ANEXO IV .....	91
	ANEXO V .....	93
	ANEXO VI.....	94
	ANEXO VII.....	95
	ANEXO VIII .....	96

## 1. INTRODUÇÃO

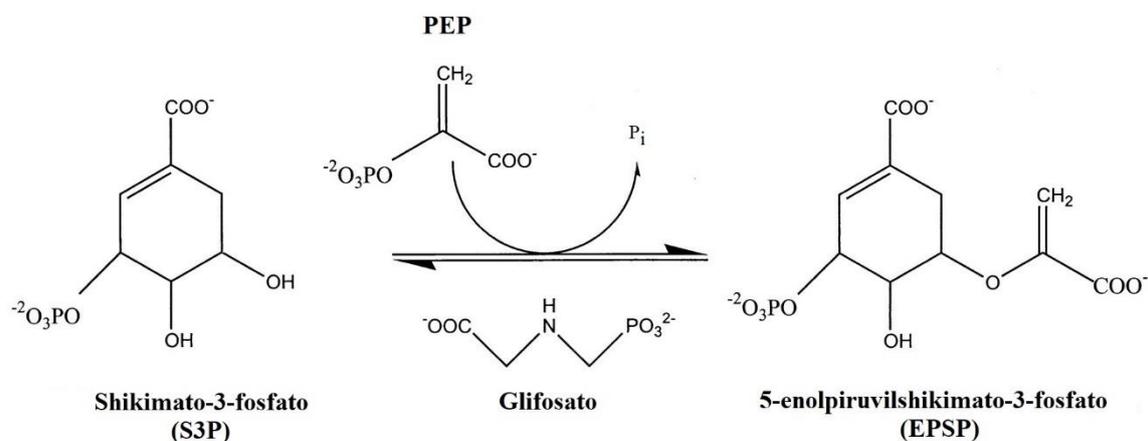
Atualmente, o Brasil é um país dependente do agronegócio, sendo o terceiro maior exportador mundial de produtos agropecuários. Ademais, segundo relatório do Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Cepea) da Universidade São Paulo, em associação com Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA), o Produto Interno Bruto (PIB) do agronegócio brasileiro cresceu cerca de 0,5 % de janeiro a setembro de 2023. Assim, estimou-se que ao final de 2023, o PIB deste setor representou cerca de R\$ 2,63 trilhões, respondendo por 24,4 % do PIB brasileiro. Parte deste sucesso pode ser atribuído à produção em larga escala de plantas transgênicas, como a soja *Roundup Ready*, resistente ao pesticida glifosato, comercializada pela Monsanto.

O glifosato é um agrotóxico, classificado como herbicida, e empregado na eliminação de plantas invasoras em cultivos, as quais são capazes de induzir perda na produtividade (Embrapa, 2023). Seu mecanismo de ação consiste na inibição da enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase (EPSPS), o que causa um bloqueio na produção de aminoácidos aromáticos, necessários à sobrevivência das plantas, que podem morrer em questão de semanas após aplicação de tal agroquímico, caso não sejam resistentes (Herrmann & Weaver, 1999). Entretanto, devido à utilização em larga escala do glifosato no Brasil e no mundo, e tendo em vista a sugestão de que este agroquímico possa causar algumas comorbidades humanas, estudos ambientais apresentam dados preocupantes quanto à sua acumulação em corpos de águas, que são utilizados para abastecimento de parte da população brasileira (Mendonça et al., 2020).

Assim, o monitoramento ambiental do glifosato é de interesse da sociedade, e aplicações biotecnológicas, como o uso de biossensores, podem ser utilizadas para tal fim. Idealmente, são utilizadas moléculas altamente específicas acopladas ao sensor, para se obter uma detecção mais seletiva e sensível ao analito de interesse (Bhalla et al., 2016). Assim, é possível propor a utilização da EPSPS, proveniente de um organismo não resistente ao glifosato, como meio de detecção do glifosato em soluções aquosas.

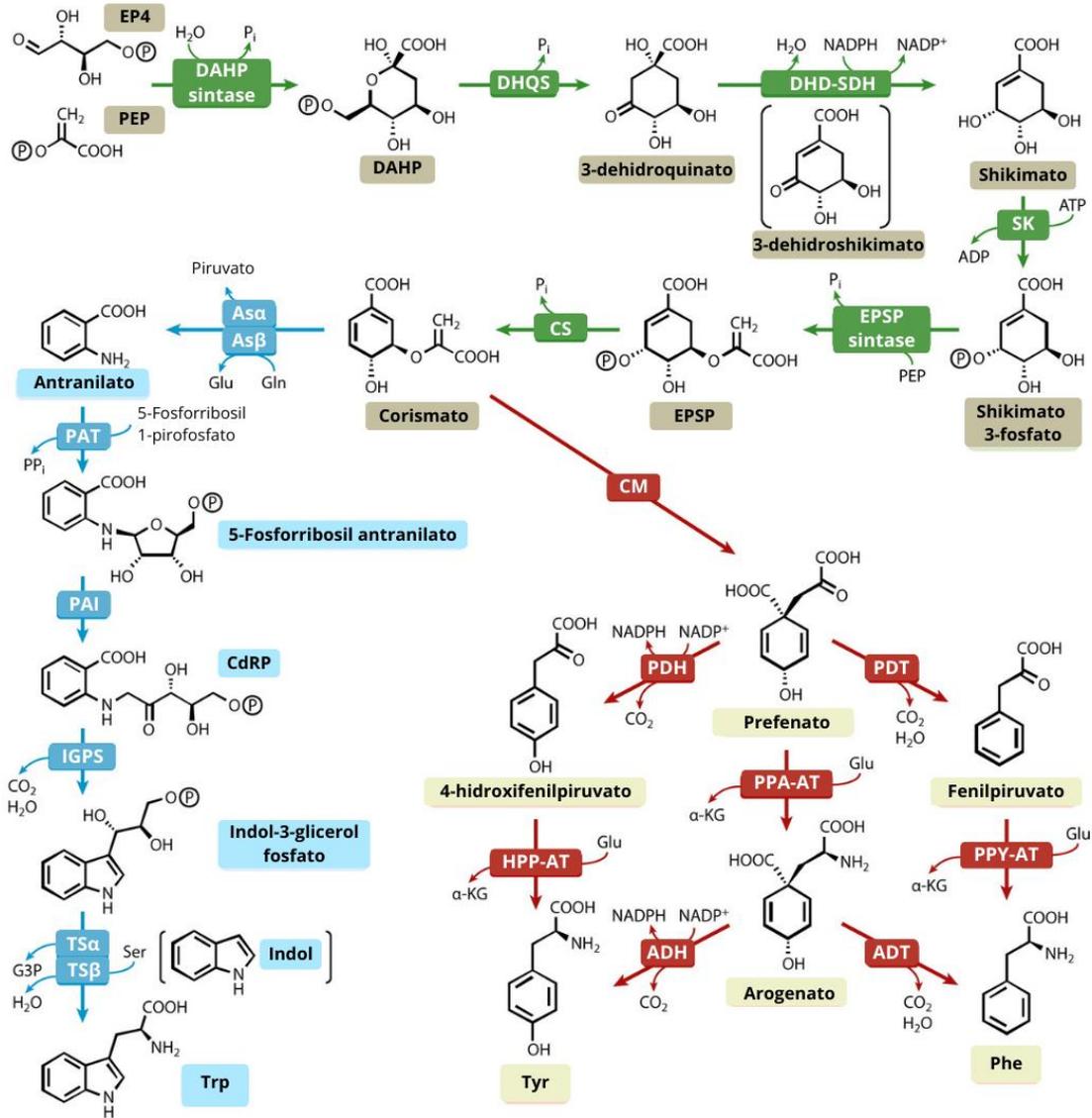
### 1.1. 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase (EPSPS)

A EPSPS (também chamada de 3-fosfoshikimato 1-carboxiviniltransferase, EC 2.5.1.19) é uma enzima monomérica, de aproximadamente 46 kDa, que catalisa a sexta etapa da via do shikimato. Ela transfere a porção enolpiruvil do fosfoenolpiruvato (PEP) à posição 5-hidróxi do shikimato-3-fosfato (S3P), assim produzindo o 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) e liberando fosfato inorgânico (Figura 1). Esta reação não é comum dentre as proteínas que utilizam o PEP como substrato, uma vez que, a EPSPS cliva a ligação C-O ao invés da ligação P-O. O glifosato é um inibidor competitivo em relação ao PEP (Schönbrunn et al., 2001; Walsh et al., 1996).



**Figura 1** - Reação catalisada pela EPSPS. Fonte: adaptada de Funke et al. (2009).

A via do shikimato (Figura 2) foi inicialmente descrita por Bernhard Davis, David Sprinson e seus colaboradores, com sete etapas enzimáticas que modificam fosfoenolpiruvato e eritrose-4-fosfato em corismato, sendo este último o precursor da biossíntese de fenilalanina, tirosina e triptofano (Herrmann, 1995). Por consequência, esta via também está envolvida na produção de diversos metabólitos secundários aromáticos necessários ao crescimento, desenvolvimento, reprodução, defesa e respostas ambientais em plantas (Maeda & Dudareva, 2012). Além de plantas, essa via está presente em bactérias, fungos, algas, protozoários, e ausente em mamíferos (Herrmann & Weaver, 1999). A ausência da via do shikimato em humanos é um fator decisivo no desenvolvimento de agroquímicos voltados para sua inibição, uma vez que, em teoria, a utilização de tais agroquímicos não nos causaria efeitos adversos.



**Figura 2** – Representação da via do shikimato (setas verdes), e subsequente produção dos aminoácidos aromáticos em plantas: triptofano (Trp) - em azul; tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe) – em vermelho. Abreviações de enzimas, por ordem alfabética: ADH, arogenato dehidrogenase; ADT, arogenato desidratase; Asa, subunidade alfa da antranilato sintase; Asβ, subunidade beta da antranilato sintase; CdRP, 1-(o-carboxifenilamino)-1-deoxirribulose 5-fosfato; CM, corismato mutase; CS, corismato sintase; DAHP sintase, 3-deoxi-d-arabino-heptulose 7-fosfato sintase; DHD, 3-dehidroquinato desidratase; DHQS, 3-dehidroquinato sintase; EPSP sintase, 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintase; HPP-AT, 4-hidroxifenilpiruvato aminotransferase; IGPS, indol-3-glicerol fosfato sintase; PAI, fosforribosil antranilato isomerase; PAT, fosforribosil antranilato transferase; PDH, prefenato dehidrogenase; PDT, prefenato desidratase; PPA-AT, prefenato aminotransferase; PPY-AT, fenilpiruvato aminotransferase; SDH, shikimato dehidrogenase; SK, shikimato quinase; TSα, subunidade α da triptofano sintase; TSβ, subunidade β da triptofano sintase. Outras abreviações: CdRP, 1-(o-carboxifenilamino)-1-deoxirribulose 5-fosfato; EP4, eritrose 4-fosfato; Gln, glicina; Glu, glutamato; G3P, gliceraldeído-3-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; Pi, fosfato inorgânico; PPI, pirofosfato inorgânico; α-KG, α-cetoglutarato. Fonte: adaptada de Maeda & Dudareva (2012).

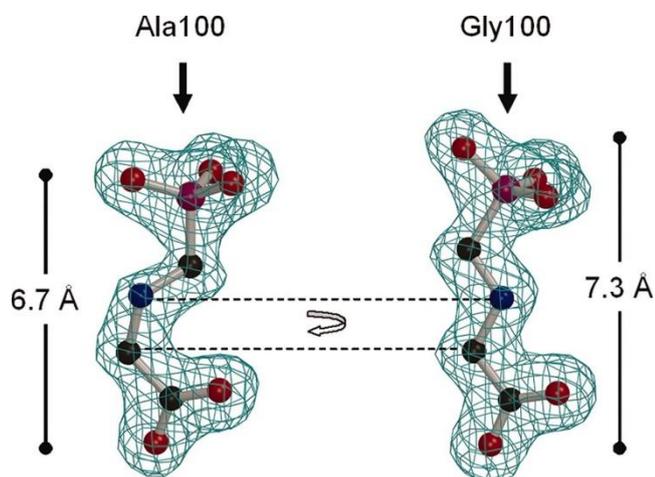
O desenvolvimento de agroquímicos direcionados a plantas invasoras em cultivares é de suma importância para evitar a perda de produtividade, que em média varia de 13 % a 15 % de grãos em áreas em que controles de pragas não são aplicados (Embrapa, 2023). Nesse contexto, o uso de agroquímicos, tais como o glifosato, auxiliam no controle de plantas invasoras no manejo agrícola, promovendo aumento de produtividade.

O organofosforado glifosato é um agroquímico, análogo a um estado de transição do PEP (Duke & Powles, 2008), classificado como herbicida de alto espectro, não seletivo, vendido sob patente pela Monsanto de 1974 a 2000. À expiração da patente, novas formulações genéricas passaram a ser comercializadas (de Castilhos Ghisi et al., 2020). O glifosato é autorizado para uso no Brasil em diversas culturas, como: abacate, banana, café, feijão, mandioca, soja, e trigo, dentre outros. (Anvisa, 2023).

Referente à sensibilidade intrínseca ao glifosato, a EPSPS de diferentes organismos pode ser classificada em classe I ou classe II. Em enzimas da classe I, encontradas na maioria das plantas e em bactérias como a *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, a atividade catalítica é inibida em baixas concentrações micromolares de glifosato. Por outro lado, em enzimas da classe II, encontradas em algumas espécies bacterianas, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, e cepas de *Agrobacterium sp.* CP4, a atividade catalítica é mantida mesmo na presença de concentrações elevadas de glifosato (Funke et al., 2009).

Dentre as EPSPS catalogadas como classe II, destaca-se a de *Agrobacterium sp.* CP4, que foi utilizada no desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes ao glifosato, sendo soja a primeira (Padgett et al., 1995). Ao expressar a CP4-EPSPS, a soja transgênica sobrevive à aplicação do glifosato, enquanto as plantas invasoras perecem. A notável insensibilidade da CP4-EPSPS ao glifosato, comparada a *Ec*-EPSPS (EPSPS de *E. coli*), pode ser atribuída ao resíduo de A100. O grupo metil da A100 se projeta no sítio de ligação ao glifosato, se chocando com um oxigênio do grupo fosfonato do glifosato. Como resultado, a molécula de glifosato adota uma conformação substancialmente diferente da observada em *Ec*-EPSPS, que possui uma G96 (resíduo equivalente a A100 em CP4-EPSPS). Na *Ec*-EPSPS, a molécula de glifosato assume uma conformação linear, enquanto na CP4-EPSPS, esta molécula adota uma conformação encurtada em até 0,6 Å, devido à rotação da ligação covalente N-C adjacente ao grupo carboxila do glifosato (Figura 3). Estudos computacionais *ab initio* evidenciam um aumento de energia de

aproximadamente 17 kcal/mol quando a molécula de glifosato está na conformação encurtada, se comparada a sua conformação linear. Esse aumento na energia relacionado à conformação da molécula de glifosato pode explicar a razão da sua inibição ser ineficiente em proteínas do tipo CP4-EPSPS (Funke et al., 2006).



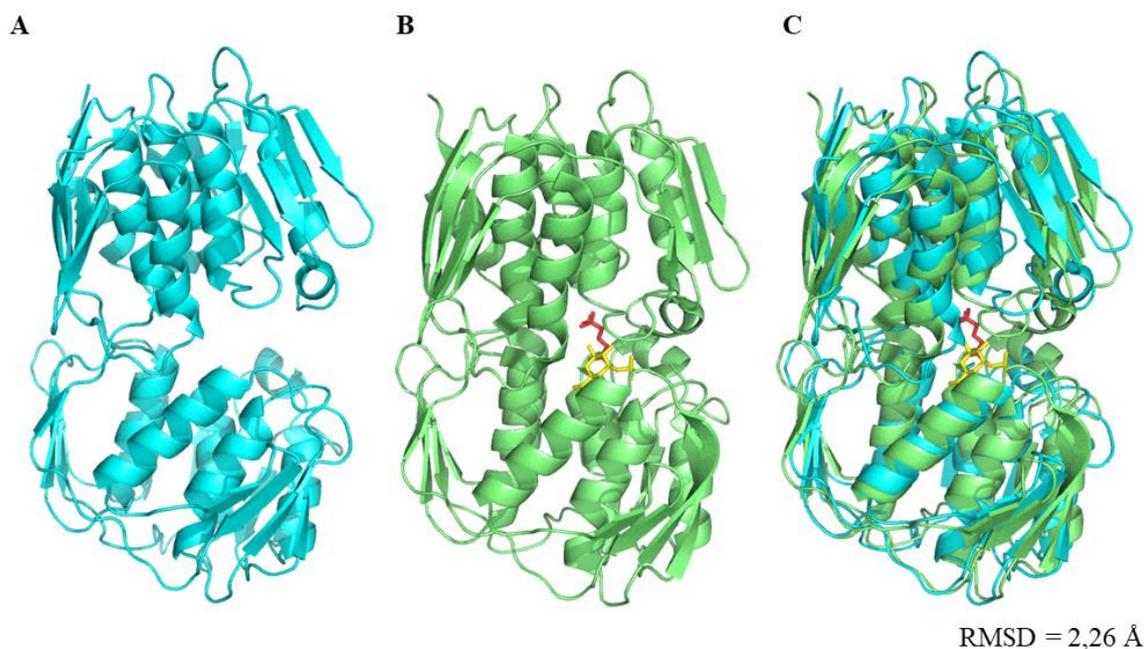
**Figura 3** – Representação de densidade eletrônica de duas possíveis conformações da molécula de glifosato. Ao interagir com a CP4-EPSPS com mutação A100G (direita), o glifosato adota uma conformação idêntica a observada na *Ec*-EPSPS. Já na estrutura de CP4-EPSPS “selvagem” (esquerda), a molécula de glifosato é encurtada em aproximadamente 0,6 Å, devido à rotação em torno da ligação C-N ao lado do grupo carboxila. Fonte: Funke et al. (2006).

A mutação G96A na *Ec*-EPSPS de fato a torna insensível ao glifosato, porém afeta a afinidade da enzima pelo PEP (Eschenburg et al., 2002). Entretanto, outras mutações na *Ec*-EPSPS reportadas na literatura são capazes de diminuir a sensibilidade da enzima ao glifosato sem reduzir drasticamente a sua afinidade pelo PEP, como: a dupla mutação T97I/P101S (Funke et al., 2009); e, as mutações P101G, P101A, P101S (Healy-Fried et al., 2007).

A *Ec*-EPSPS é composta por dois domínios globulares distintos, aproximadamente hemisféricos, cada um com um raio de cerca de 25 Å. Ambos os terminais amino e carboxílico da cadeia estão localizados em um dos domínios, com dois segmentos de cruzamento polipeptídico. Distribuído sobre o eixo de cada hemisfério estão três hélices  $\alpha$  enterradas, de três a quatro voltas cada; as superfícies apresentam três estruturas de folhas  $\beta$ , com quatro fitas cada, e três hélices  $\alpha$  paralelas que possuem faces hidrofílicas (Stallings et al., 1991). Com resolução de 3,0 Å, a estrutura com código PDB

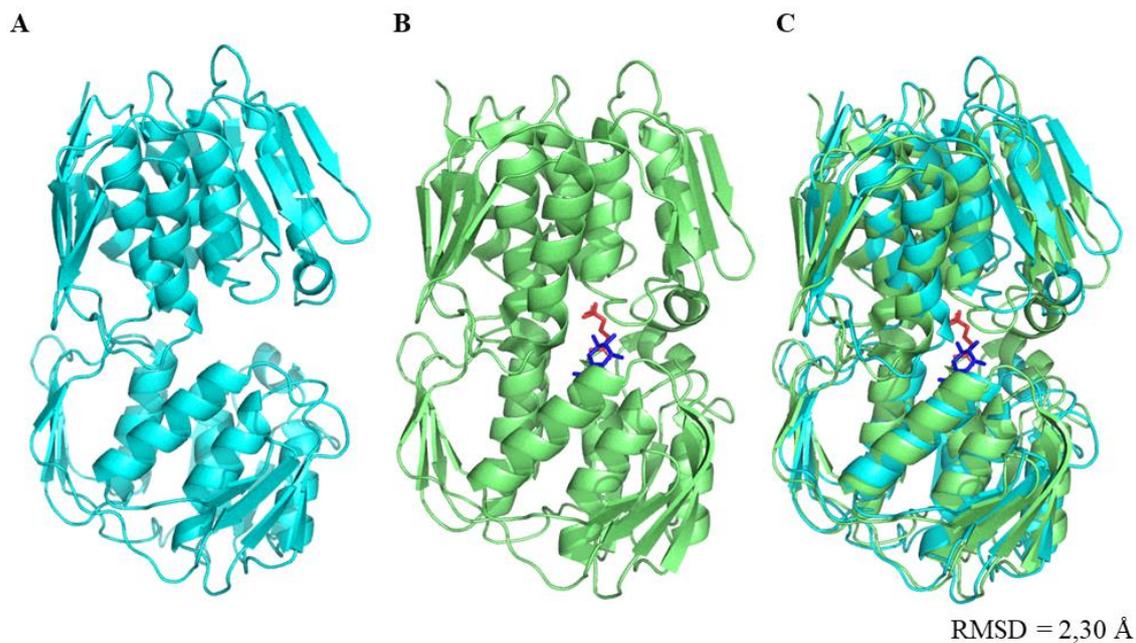
1EPS, é a única de *Ec*-EPSPS, livre de substratos, resolvida por difração de raios X. Considerando a baixa resolução desta estrutura, é possível fazer uma modelagem molecular por homologia utilizando a EPSPS de *Klebsiella pneumoniae* como modelo (PDB: 7TM4; resolução de 1,70 Å), a fim de se obter uma melhor visualização (Anexos I e II). Estas duas proteínas possuem entre si alta identidade (> 85%) e similaridade (> 90%), segundo o *software* BLAST (Altschul et al., 1990).

Já na estrutura de *E. coli* obtida por co-cristalização com S3P e glifosato, destaca-se a aproximação dos dois domínios de EPSPS (PDB: 1G6S; resolução de 1,50 Å) em movimento semelhante ao de um parafuso, com o sítio ativo emergindo da fenda na região entre os domínios (Figura 4). Acredita-se que o S3P seja fundamental para a transição do estado aberto para o estado fechado, e que o fechamento do domínio resulta em um acúmulo de cargas positivas na fenda, atraindo moléculas carregadas negativamente para o sítio ativo da enzima. O mecanismo proposto, em que a ligação de S3P é um pré-requisito para a ligação do glifosato, é corroborado pela descoberta de que a substituição R27A, um resíduo que interage exclusivamente com S3P, impede tanto a ligação de S3P como a do glifosato. O glifosato se liga perto do S3P, sem perturbar a estrutura da cavidade do sítio ativo estabelecida no complexo EPSPS-S3P livre de inibidores. O grupo 5-hidroxila de S3P forma uma ligação de hidrogênio com o átomo de nitrogênio de glifosato. Duas interações adicionais entre o substrato e o inibidor são mediadas através da cadeia lateral de K22 e uma molécula de água (Schönbrunn et al., 2001).



**Figura 4** – Representação da *Ec*-EPSPS em conformação aberta e fechada. **A)** *Ec*-EPSPS livre de ligantes na conformação aberta, obtida por modelagem comparativa a partir da *Kb*-EPSPS. **B)** *Ec*-EPSPS na conformação fechada, interagindo com S3P e glifosato (PDB 1G6S). **C)** Superposição da *Ec*-EPSPS em conformação aberta (A) e fechada (B) – RMSD = 2,26 Å. *Ec*-EPSPS representada em *cartoon*, ciano e verde nas conformações aberta e fechada, respectivamente. S3P e glifosato representados em *sticks*, nas cores amarelo e vermelho, respectivamente. Imagens feitas no *Pymol* versão 2.2.2. Fonte: elaborada pelo autor.

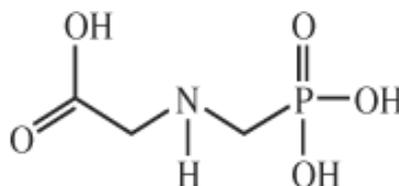
A molécula de shikimato, utilizada na reação anterior à de EPSPS pela shikimato quinase (SK), também é capaz de induzir a mudança na conformação da EPSPS do estado aberto para o estado fechado (Figura 5). Isso pode ser observado na estrutura de *Ec*-EPSPS obtida por co-cristalização com shikimato e glifosato (PDB: 2AAY; resolução de 1,55 Å). É importante destacar que a afinidade da *Ec*-EPSPS pelo shikimato ( $K_m = 47,00$  mM) é menor quando comparada à afinidade pelo S3P ( $K_m = 0,09$  mM) (Priestman, Healy, et al., 2005).



**Figura 5** - Representação da *Ec*-EPSPS em conformação aberta e fechada. **A)** *Ec*-EPSPS livre de ligantes na conformação aberta obtida por modelagem comparativa a partir da *Kb*-EPSPS. **B)** *Ec*-EPSPS na conformação fechada, interagindo com shikimato, e glifosato (PDB: 2AAY). **C)** Superposição da *Ec*-EPSPS em conformação aberta (A) e fechada (B) – RMSD = 2,30 Å. *Ec*-EPSPS representada em *cartoon*, ciano e verde nas conformações aberta e fechada, respectivamente. Shikimato e glifosato representados em *sticks* nas cores azul e vermelho, respectivamente. Imagens feitas no *Pymol* versão 2.2.2. Fonte: elaborada pelo autor.

## 1.2. Glifosato

O glifosato [N-(fosfonometil) glicina, *International Union of Pure and Applied Chemistry*] (Figura 6), aplicado ao sistema foliar das plantas, é rapidamente translocado para regiões de crescimento ativo das plantas onde pode causar uma disrupção efetiva da via do shikimato, causando a morte destas plantas num período de 1 a 3 semanas. Outras rotas em potencial de entrada do glifosato nas plantas são pelas raízes, troncos, ou brotos emergentes destes dois (Kanissery et. al., 2019). Ele foi pela primeira vez implicado como um inibidor da via do shikimato através do trabalho de Steinrücken & Amrhein (1980), no qual observaram um acúmulo de shikimato em tecidos de plantas. Esse acúmulo está associado ao sistema de regulação da via do shikimato, pois ao não receber *feedback* pela produção dos aminoácidos aromáticos, continua produzindo S3P, que não pode ser utilizado pela EPSPS, e é reconvertido em shikimato (Duke & Powles, 2008).



**Figura 6** - Fórmula estrutural do glifosato.

O glifosato é um composto estável, sendo degradado principalmente por vias enzimáticas de microrganismos. A sua biodegradação em ambientes aquáticos ocorre através de através da enzima glifosato oxidorreductase (GOX), que converte o glifosato em ácido aminometilfosfônico (AMPA) e glioxilato. O AMPA é um substrato da C-P liase e pode ser oxidado a CO<sub>2</sub>, enquanto o glioxilato pode ser utilizado por plantas e microrganismos no ciclo do glioxilato (Tauhata et al., 2020). No entanto, seu uso extensivo na agricultura, associado a não observação de boas práticas de aplicação, causa um acúmulo em ambientes aquáticos (Kanissery et. al., 2019).

Em virtude da acumulação de glifosato, esforços no sentido de tratamento de água estão sendo realizados, destacando-se processos de: i) adsorção, na qual ocorre adesão das moléculas de glifosato à superfície de substâncias sólidas. É uma técnica de baixo custo, fácil operação, flexibilidade, e livre de formação de subprodutos. Porém, apresenta

variabilidade de performance de alguns adsorventes orgânicos, difícil separação sólido-líquido de adsorventes de carvão, e regeneração limitada dos adsorventes; ii) filtração em membranas com poros de até 1 nm, capazes de impedir passagem de moléculas entre 300 e 500 Da. Entretanto, esta técnica pode ser impactada por bloqueio dos poros por matéria orgânica, que possui um papel fundamental na interação com as moléculas micropoluentes, além da necessidade das membranas de suportar altas pressões para passagem de água; iii) biorremediação, a qual utiliza da capacidade de microrganismos (principalmente bactérias e fungos) de degradar o glifosato tanto em água, quanto no solo. Contudo, para atingir completa degradação do poluente, é necessário otimizar as condições de pH, temperatura, tempo de incubação, concentração de inóculo, e concentração de glifosato (Kimbi Yaah et al., 2024).

Uma vez que a enzima EPSPS é encontrada em todo o reino vegetal, a aplicação do glifosato para eliminação de plantas invasoras sem prejuízo às espécies cultivadas para comercialização foi viabilizada pelo desenvolvimento de espécies transgênicas resistentes ao glifosato. A possibilidade de associar o uso do herbicida glifosato ao cultivo de plantas transgênicas resistentes a esse princípio ativo propiciou o uso extensivo dessa substância em lavouras, conseqüentemente aumentando a presença de glifosato nos alimentos, água e ar (Gillezeau et al, 2019; Xu et al, 2019). Essa exposição ao glifosato vem gerando um debate na comunidade científica sobre seu potencial cancerígeno. Segundo a Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC - *International Agency for Research on Cancer*) da Organização Mundial da Saúde (OMS), a partir de estudos de exposição em trabalhadores rurais, realizados nos Estados Unidos, Canadá e Suécia, o glifosato aumenta o risco de linfoma não-Hodgkin. Também se observou a formação de um carcinoma no tubo renal de camundongos CD-1 expostos ao glifosato. Estes dados resultaram na classificação do glifosato como provável carcinógeno humano (Grupo 2A) pela IARC (Guyton et al, 2015), mesmo havendo discordância dessa classificação por parte de outras agências norte-americanas e europeias (Xu et al, 2019).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, do inglês “*United States Environmental Protection Agency*”), discordou da classificação da IARC do glifosato como “provável cancerígeno humano” após realização de estudo próprio, e mantém sua aprovação para uso do herbicida no país (EPA, 2024). No Brasil, enquanto o Ministério Público Federal recomendou a proibição do glifosato, a Anvisa (Agência

Nacional de Vigilância Sanitária) decidiu manter sua utilização sob promessa de realizar novos estudos toxicológicos (Nascimento et al., 2019).

Em relação aos níveis seguros de exposição ao glifosato também são notadas discrepâncias: enquanto na União Europeia (EU) o limite tolerável de glifosato na água potável é de até 0,1 µg/L (Bombardi, 2017), no Brasil o limite aceitável é 5000 vezes maior, sendo tolerados níveis de até 500 µg/L, conforme a resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 396, de 3 de abril de 2008 (Brasil, 2008). Nos Estados Unidos a concentração é ainda maior, sendo aceitos até 700 µg/L de glifosato na água potável (EPA, 2024).

Apesar de não haver consenso sobre o potencial carcinogênico do glifosato, os resultados de diversos estudos científicos apontam para a necessidade de vigilância desse princípio ativo e discussão dos seus impactos na saúde pública. Por exemplo, estudos sugerem alterações na relação bactérias-sistema imune na interface intestinal, que podem levar a uma menor tolerância à microbiota intestinal ou mesmo ao desenvolvimento de infecções (Peillex & Pelletier, 2020).

Além da preocupação com humanos, animais também podem sofrer os efeitos nocivos da acumulação de poluentes como glifosato em ambientes aquáticos. Peixes, por exemplo, são exímios bioindicadores ambientais, pois permitem avaliação de problemas potenciais em estágios iniciais de contaminação. Embora a aplicação de glifosato em níveis considerados seguros não cause mortalidade em peixes, a presença contínua deste agroquímico pode causar alterações bioquímicas, fisiológicas, e por consequência, nos padrões comportamentais (por exemplo, reprodução). Isso compromete a manutenção destes animais em seus habitats naturais (Lopes et al., 2022).

Segundo Vila-Aiub et. al. (2008), com o uso indiscriminado de agroquímicos à base de glifosato, desde o início dos anos 2000, espécies de plantas invasoras resistentes ao herbicida foram registradas. No Brasil, espécies como *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis*, já estavam presentes em plantações de frutas cítricas e de soja transgênica. A *C. bonariensis* apresentava uma resistência 14,7 vezes maior que plantas não suscetíveis, enquanto em *C. canadensis* este número era 10,8 vezes maior comparado a plantas não suscetíveis. Essa presença de plantas resistentes ao glifosato nas plantações, implica na necessidade de se aumentar as concentrações de agroquímicos para controle durante a produção agrícola.

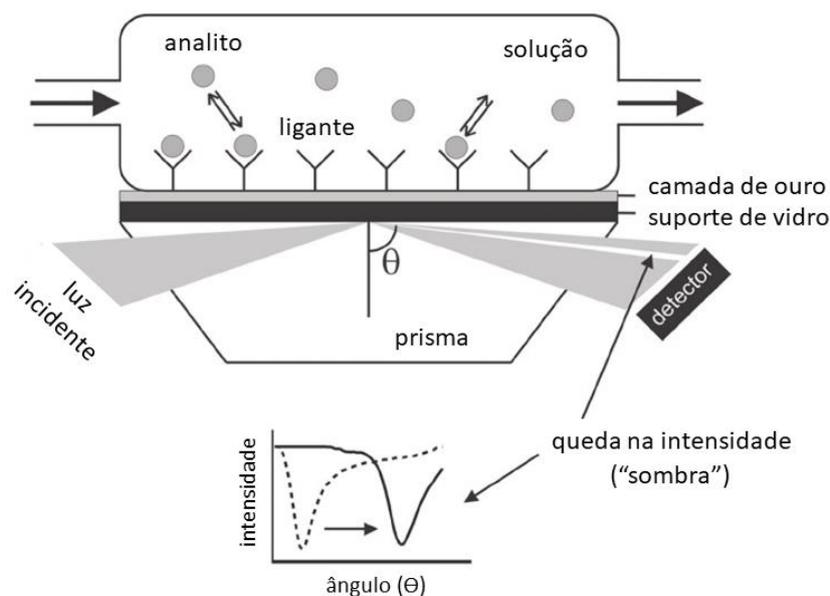
Os principais mecanismos de surgimento dessa resistência ao glifosato, que segue o padrão esperado da seleção natural, estão envolvidos em: (i) mutações na EPSPS; (ii) super expressão de EPSPS sensíveis ao glifosato (Haghani et. al., 2008).

No presente momento, os métodos cromatográficos são os mais utilizados para a quantificação de glifosato, entretanto estes requerem procedimentos de pré-tratamento de amostras que consomem muito tempo e não dão resultados em tempo real. Além disso, estão confinados ao laboratório. Uma vez que, em sua maioria, são utilizados processos de detecção óptica, é necessária uma etapa de derivatização para avaliar a retenção adequada nas colunas cromatográficas e os limites mínimos de detecção. Isto aumenta o tempo de análise, os custos e pode gerar resíduos perigosos (Zambrano-Intriago et al., 2021). Nos últimos anos, diversos métodos para detecção do glifosato mais sensíveis vêm sendo desenvolvidos baseados em métodos eletroquímicos (Noori et al., 2020), imunossensores (Reynoso et al., 2019), colorimétrico (Tai et al., 2022), ou ainda, por ressonância plasmônica de superfície (Ding & Yang, 2013; Do et al., 2020).

### 1.3. Ressonância plasmônica de superfície (SPR)

O fenômeno físico de SPR (do inglês, *Surface Plasmon Resonance*) é observado em camadas finas de filmes condutores em interface entre meios de diferentes índices de refração, quando feixes de luz plano-polarizadas estão sob condições de reflexão total interna (TIR, do inglês, *total internal reflexion*). A TIR acontece quando um feixe de luz plano-polarizada se propagando em um meio de refração mais alto encontra uma interface em um meio de refração mais baixo em um ângulo de incidência acima do ângulo crítico. Assim, a luz é totalmente refletida na interface e se propaga de volta para o meio de alto índice de refração. Apesar da luz totalmente refletida para o meio de refração mais alto não perder nenhuma energia sob TIR, o feixe de luz “vaza” para o meio de menor refração uma intensidade de campo elétrico chamada de onda evanescente. Em uma certa combinação de ângulo de incidência e energia (comprimento de onda), os *plasmons* (ondas de densidade de carga eletrônica) são excitados. Como resultado, observa-se uma característica absorção de energia através do campo de onda evanescente e o SPR é visto como uma queda na intensidade de luz refletida (Figura 7). As condições para o efeito de ressonância são muito sensíveis às mudanças no índice de refração na superfície metálica, que variam principalmente pelas concentrações dos componentes das soluções utilizadas (Biacore Handbook, 2022).

Através da técnica de SPR, diversos estudos de interações de biomoléculas podem ser realizados. Assim, existem diversos *sensor chips* disponibilizados comercialmente para experimentos de SPR, e suas características variam entre fornecedores e o objetivo de análise. Porém, tradicionalmente o metal mais utilizado é o ouro, pois é estável ao processo de oxidação, e também é inerte, ou seja, não interage com amostras biológicas. Outros metais como prata, cobre e platina, são estudados para o desenvolvimento de *chips* para SPR, entretanto sua propensão a oxidação tornam os experimentos pouco reprodutíveis (Hinman et al., 2018).



**Figura 7** – Representação esquemática de um sistema de SPR. Nela, observa-se a interação de um analito em solução, ao seu ligante imobilizado na superfície de ouro do *chip* acoplado a um prisma. Essa interação causa uma queda na intensidade da luz incidente refletida sob TIR. Por sua vez, a queda na intensidade desvia o ângulo ressonância ( $\Theta$ ) para a direita, que é uma representação direta do índice de refração do meio oposto ao da luz incidente. Fonte: adaptada de Hahnefeld et. al. (2004).

As superfícies dos diferentes *chips* são preparadas com grupos funcionais capazes de imobilizar biomoléculas tanto por ligação covalente, quanto de forma transiente. Do modelo de ligação covalente pode-se citar a formação de pontes de dissulfeto entre grupamentos tiol (-SH), como o presente nas cisteínas das proteínas (Biacore Handbook, 2022). E, no caso de interações transientes, um modelo clássico é a presença de uma camada de ácido nitrilotriacético (NTA), conjugada com  $Ni^{2+}$ , que é capaz de imobilizar as proteínas que possuem em suas extremidades caudas de histidina. Este mesmo princípio é empregado nas purificações de cromatografia de afinidade a metal imobilizado (Nieba et al., 1997; Biacore Handbook, 2022). Os *chips* devem ser projetados para permitirem procedimentos de regeneração (etapa crucial para reutilização entre análises), além de exibirem baixa porcentagem de interações não específicas (Hahnefeld et. al. 2004).

A versatilidade dos *chips* desenvolvidos para análises de SPR permitem a utilização desta técnica em uma gama de aplicações biotecnológicas, como por exemplo para avaliação da presença de biomarcadores de cânceres (como a superexpressão da proteína HER2 em câncer de mama, ou de PSA em câncer de próstata), os quais são liberados nos organismos em fases iniciais da doença, diminuindo a ocorrência de

diagnósticos tardios, o que aumentam as chances de sobrevivência dos pacientes (Gade et al., 2022). A técnica de SPR também pode ser utilizada para verificar a constante de afinidade entre os receptores ACE2 de células humanas, que permitem a entrada do vírus SARS-CoV-2 através da proteína *Spike* (Baardsnes & Paul-Roc, 2024), ou ainda para realizar *screenings* de moléculas capazes de bloquear ACE2, assim impedindo a infecção viral (Ma et al., 2021).

O glifosato possui um papel importante na indústria do agronegócio brasileiro. Em 2022, foram comercializadas 382,8 mil toneladas de produtos que possuíam o glifosato como princípio ativo. Representando 47,8 % de agroquímicos comercializados no país, o glifosato se consolida como em primeiro lugar entre os mais utilizados (Ibama, 2023). Não existem dados publicados utilizando o método de SPR, de análises ambientais em corpos de água potencialmente contaminados por glifosato no Brasil. Em 2020, na bacia do rio Paraná, amostras de água foram coletadas e analisadas quanto a presença de glifosato por métodos cromatográficos. Neste rio, o qual irriga principalmente plantações de soja e milho, foram verificadas concentrações entre 0,31 µg/L e 1,65 µg/L por métodos cromatográficos. Embora estes valores estejam abaixo do limite permitido pela legislação brasileira, e levando em consideração que este rio abastece diversas cidades (49 % do consumo de água do rio é destinado ao suprimento populacional da região, enquanto 11 % é utilizado pelo setor agrícola), devem ser realizados estudos frequentes de monitoração ambiental (Mendonça et al., 2020). A utilização de metodologias que permitam a análise em tempo real, e com alta especificidade são de suma importância. Em vista disso, este trabalho propõe a utilização da *Ec-EPSPS* para detecção de glifosato, através do método de SPR.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

O objetivo principal deste projeto de mestrado é produzir a *Ec*-EPSPS, caracterizá-la na sua forma nativa, em associação aos seus substratos e ao glifosato, explorando mudanças conformacionais para a construção de biossensor por ressonância plasmônica de superfície capaz de detectar glifosato em amostras aquosas.

### 2.2. Objetivos específicos

- Clonar o gene da *Ec*-EPSPS em vetores pET-LIC, para expressão em larga escala em cepas de *Escherichia coli*;
- Purificar a proteína resultante da expressão;
- Caracterizar a *Ec*-EPSPS purificada em relação à estabilidade e atividade biológica;
- Determinar a afinidade da *Ec*-EPSPS pelo glifosato através de ensaios bioquímicos;
- Funcionalizar a superfície de ouro dos sensores para adsorção da *Ec*-EPSPS;
- Determinar a sensibilidade do biossensor construído para a detecção de glifosato a partir de amostras em solução aquosa.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Clonagem dos fragmentos gênicos codificantes da proteína de interesse

A sequência codificante da EPSPS de *E. coli*, selecionada a partir do GenBank (Gene ID: 945528), foi obtida comercialmente pela empresa FastBio em plasmídeos pUC57. O gene da EPSPS foi amplificado e clonado nos vetores pET-M11 e pET-SUMO, adaptados para o sistema de clonagem de ligação independente, denominado pET-LIC. Este método dispensa tanto o uso de enzimas de restrição para formação de extremidades coesivas, quanto o de DNA ligase para a inserção do fragmento gênico de interesse no vetor de clonagem (Aslanidis & de Jong, 1990). Para essa finalidade, os oligonucleotídeos iniciadores foram planejados contendo pares de bases sobressalentes, resultando em uma cauda complementar aos vetores linearizados (Tabela 1).

**Tabela 1** - Descrição dos oligonucleotídeos iniciadores de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”), planejados para amplificação de segmentos gênicos de interesse. Destacados em negrito estão as caudas salientes compatíveis com o sistema LIC empregado. Os códons de início e término estão sublinhados.

Amplificação	Oligonucleotídeos iniciadores
<i>Ec</i> -EPSPS	Fw: 5'- <b>CAGGGCGCCATGGAATCATTAACTACAACCC</b> – 3' Rv: 5'- <b>GACCCGACGCGGTTACGCTGCCTGGCTGATAC</b> – 3'
Vetores pET-LIC	Fw: 5'- TGGCGCCCTGAAAATAAAG - 3' Rv: 5'- CCGCGTCGGGTAC - 3'

##### 3.1.1. Preparo dos vetores

Os vetores de clonagem pET-M11 e pET-SUMO foram submetidos a uma etapa inicial de digestão utilizando-se a enzima BsaI (sequência de reconhecimento 5'-GGTCTC(N1)/(N5)- 3'). Para a digestão, os vetores foram incubados por 1 h a 37 °C, nas condições descritas na Tabela 2. A digestão foi finalizada com incubação da reação a 65 °C para inativação enzimática, e então analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com 0,1µL/mL de Safedye Nucleic Acid Stain 20.000x (Cellco Biotec).

**Tabela 2** - Parâmetros utilizados para digestão dos vetores de clonagem.

Reagente	Concentração
Tampão CutSmart/NEB31	1X
Vetor pET-LIC	500 ng
Enzima BSAI	5U
H <sub>2</sub> O	25 µL

Apesar do gene codificante da GFP (Proteína fluorescente verde, do inglês “*Green Fluorescent Protein*”) ser flanqueado por dois sítios de BsaI, a digestão não é eficiente e suficiente para linearizar e remover o gene da GFP. Assim, após a digestão é necessário amplificar os vetores linearizados por PCR, excluindo-se a região de GFP. A PCR foi realizada com a enzima Taq High Fidelity Pol (Cellco Biotec), seguindo os parâmetros descritos na Tabela 3.

**Tabela 3** - Parâmetros utilizados para amplificação dos vetores linearizados.

Reagente	Concentração	Ciclagem Térmica
Tampão Taq High Fidelity Pol 10X	1X	95 °C – 1 min
dNTP [10 mM] (N = A, G, C, T)	0,2 mM	30 ciclos de:
Oligonucleotídeo senso [25 µM]	0,5 µM	95 °C – 20 s
Oligonucleotídeo anti-senso [25 µM]	0,5 µM	65 °C – 30 s
DNA molde	1 – 100 ng	72 °C – 6 min
Taq High Fidelity Pol	1 U/uL	72 °C – 6 min
H <sub>2</sub> O	50 µL	4 °C - ∞

A amplificação de cada fragmento foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,8 % corado com 0,1 µL/1 mL de Safedye Nucleic Acid Stain 20.000x (Cellco Biotec). Em seguida, o produto da amplificação de cada vetor foi incubado com DpnI (0,5 µL para 25 µL de reação) a 37 °C por 16 h.

### 3.1.2. Preparo dos fragmentos gênicos de interesse

Os fragmentos gênicos de *Ec*-EPSPS, adquiridos e clonados em vetores pUC57, foram transformados em células de *E. coli* DH5α. Após plaquear o produto de transformação em meio LB ágar suplementado com 100 µg/mL de ampicilina (antibiótico

de seleção) e incubar as placas por 16 h a 37 °C, foi realizado inóculo das colônias em meio LB líquido suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. O inóculo foi incubado sob agitação de 200 rpm, a 37 °C, por 16 h, e utilizado para extração do DNA plasmidial, a partir do qual os fragmentos gênicos de interesse foram amplificados por PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 1. Os parâmetros utilizados para amplificação dos fragmentos de EPSPS foram os mesmos descritos para amplificação dos vetores linearizados (Tabela 3). A amplificação dos segmentos gênicos de interesse foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com 0,1µL/mL de Safedye Nucleic Acid Stain 20.000x (Cellco Biotec).

### 3.1.3. Tratamento com T4 DNA polimerase, transformação em células competentes e extração do DNA plasmidial recombinante

Os vetores e os fragmentos gênicos previamente preparados foram quantificados em espectrofotômetro (Nanodrop 2000 Thermo Scientific) e tratados separadamente com T4 DNA polimerase (Thermo Scientific) para formação das extremidades coesivas (Karam & Konigsberg, 2000). A reação, descrita na Tabela 4, foi incubada por 30 minutos a 22 °C e inativada por 20 minutos a 75 °C.

**Tabela 4** - Parâmetros utilizados no tratamento com T4 DNA polimerase.

Reagentes	Concentração
Tampão T4 DNA polimerase	1X
DTT	4 mM
dATP (vetor)/ dTTP (fragmento gênico)	2,5 mM
Enzima T4 DNA polimerase	1 U
Vetor/ Fragmento gênico	600 ng/ 167 ng
H <sub>2</sub> O	20 µL

Para a reação de anelamento, foi utilizada a proporção de 0,02 pmol do fragmento gênico e entre 25 e 50 ng do vetor LIC (Sistema de Clonagem de Ligação Independente) tratado, misturando-se vetor e fragmento em um microtubo e incubando-se em temperatura ambiente por 30 minutos. O produto das reações de anelamento foi utilizado para a transformação de células competentes *E. coli* DH5α, e o produto de transformação

foi semeado em placas de Petri em meio sólido LB suplementado com 50 µg/mL de canamicina.

Após o cultivo por 16 horas a 37 °C, as placas foram inspecionadas para identificação de colônias. Todas as colônias de cada placa foram enumeradas e submetidas a PCR de colônia seguindo protocolo descrito na Tabela 3, utilizando-se como DNA molde células coletadas a partir das colônias transformantes devidamente identificadas. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com 0,1µL/1mL de Safedye Nucleic Acid Stain 20.000x (Cellco Biotec).

As colônias para as quais houve amplificação do fragmento gênico de interesse foram identificadas como verdadeiro-positivos, enquanto as colônias para as quais não houve amplificação foram identificadas como falso-positivos. Para cada construção de interesse foi inoculada uma colônia verdadeiro-positiva em meio líquido LB por 16 horas a 37 °C, também suplementado com canamicina (50 µg/mL). O DNA plasmidial foi obtido com o kit Fast-n-Easy Plasmid-Prep (Cellco Biotec).

#### **3.1.4. Testes de expressão**

Células de *E. coli* BL21 (DE3) e *E. coli* Rosetta (DE3) foram transformadas com vetores pET-M11 e pET-SUMO contendo o gene da proteína de interesse. As cepas transformadas foram cultivadas aerobicamente a 37 °C em meio LB até atingirem densidade ótica igual a 0,8 no comprimento de onda de 600 nm ( $DO_{600\text{ nm}}$ ). Para avaliar a condição com maior expressão de proteína na fração solúvel, empregaram-se dois protocolos: i. expressão em meio LB induzida por IPTG (20 horas a 37 °C); e ii. expressão em meio autoindutor ZYM-5052 (20 horas a 18 °C) (Studier, 2005). Ao final do período de expressão, as células foram separadas por centrifugação (4.000 g, 10 minutos) e ressuspensas em tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 10 % (v/v) de glicerol) em um décimo do volume de cultura inicial, suplementado com 3 unidades/mL de Turbo Nuclease (Cellco Biotec) e 0,2 mg/mL de lisozima. As células ressuspensas permaneceram em banho de gelo por 30 minutos. Ao final desse período foram realizados 4 ciclos consecutivos de congelamento em ultrafreezer (- 80 °C) e descongelamento. Ao final do processo, o lisado obtido foi centrifugado (16.000 g, 10 minutos) e as frações solúvel e insolúvel submetidas à análise por eletroforese em gel de acrilamida (SDS-PAGE 12 %) para avaliar o perfil de expressão.

## 3.2. Purificação da proteína *Ec*-EPSPS

### 3.2.1. Expressão da *Ec*-EPSPS e lise celular

Do estoque de *E. coli* BL21 (DE3) transformada com plasmídeo pET-M11, 100 µL foram inoculados em 10 mL de meio LB acrescido de 50 µg/mL de canamicina e deixados por 16 h em câmara incubadora, sob rotação de 220 rpm, a 37 °C. Em seguida, 5 mL de pré-inóculo foram introduzidos a 500 mL de meio autoindutor ZYM-5052 com 50 µg/mL de canamicina, e levados a câmara incubadora sob rotação de 220 rpm, a 37 °C, até que se atingisse DO<sub>600 nm</sub> entre 0,6 e 0,8. Ao atingir DO<sub>600 nm</sub> desejada, diminuiu-se a temperatura para 16 °C para dar início à expressão de *Ec*-EPSPS. Cerca de 20 h depois, as células foram retiradas da incubadora, centrifugadas com RCF = 4700 g, por 40 minutos, a 8 °C. O *pellet* foi ressuscitado em tampão (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl, 10 % (v/v) de glicerol) e lisado em duas etapas: química e física em sonicador.

A etapa de lise química ocorreu por adição de 4 mM de DTT, 2 mM de PMSF (fluoreto de fenilmetanosulfonil) e 0,2 mg/mL de lisozima. Após adição e homogeneização dos reagentes, a solução foi incubada em banho de gelo por 30 min. A seguir, ainda incubadas a 4 °C, as células foram lisadas em sonicador por 40 min, sendo aplicados pulsos intermitentes, totalizando 18 s de lise por min. O sonicador utilizado era da marca Branson Sonifier, modelo 450. Logo depois, os restos celulares foram centrifugados com RCF = 12000 g, por 50 min, a 4 °C, e separou-se as frações solúvel e insolúvel após lise celular.

### 3.2.2. Cromatografia de afinidade a metal imobilizado (Ni<sup>2+</sup>)

Esta etapa de purificação seguiu-se com uma coluna HiTrap HP 5 mL da GE Healthcare. A amostra (fração solúvel pós lise celular) foi aplicada à coluna em fluxo contínuo de 3 mL/min, com tampão em pH 8,0 contendo: 50 mM de Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10 % (v/v) de glicerol e 15 mM de imidazol (para evitar interação de proteínas inespecíficas de *E. coli* com a coluna). O tampão de eluição, em pH 8,0, continha: 50 mM de Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10 % (v/v) de glicerol e 500 mM de imidazol. A eluição da amostra que aderiu à coluna foi feita em etapas, em fluxo contínuo de 2,5 mL/min, utilizando-se concentrações crescentes de imidazol, sendo estas: 25 mM, 50 mM, 100

mM, 250 mM e 500 mM de imidazol. Após a purificação, realizou-se uma análise qualitativa da pureza de cada amostra em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12 %.

### 3.2.3. Cromatografia de exclusão molecular

Para esta etapa de purificação utilizou-se a coluna Superdex 75 16/600 da GE Healthcare. As amostras de interesse foram dialisadas em tampão, que incluía: 20 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM de NaCl. A diálise foi feita em concentrador (Amicon Ultra-15 30 K), sob centrifugação de RCF = 4000 g, a 4 °C, em sessões de 8 a 10 min. Uma vez dialisadas, as amostras foram concentradas para volumes entre 1 e 2 mL a fim de serem aplicadas na coluna em fluxo contínuo de 0,5 mL/min. Após a coleta, as amostras foram analisadas quanto a sua pureza em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12 %.

### 3.3. Quantificação da proteína

Após as etapas de purificação, a concentração da *Ec*-EPSPS foi avaliada por meio da absorbância da proteína a 280 nm ( $Abs_{280nm}$ ), como definido pela lei de Lambert-Beer (equação 1):

$$Abs\ 280\ nm = \varepsilon * c * l \quad (\text{Equação 1})$$

onde:  $\varepsilon$  é o coeficiente de extinção molar da proteína ( $M^{-1}\ cm^{-1}$ );  $c$  é a concentração da proteína (M);  $l$  é o caminho óptico (cm).

A absorbância a 280 nm de cada alíquota foi obtida utilizando-se o espectrofotômetro Jasco V-530 (Jasco Analytical Instruments, Tóquio, Japão). Foram utilizadas cubetas de quartzo com 1 cm de largura para o experimento. O coeficiente de extinção molar ( $31860\ M^{-1}\ cm^{-1}$ ) foi determinado pelo programa ProtParam (Gasteiger et al., 2005). Ainda de acordo com o ProtParam, a  $Abs_{280nm}$  da *Ec*-EPSPS a 1mg/mL é igual a 0,663. Assim, caso seja necessário avaliar a concentração de *Ec*-EPSPS em mg/mL, é possível utilizar a seguinte equação (2):

$$C = \frac{Abs\ 280\ nm}{0,663} \quad (\text{Equação 2})$$

onde:  $C$  é a concentração da proteína em mg/mL;  $Abs_{280nm}$  é o valor de absorvância obtido no espectrofotômetro; e 0,663 é a absorvância teórica que representa 1 mg/mL.

### 3.4. Análise da estrutura secundária e termoestabilidade da *Ec*-EPSPS por dicroísmo circular

A porcentagem de estruturas secundárias da *Ec*-EPSPS foi estimada por dicroísmo circular (CD, do inglês *circular dichroism*), utilizando o espectropolarímetro Jasco J-815 equipado com um sistema de controle de temperatura Peltier, conectado a uma bomba de água. Os espectros dicroicos foram obtidos utilizando-se uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de largura, na faixa de comprimentos de ondas distantes da luz UV (190 – 260 nm), com intervalos de leitura de 0,2 nm, taxa de escaneamento de 100 nm/min, na temperatura de 25 °C. Anterior ao experimento, a *Ec*-EPSPS foi dialisada em água. Os ensaios foram realizados na concentração de 0,190 mg/mL, em três pH: 4,0; 7,5; 9,0. Para manter os pH com pouca variação durante as análises, utilizaram-se tampões acetato de sódio (pH 4,0), e Tris-HCl (pH 7,5 e 9,0), ambos a 5 mM.

Para a condução dos experimentos foram registradas três leituras consecutivas e o espectro resultante da média entre os 3 espectros dicroicos foi considerado e ajustado com a subtração dos valores do sinal dicroico do espectro do tampão utilizado como branco. As elipticidades (mdg) obtidas no ensaio foram convertidas em elipticidade molar ( $[\theta]$ ) ( $\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$ ) baseado na massa calculada por resíduo de 115 Da segundo a equação 3:

$$[\theta] = \frac{115 \cdot \alpha}{10 \cdot C \cdot l} \quad (\text{Equação 3})$$

onde,  $\alpha$  é o sinal dicroico em mdeg,  $C$  é a concentração da amostra (mg/mL) e  $l$  é o caminho óptico (cm) da cubeta utilizada.

Os dados de elipticidade molar nos diferentes pH testados foram convertidos em porcentagem de estruturas secundárias pelo *software* CDNN (Böhm et al., 1992).

A termoestabilidade da *Ec*-EPSPS, em pH 7,5, foi verificada variando-se a temperatura de 10 °C a 90 °C, com leituras consecutivas em 222 nm a cada 0,2 °C. Além disso, a cada 10 °C, foi realizada uma leitura do espectro completo de 190 nm a 260 nm. Para se determinar a temperatura de transição ( $T_m$ ) da *Ec*-EPSPS, os dados de  $[\theta]$  ( $\text{deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ ) em 222 nm foram aplicados a seguinte equação (4):

$$Fu = \frac{Sn - [\theta]}{Sn - Su} \quad (\text{Equação 4})$$

onde,  $Fu$  representa a fração proteica desnaturada,  $Sn$  e  $Su$  representam a quantidade de proteína que estão no estado nativo e desdobrado, e  $[\theta]$  o valor medido em 222 nm.

A  $T_m$  foi estimada pelo ajuste sigmoideal das curvas de desnaturação utilizando a equação Boltzmann, pelo programa Origin 8 (Microcal Software Inc., USA).

### 3.5. Determinação dos parâmetros de atividade da *Ec*-EPSPS

Para este experimento, utilizou-se o método de Lanzetta (Lanzetta et al., 1979), o qual capta a liberação de fosfato inorgânico liberado pela reação catalisada da *Ec*-EPSPS. Para isso foi obtido o “*Malachite Green Phosphate Assay Kit*” (MAK307, Sigma-Aldrich). Seguindo recomendações do fabricante, foram 20  $\mu\text{L}$  de reagente de Lanzetta para cada 80  $\mu\text{L}$  de reação, com leitura de absorbância a 620 nm após 30 min de desenvolvimento de cor. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro leitor de placas SpectraMax M2. As placas utilizadas eram de poliestireno, transparentes, com 96 poços, e fundo chato. Antes do início dos experimentos, foi construído um gráfico comparando concentrações conhecidas de fosfato inorgânico (variando de 0  $\mu\text{M}$  a 40  $\mu\text{M}$ ) às absorbâncias obtidas a 620 nm. A função obtida deste gráfico foi utilizada para determinar as concentrações de fosfato inorgânico liberados pela atividade da *Ec*-EPSPS durante os experimentos que se seguiram (Anexo V).

#### 3.5.1. Afinidade da *Ec*-EPSPS por seus substratos

A afinidade da *Ec*-EPSPS pelo S3P foi determinada pela influência da variação de suas concentrações acompanhada a uma concentração fixa de 0,500 mM de PEP. Para o S3P, as 12 concentrações testadas foram: 0,300 mM, 0,200 mM, 0,150 mM, 0,100 mM, 0,075 mM, 0,050 mM, 0,038 mM, 0,025 mM, 0,019 mM, 0,012 mM, 0,009 mM, 0,006 mM.

Já a afinidade da enzima pelo PEP foi determinada, com a concentração de S3P fixa em 0,300 mM, pela variação em 10 concentrações diferentes: 0,500 mM, 0,400 mM, 0,250 mM, 0,200 mM, 0,125 mM, 0,100 mM, 0,062 mM, 0,050 mM, 0,025 mM, 0,015 mM, 0,012 mM.

Os experimentos seguiram-se à temperatura ambiente, por 15 min antes da adição de agente colorimétrico, em tampão 20 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM DTT, e *Ec*-EPSPS a 25 nM. O início da reação foi contado a partir da adição de S3P. O controle negativo em ambos os experimentos era composto por todos os componentes, exceto o S3P. Experimentos realizados em duplicata.

Uma vez finalizado o experimento, as absorbâncias foram transformadas em concentração de Pi, conforme à equação (5):

$$[Pi] = \frac{Abs\ 620\ nm - 0,0106}{0,016} \quad (\text{Equação 5})$$

onde,  $[Pi]$  é a concentração de Pi (mM) referente à absorbância obtida, e *Abs 620 nm* é o valor de absorbância a 620 nm.

Para determinar as constantes de  $K_m$  para S3P e PEP, a seguinte equação (6), derivada da equação de Michaelis-Menten, foi aplicada:

$$[Pi]v = \frac{[Pi]_{max} * [S]}{[S] + K_m} \quad (\text{Equação 6})$$

onde,  $[Pi]v$  representa a taxa de variação na concentração de Pi (mM) produzido por concentração de substrato,  $[Pi]_{max}$  representa a concentração máxima (mM) de Pi produzido, e  $[S]$  representa a concentração do substrato (mM).

A análise dos dados foi realizada com auxílio do *software* GraphPad Prism, versão 9.0.0. para Windows, Boston, Massachusetts, USA ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

### 3.5.2. Sensibilidade da *Ec*-EPSPS pelo glifosato

A sensibilidade da *Ec*-EPSPS pelo glifosato foi determinada verificando-se a influência de concentrações crescentes de glifosato, contra concentrações fixas de SP3 (0,3 mM) e PEP (0,6 mM) que são capazes de saturar a atividade enzimática. As 11 concentrações utilizadas foram: 0,000 mM, 0,004 mM, 0,008 mM, 0,016 mM, 0,031 mM, 0,063 mM, 0,125 mM, 0,250 mM, 0,500 mM, 1,00 mM, 2,00 mM.

Os experimentos seguiram-se à temperatura ambiente, por 15 min antes da adição de agente colorimétrico, em tampão 20 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM DTT, e *Ec*-EPSPS a 25 nM. O início da reação foi contado a partir da adição de PEP. O controle negativo foi composto por todos os componentes, exceto o S3P. Experimento realizado em triplicata.

Para analisar os dados, as absorvâncias a 620 nm obtidas foram transformadas em porcentagem de inibição por glifosato. Com essa finalidade, primeiramente as absorvâncias obtidas foram convertidas para atividade relativa (equação 7):

$$Atv. Rel. (\%) = \frac{Abs\ 620\ nm * 100}{Abs\ max\ 620\ nm} \quad (\text{Equação 7})$$

onde: *Atv. Rel. (%)* é a atividade relativa em porcentagem; *Abs 620 nm* é o valor de absorvância obtido; *Abs max 620 nm* é o valor de absorvância obtido em 0,00 mM de glifosato.

Em seguida para modificar os dados de *Atv. Rel (%)* em porcentagem de inibição, utiliza-se a seguinte equação (8):

$$I (\%) = 100 \% - Atv. Rel. (\%) \quad (\text{Equação 8})$$

onde:  $I$  (%) refere-se a porcentagem de inibição da *Ec*-EPSPS por glifosato; e *Atv. Rel.* (%) é a atividade relativa em porcentagem.

Para se determinar o  $IC_{50}$  do glifosato a seguinte equação (9) foi aplicada:

$$I(\%) = I(\%)_{max} + \frac{(I(\%)_{max} - I(\%)_{min})}{1 + \left(\frac{[I]}{[IC_{50}]}\right)} \quad (\text{Equação 9})$$

onde:  $I$  (%) refere-se a porcentagem de inibição da *Ec*-EPSPS por glifosato;  $I(\%)_{max}$  é o valor máximo obtido de  $I$  (%);  $I(\%)_{min}$  é o valor mínimo obtido de  $I$  (%);  $[I]$  é a concentração de glifosato (mM) aplicada; e  $[IC_{50}]$  é concentração de glifosato (mM) necessária para se obter 50 % de inibição.

A análise dos dados foi realizada com auxílio do *software* GraphPad Prism, versão 9.0.0. para Windows, Boston, Massachusetts, USA ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

### 3.6. Experimentos com o sensor de SPR para detecção de glifosato

#### 3.6.1. Preparo dos *chips*

Os *chips* foram desenvolvidos e fornecidos pela equipe do Laboratório de Estruturas de Micro-ondas e Ondas Milimétricas (LEMON, Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília). O tipo de imobilização escolhido para *Ec*-EPSPS à superfície de ouro dos *chips* seria mediado pela cauda de histidina presente no N-terminal da *Ec*-EPSPS. Para tanto, utilizando-se do kit comercial *NTA-SAM formation reagent*, o seguinte protocolo foi seguido:

- 1) Limpeza dos *chips* com solução piranha na proporção (4 volumes de ácido sulfúrico para 1 volume de peróxido de hidrogênio 30 %) por 10 min para eliminação de matéria orgânica que pudesse estar aderida à superfície de ouro.

- 2) Em seguida, lavagem dos *chips* seguindo a ordem: água deionizada (5 min); álcool isopropílico (5 min); acetona (5 min); água deionizada (5 min).
- 3) Preparo do reagente de formação de monocamadas auto-montadas de ácido tris-nitriloacético (NTA-SAM). Para isso, o reagente disponibilizado no kit foi dissolvido em 10 mL de etanol, concentração final 0,2 mmol/L.
- 4) Os *chips* secos foram imersos na solução contendo NTA-SAM, e deixados à temperatura ambiente por pelo menos 16 horas.
- 5) Após as 16 horas, os *chips* foram introduzidos ao sensor de SPR para as análises de interação da *Ec*-EPSPS com o glifosato.

### 3.6.2. Análises no sensor de SPR

O equipamento de SPR foi desenvolvido pela equipe do Laboratório de Estruturas de Micro-ondas e Ondas Milimétricas (Lemon), sob supervisão do Prof. Dr. Daniel Orquiza Carvalho. Os *chips* foram acoplados ao sensor, com a parte da lâmina coberta de ouro, onde houve a deposição do NTA-SAM, voltada para o sistema microfluídico. Assim, o espelho que compõe a outra face do *chip* estaria voltado para o prisma.

O feixe de luz, utilizado pelo equipamento de SPR, possuía comprimento de onda de 633 nm. O ângulo de ressonância ( $\Theta$ ) variou de 52,500° a 86,325°. A cada 0,075°, 10 leituras consecutivas eram realizadas, e a média dessas leituras gerava um ponto. A variação na leitura foi expressa em Potência Refletida [P (mW)] dependente de  $\Theta$ .

A ordem das soluções para leitura no equipamento, aplicada ao sistema microfluídico em fluxo de 0,1 mL/min, foi: i) água deionizada; ii) NiSO<sub>4</sub> a 40 mM; iii) Tampão HBS-EPS (HEPES 0.1 M pH 7,5, NaCl 0.15 M, EDTA 0.003 M, Tween 20 0,05 %); iv) *Ec*-EPSPS a 0,1 mg/mL; v) Tampão HBS-EPS; vi) Glifosato a 50 mM. Para cada solução, três leituras diferentes foram realizadas, e a média das curvas foi plotada em gráficos para análise dos resultados.

A passagem de tampão HBS-EPS, logo após à de níquel, gera uma primeira linha de base, pois neste ponto o *chip* está pronto para imobilização da proteína. Após a

imobilização da *Ec*-EPSPS, há uma segunda passagem de tampão HBS-EPS. Neste ponto, a partir do deslocamento da curva de ressonância, é possível inferir se houve modificações na superfície dos *chips*. Em seguida, a interação do glifosato com a *Ec*-EPSPS pode ser verificada. As análises foram realizadas com base no deslocamento entre os pontos mínimos das curvas de ressonância.

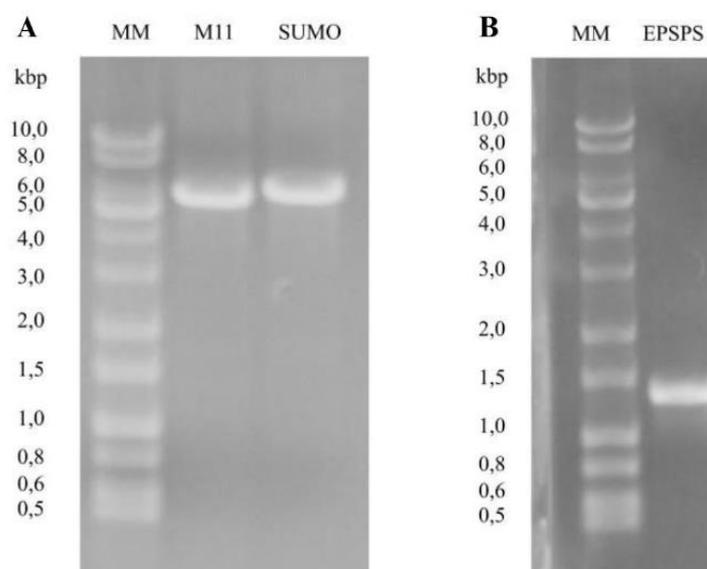
Os experimentos descritos para esta etapa foram realizados apenas uma vez.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Clonagem dos fragmentos gênicos codificantes da proteína de interesse

#### 4.1.1. Preparo dos vetores e fragmentos gênicos de interesse

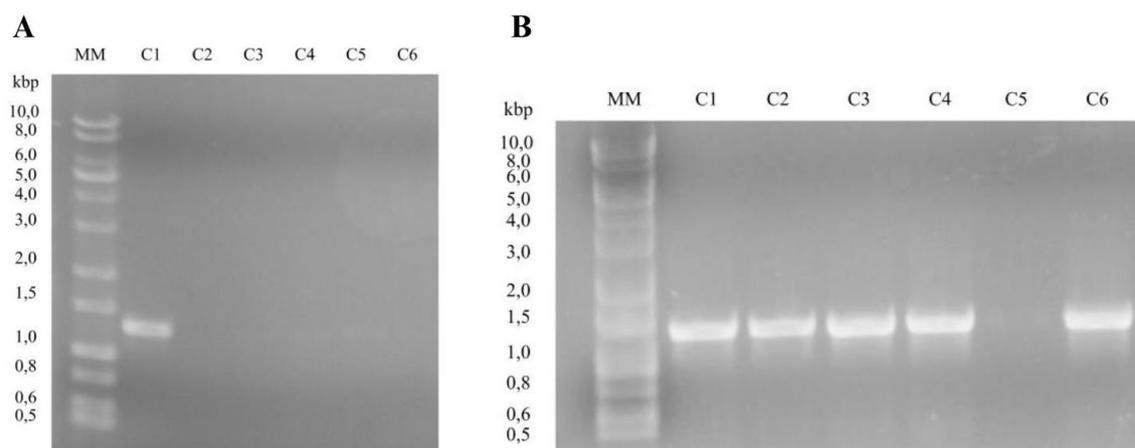
Os vetores pET-M11 e pET-SUMO foram digeridos por BsaI, e linearizados. Em seguida, foram amplificados excluindo-se a região do GFP, tornando-os aptos a se anelarem ao gene da *Ec*-EPSPS após tratamento com T4 polimerase e dTTP (descrito na seção 3.1.3). Estes vetores linearizados sem o gene da GFP possuem em torno de 6000 pares de bases (Figura 8 – A). Já o gene da *Ec*-EPSPS, adquirido em vetores pUC57, foi amplificado por PCR adicionando-se uma cauda complementar aos vetores pET-LIC, sendo o anelamento possível após tratamento com T4 polimerase e dATP (descrito na seção 3.1.3). O gene da *Ec*-EPSPS possui em torno de 1300 pares de bases (Figura 8 – B).



**Figura 8** – **A)** Resultado após digestão dos vetores pET-LIC por BsaI, e amplificação por PCR excluindo o gene de GFP. Da esquerda para a direita do gel: MM) marcador molecular de DNA; M11) digestão do vetor pET-M11; SUMO) digestão do vetor pET-SUMO. **B)** Resultado da amplificação do gene de interesse. Da esquerda para a direita do gel: MM) marcador molecular de DNA; EPSPS) amplificação do gene da EPSPS. Fonte: elaborada pelo autor.

#### 4.1.2. Tratamento com T4 DNA polimerase, transformação em células competentes e extração do DNA plasmidial recombinante

O gene de *Ec*-EPSPS e os vetores pET-LIC amplificados foram tratados separadamente com T4 polimerase para formação de extremidades coesivas. Assim, a etapa de anelamento foi viável, seguida pela transformação dos vetores fechados com o gene da proteína de interesse em *E. coli* DH5 $\alpha$ . O vetor pET-M11 apresentou mais colônias falso-positivas do que verdadeiro-positivas (Figura 9 – A), entretanto apenas uma colônia verdadeiro-positiva já seria suficiente para extração plasmidial e posterior transformação em bactérias de expressão. O vetor pET-SUMO apresentou mais colônias verdadeiro-positivas do que falso-positivas (Figura 9 – B), então a colônia 1 foi designada para extração plasmidial e transformação em bactérias de expressão.

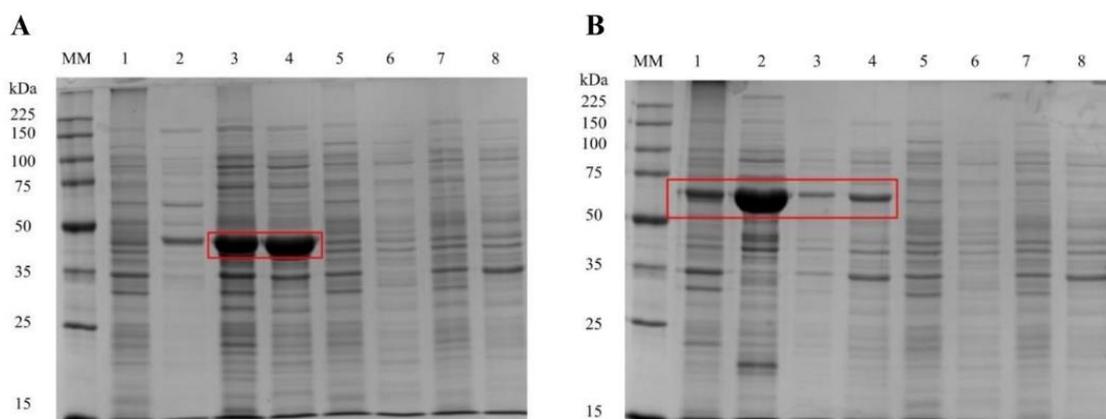


**Figura 9 - A)** Resultado após anelamento de vetor pET-M11 com gene da *Ec*-EPSPS e transformação em *E. coli* DH5 $\alpha$ . Da esquerda para a direita: MM) marcador molecular de DNA; Cn) colônia n de *E. coli* DH5 $\alpha$ , sendo “n” um número designado para cada colônia encontrada. **B)** Resultado após anelamento de vetor pET-SUMO com gene da *Ec*-EPSPS e transformação em *E. coli* DH5 $\alpha$ . Da esquerda para a direita: MM) marcador molecular de DNA; Cn) colônia n de *E. coli* DH5 $\alpha$ , sendo “n” um número designado para cada colônia encontrada. Fonte: elaborada pelo autor.

#### 4.1.3. Testes de Expressão

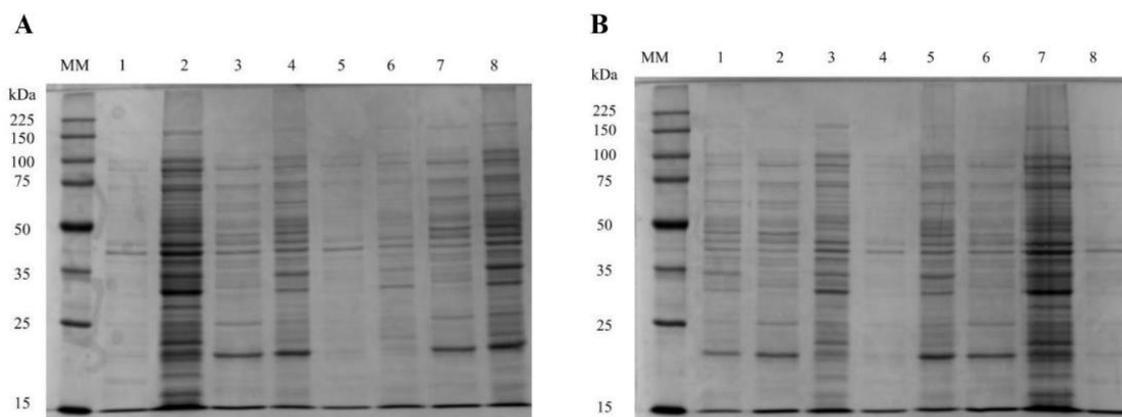
A expressão e obtenção da proteína na fração solúvel pós lise celular foi bem sucedida, tanto em plasmídeos pET-M11 quanto em pET-SUMO em células de *E. coli* BL21 (DE3). No caso dos plasmídeos pET-M11 em BL21 (DE3), o meio autoindutor ZYM-5052 é a condição de expressão ideal, com presença da proteína em grande quantidade na fração insolúvel e solúvel pós-lise celular (Figura 10 – A). Já no caso de

pET-SUMO em BL21 (DE3), o meio LB com adição de IPTG se mostrou a condição de expressão modelo com presença da proteína em maior quantidade na fração solúvel pós-lise celular, se comparada à fração insolúvel (Figura 10 – B).



**Figura 10** - Géis SDS-PAGE 12 % referente às construções de pET-M11 (A) e pET-SUMO (B) em *E. coli* BL21 (DE3). Da esquerda para a direita temos: MM) marcador molecular de proteínas; 1) fração insolúvel pós-lise celular da expressão em meio LB; 2) fração solúvel pós-lise celular da expressão em meio LB; 3) fração insolúvel pós-lise celular da expressão em meio ZYM-5052; 4) fração solúvel pós-lise celular da expressão em meio ZYM-5052; 5) fração insolúvel pós-lise celular do grupo controle em meio LB; 6) fração solúvel pós-lise celular do grupo controle em meio LB; 7) fração insolúvel pós-lise celular do grupo controle em meio ZYM-5052; 8) fração solúvel pós-lise celular do grupo controle em meio ZYM-5052. Destacado em vermelho, está a banda referente à *Ec*-EPSPS. Fonte: elaborada pelo autor.

As construções de pET-M11 ou pET-SUMO em *E. coli* Rosetta (DE3) não apresentaram expressão significativa ou discernível de EPSPS, tanto em meio ZYM-5052 quanto em meio LB (Figura 11 – A e B). Portanto, foram descartadas como possíveis condições de expressão em que se obtenha quantidade significativa de proteína de interesse necessária para a continuidade do projeto.



**Figura 11** - Géis de SDS-PAGE 12 % referentes às construções de pET-M11 (A) e pET-SUMO (B) em *E. coli* Rosetta (DE3). Da esquerda para a direita temos: MM) marcador molecular de proteínas; 1) fração insolúvel pós-lise celular da expressão em meio LB; 2) fração solúvel pós-lise celular da expressão em meio LB; 3) fração insolúvel pós-lise celular da expressão em meio ZYM-5052; 4) fração solúvel pós-lise celular da expressão em meio ZYM-5052; 5) fração insolúvel pós-lise celular do grupo controle em meio LB; 6) fração solúvel pós-lise celular do grupo controle em meio LB; 7) fração insolúvel pós-lise celular do grupo controle em meio ZYM-5052; 8) fração solúvel pós-lise celular do grupo controle em meio ZYM-5052. Destacado em vermelho, está a banda referente à *Ec*-EPSPS. Fonte: elaborada pelo autor.

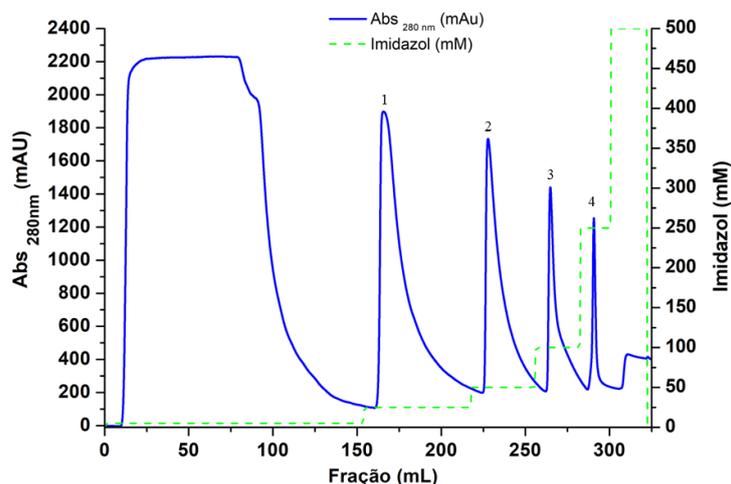
As proteínas expressas em vetores pET-SUMO recebem em sua extremidade N-terminal, além da cauda de histidina, uma pequena proteína de 11 kDa do tipo ubiquitina (SUMO) que pode aumentar a capacidade de expressão e solubilidade (Sun et al., 2008). Contudo, como as proteínas expressas a partir de vetores pET-M11, que possuem apenas a cauda de histidina na extremidade N-terminal, não apresentaram problemas na solubilidade pós-lise celular, estas são ideais para a progressão do projeto, pois a proteína SUMO poderia interferir nas interações da EPSPS com seus substratos e inibidores.

## 4.2. Purificação da *Ec*-EPSPS

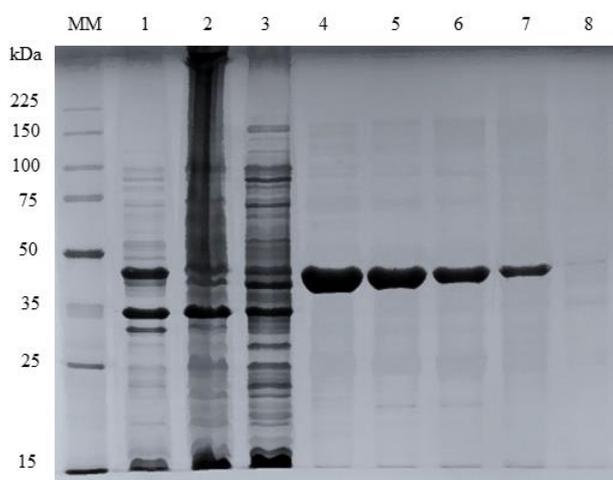
### 4.2.1. Cromatografia de afinidade a metal imobilizado ( $\text{Ni}^{2+}$ )

Ao acompanhar a primeira cromatografia (Figura 12), observa-se que existem 4 picos na absorbância ao se adicionar concentrações crescentes de 25 mM a 500 mM de imidazol. A análise posterior em gel SDS-PAGE 12% (Figura 13) confirmou que se tratava da proteína de interesse em todas as concentrações de 25 mM e 500 mM de imidazol.

A eluição da proteína em concentrações altas de imidazol (100 e 250 mM, especificamente) é um indicativo favorável quanto à exposição da cauda de histidina, que será fundamental para o tipo de acoplamento proposto aos *chips* de SPR.



**Figura 12** - Cromatografia de afinidade a metal imobilizado ( $\text{Ni}^{2+}$ ). No gráfico é possível observar quatro marcações numéricas, representando picos na absorvância em 280 nm: 1) adição de 25 mM de imidazol; 2) adição de 50 mM de imidazol; 3) adição de 100 mM de imidazol; 4) adição de 250 mM de imidazol. Fonte: elaborada pelo autor.

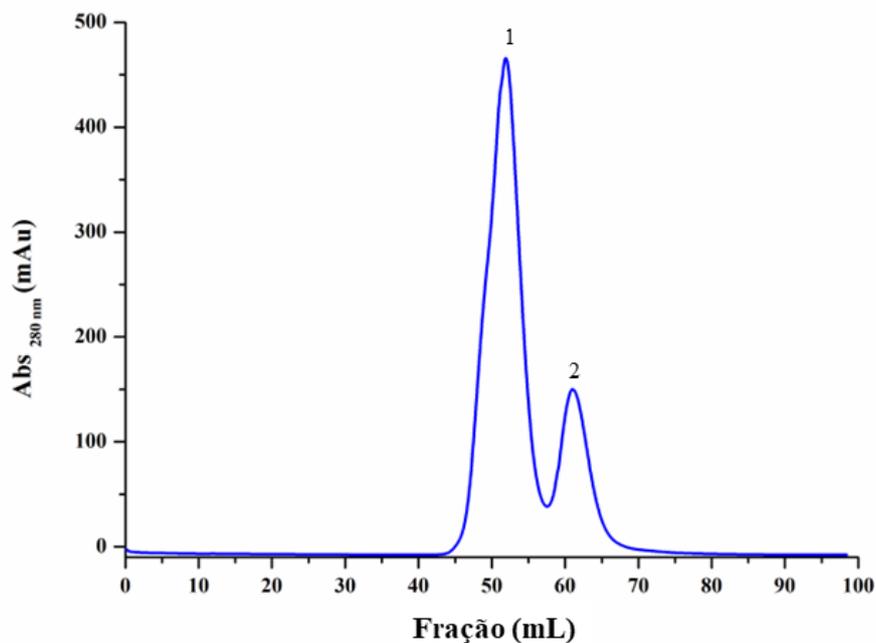
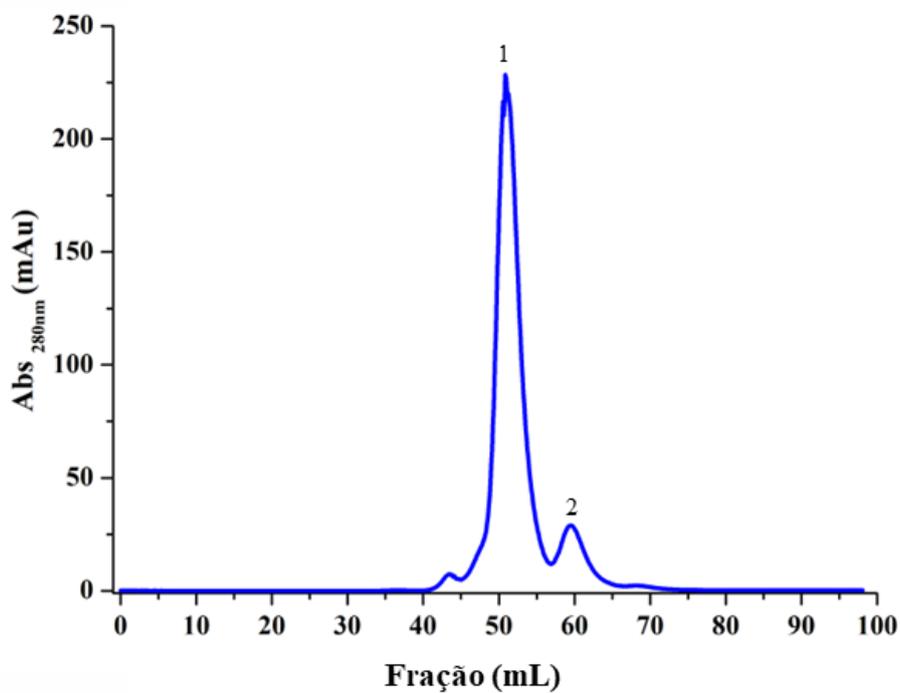


**Figura 13** - Gel de SDS-PAGE 12 %. No gel temos, da esquerda para a direita: MM) marcador molecular de proteínas; 1) fração insolúvel pós-lise celular; 2) fração solúvel pós-lise celular aplicada na coluna; 3) *flow through* da purificação; 4) pico na absorvância em 280 nm com adição de 25 mM de imidazol; 5) pico na absorvância em 280 nm com adição de 50 mM de imidazol; 6) pico na absorvância em 280 nm com adição de 100 mM de imidazol; 7) pico na absorvância em 280 nm com adição de 250 mM de imidazol; 8) lavagem da coluna com 500 mM de imidazol. Fonte: elaborada pelo autor.

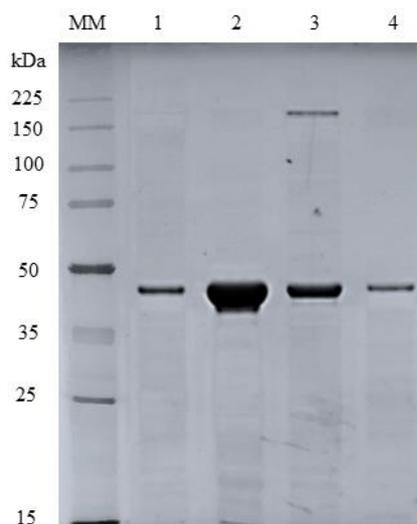
#### 4.2.2. Cromatografia de exclusão molecular

O resultado da exclusão molecular mostra que existem 2 picos na separação em tamanhos. A amostra de *Ec*-EPSPS eluída no pico 1 apresenta uma tendência à formação de estados oligoméricos da proteína, ao contrário do observado no pico 2 em que a proteína de interesse tem uma maior tendência de se manter no estado monomérico. Ao se aplicar na coluna separadamente as amostras referentes às eluições em 100 mM e 250 mM de imidazol, observa-se que o pico 1 é consideravelmente maior que o pico 2 nas duas purificações (Figura 14 – A e B), ou seja, a *Ec*-EPSPS nestas condições apresenta uma tendência maior a formação de estados oligoméricos. É também possível analisar qualitativamente o resultado destas duas cromatografias a partir do gel em SDS-PAGE 12 % (Figura 15).

A partir dos resultados obtidos nas duas etapas de purificação, é possível definir que a fração obtida nos picos 2 da exclusão molecular da proteína, eluída em 100 mM de imidazol na cromatografia de afinidade a metal imobilizado, é recomendada para etapas de caracterização bioquímica/biofísica, e construção de biossensores.

**A****B**

**Figura 14** – **A)** Cromatografia de exclusão molecular referente à amostra eluída em 100 mM de imidazol. No gráfico é possível observar duas marcações numéricas, representando: 1) pico 1 da exclusão molecular eluído entre 45 e 55 mL; 2) pico 2 da exclusão molecular eluído entre 55 e 75 mL. **B)** Cromatografia de exclusão molecular referente à amostra eluída em 250 mM de imidazol. No gráfico é possível observar duas marcações numéricas, representando: 1) pico 1 da exclusão molecular eluído entre 40 e 55 mL; 2) pico 2 da exclusão molecular eluído entre 55 e 70 mL. Fonte: elaborada pelo autor.

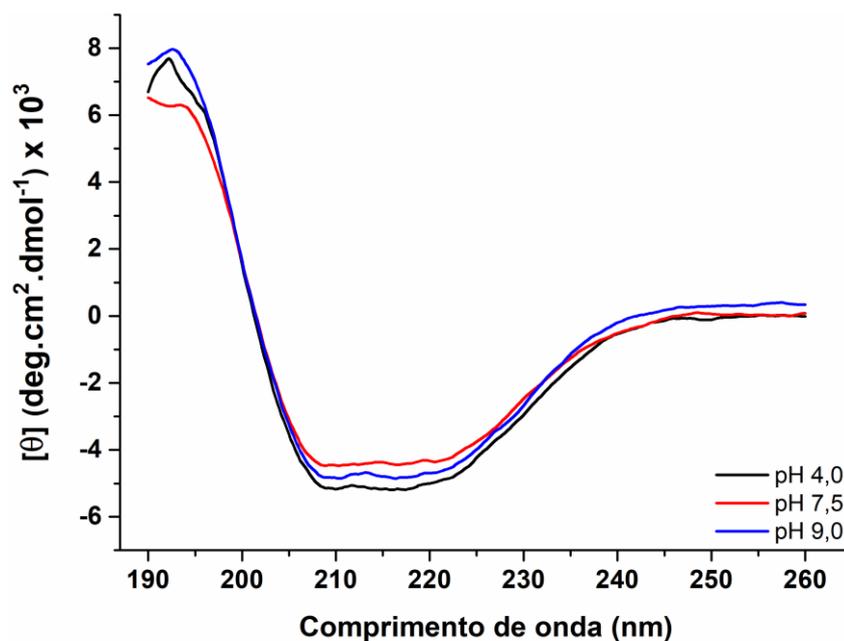


**Figura 15** - No gel de SDS-PAGE 12 % temos, da esquerda para a direita: MM) marcador molecular de proteínas; 1) pico 1 da exclusão molecular referente à amostra eluída em 100 mM de imidazol; 2) pico 2 da exclusão molecular referente à amostra eluída em 100 mM de imidazol; 3) pico 1 da exclusão molecular referente à amostra eluída em 250 mM de imidazol; 4) pico 2 da exclusão molecular referente à amostra eluída em 250 mM de imidazol. Fonte: elaborada pelo autor.

### 4.3. Análise da estrutura secundária e termoestabilidade da *Ec*-EPSPS por dicroísmo circular

#### 4.3.1. Análise da estrutura secundária em diferentes pH

Os espectros de dicroísmo circular da *Ec*-EPSPS em diferentes pH, a 25 °C, apresentaram sinal dicroico com banda positiva em aproximadamente 193 nm e banda negativa entre 208 e 222 nm. O sinal dicroico obtido, com varredura entre 190 nm e 260 nm, não apresentou diferenças significativas entre os pH analisados (Figura 16), indicando que a variação de pH promove mudanças conformacionais discretas a nível de estrutura secundária, como mostra a Tabela 5. Entretanto, não é possível afirmar que a *Ec*-EPSPS se mantém ativa em pH ácido (4,0) ou básico (9,0), pois não há dados publicados apresentando esta relação. De acordo com a literatura, os ensaios de atividade enzimática da *Ec*-EPSPS foram tradicionalmente realizados em torno do pH 7,0 (neutro) com variação entre os pH 6,8 e 7,5 (Tabela 8).



**Figura 16** – Espectros de CD (260 – 190 nm) a 25 °C em tampão 5 mM: acetato de sódio (pH 4,0); e Tris-HCl (pH 7,5; pH 9,0). Fonte: elaborada pelo autor.

**Tabela 5** - Percentual de estruturas secundárias da *Ec*-EPSPS variando-se o pH. Dados obtidas pelo programa de deconvolução CDNN.

Estruturas Secundárias	pH 4,0	pH 7,5	pH 9,0
Hélice $\alpha$	13,3 %	12,4 %	13,2 %
Antiparalela $\beta$	29,9 %	31,7 %	30,6 %
Paralela $\beta$	5,9 %	5,8 %	5,9 %
Volta $\beta$	18,7 %	18,6 %	18,7 %
Desordenadas	33,2 %	33,1 %	33,0 %

De acordo com Haghani et al. (2008), o conteúdo das estruturas secundárias da *Ec*-EPSPS em pH 7,8 estimado por CD e com base no modelo *in silico*, é de 40 % e 34,7 % para hélice  $\alpha$  e 31 % e 23,5 % para folhas- $\beta$ , respectivamente. Esses valores estão em correspondência com aqueles estimados para a estrutura cristalográfica da proteína (PDB:1G6S), que apresenta 35,1 % de  $\alpha$ -hélice e 25,5 % de folha  $\beta$  (Tabela 6).

**Tabela 6** - Comparação da porcentagem de estruturas secundárias da *Ec*-EPSPS em diferentes modelos.

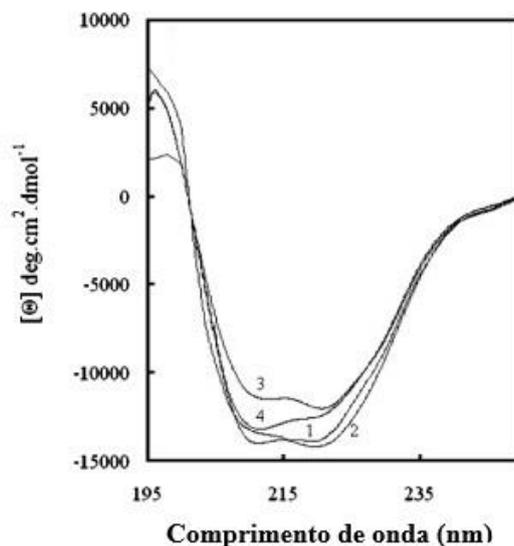
<b>Estruturas Secundárias</b>	<b>pH 7,5</b>	<b>(Haghani et. al., 2008)</b>	<b>PDB: 1G6S</b>	<b><i>In silico</i></b>
Hélice $\alpha$	12,4 %	40,0 %	35,1 %	34,7 %
Folha $\beta$	37,5 %	31,0 %	25,5 %	23,5 %
Outras	51,7 %	29,0 %	39,4 %	41,8 %

<sup>1</sup>pH 7,5 escolhido para comparação pois é o utilizado durante os experimentos no biossensor.

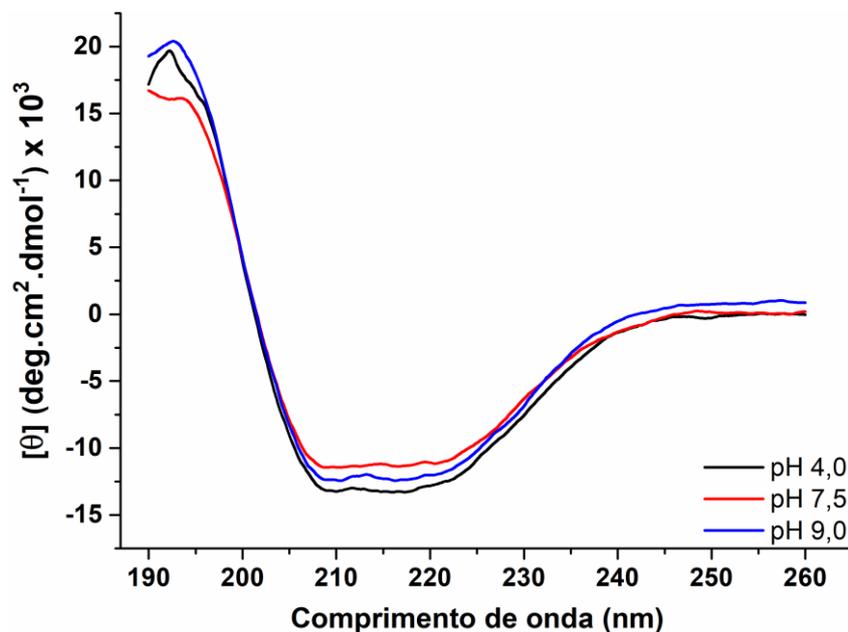
<sup>2</sup> Porcentagem de estruturas secundárias do PDB e modelo *in silico* obtidas através do *software* 2struc (<https://2struc.cryst.bbk.ac.uk/>).

Os espectros de CD obtidos, em diferentes pH, confirmaram o mesmo perfil dicróico da *Ec*-EPSPS ao modelo experimental (Figura 17, curva número 1), típico do mesmo tipo de dobramento, porém apresentando menor intensidade de sinal. A partir destes dados, foi hipotetizado que isto ocorreu devido a um erro na concentração da proteína. Inicialmente esta concentração foi estimada em 0,187 mg/mL, mas, no momento de utilização para os espectros de CD, parte do conteúdo proteico agregou, resultando em um conteúdo solúvel de concentração provavelmente 2,5 vezes menor do que estimado inicialmente. Esta hipótese foi levantada posteriormente, uma vez que, após 24 horas, esta mesma amostra, ao ser utilizada para registro de fluorescência, apresentou aspectos de agregação. Devido a isso, esta foi centrifugada e o espectro de fluorescência obtido não apresentou nenhuma banda de emissão que correspondesse à amostra de proteína (Anexo IV), o que confirma a total agregação previa da proteína. Portanto, os dados do conteúdo das estruturas secundárias desta proteína apresentados na Tabela 5 foram estimados considerando esta concentração 2,5 vezes maior. A variação no percentual de hélice  $\alpha$  é a que apresenta a maior discrepância, com a *Ec*-EPSPS avaliada neste trabalho (12,4 %, em pH 7,5) não atingindo a metade da porcentagem observada nos modelos experimental (40 %), estrutural (35,1 %) e computacional (34,7 %) – Tabela 6. Caso a hipótese aqui apresentada seja verdadeira, a correção da concentração da amostra utilizada para os espectros de CD de 0,187 mg/mL para 0,075 mg/mL, os conteúdos de estruturas secundárias ficam próximos aos valores publicados por Haghani et. al (2008). Infelizmente, após todo este ocorrido, não restava mais nenhuma amostra purificada para repetição e confirmação desta hipótese. Para efeitos ilustrativos, a seguir podem ser

observados os espectros simulados com a concentração em aproximadamente 0,075 mg/mL (Figura 18), e seus conteúdos de estruturas secundárias (Tabela 7).



**Figura 17** – Espectros de CD na região do UV distante de: *Ec*-EPSPS sem mutações (1), *Ec*-EPSPS G96A (2), *Ec*-EPSPS A183T (3), e *Ec*-EPSPS G96A/A183T (4). Concentração das proteínas: 0,2 mg/mL. Fonte: adaptada de Haghani et. al. (2008).



**Figura 18** - Espectros de CD (260 – 190 nm) a 25 °C da concentração hipotética da *Ec*-EPSPS (~ 0,075 mg/mL) em tampão 5 mM: acetato de sódio (pH 4,0); e Tris-HCl (pH 7,5; pH 9,0). Fonte: elaborada pelo autor.

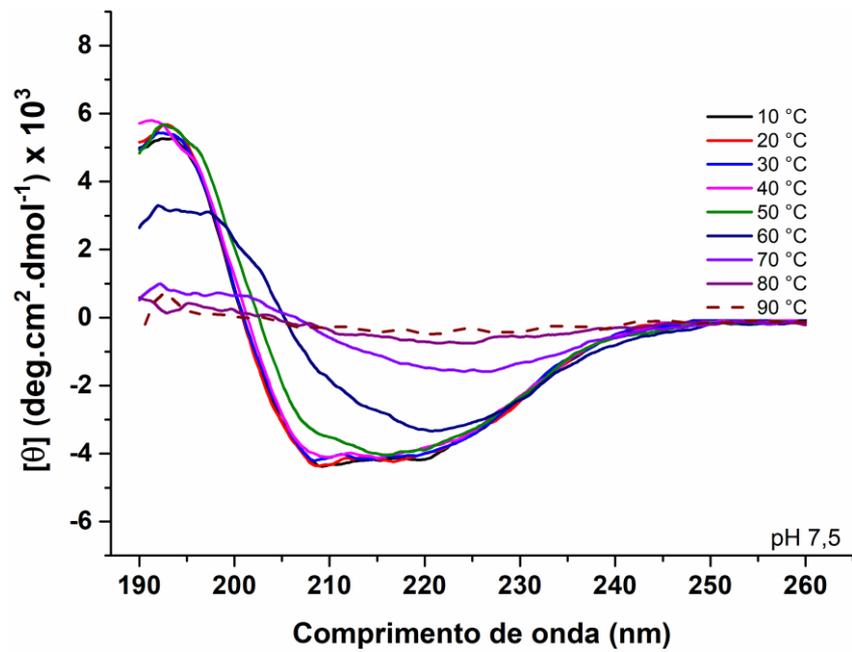
**Tabela 7** - Percentual de estruturas secundárias da *Ec*-EPSPS, com a concentração da proteína corrigida, variando-se o pH. Para fins de comparação, também estão presentes os dados experimentais publicados por Haghani et. al. (2008). Dados obtidas pelo programa de deconvolução CDNN.

<b>Estruturas Secundárias</b>	<b>pH 4,0</b>	<b>pH 7,5</b>	<b>pH 9,0</b>	<b>(Haghani et. al., 2008)</b>
Hélice $\alpha$	33,0 %	35,4 %	31,5 %	40,0 %
Folha $\beta$	30,3 %	32,4 %	36,8 %	31,0 %
Outras	36,7 %	31,7 %	31,7 %	29,0 %

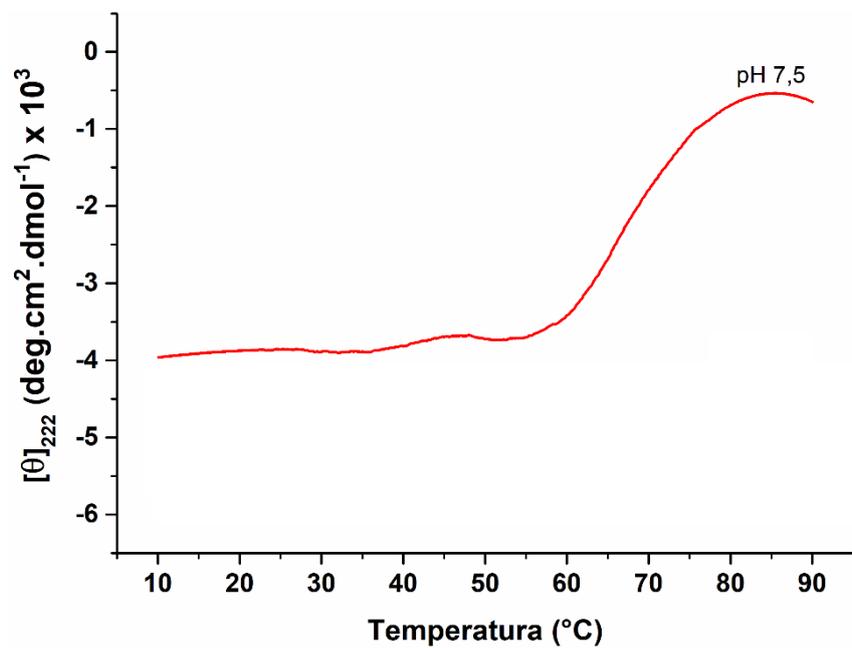
#### **4.3.2. Termoestabilidade da *Ec*-EPSPS**

O pH 7,5 foi escolhido para verificar a termoestabilidade da *Ec*-EPSPS, porque esta é a condição padrão nos experimentos realizados no biosensor. Em pH 7,5, a enzima inicia o processo de desnaturação em torno de 50 °C, e atinge o máximo por volta de 80 °C (Figura 19 - A e B). A temperatura de transição ( $T_m$ ) do estado nativo para desenovelado da *Ec*-EPSPS é igual a 66,4 °C (Figura 20). Ademais, o glifosato sem aditivos é quase 100 % degradado a 60 °C, podendo ser verificada uma redução acima de 50 % da sua concentração inicial nos primeiros 30 min nesta temperatura (Balah et al., 2017). Baseado nestes dados, seria interessante verificar que a temperatura durante os experimentos no sensor não ultrapasse 50 °C, em razão da estabilidade da enzima e do glifosato.

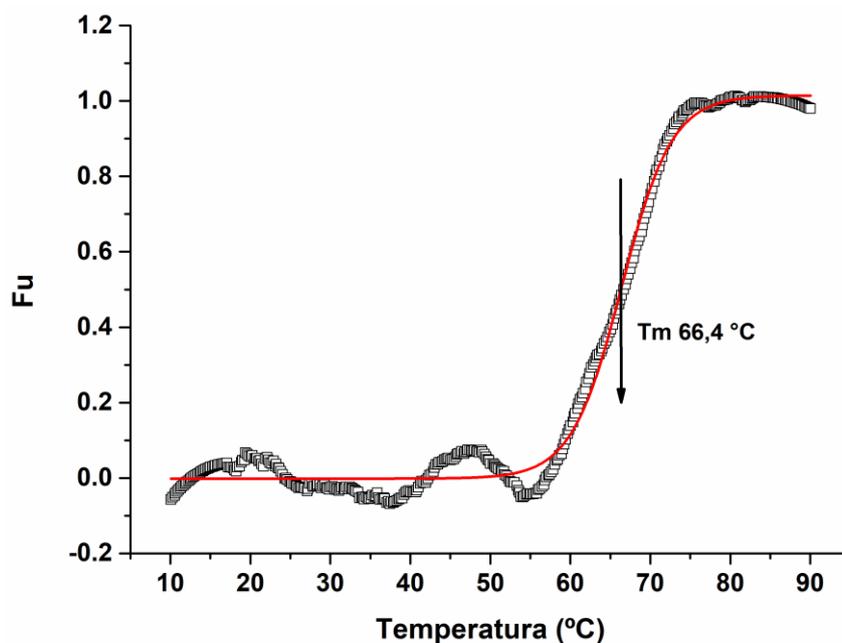
A



B



**Figura 19** - Análises de dicroísmo circular da Ec-EPSPS em 5 mM de tampão Tris-HCl pH 7,5, variando-se a temperatura de 10 °C a 90 °C. **A)** Espectros de dicroísmo circular na região distante do UV (190 nm a 260 nm) da Ec-EPSPS, sob variação de temperatura. **B)** Medidas de dicroísmo circular a 222 nm da Ec-EPSPS, sob variação de temperatura. Fonte: elaborada pelo autor.

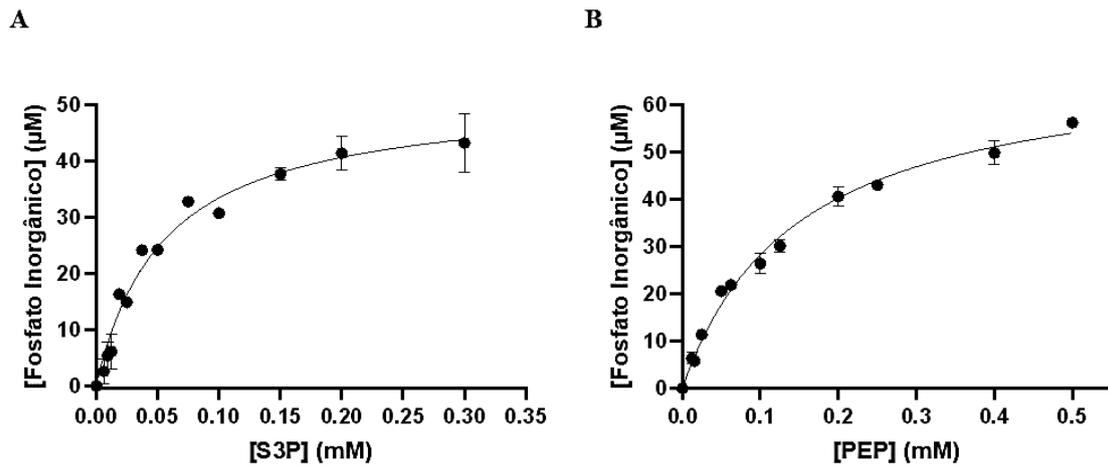


**Figura 20** – Curva de desnaturação térmica a 222 nm da *Ec*-EPSPS, sob variação de temperatura de 10 °C a 90 °C. A temperatura de transição ( $T_m$ ) da *Ec*-EPSPS, estimada a partir das curvas ajustadas, foi de 66,4 °C. Fonte: elaborada pelo autor.

#### 4.4. Determinação dos parâmetros de atividade da *Ec*-EPSPS

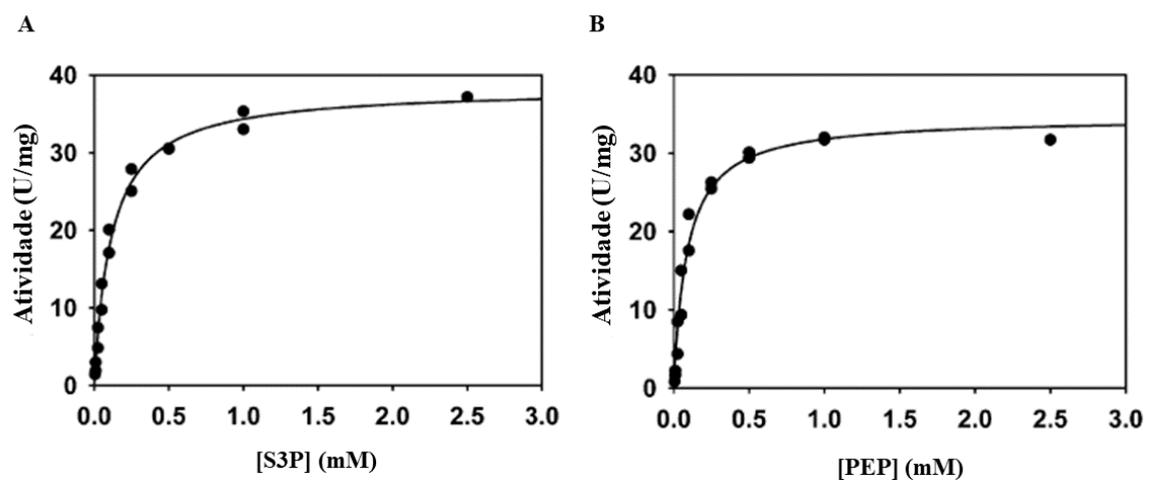
##### 4.4.1. Afinidade da *Ec*-EPSPS por seus substratos

Os valores de  $K_m$  de S3P e PEP, obtidos a partir da aplicação da equação 4 aos gráficos obtidos (Figura 21), foram de:  $0,055 \pm 0,018$  mM e  $0,148 \pm 0,023$  mM, respectivamente. Os valores obtidos de  $K_m$ , tanto para S3P quanto para PEP, estão de acordo com dados publicados anteriormente (Tabela 8). Em relação ao S3P, os valores publicados de  $K_m$  variam entre 0,018 mM e 0,141 mM. No caso do PEP, variam entre 0,025 mM e 0,140 mM. Uma série de fatores pode influenciar nestes resultados, e na Tabela 5 estão exemplificados alguns: concentração de proteína utilizada; tipo de tampão; concentração de sais; e, tempo de reação.



**Figura 21** – Concentração de fosfato inorgânico ( $\mu\text{M}$ ) liberado pela *Ec*-EPSPS variando-se as concentrações de substrato da *Ec*-EPSPS. **A)** Concentração de S3P variando de 0,00 mM a 0,30 mM. PEP fixado em 0,50 mM. **B)** Concentração de PEP variando de 0,00 mM a 0,50 mM. S3P fixado em 0,30 mM. Dados aplicados à equação 4 gerando  $K_m$  de 0,055 mM (S3P) e 0,148 mM (PEP). Fonte: elaborada pelo autor.

A *Ec*-EPSPS é caracterizada como uma enzima de Michaelis-Menten, ou seja, em altas concentrações de substratos (S3P ou PEP) não há uma variação significativa na formação de produtos (EPSP e  $\text{P}_i$ ) (Princípios de Bioquímica de Lehninger, 2009), como pode ser notado no trabalho publicado por Escenburg et. al. (2002) – Figura 22. Na figura 22, é possível observar o platô característico de enzimas de Michaelis-Menten, sobretudo nas concentrações acima de 1 mM de S3P ou PEP.



**Figura 22** - Atividade enzimática (U/mg) da *Ec*-EPSPS sem mutações sob variadas concentrações de substrato, PEP a 1 mM (**A**) e S3P a 1 mM (**B**). Dados de  $K_m$  apresentados na Tabela 5. Fonte: adaptada de Escenburg et. al. (2002).

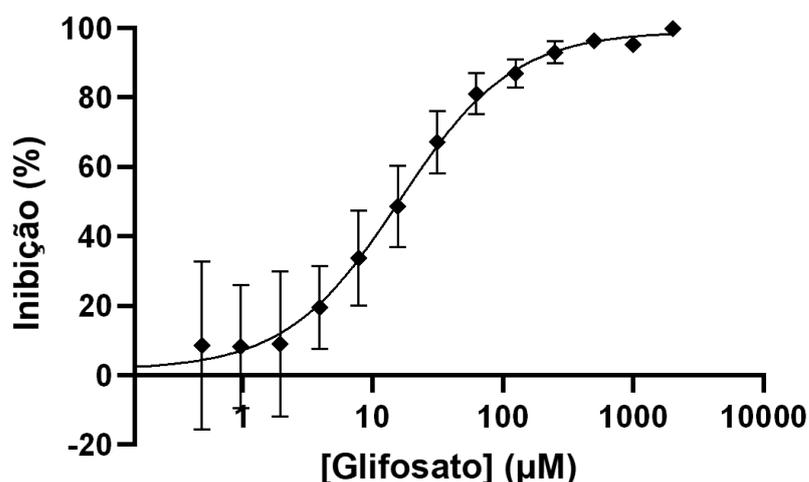
Outros métodos foram descritos para verificar a atividade enzimática da *Ec*-EPSPS. A reação, com a *Ec*-EPSPS purificada, pode ser acoplada com a enzima corismato sintase (sétima etapa da via do shikimato), assim a produção de corismato é observada através de mudanças na absorbância a 275 nm. Com este método, os  $K_m$  de S3P e PEP foram determinados em 0,0025 mM e 0,0160 mM, respectivamente, além de apresentar dados iniciais da alta eficiência do glifosato como inibidor da *Ec*-EPSPS ( $K_i = 0,0009$  mM) (Duncan et al., 1984; Lewendon & Coggins, 1987).

**Tabela 8** – Dados publicados até 02/03/2024 quanto aos parâmetros enzimáticos da *Ec*-EPSPS sem mutações, obtidos pelo método de Lanzetta (como descrito neste trabalho).

[ <i>Ec</i> -EPSPS]	Tampão	Tempo de Reação	K <sub>m</sub> (S3P) (mM)	K <sub>m</sub> (PEP) (mM)	IC <sub>50</sub> (glifosato) (mM)	Referência
-	50 mM HEPES (pH 7,0)	-	0,020	0,025	0,010	(Huynh, 1987)
20 nM	50 mM Pipes-NaOH (pH 6,8), 2 mM DTT	3 min	0,120	0,088	0,010	(Eschenburg et al., 2002)
69 nM	50 mM HEPES-NaOH (pH 7,0), 2 mM DTT, 100 mM KCl	3 min	0,140	0,140	0,009	(Priestman, Funke, et al., 2005)
22 nM	500 mM MES (pH 5,5), 2 mM DTT	-	0,090	0,100	0,006	(Priestman, Healy, et al., 2005)
3,4 nM	50 mM HEPES (pH 7,5), 100 mM KCl, 2 mM DTT	30 min	0,060	0,060	-	(Healy-Fried et al., 2007)
19 nM	50 mM Tris (pH 7.8), 2 mM DTT	3 min	-	0,100	0,050	(Haghani et al., 2008)
-	50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT	10 min	0,018	0,040	-	(Berti & Chindemi, 2009)
-	50 mM HEPES (pH 7,5), 100 mM KCl, 2 mM DTT	-	0,048	0,045	0,002	(Funke et al. 2009)
-	50 mM HEPES (pH 7,0)	3 – 5 min	0,060	0,065	0,050	(Peng et al., 2012)
-	50 mM HEPES (pH 7,0)	3 – 5 min	0,141	0,097	0,055	(Zhou et al., 2012)
0,001 g/L	50 mM HEPES (pH 7,0)	4 min	0,111	0,065	0,040	(Yi et al., 2015)
0,008 g/L	50 mM HEPES (pH 7,0)	4 min	0,115	0,060	0,040	(Yi et al., 2016)
-	50 mM HEPES-NaOH (pH 7,0)	-	-	0,089	0,053	(Wang et al., 2019)
25 nM	20 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM DTT	15 min	0,055	0,148	0,016	Este trabalho.

#### 4.4.2. Sensibilidade da *Ec*-EPSPS pelo glifosato

O valor de  $IC_{50}$  (glifosato) para *Ec*-EPSPS obtido foi de  $0,016 \pm 0,006$  mM (Figura 23). De acordo com dados da literatura, este valor pode variar entre 0,002 mM e 0,055 mM (Tabela 8). A *Ec*-EPSPS é definida canonicamente como pertencente à classe I, sensível a concentrações micromolares de glifosato (Funke et al., 2009), e assim foi utilizada como controle positivo durante a caracterização de EPSPS de outros organismos pertencentes a ambas as classes, a exemplo de: *Sorghum bicolor* -  $K_i = 0,002$  mM (Ream et al., 1988); *Rahnella aquatilis* -  $K_i = 0,005$  mM, e  $IC_{50} = 0,260$  mM (Peng et al., 2012); e, *Isoptericola variabilis* -  $K_i = 1,152$  mM, e  $IC_{50} = 5,400$  mM (Yi et al., 2015).



**Figura 23** – Porcentagem de inibição da *Ec*-EPSPS por glifosato. *Ec*-EPSPS testada na presença de 0,300 mM de S3P, 0,600 mM de PEP ( $= 4,05 \times K_m$ ) e concentrações crescentes de glifosato. Dados aplicados à equação 9 gerando um  $IC_{50}$  de 0,016 mM ( $I(\%)_{max} = 99,07$  %;  $I(\%)_{min} = 1,50$  %). Fonte: elaborada pelo autor.

Algumas mutações descritas para *Ec*-EPSPS são capazes de dessensibilizar a interação da enzima com o glifosato. Healy-Fried et al. (2007), baseado na mutação característica da P106S de *Eleusine indica* (espécie de capim que infesta plantações em todo Brasil), induziu mutações na P101 da *Ec*-EPSPS. As mutações não afetaram significativamente a atividade enzimática, sobretudo em respeito ao PEP (Tabela 9), exceto na P101L ( $K_m$  PEP = 150 μM), em que o  $K_m$  é 2,5 vezes maior do que o observado para a enzima sem mutações ( $K_m$  PEP = 60 μM). Todas as constantes de inibição ( $K_i$ ) das *Ec*-EPSPS mutadas apresentaram um aumento significativo comparado à enzima sem

mutações ( $K_i = 0,4 \mu\text{M}$ ), destacando-se a mutação P101L ( $K_i = 66,0 \mu\text{M}$ ), com um aumento 165 vezes maior.

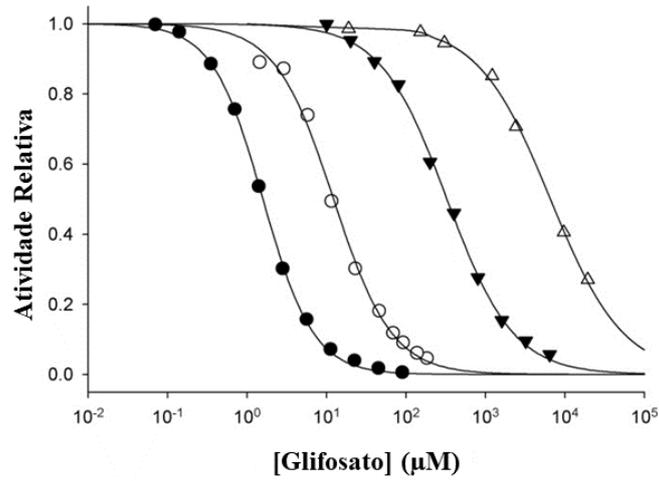
**Tabela 9** – Comparação de parâmetros cinéticos da *Ec*-EPSPS sem e com mutações na P101. Fonte: adaptada de Healy-Fried et al. (2007)

<i>Ec</i> -EPSPS	$K_m$ (S3P) ( $\mu\text{M}$ )	$K_m$ (PEP) ( $\mu\text{M}$ )	$K_i$ (glifosato) ( $\mu\text{M}$ )
Sem mutações	60	60	0,4
P101S	80	70	5,5
P101G	60	90	12,0
P101A	60	80	19,0
P101L	100	150	66,0

A dupla mutação T97I/P101S (TIPS) na *Ec*-EPSPS também diminui a sensibilidade característica da enzima pelo glifosato. Funke et al. (2009) estudou essas mutações na *Ec*-EPSPS como modelo para desenvolvimento de plantas transgênicas (Figura 24). Neste trabalho, foi demonstrado que a dupla mutação TIPS aumenta em 2 vezes a afinidade da enzima pelo PEP ( $K_m \text{ PEP} = 100 \mu\text{M}$ ), se comparado a enzima sem mutações ( $K_m = 45 \mu\text{M}$ ). Com apenas a mutação T97I ( $K_m \text{ PEP} = 380 \mu\text{M}$ ), o valor é 8,4 vezes maior que a proteína sem mutações. A mutação P101S ( $K_m \text{ PEP} = 71 \mu\text{M}$ ) é a que apresenta o menor aumento (1,6 vezes maior). Em relação a capacidade de inibição ao glifosato, a dupla mutação TIPS ( $\text{IC}_{50} = 6600 \mu\text{M}$ ) apresenta um aumento extremamente significativo, sendo 4125 vezes maior que a enzima sem mutações ( $\text{IC}_{50} = 1,6 \mu\text{M}$ ). Isso mostra a eficiência da mutação TIPS em inibir o glifosato, e seu potencial para desenvolvimento de plantas transgênicas, ainda significativamente maior que as mutações na P101, apresentadas anteriormente na Tabela 9.

**Tabela 10** - Comparação de parâmetros cinéticos da *Ec*-EPSPS sem e com mutações: P101S; T97I; TIPS. Fonte: Adaptado de Funke et. al. (2009).

<i>Ec</i> -EPSPS	$K_m$ (S3P) ( $\mu\text{M}$ )	$K_m$ (PEP) ( $\mu\text{M}$ )	$\text{IC}_{50}$ (glifosato) ( $\mu\text{M}$ )	$K_i$ (glifosato) ( $\mu\text{M}$ )
Sem mutações	48	45	1,6	0,3
P101S	71	71	12,0	3,0
T97I	77	380	330,0	90,0
TIPS	71	100	6600,0	2420,0



**Figura 24** – Comparação das curvas de inibição da *Ec*-EPSPS pelo glifosato: *Ec*-EPSPS sem mutações (●); P101S (○); T97I (▲); TIPS (△). Valores de IC<sub>50</sub> obtidos (Tabela 9) em condições de saturação de S3P (1 mM) e concentrações de PEP equivalentes aos seus valores de K<sub>m</sub>. Fonte: adaptada de Funke et. al. (2009).

#### 4.5. Análises no sensor de SPR

As curvas de ressonância foram obtidas a partir da análise sequencial de diferentes soluções (Tabela 11 e Figura 25), e os deslocamentos entre os ângulos nos pontos de mínimo obtidos sugere a imobilização adequada da *Ec*-EPSPS na superfície de ouro dos chips. A etapa de passagem do níquel na superfície dos sensores é de suma importância para formação do sistema NTA/Ni<sup>2+</sup>, para que se possa realizar a ancoragem da *Ec*-EPSPS através da sua cauda de histidina. Em seguida, lavou-se o sistema com tampão HBS-EPS para retirada de excesso de níquel, e a partir disso a nova medida serve como linha de base para os próximos experimentos.

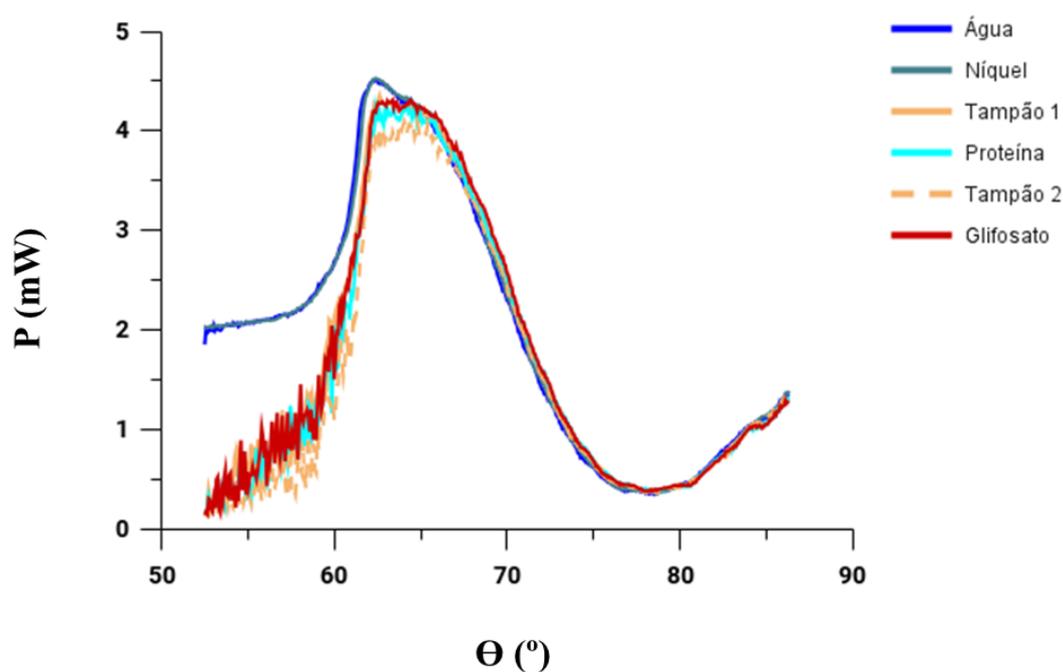
Neste ponto o ângulo  $\Theta$  do ponto mínimo ( $P = 0,367 \pm 0,003$  mW) era de  $78,00^\circ$  sem desvio padrão (Figura 26). Durante a aplicação de *Ec*-EPSPS, o  $\Theta$  mínimo passou para  $78,45^\circ \pm 0,27^\circ$ , com  $P = 0,380 \pm 0,006$  mW (Figura 27). O equipamento de SPR possui um erro de  $0,01$  a  $0,015^\circ$ , então é possível que a tendência da *Ec*-EPSPS em agregar influencie na leitura durante a sua aplicação na superfície dos *chips*, ocasionando uma variação em  $\Theta$  de  $0,27^\circ$ . A segunda passagem de tampão, para retirada do excesso de *Ec*-EPSPS, apresentou um  $\Theta$  mínimo de  $78,75^\circ$  sem desvio padrão, com  $P = 0,362 \pm 0,003$  mW (Figura 28). A partir destes dados, verifica-se que houve um deslocamento da curva de ressonância, entre as passagens do tampão, de  $0,75^\circ$ , que provavelmente está relacionado à imobilização da *Ec*-EPSPS à superfície dos *chips*.

A aplicação subsequente de glifosato a 50 mM ao sistema causou um deslocamento da curva, com o  $\Theta$  do novo ponto mínimo ( $P = 0,379 \pm 0,002$  mW) em  $78,1^\circ \pm 0,12^\circ$  (Figura 29). Assim, nas condições apresentadas até o momento, houve um deslocamento de  $-0,65^\circ \pm 0,12^\circ$ , para o glifosato. Novos experimentos devem ser realizados para confirmar esta relação. Assim, não é possível afirmar que o sistema empregado até então seja capaz de verificar a presença de glifosato em solução, mesmo em concentrações altas.

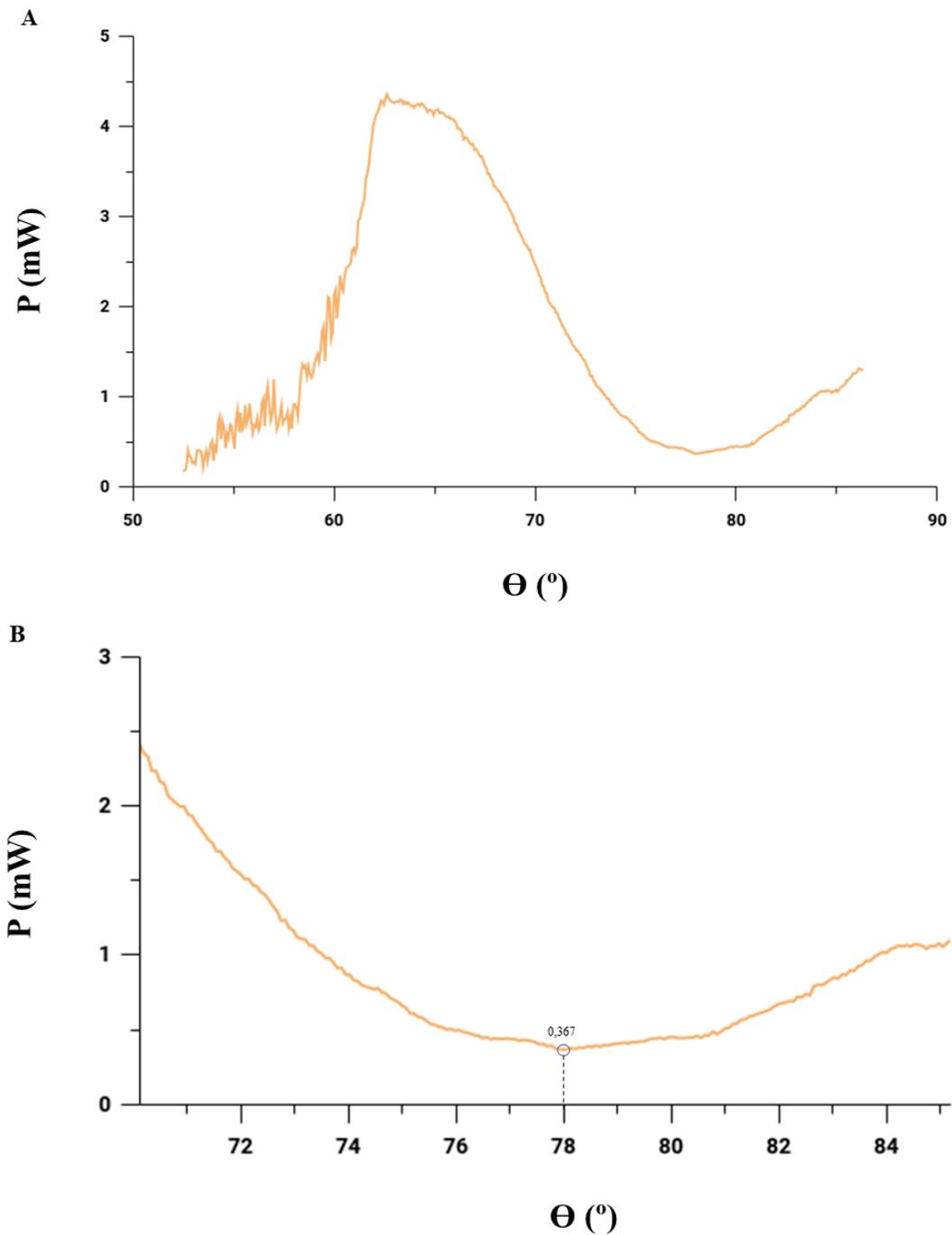
A continuidade dos experimentos está atualmente focada na otimização da limpeza da superfície de ouro dos *chips*, e subsequente maximização da superfície de contato com a solução de NTA-SAM.

**Tabela 11** – Pontos mínimos dos espectros de ressonância plasmônica de superfície e seus respectivos ângulos.

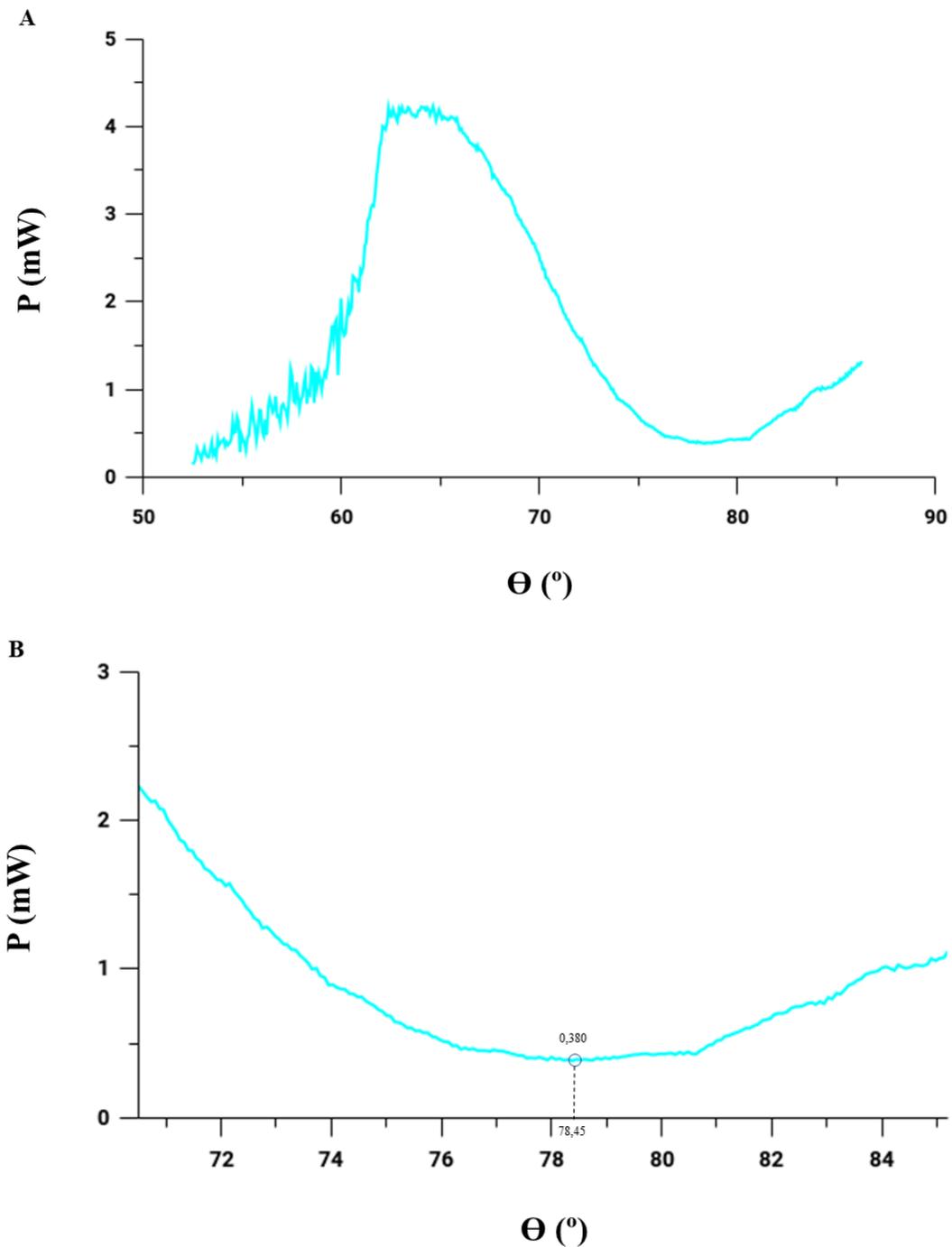
Solução	P (mW)	$\Theta$ (°)
Água deionizada	$0,352 \pm 0,004$	$78,38 \pm 0,15$
NiSO <sub>4</sub>	$0,357 \pm 0,010$	$78,75 \pm 0,15$
Tampão HBS-EPS (1)	$0,367 \pm 0,003$	$78,00 \pm 0,00$
<i>Ec</i> -EPSPS 0,1 mg/mL	$0,380 \pm 0,006$	$78,45 \pm 0,27$
Tampão HBS-EPS (2)	$0,362 \pm 0,003$	$78,75 \pm 0,00$
Glifosato 50 mM	$0,379 \pm 0,002$	$78,10 \pm 0,12$



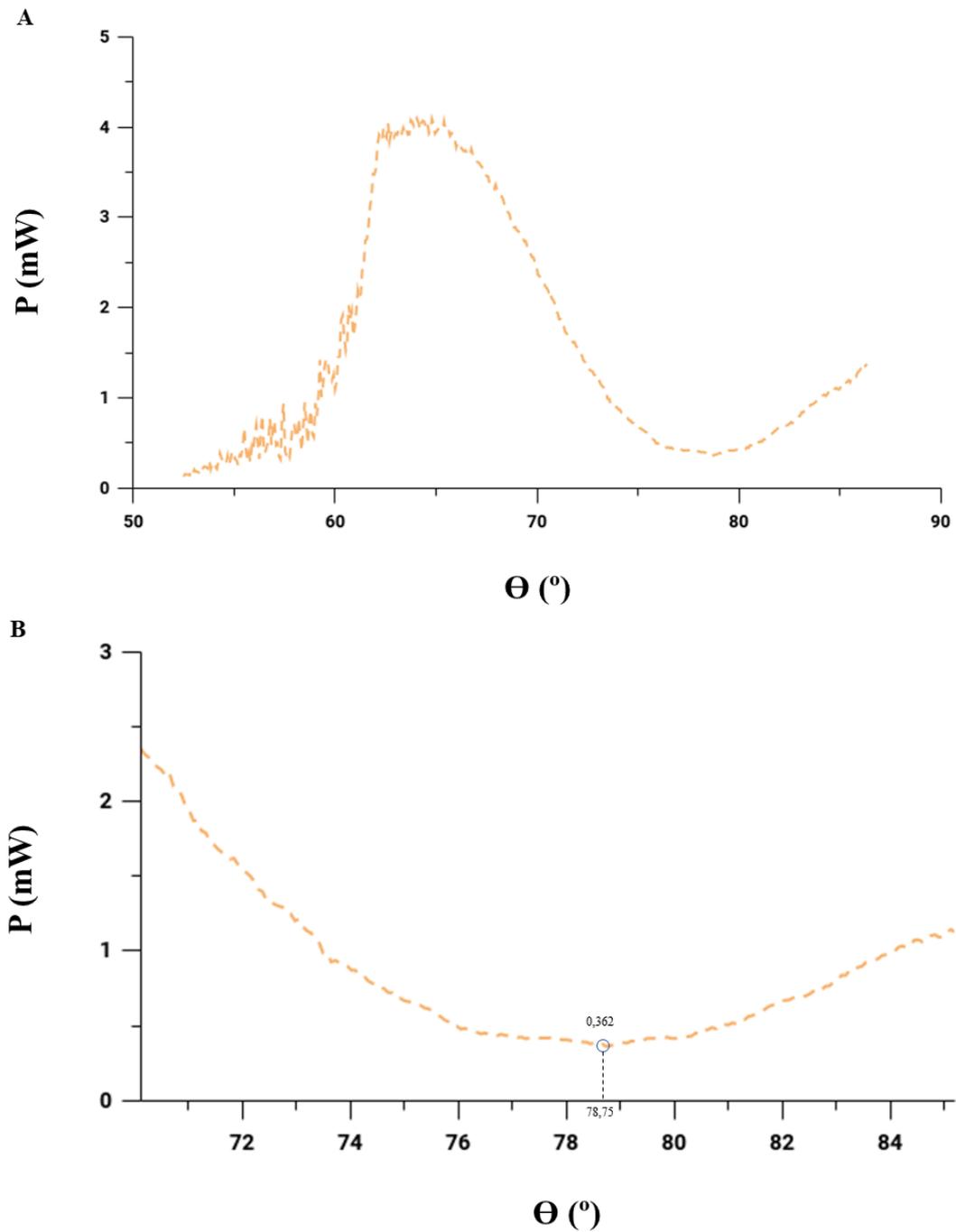
**Figura 25** – Espectros de ressonância entre as diferentes soluções aplicadas ao sistema de SPR. Seguindo a ordem descrita na legenda da imagem: H<sub>2</sub>O (azul); NiSO<sub>4</sub> (ciano escuro); primeira passagem de tampão HBS-EPS (laranja); *Ec*-EPSPS a 0,1 mg/mL (ciano); segunda passagem de tampão HBS-EPS (laranja tracejado); glifosato a 50 mM (vermelho). Fonte: elaborada pelo autor.



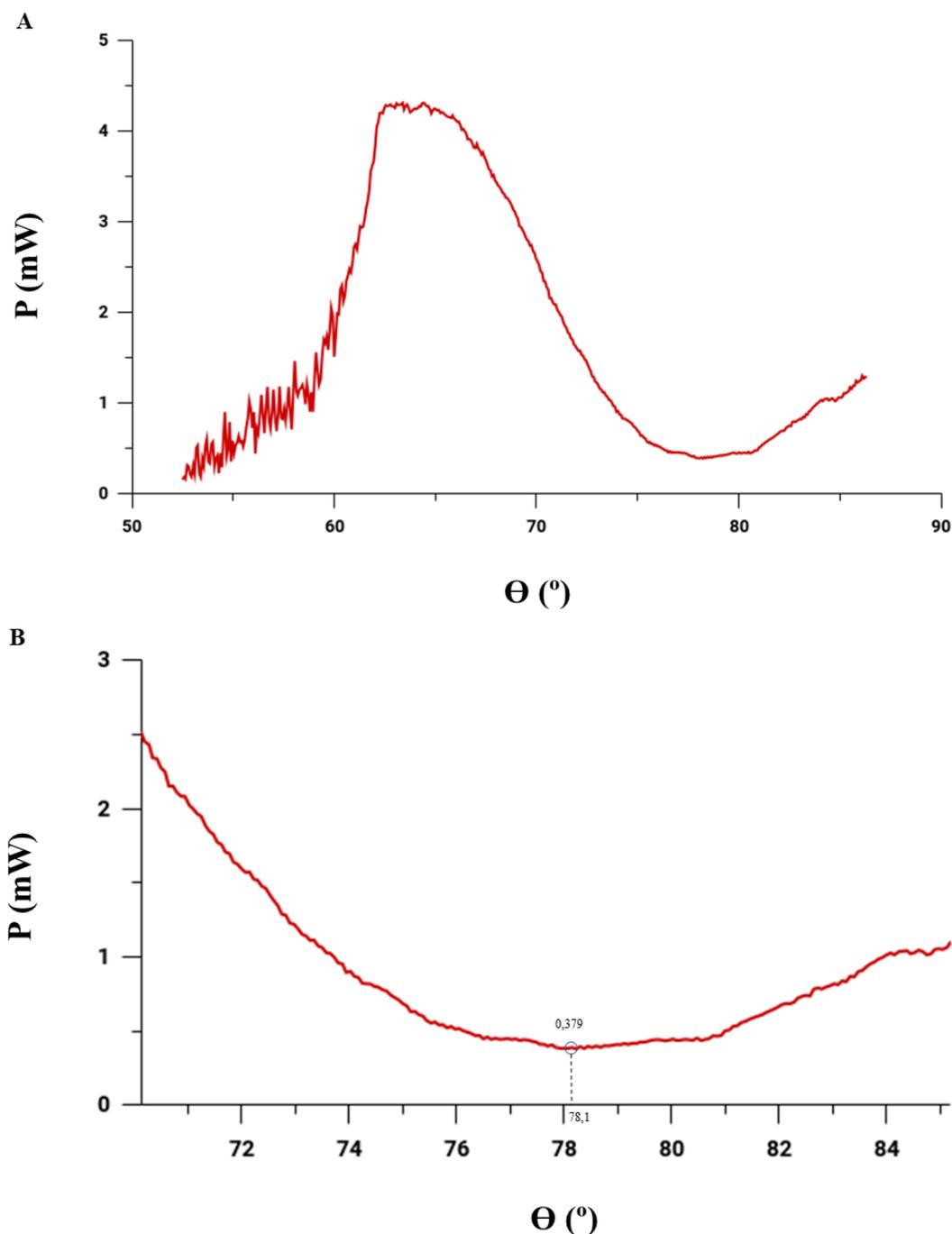
**Figura 26** – A) Espectro de ressonância da primeira passagem de tampão HBS-EPS. B) Aproximação da região em que se observa o ponto mínimo de  $P$  (mW), em 0,367. O ângulo  $\Theta$  correspondente ao ponto mínimo, em  $78,00^\circ$ , está registrado na imagem. Fonte: elaborada pelo autor.



**Figura 27** – **A)** Espectro de ressonância da aplicação de *Ec*-EPSPS a 0,1 mg/mL. **B)** Aproximação da região em que se observa o ponto mínimo de P (mW), em 0,380. O ângulo  $\Theta$  correspondente ao ponto mínimo, em  $78,45^\circ \pm 0,27^\circ$ , está registrado na imagem. Fonte: elaborada pelo autor.



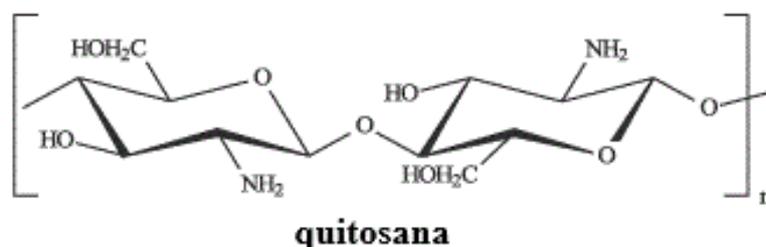
**Figura 28** – **A)** Espectro de ressonância da segunda passagem de tampão HBS-EPS. **B)** Aproximação da região em que se observa o ponto mínimo de  $P$  (mW), em 0,362. O ângulo  $\theta$  correspondente ao ponto mínimo, em  $78,75^\circ$ , está registrado na imagem. Fonte: elaborada pelo autor.



**Figura 29 - A)** Espectro de ressonância da aplicação de glifosato a 50 mM. **B)** Aproximação da região em que se observa o ponto mínimo de P (mW), em 0,379. O ângulo  $\Theta$  correspondente ao ponto mínimo, em  $78,10^\circ \pm 0,12^\circ$ , está registrado na imagem. Fonte: elaborada pelo autor.

Outros trabalhos publicados na literatura, que utilizaram equipamentos já estabelecidos no mercado, descreveram o uso de SPR para detecção de glifosato: Ding & Yang (2013) utilizaram um oligopeptídeo (TPFDLRPSSDTRGGGC) imobilizado a um sensor de ouro pela cisteína no C-terminal, com as leituras de SPR realizadas em um equipamento Biacore; enquanto no método desenvolvido por Do et al. (2020), o

polissacarídeo catiônico quitosana (*chitosan*; (1-4)-linked 2 acetamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucan, IUPAC) (Figura 30) foi imobilizado à superfície de ouro dos *chips*, e posteriormente revestido com nanopartículas de ZnO, com as leituras de SPR realizadas em equipamentos BioNavis. Para fins desta discussão nomearemos os dois modelos de *Oli*-SPR (Ding & Yang, 2013) e *Chi*-SPR (Do et al., 2020).



**Figura 30** - Representação esquemática da estrutura primária da quitosana, sendo “n” o grau de polimerização. Fonte: adaptada de Assis et. al. (2003).

As bases para interação do glifosato ao *Oli*-SPR residem na presença dos aminoácidos carregados (R e D) na sua sequência. Para demonstrar isso, os autores substituíram os aminoácidos R e D por alaninas. Este novo oligopeptídeo (TPFALAPSSATAGGGC) foi imobilizado à superfície dos *chips* e apresentou uma resposta no sistema de SPR 6 vezes menor do que a observada para o *Oli*-SPR (Ding & Yang, 2013). No caso do *Chi*-SPR, os grupamentos hidroxilas nas suas extremidades formam potenciais pontos de ancoragem para ligação do glifosato. Ainda devido às suas hidroxilas, a quitosana pode ser utilizada para separação seletiva de alguns compostos em águas residuais (Do et al., 2020).

No sistema *Oli*-SPR, foram aplicadas concentrações de 0  $\mu$ M a 64  $\mu$ M de glifosato em tampão HBS-EP (0.01 M HEPES (pH 7,4), 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% (v/v) surfactante P20), que apresentaram aumento correspondente na resposta, com a observação de uma região linear entre 0  $\mu$ M e 5  $\mu$ M. Já no modelo *Chi*-SPR, em condições ideais, o sensor conseguiu avaliar concentrações de glifosato em água entre 0  $\mu$ M e 189  $\mu$ M, com uma linearidade observada entre 0  $\mu$ M e 0,59  $\mu$ M. A partir desta região linear, os limites de detecção (LD) foram determinados em 0,58  $\mu$ M (*Oli*-SPR), e 0.008  $\mu$ M (*Chi*-SPR). A escolha inicial da *Ec*-EPSPS como meio de detecção de glifosato partiu do pressuposto de que a enzima possui alta afinidade pelo seu inibidor, o que pôde ser

verificado na seção 4.4.2. No entanto, dados de calorimetria de titulação isotérmica publicados por Ream et al. (1992) demonstram que a alta afinidade pelo glifosato apenas ocorre quando a *Ec*-EPSPS está conjugada com o S3P ( $K_d = 0,15 \mu\text{M}$ ). A enzima não conjugada com S3P possui uma constante de ligação 80000 vezes maior ( $K_d = 12000 \mu\text{M}$ ). Sendo assim, é provável que seja necessário a utilização de S3P durante as análises de SPR, para que se obtenha um LD de glifosato próximo dos obtidos pelos sensores *Oli*-SPR e *Chi*-SPR.

O pH influenciou na interação do glifosato em ambos os sensores. No caso de *Oli*-SPR, verificada a influência entre os pH 2,0 e 8,0, observou-se que existe uma região de resposta ótima entre os pH 6,5 e 8,0. Abaixo do pH 6,5, a resposta de SPR diminui, o que pode ocorrer devido ao ponto isoelétrico do oligopeptídeo estar na faixa de 6,93. Assim, em pH 6,5 a carga total do oligopeptídeo muda de negativa para positiva, o que influencia na interação eletrostática com o glifosato (Ding & Yang, 2013). O *Chi*-SPR, com variação entre os pH 4,0 e 7,0, apresentou uma maior eficiência em pH 5,5, sem agente tamponante (Do et al., 2020).

A força iônica, observado por experimentos com variação da concentração de  $\text{MgCl}_2$  (*Oli*-SPR) e  $\text{NaCl}$  (*Chi*-SPR), também diminuiu a resposta de SPR em ambos os sensores. No sensor *Oli*-SPR foi observado um decaimento gradativo no sinal de SPR entre 0 mM e 500 mM de  $\text{MgCl}_2$ . Entre 500 mM e 1000 mM de  $\text{MgCl}_2$  não houve mudanças significativas. Essa diminuição da resposta acontece provavelmente por interferência às interações eletrostáticas entre o oligopeptídeo e as moléculas de glifosato (Ding & Yang, 2013). Assim como no sensor *Oli*-SPR, o modelo *Chi*-SPR apresentou maior resposta sem adição de sais, ou seja, em 0 mM de  $\text{NaCl}$ . Contudo, ao contrário de *Oli*-SPR, não houve uma diminuição gradativa com o aumento na concentração de  $\text{NaCl}$ . A presença de 0,1 mM de  $\text{NaCl}$  já foi suficiente para diminuir mais de 80 % da resposta. A partir disso, o aumento na concentração  $\text{NaCl}$  não influenciou na resposta do sensor (Do et al., 2020).

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O gene da enzima *Ec*-EPSPS foi clonado em vetores de expressão adaptados ao sistema pET-LIC (pET-M11 e pET-SUMO). Em seguida os vetores foram transformados em cepas de bactérias *E. coli* BL21 (DE3) e Rosetta para fins de superexpressão. Foi demonstrado que o sistema de obtenção da proteína de interesse mais favorável encontrava-se em cepas de BL21 (DE3), transformadas com pET-M11, em meio autoindutor ZYM-5052. Em seguida à obtenção da proteína recombinante, foram realizadas duas etapas de purificação: cromatografia de afinidade a metal imobilizado, seguida da cromatografia de exclusão molecular. A cromatografia de afinidade a metal imobilizado mostra que a cauda de histidina acoplada ao N-terminal da *Ec*-EPSPS está exposta, o que é imprescindível para imobilização da mesma à superfície dos *chips*. Nestas condições de expressão e purificação da *Ec*-EPSPS, obtém-se quantidades suficientes de proteína solúvel purificada para análises bioquímicas, biofísicas, e de acoplamento da proteína ao sensor.

A partir da proteína purificada, foi possível realizar testes de caracterização estrutural e enzimática. Dados de CD nos mostram que esta enzima está em sua conformação nativa entre os pH 4,0 e 9,0, quando comparada ao conteúdo de estruturas secundárias de dados cristalográficos (PDB: 1G6S), do modelo computacional, e de dados de CD encontrados na literatura.

O ensaio de atividade da *Ec*-EPSPS, utilizando-se o método de Lanzetta, mostrou que os parâmetros de afinidade aos seus substratos (S3P e PEP), assim como os de inibição por glifosato, estão de acordo com os encontrados na literatura. Foram encontrados valores de  $K_m$  para S3P e PEP de  $0,055 \pm 0,018$  mM e  $0,148 \pm 0,023$  mM, respectivamente. O  $IC_{50}$  da *Ec*-EPSPS para o glifosato foi determinado em  $0,016 \pm 0,006$  mM.

Os resultados apresentados neste trabalho em relação ao biossensor por SPR foram realizados uma única vez. Ou seja, não existem resultados estatísticos suficientes para informar a precisão para detecção do glifosato no modelo aqui apresentado. Assim, os experimentos estão em andamento, focando principalmente nas etapas de limpeza dos sensores, formação das camadas de NTA, e imobilização da *Ec*-EPSPS. Ademais, novos experimentos serão realizados comparando as soluções utilizadas antes e depois da formação da camada de NTA na superfície de ouro dos *chips*. Assim, esperam-se obter

mais informações quanto à influência desta etapa crucial nos experimentos. Outra possibilidade é modificar/adaptar o sistema micro-fluídico do equipamento para que sejam utilizados *chips* disponíveis comercialmente, já preparados com sistema o NTA para imobilização da *Ec*-EPSPS por cauda de histidina. Com isso, espera-se ter um padrão comparativo de resultados que utilizam um modelo já descrito e comprovado na literatura.

## 6. REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Glifosato. Disponível em: <[G01 – Glifosato — Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa \(www.gov.br\)](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/medicamentos-vegetais/glifosato)>. Acesso em: 5 de jan. de 2024.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

Aslanidis, C., & de Jong, P. J. (1990). Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Research*, 18(20), 6069–6074. <https://doi.org/10.1093/nar/18.20.6069>

Assis, O. B. G., & Valmir L. da, S. (2003). Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. *Polímeros*, 13(4), 223–228. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282003000400006>

Baardsnes, J., & Paul-Roc, B. (2024). SARS-CoV-2S-Protein–Ace2 Binding Analysis Using Surface Plasmon Resonance (pp. 71–87). [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3666-4\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3666-4_5)

Balah, Mohammed. A., Gamal Aldin, A.-R., Zidan, Zidane. H., & Dahroug, Sayed. A. (2017). Photo and thermal degradation of Glyphosate and Fluazifop-butyl herbicides with and without additives. *Al-Mukhtar Journal of Sciences*, 32(2), 118–127. <https://doi.org/10.54172/mjsc.v32i2.184>

Berti, P. J., & Chindemi, P. (2009). Catalytic Residues and an Electrostatic Sandwich That Promote Enolpyruvyl Shikimate 3-Phosphate Synthase (AroA) Catalysis. *Biochemistry*, 48(17), 3699–3707. <https://doi.org/10.1021/bi802251s>

Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., Estrela, P. (2016). Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, 60(1), 1-8. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>

Biacore AB. BIACORE Technology Handbook (2022). Disponível em: <[digi-16475-pdf \(cytivalifesciences.com\)](#)>. Acesso em: 20 de fev. de 2024.

Böhm, G., Muhr, R., & Jaenicke, R. (1992). Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks. *“Protein Engineering, Design and Selection,”* 5(3), 191–195. <https://doi.org/10.1093/protein/5.3.191>

Bombardi, L. M., Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Européia, 1st ed., vol. 1. São Paulo, 2017.

Brasil. Resolução CONAMA n° 396 de 3 de abril de 2008. Disponível em: <<http://pnqa.ana.gov.br/Publicacao/RESOLU%C3%87%C3%83O%20CONAMA%20n%C2%BA%20396.pdf>>. Acesso em: 15 de fev. de 2022.

Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Cepea-USP). PIB do Agronegócio Brasileiro. Disponível em: <[PIB do Agronegócio Brasileiro - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada - CEPEA-Esalq/USP](#)>. Acesso em: 5 de dez. de 2023.

de Castilhos Ghisi, N., Zuanazzi, N. R., Fabrin, T. M. C., & Oliveira, E. C. (2020). Glyphosate and its toxicology: A scientometric review. In *Science of the Total Environment* (Vol. 733). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139359>

Ding, X., & Yang, K.-L. (2013). Development of an Oligopeptide Functionalized Surface Plasmon Resonance Biosensor for Online Detection of Glyphosate. *Analytical Chemistry*, 85(12), 5727–5733. <https://doi.org/10.1021/ac400273g>

Do, M. H., Dubreuil, B., Peydecastaing, J., Vaca-Medina, G., Nhu-Trang, T.-T., Jaffrezic-Renault, N., & Behra, P. (2020). Chitosan-Based Nanocomposites for Glyphosate Detection Using Surface Plasmon Resonance Sensor. *Sensors*, 20(20), 5942. <https://doi.org/10.3390/s20205942>

Duke, S. O., & Powles, S. B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science*, 64(4), 319–325. <https://doi.org/10.1002/ps.1518>

Duncan, K., Lewendon, A., & Coggins, J. R. (1984). The purification of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase from an overproducing strain of *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 165(1), 121–127. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(84\)80027-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(84)80027-7)

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Plantas Daninhas. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/tema-plantas-daninhas/sobre-o-tema>>. Acesso em: 31 de dez. de 2024.

*Environmental Protection Agency (EPA-USA)*. Glyphosate. Disponível em: <<https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations>>. Acesso em: 16 de fev. de 2024.

Eschenburg, S., Healy, M., Priestman, M., Lushington, G., & Schönbrunn, E. (2002). How the mutation glycine96 to alanine confers glyphosate insensitivity to 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *Planta*, 216(1), 129–135. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0908-0>

Funke, T., Han, H., Healy-Fried, M. L., Fischer, M., & Schönbrunn, E. (2006). Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(35). <https://doi.org/10.1073/pnas.0603638103>

Funke, T., Yang, Y., Han, H., Healy-Fried, M., Olesen, S., Becker, A., & Schönbrunn, E. (2009). Structural basis of glyphosate resistance resulting from the double mutation Thr97 → Ile and Pro101 → Ser in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(15). <https://doi.org/10.1074/jbc.M809771200>

Gade, A., Sharma, A., Srivastava, N., & Flora, S. J. S. (2022). Surface plasmon resonance: A promising approach for label-free early cancer diagnosis. *Clinica Chimica Acta*, 527, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2022.01.023>

Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; Protein Identification and Analysis Tools on the ExPasy Server; (In) *John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005)*. pp. 571-607.

Gill, J. P. K., Sethi, N., Mohan, A., Datta, S., & Girdhar, M. (2018). Glyphosate toxicity for animals. *Environmental Chemistry Letters*, 16(2), 401–426. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0689-0>

Gillezeau, C., Van Gerwen, M., Shaffer, R. M., Rana, I., Zhang, L., Sheppard, L., & Taioli, E. (2019). The evidence of human exposure to glyphosate: A review. In *Environmental Health: A Global Access Science Source* (Vol. 18, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s12940-018-0435-5>

Guyton, K. Z., Loomis, D., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Scoccianti, C., Mattock, H., & Straif, K. (2015). Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *The Lancet Oncology*, 16(5), 490–491. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70134-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70134-8)

Haghani, K., Hatef Salmanian, A., Ranjbar, B., Zakikhan-Alang, K., & Khajeh, K. (2008). Comparative studies of wild type *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase with three glyphosate-insensitive mutated forms: Activity, stability and structural characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1784(9), 1167–1175. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.07.021>

Hahnefeld, Claudia & Drewianka, Stephan & Herberg, Friedrich. (2004). Determination of kinetic data using surface plasmon resonance biosensors. *Methods in molecular medicine*. 94. 299-320.

Healy-Fried, M. L., Funke, T., Priestman, M. A., Han, H., & Schönbrunn, E. (2007). Structural basis of glyphosate tolerance resulting from mutations of Pro101 in *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 282(45). <https://doi.org/10.1074/jbc.M705624200>

Herrmann, K. M. (1995). The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *The Plant Cell*, 907–919. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.907>

Herrmann, K. M., & Weaver, L. M. (1999). THE SHIKIMATE PATHWAY. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50(1), 473–503. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.473>

Hinman, S. S., McKeating, K. S., & Cheng, Q. (2018). Surface Plasmon Resonance: Material and Interface Design for Universal Accessibility. *Analytical Chemistry*, 90(1), 19–39. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04251>

Huynh, Q. K. (1987). Reaction of 5-enol-pyruvoylshikimate-3-phosphate synthase with diethyl pyrocarbonate: Evidence for an essential histidine residue. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 258(1), 233–239. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(87\)90340-7](https://doi.org/10.1016/0003-9861(87)90340-7)

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (Ibama). Relatórios de comercialização de agrotóxicos. Disponível em: <[Relatórios de comercialização de agrotóxicos — Ibama \(www.gov.br\)](http://www.gov.br/relatorios-de-agrotoxicos)>. Acesso em: 5 de jan. de 2024.

Kanissery, R., Gairhe, B., Kadyampakeni, D., Batuman, O., & Alferez, F. (2019). Glyphosate: Its Environmental Persistence and Impact on Crop Health and Nutrition. *Plants*, 8(11), 499. <https://doi.org/10.3390/plants8110499>

Karam, J. D., & Konigsberg, W. H. (2000). DNA polymerase of the T4-related bacteriophages. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 64, 65–96. [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(00\)64002-3](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(00)64002-3)

Kimbi Yaah, V. B., Ahmadi, S., Quimbayo M, J., Morales-Torres, S., & Ojala, S. (2024). Recent technologies for glyphosate removal from aqueous environment: A critical review. *Environmental Research*, 240, 117477. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.117477>

Lanzetta, P. A., Alvarez, L. J., Reinach, P. S., & Candia, O. A. (1979). An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Analytical Biochemistry*, *100*(1), 95–97. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90115-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90115-5)

Lewendon, A., & Coggins, J. R. (1987). [43] *3-Phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase from Escherichia coli* (pp. 342–348). [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(87\)42045-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(87)42045-4)

Lopes, A. R., Moraes, J. S., & Martins, C. de M. G. (2022). Effects of the herbicide glyphosate on fish from embryos to adults: a review addressing behavior patterns and mechanisms behind them. *Aquatic Toxicology*, *251*, 106281. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106281>

Ma, L., Liu, H., Liu, X., Yuan, X., Xu, C., Wang, F., Lin, J., Xu, R., & Zhang, D. (2021). Screening S protein – ACE2 blockers from natural products: Strategies and advances in the discovery of potential inhibitors of COVID-19. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *226*, 113857. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113857>

Maeda, H., & Dudareva, N. (2012). The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, *63*(1), 73–105. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105439>

Mendonça, C. F. R., Boroski, M., Cordeiro, G. A., & Toci, A. T. (2020). Glyphosate and AMPA occurrence in agricultural watershed: the case of Paraná Basin 3, Brazil. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, *55*(10), 909–920. <https://doi.org/10.1080/03601234.2020.1794703>

Nascimento, D. Z. do, Marques, G. M., & Trevisol, D. J. (2019). O desafio das agências reguladoras ao redor do mundo no uso do glifosato. *Saúde e Sociedade*, *28*(4), 297–298. <https://doi.org/10.1590/s0104-12902019180684>

Nelson, David L.; Cox, Michael M.. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 7 Porto Alegre: Artmed, 2019, 1278 p.

Nieba, L., Nieba-Axmann, S. E., Persson, A., Hämäläinen, M., Edebratt, F., Hansson, A., Lidholm, J., Magnusson, K., Karlsson, Å. F., & Plückthun, A. (1997). BIACORE Analysis of Histidine-Tagged Proteins Using a Chelating NTA Sensor Chip. *Analytical Biochemistry*, 252(2), 217–228. <https://doi.org/10.1006/abio.1997.2326>

Noori, J. S., Mortensen, J., & Geto, A. (2020). Recent Development on the Electrochemical Detection of Selected Pesticides: A Focused Review. *Sensors*, 20(8), 2221. <https://doi.org/10.3390/s20082221>

Padgett, S. R., Kolacz, K. H., Delannay, X., Re, D. B., LaVallee, B. J., Tinius, C. N., Rhodes, W. K., Otero, Y. I., Barry, G. F., Eichholtz, D. A., Peschke, V. M., Nida, D. L., Taylor, N. B., & Kishore, G. M. (1995). Development, Identification, and Characterization of a Glyphosate-Tolerant Soybean Line. *Crop Science*, 35(5), 1451–1461. <https://doi.org/10.2135/cropsci1995.0011183X003500050032x>

Peillex, C., & Pelletier, M. (2020). The impact and toxicity of glyphosate and glyphosate-based herbicides on health and immunity. *Journal of Immunotoxicology*, 17(1), 163–174. <https://doi.org/10.1080/1547691X.2020.1804492>

Peng, R.-H., Tian, Y.-S., Xiong, A.-S., Zhao, W., Fu, X.-Y., Han, H.-J., Chen, C., Jin, X.-F., & Yao, Q.-H. (2012). A Novel 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase from *Rahnella aquatilis* with Significantly Reduced Glyphosate Sensitivity. *PLoS ONE*, 7(8), e39579. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039579>

Priestman, M. A., Funke, T., Singh, I. M., Crupper, S. S., & Schönbrunn, E. (2005). 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Staphylococcus aureus* is insensitive to glyphosate. *FEBS Letters*, 579(3), 728–732. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.12.057>

Priestman, M. A., Healy, M. L., Funke, T., Becker, A., & Schönbrunn, E. (2005). Molecular basis for the glyphosate-insensitivity of the reaction of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase with shikimate. *FEBS Letters*, 579(25). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.09.066>

Ream, J. E., Steinrücken, H. C., Porter, C. A., & Sikorski, J. A. (1988). Purification and Properties of 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase from Dark-Grown Seedlings of *Sorghum bicolor*. *Plant Physiology*, 87(1), 232–238. <https://doi.org/10.1104/pp.87.1.232>

Ream, J. E., Yuen, H. K., Frazier, R. B., & Sikorski, J. A. (1992). EPSP synthase: binding studies using isothermal titration microcalorimetry and equilibrium dialysis and their implications for ligand recognition and kinetic mechanism. *Biochemistry*, 31(24), 5528–5534. <https://doi.org/10.1021/bi00139a015>

Reynoso, E., Torres, E., Bettazzi, F., & Palchetti, I. (2019). Trends and Perspectives in Immunosensors for Determination of Currently-Used Pesticides: The Case of Glyphosate, Organophosphates, and Neonicotinoids. *Biosensors*, 9(1), 20. <https://doi.org/10.3390/bios9010020>

Robert, X., & Gouet, P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Research*, 42(W1), W320–W324. <https://doi.org/10.1093/nar/gku316>

Schönbrunn, E., Eschenburg, S., Shuttleworth, W. A., Schloss, J. V., Amrhein, N., Evans, J. N. S., & Kabsch, W. (2001). Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(4), 1376–1380. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1376>

Stallings, W. C., Abdel-Meguid, S. S., Lim, L. W., Shieh, H. S., Dayringer, H. E., Leimgruber, N. K., Stegeman, R. A., Anderson, K. S., Sikorski, J. A., Padgett, S. R., & Kishore, G. M. (1991). Structure and topological symmetry of the glyphosate target 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: a distinctive protein fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(11), 5046–5050. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.11.5046>

Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1), 207–234. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>

Sun, Z., Xia, Z., Bi, F., & Liu, J.-N. (2008). Expression and purification of human urodilatin by small ubiquitin-related modifier fusion in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(3), 495–502. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1330-0>

Tai, S., Qian, Z., Ren, H., Barimah, A. O., Peng, C., & Wei, X. (2022). Highly selective and sensitive colorimetric detection for glyphosate based on  $\beta$ -CD@DNA-CuNCs enzyme mimics. *Analytica Chimica Acta*, 1222, 339992. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339992>

Tauhata, S. B. F., Araújo, G. B. de, Alves, S. D. F. de O., Martins, D. N. V., Lopes, L. S., & Casaletti, L. (2020). The glyphosate controversy: an update. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 87. <https://doi.org/10.1590/1808-1657001002018>

Vila-Aiub, M. M., Vidal, R. A., Balbi, M. C., Gundel, P. E., Trucco, F., & Ghersa, C. M. (2008). Glyphosate-resistant weeds of South American cropping systems: an overview. *Pest Management Science*, 64(4), 366–371. <https://doi.org/10.1002/ps.1488>

Walsh, C. T., Benson, T. E., Kim, D. H., & Lees, W. J. (1996). The versatility of phosphoenolpyruvate and its vinyl ether products in biosynthesis. *Chemistry & Biology*, 3(2), 83–91. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(96\)90282-3](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(96)90282-3)

Wang, L., Peng, R., Tian, Y., Gao, J., Wang, B., & Yao, Q. (2019). A thermostable 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Thermotoga maritima* enhances glyphosate tolerance in *Escherichia coli* and transgenic *Arabidopsis*. *Extremophiles*, 23(6), 659–667. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01118-3>

Webb, B., & Sali, A. (2016). Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics*, 54(1). <https://doi.org/10.1002/cpbi.3>

Xu, J., Smith, S., Smith, G., Wang, W., & Li, Y. (2019). Glyphosate contamination in grains and foods: An overview. In *Food Control* (Vol. 106). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106710>

Yi, S., Cui, Y., Zhao, Y., Liu, Z., Lin, Y., & Zhou, F. (2016). A Novel Naturally Occurring Class I 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase from *Janibacter* sp. Confers High Glyphosate Tolerance to Rice. *Scientific Reports*, 6(1), 19104. <https://doi.org/10.1038/srep19104>

Yi, S., Wu, G., Lin, Y., Hu, N., & Liu, Z. (2015). Characterization of a new type of glyphosate-tolerant 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase from *Isoptericola variabilis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 111, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.11.009>

Zambrano-Intriago, L. A., Amorim, C. G., Rodríguez-Díaz, J. M., Araújo, A. N., & Montenegro, M. C. B. S. M. (2021). Challenges in the design of electrochemical sensor for glyphosate-based on new materials and biological recognition. *Science of The Total Environment*, 793, 148496. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148496>

Zhou, C.-Y., Tian, Y.-S., Xu, Z.-S., Zhao, W., Chen, C., Bao, W.-H., Bian, L., Cai, R., & Wu, A.-Z. (2012). Identification of a new gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase using genomic library construction strategy. *Molecular Biology Reports*, 39(12), 10939–10947. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1994-0>

## ANEXO I

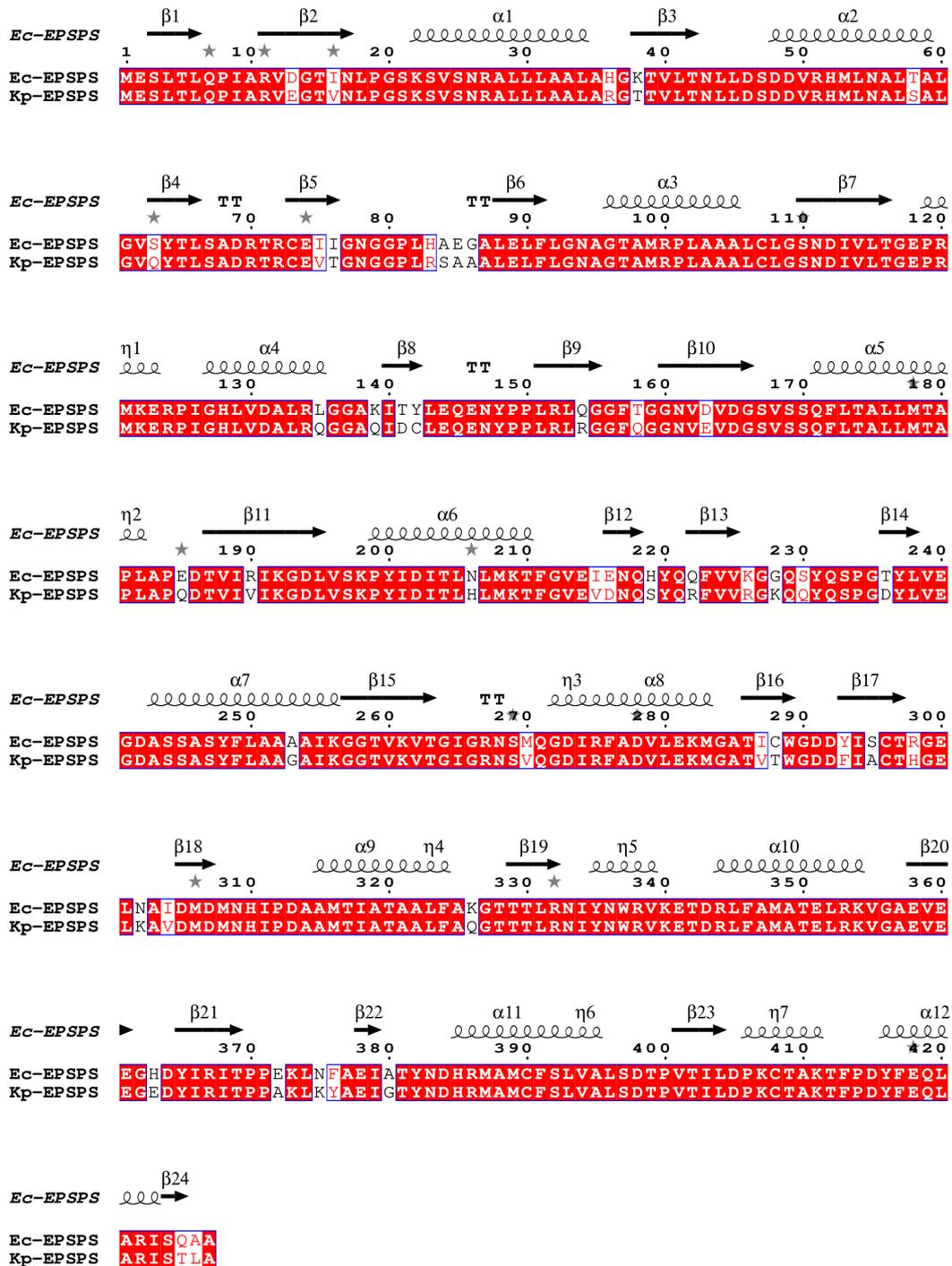


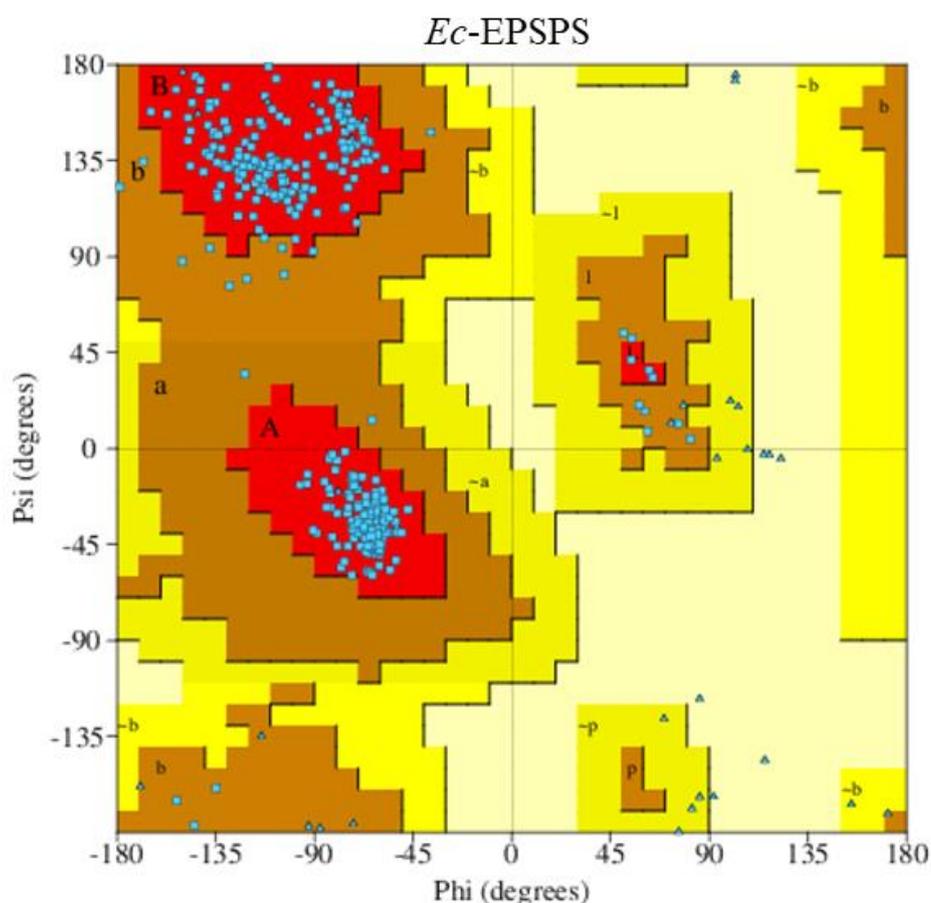
Figura 31 - Alinhamento da sequência de *Ec-EPSPS* com a de *Kp-EPSPS*. Imagem gerada pelo servidor ESPrnt (<https://esprnt.ibcp.fr/>).

## ANEXO II

Gráfico de Ramachandran do modelo de *Ec*-EPSPS gerado por homologia à *Kp*-EPSPS, através do *software Modeller* (<https://salilab.org/modeller/>). A metodologia utilizada foi descrita por Webb et al. (2016).

O gráfico foi produzido e analisado com auxílio da base de dados ProFunc (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/profunc/>), através do servidor PROCHECK (<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/>).

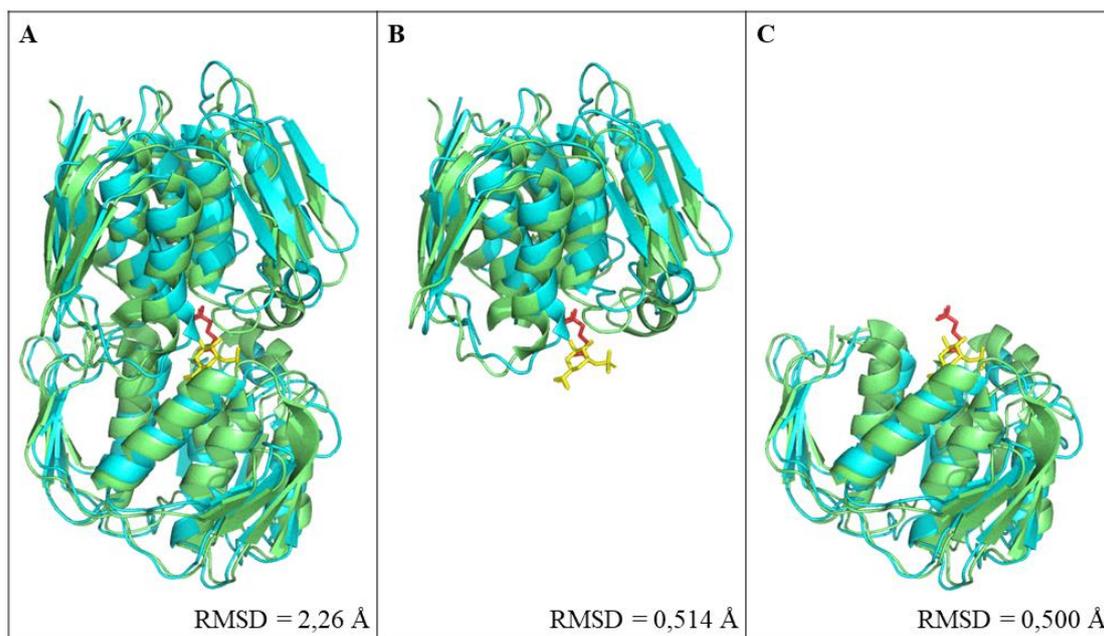
A porcentagem de aminoácidos em regiões mais favoráveis é de 94,0 %. Os outros 6,0 % ainda estão em regiões permitidas. No gráfico, os aminoácidos estão representados como quadrados, exceto as glicinas que são representadas por triângulos.



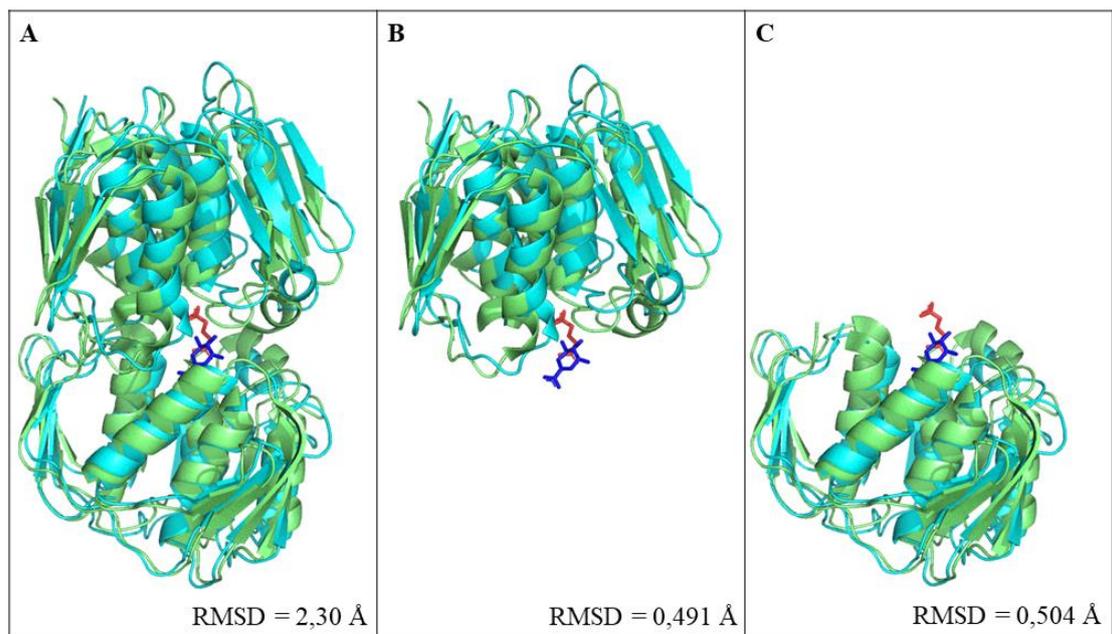
**Figura 32** - Gráfico de Ramachandran do modelo de *Ec*-EPSPS gerado por homologia à *Kp*-EPSPS, através do *software Modeller*.

## ANEXO III

Superposição dos dois domínios de *Ec*-EPSPS, entre as conformações aberta e fechada, por S3P (Figura 33) e shikimato (Figura 34): domínio superior correspondente aos aminoácidos 1-19/241-427; domínio inferior correspondente aos aminoácidos 20-240. Seus respectivos RMSD estão descritos na imagem.



**Figura 33 - A)** Superposição da *Ec*-EPSPS em conformação aberta (ciano), livre de ligantes, à *Ec*-EPSPS em conformação fechada (verde), interagindo com S3P e glifosato. **B)** Superposição dos domínios superiores da *Ec*-EPSPS em conformação aberta e fechada – RMSD = 0,514 Å. **C)** Superposição dos domínios inferiores da *Ec*-EPSPS em conformação aberta e fechada – RMSD = 0,500 Å. Desenhos feitos no *Pymol* versão 2.2.2. S3P e glifosato representados em sticks nas cores amarelo e vermelho, respectivamente. Fonte: elaborada pelo autor.

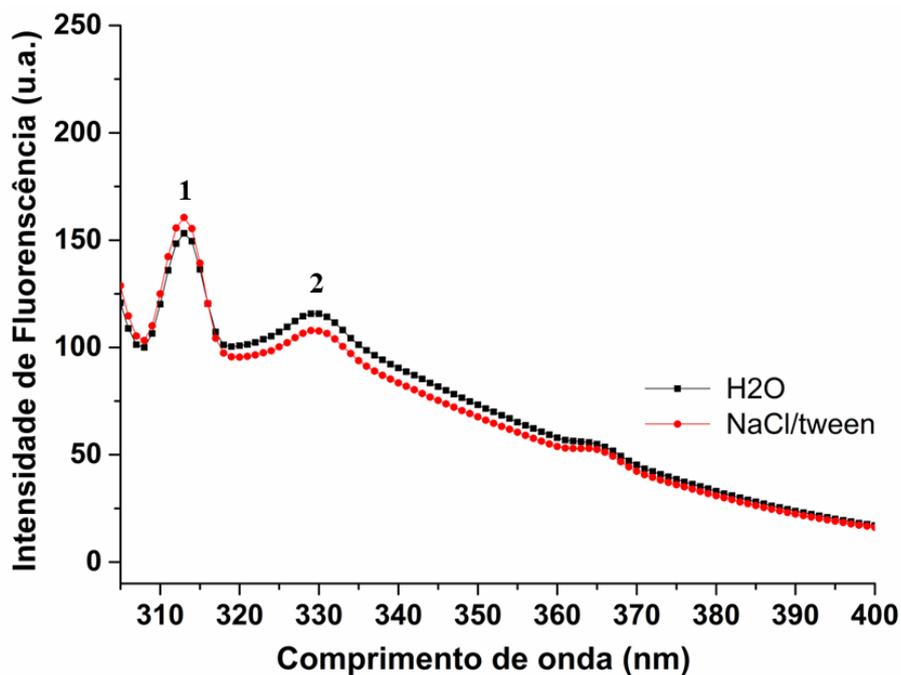


**Figura 34 - A)** Superposição da *Ec*-EPSPS em conformação aberta (ciano), livre de ligantes, à *Ec*-EPSPS em conformação fechada (verde), interagindo com shikimato e glifosato. **B)** Superposição dos domínios superiores da *Ec*-EPSPS em conformação aberta e fechada – RMSD = 0,491 Å. **C)** Superposição dos domínios inferiores da *Ec*-EPSPS em conformação aberta e fechada – RMSD = 0,504 Å. Desenhos feitos no *Pymol* versão 2.2.2. Shikimato e glifosato representados em *sticks* nas cores azul e vermelho, respectivamente. Fonte: elaborada pelo autor.

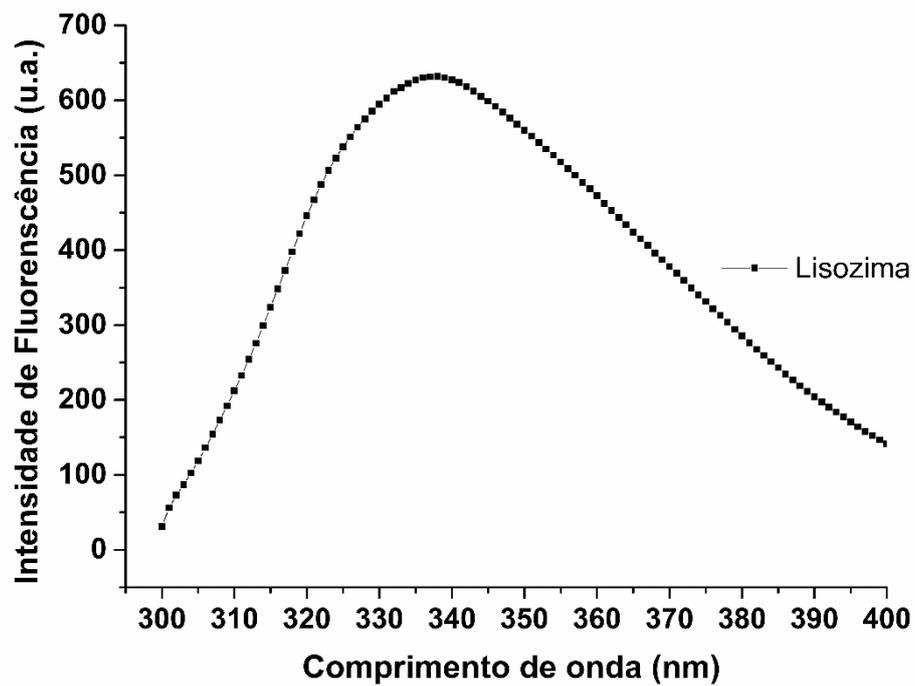
## ANEXO IV

Espectros de Fluorescência da *Ec*-EPSPS a 0,1 mg/mL, em água e na presença de 150 mM de NaCl e 0,1 % de tween 20. A lisozima, a 0,03 mg/mL em água, foi utilizada como controle para demonstrar a sensibilidade do aparelho utilizado.

Medidas de fluorescência da proteína *Ec*-EPSPS foram realizadas no espectrofluorímetro Jasco (Jasco FP-650, Tóquio, Japão) acoplado a um controlador de temperatura do tipo Peltier (Jasco Analytical Instruments, Japão).



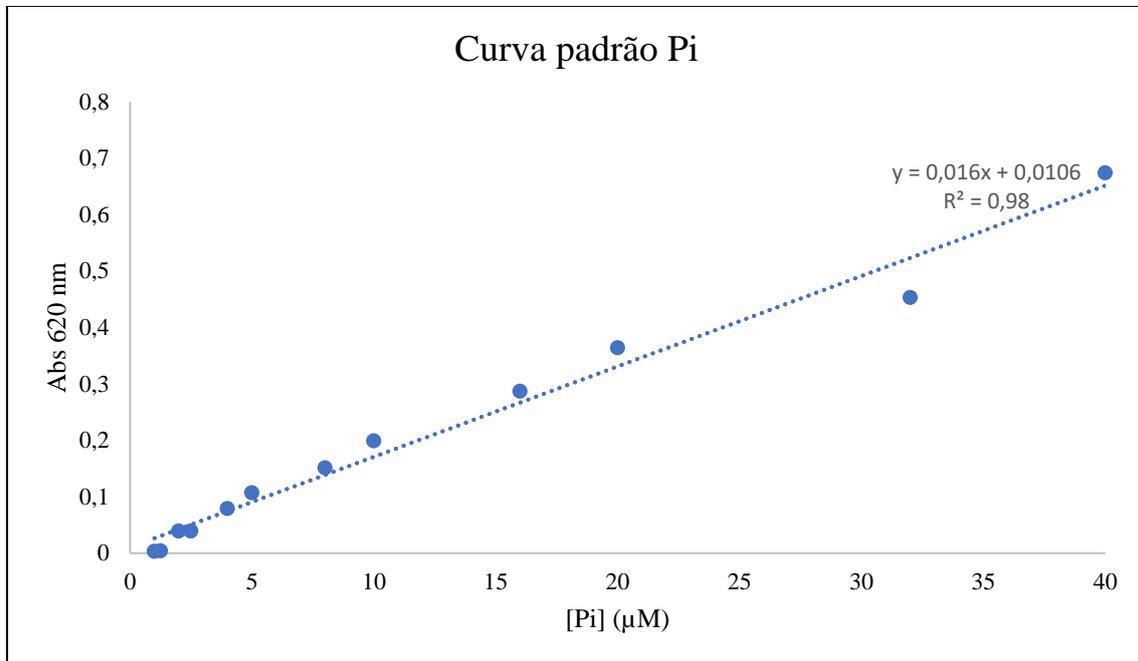
**Figura 35** - Emissão de fluorescência de *Ec*-EPSPS em água ultrapura (tipo 1) e na presença de 150 mM de NaCl e 0,1 % de tween 20 a 25°C. As marcações numéricas indicam as bandas de emissão para tirosina em aproximadamente 312 nm (1) e triptofano em 330 nm (2).



**Figura 36** - Espectro de emissão de lisozima na concentração 0,03 mg/mL em água deionizada, obtido com excitação em 295 nm. A banda em aproximadamente 335 nm corresponde a emissão do triptofano, localizado em ambiente parcialmente exposto ao solvente.

## ANEXO V

Curva padrão de fosfato inorgânico, variando de 0,0  $\mu\text{M}$  a 40  $\mu\text{M}$ .



**Figura 37** - Curva padrão da absorbância em 620 nm de fosfato inorgânico, variando-se a concentração de 0,0  $\mu\text{M}$  a 40  $\mu\text{M}$ .

## ANEXO VI

Tabela 12 – Dados brutos do ensaio de atividade da *Ec*-EPSPS por seus substratos (S3P e PEP).

S3P						PEP					
[S3P] (mM)	Abs 1	Abs 2	[Pi] <sub>1</sub> ( $\mu$ M)	[Pi] <sub>2</sub> ( $\mu$ M)	Média [Pi]	[PEP] (mM)	Abs 1	Abs 2	[Pi] <sub>1</sub> ( $\mu$ M)	[Pi] <sub>2</sub> ( $\mu$ M)	Média [Pi] ( $\mu$ M)
0,300	0,713	0,869	39,3	47,1	43,2 $\pm$ 5,5	0,500	0,996	0,993	54,4	54,3	54,4 $\pm$ 0,1
0,200	0,707	0,808	38,9	43,7	41,3 $\pm$ 3,4	0,400	0,848	0,931	46,3	50,9	48,6 $\pm$ 1,6
0,150	0,665	0,714	36,6	38,6	37,6 $\pm$ 1,4	0,250	0,748	0,766	40,8	41,8	41,3 $\pm$ 0,3
0,100	0,572	0,554	31,5	29,8	30,6 $\pm$ 1,2	0,200	0,664	0,732	36,2	39,9	38,1 $\pm$ 1,3
0,075	0,582	0,619	32,1	33,3	32,7 $\pm$ 0,9	0,125	0,528	0,512	28,7	27,8	28,3 $\pm$ 0,3
0,050	0,448	0,441	24,7	23,6	24,1 $\pm$ 0,8	0,100	0,501	0,464	27,2	25,2	26,2 $\pm$ 0,7
0,040	0,451	0,436	24,9	23,3	24,1 $\pm$ 1,1	0,063	0,365	0,375	19,8	20,3	20,0 $\pm$ 0,2
0,025	0,277	0,274	15,3	14,4	14,8 $\pm$ 0,6	0,050	0,329	0,320	17,8	17,3	17,5 $\pm$ 0,2
0,019	0,290	0,312	16,0	16,5	16,2 $\pm$ 0,3	0,031	0,187	0,394	10,0	21,4	15,7 $\pm$ 4,0
0,013	0,066	0,166	3,7	8,4	6,1 $\pm$ 3,3	0,025	0,165	0,187	8,8	10,0	9,4 $\pm$ 0,4
0,009	0,060	0,145	3,4	7,3	5,3 $\pm$ 2,8	0,016	0,063	0,082	3,2	4,2	3,7 $\pm$ 0,4
0,006	0,013	0,090	0,8	4,3	2,5 $\pm$ 2,4	0,012	0,084	0,071	4,3	3,6	4,0 $\pm$ 0,3
0,000	0,000	0,000	0,0	0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,000	0,000	0,000	0,0	0,0	0,0 $\pm$ 0,0

## ANEXO VII

Tabela 13 – Dados brutos do ensaio de inibição da *Ec*-EPSPS pelo glifosato.

[Glifosato] ( $\mu\text{M}$ )	Abs 1	Abs 2	Abs 3	At. Rel. 1 (%)	At. Rel. 2 (%)	At. Rel. 3 (%)	Média (At. Rel.)	Inibição 1 (%)	Inibição 2 (%)	Inibição 3 (%)	Média (Inibição)
0	1,110	1,090	1,356	100,0	100,0	100,0	100,0 $\pm$ 0,0	0,0	0,0	0,0	0,0 $\pm$ 0,0
0,488	1,292	0,742	1,216	116,4	68,1	89,7	89,7 $\pm$ 24,2	-16,4	31,9	10,3	10,3 $\pm$ 24,2
0,977	1,241	0,848	1,160	111,8	77,8	85,5	85,5 $\pm$ 17,8	-11,8	22,2	14,4	14,4 $\pm$ 17,8
1,953	1,275	0,896	1,029	114,9	82,2	75,9	82,2 $\pm$ 20,9	-14,9	17,8	24,1	17,8 $\pm$ 20,9
3,906	0,959	0,961	0,904	86,4	88,2	66,7	86,4 $\pm$ 11,9	13,6	11,8	33,3	13,6 $\pm$ 11,9
7,813	0,822	0,808	0,684	74,0	74,1	50,4	74,0 $\pm$ 13,6	25,9	25,9	49,6	25,9 $\pm$ 13,6
15,625	0,653	0,628	0,515	58,8	57,6	38,0	57,6 $\pm$ 11,7	41,2	42,4	62,0	42,4 $\pm$ 11,7
31,250	0,403	0,433	0,306	36,3	39,8	22,6	36,3 $\pm$ 9,1	63,7	60,2	77,4	63,7 $\pm$ 9,1
62,500	0,231	0,259	0,168	20,8	23,8	12,4	20,8 $\pm$ 5,9	79,2	76,2	87,6	79,2 $\pm$ 5,9
125,000	0,173	0,167	0,113	15,6	15,3	8,3	15,3 $\pm$ 4,1	84,4	84,7	91,7	84,7 $\pm$ 4,1
250,000	0,077	0,112	0,053	7,0	10,3	3,9	7,0 $\pm$ 3,2	93,0	89,7	96,1	93,0 $\pm$ 3,2
500,000	0,059	0,036	0,031	5,3	3,3	2,3	3,3 $\pm$ 1,5	94,6	96,7	97,7	96,7 $\pm$ 1,5
1000,000	0,069	0,066	0,028	6,2	6,1	2,1	6,0 $\pm$ 2,4	93,8	93,9	97,9	93,9 $\pm$ 2,4
2000,000	0,000	0,000	0,000	0,0	0,0	0,0	0,0 $\pm$ 0,0	100,0	100,0	100,0	100,0 $\pm$ 0,0

## ANEXO VIII

Os índices de refração das diferentes soluções aplicadas ao sistema de SPR foram obtidos após realização dos experimentos apresentados neste trabalho, assim estão registrados neste anexo para futuras observações. Foi utilizado um refratômetro digital: HUIOP SMART SENSOR ST335A (resolução  $\pm 0,1\%$  brix, faixa de medição 0.0% ~35.0% em brix, índices de refração: 1.33300 ~1.42600) da Nanning Bokun Instrument Equipment Co., China.

<b>Soluções</b>	<b>Índices de Refração</b>
água deionizada	1,33301
tampão HBS-EPS	1,33550
água deionizada	1,33291
tampão TRIS	1,33673
água deionizada	1,33295
sulfato de níquel	1,33424
água deionizada	1,33295
tampão TRIS	1,33660
<i>Ec</i> -EPSPS	1,33292
glifosato 2,5 mM	1,33298
glifosato 5,0 mM	1,33302
glifosato 10,0 mM	1,33305
glifosato 20,0 mM	1,33355
glifosato 40,0 mM	1,33406
lisozima 0,1 mg/mL	1,33296