

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0801904-5 A2**



* B R P I 0 8 0 1 9 0 4 A 2 *

(22) Data de Depósito: 15/05/2008

(43) Data da Publicação: 12/01/2010
(RPI 2036)

(51) *Int.Cl.:*

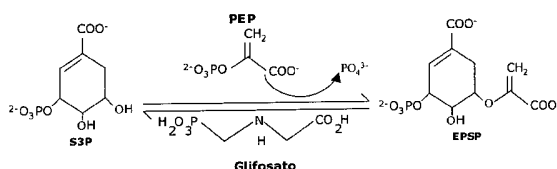
A01N 57/20 (2010.01)

(54) Título: **COMPOSTOS INIBIDORES DA ENZIMA EPSP SINTASE COMO INGREDIENTES ATIVOS DE HERBICIDAS**

(73) Titular(es): Universidade Federal de Lavras

(72) Inventor(es): Elaine Fontes Ferreira da Cunha, Melissa Soares Caetano, Teodorico de Castro Ramalho

(57) Resumo: COMPOSTOS INIBIDORES DA ENZIMA EPSP SINTASE COMO INGREDIENTES ATIVOS DE HERBICIDAS. A presente invenção refere-se a estruturas químicas análogas ao glifosato, inibidor da enzima EPSP sintase e principal ingrediente ativo do herbicida Roundup®, obtidas por substituição de grupos funcionais que proporcionam melhor interação com essa enzima. A substituição do átomo de hidrogênio ligado ao carbono próximo ao grupo fosfato por um grupo metóxi ou metil confere a um dos compostos uma melhor interação com o sítio ativo da enzima alvo, sendo, portanto, um inibidor mais potente que o glifosato. A tecnologia deve ser utilizada para erradicação de plantas daninhas em culturas extensivas de difícil controle de plantas invasoras. Os dados referentes à melhor interação da invenção com a enzima alvo em relação ao composto já existente são baseados na simulação computacional do ancoramento molecular ("docking"), técnica que se baseia em simular a afinidade de uma droga ao sítio receptor de uma enzima.





COMPOSTOS INIBIDORES DA ENZIMA EPSP SINTASE COMO INGREDIENTES ATIVOS DE HERBICIDAS

A presente invenção refere-se a estruturas químicas inibidoras da EPSP sintase, obtidas por substituição de grupos funcionais que proporcionem
5 melhor interação com essa enzima. A substituição do átomo de hidrogênio ligado ao carbono próximo ao grupo fosfato por um grupo metóxi ou metil confere a um dos compostos objeto da presente invenção, uma melhor interação com o sítio ativo da enzima alvo, sendo, portanto, um inibidor potente. A tecnologia deve ser utilizada para erradicação de plantas daninhas
10 em culturas extensivas de difícil controle de plantas invasoras.

A presente invenção é análoga ao glifosato, que é um dos herbicidas mais comercializados no mundo, porém mais potente do que esse.

O glifosato pertence ao grupo químico das glicinas substituídas, classificado como não-seletivo e de ação sistêmica, e age no interior da planta,
15 circulando com a seiva. Apresenta largo espectro de ação, o que possibilita um excelente controle de plantas daninhas anuais ou perenes, tanto de folhas largas como estreitas.

Quanto à absorção, o glifosato é absorvido basicamente pela região clorofilada das plantas (folhas e tecidos verdes) e translocado,
20 preferencialmente pelo floema, para os tecidos meristemáticos. Atua como um potente inibidor da atividade da enzima EPSP sintase (5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase). Nenhuma outra classe de herbicidas comerciais inibe essa enzima que é catalisadora de uma das reações de síntese dos aminoácidos aromáticos essenciais fenilalanina, tirosina e triptofano. Quando ocorre a
25 redução desses aminoácidos a planta pára de crescer, mas essa simples redução de aminoácidos não explica a ação final do herbicida. Acredita-se que a desregulação da rota do ácido shikímico resulta na perda de carbonos disponíveis para outras reações celulares na planta, uma vez que 20% do carbono das plantas são utilizados nessa rota metabólica. A enzima EPSP
30 sintase influencia também em outros processos como a inibição da síntese de clorofila impedindo a fotossíntese, estimula a produção de etileno e nitrato em

níveis tóxicos à planta, reduz a síntese de proteínas e eleva a concentração do ácido 3-indol acético (IAA) na gema apical inibindo o desenvolvimento das gemas laterais impedindo o crescimento e acelerando a morte da planta.

Várias pesquisas demonstram que o glifosato forma um complexo ternário com a enzima EPSP sintase e o S3P (EPSPS-S3P-glifosato). O complexo ternário formado é semelhante ao complexo EPSPS-S3P-PEP requerido para a catálise (com substrato natural PEP). Enquanto algumas modificações na estrutura do PEP são toleradas, menores mudanças estruturais no glifosato levam a uma perda significativa no potencial inibidor, reduzindo a atividade herbicida.

Até o momento, não existem análogos ao glifosato mais ativos e os compostos descritos na literatura são α -substituídos ao grupamento ácido ou N-substituídos. É importante salientar que uma das primeiras enzimas resistentes ao glifosato é a EPSP sintase mutante Gly96Ala da *Klebsiella pneumoniae*. A enzima mutante é insensível ao glifosato com afinidade inalterada pelo primeiro substrato, shikimato-3-fosfato (S3P), mas apresenta uma afinidade 30 vezes menor pelo segundo substrato, fosfoenolpiruvato (PEP) (ESCHENBURG, Susanne; HEALY, Martha L.; PRIESTMAN, Melanie A.; SCHONBRUNN, Gerald H.; LUSHINGTON, Ernest How the mutation glycine96 to alanine confers glyphosate insensitivity to 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase from Escherichia coli. 2002. Planta, v. 216, p. 129–135). De acordo com Eschenburg et al., a concentração mínima do glifosato capaz de inibir 50% da atividade enzimática (IC50) da EPSP sintase da Escherichia coli nativa é 0,01 mM e da mutante Gly96Ala >10mM.

A atuação do glifosato como herbicida foi descoberta pela empresa Monsanto em 1970 e a primeira formulação comercial foi lançada nos Estados Unidos em 1974, com o nome comercial de Roundup®. Atualmente é utilizado em mais de 130 países, sendo aplicado para controle de plantas daninhas nas áreas agrícolas, industriais, florestais, residenciais e ambientes aquáticos. A toxicidade relativamente baixa pode ser atribuída à modalidade bioquímica de ação do glifosato em um caminho metabólico nas plantas (chamado

mecanismo do ácido "shikimico"), similar ao existente em alguns microorganismos mais complexos, não existindo, entretanto, em animais. Apesar da elevada eficiência, o herbicida não tem ação sobre as sementes das ervas no solo e, portanto, deve ser aplicado quando as espécies a serem
5 eliminadas emergirem do solo. A presente invenção, segundo os cálculos realizados, mostrou-se mais estável no sítio ativo da enzima alvo, apresentando melhor interação, sendo assim um inibidor mais potente que o glifosato e, conseqüentemente, um melhor herbicida para o controle de ervas daninhas.

10 Por meio de busca de anterioridade nos bancos de patentes, pesquisando-se sobre os análogos de glifosato, foram encontrados alguns ácidos aminofosfônicos substituídos, como pode ser visto nas patentes GB 1471591 e IE 47653, mas nenhum dos compostos com a substituição no local proposto nesta invenção e não apresentam a mesma aplicação.

15 O objeto da presente invenção são novos inibidores da EPSP sintase análogos ao glifosato, que serão utilizados como princípio ativo para herbicida mais potente que o existente no mercado, na erradicação de plantas daninhas em culturas extensivas de difícil controle de plantas invasoras.

A presente invenção será descrita com referência ao esquema abaixo:

20 A enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase catalisa a reação de transferência do grupamento enolpiruvil do fosfoenolpiruvato (PEP) para o shikimato-3-fosfato (S3P) formando os produtos 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato (EPSP) e fosfato inorgânico (Pi) (Esquema 1).

Esquema 1 – No esquema 1, pode-se observar a reação catalisada pela EPSP
25 sintase, onde o glifosato é competidor do substrato natural PEP e atua inibindo a enzima impedindo, portanto, a formação dos produtos 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato (EPSP) e fosfato inorgânico (Pi).

Descreve-se, a seguir, com detalhes, a realização da presente invenção:

30 Os dados referentes à melhor interação da invenção com a enzima alvo em relação ao composto já existente são baseados na simulação

computacional do ancoramento molecular ("docking"), técnica que se baseia em simular a afinidade de uma droga ao sítio receptor de uma enzima. O ancoramento molecular utiliza a estrutura tridimensional dos biorreceptores para analisar interações com ligantes. É um método que prediz a orientação preferida de uma molécula em relação a uma segunda quando vinculadas uma a outra para formar um complexo estável. O conhecimento da orientação preferida, por sua vez, pode ser utilizado para prever a afinidade entre as duas moléculas usando, por exemplo, funções.

Docking é frequentemente utilizado para prever a ligação e a orientação de pequenas moléculas em relação à proteína alvo, desempenhando um papel importante na concepção racional de novos inibidores.

Pesquisas de síntese, testes biológicos e elaboração de formulações podem ser conduzidos focando-se o interesse nas estruturas propostas, evitando experimentos preliminares e, conseqüentemente, insucesso e custos elevados durante o processo.

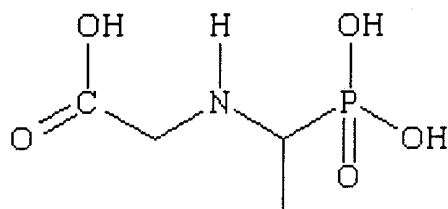
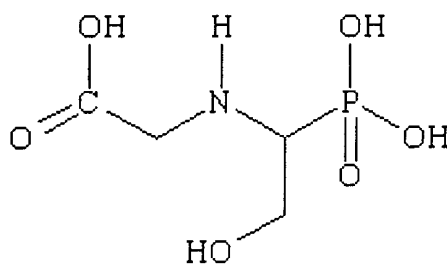
A disponibilidade de programas computacionais de química e os bancos de dados em rede são, atualmente, ferramentas fundamentais para a descoberta e o planejamento de compostos. Estas informações permitem uma análise rápida da atividade biológica *versus* propriedades físico-químicas de uma série de moléculas de interesse.

O ancoramento molecular é uma das mais importantes técnicas de investigação das interações moleculares entre a proteína e um ligante nos casos em que a estrutura 3D da proteína já foi elucidada. Este tipo de simulação encontra a estrutura mais estável do complexo proteína-ligante e calcula essa estabilidade relativa (KUNTZ, I.D.; BLANEY, J.M.; OATLEY, S.J.; *et al.* A geometric approach to macromolecule- ligand interations. 1982. *Journal of molecular biology*. v. 161, p. 269-288. LEACH, P.G.L.; ZNOJIL, M. On the elementary schrodinger bound-states and their multiplets. 1992. *Journal of mathematical physics*. V. 33, p. 2785-2794.).

Estruturas químicas de inúmeras enzimas, obtidas cristalograficamente, são amplamente disponíveis em bancos de dados, como o PDB (Protein Data Bank) e a inserção da droga no sítio ativo dessas enzimas pode ser modelada computacionalmente (*docking*) (BERMAN, H. M.;
 5 Wesrbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G. et al. *Nucleic Acids Research* 2000, 28, 235.).

O aspecto inovador da presente invenção consiste no fato de se estabelecer computacionalmente a estrutura mais estável do complexo proteína-ligante e calcular essa estabilidade relativa. Estruturas químicas,
 10 especialmente uma (B), apresenta atividade herbicida substancialmente maior do que todas aquelas existentes no estado da técnica (SIKORSKI, J.A.; GRUYS, K. *Understanding Glyphosate's molecular mode of action with EPSP synthase: Evidence favoring an allosteric inhibitor model. Acc. Chem. Res*, 1997. v. 30, p. 2-8.).

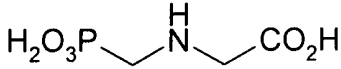
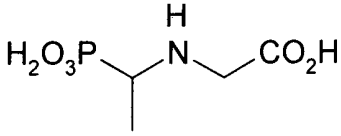
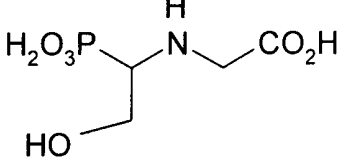
15

**A****B**

A substituição do átomo de hidrogênio ligado ao carbono próximo ao grupo fosfato por um grupo metóxi ou metil confere a um dos compostos uma melhor interação com o sítio ativo da enzima alvo, sendo, portanto, um inibidor

mais potente que o glifosato. A substituição dos grupos funcionais no qual foram obtidos os análogos A e B, não alteram a forma de ação do glifosato; ele continua sendo pós-emergente, sistêmico e não seletivo.

- 5 **Tabela 1.** Glifosato e análogos e seus respectivos valores de energia intermolecular (Kcal/mol).

	Energia Intermolecular kcal/mol
	-115,46
	-108,97
	-117,14

- 10 A estrutura cristalográfica da enzima EPSP sintase, incluindo águas de cristalização, S3P, e o inibidor glifosato, foram obtidos do “Protein Data Bank” (PDB – código: 1G6S). Os átomos de hidrogênio foram adicionados à estrutura do complexo.

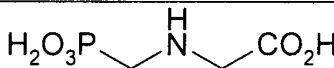
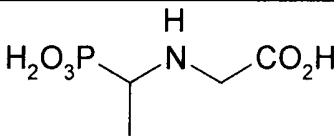
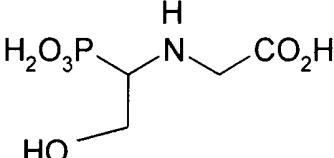
A posição e a orientação inicial usada para o ancoramento dos dois derivados do glifosato na enzima EPSP sintase foram obtidas pela modificação do ligante extraído do PDB.

- 15 Modificou-se o átomo de hidrogênio ligado ao carbono, próximo ao grupo fosfato na estrutura do inibidor, por grupamentos metil e metoxi, dando origem à estrutura dos análogos.

- 20 Foram estabelecidos computacionalmente os valores de energia intermolecular para o glifosato e para a presente invenção também na enzima mutante Gly96Ala, onde foi realizada apenas a substituição do resíduo de

aminoácido Glicina 96 pela Alanina no sítio ativo da enzima EPSP sintase (Tabela 2).

Tabela 2. Energia intermolecular para glifosato e análogos na enzima EPSP sintase mutante Gly96Ala.

	Energia Intermolecular kcal/mol
	-49,3044
	-48,5263
	-68,2900

5

Esses dados corroboram com os dados experimentais, uma vez que o glifosato se mostrou menos estável na enzima mutante com relação à enzima nativa. O análogo com substituinte metóxi, de acordo com a presente invenção, apresentou-se mais estável que os produtos existentes no mercado, tanto na enzima nativa quanto na enzima mutante. De maneira semelhante ao glifosato, apresentou menor estabilidade no docking com a enzima mutante, o que significa que a enzima mutante Gly96Ala seria também insensível à presente invenção.

10

Os resultados de *docking* se basearam na complementaridade receptor-ligante, considerando propriedades estéricas e eletrostáticas, bem como o potencial de interação no complexo e energia intramolecular do ligante.

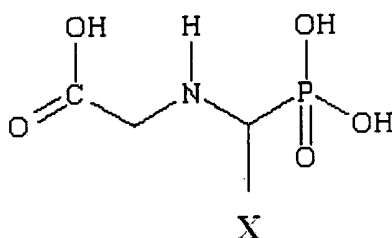
15

Estudos de *docking* permitiram propor herbicidas altamente potentes, estruturalmente parecidos com compostos já conhecidos, todavia com atividades biológicas calculadas significativamente superiores tanto para a enzima nativa EPSP sintase quanto para a enzima mutante Gly96Ala, tornando-os úteis como herbicidas no controle de ervas daninhas.

20

REIVINDICAÇÕES

- 1- "COMPOSTOS INIBIDORES DA ENZIMA EPSP SINTASE COMO INGREDIENTES ATIVOS DE HERBICIDAS" **caracterizados pela** determinação computacional de estruturas químicas potencialmente úteis como herbicidas, compostos análogos ao "glifosato" substituídos na posição α ao grupamento fosfato e que possuem a seguinte fórmula:

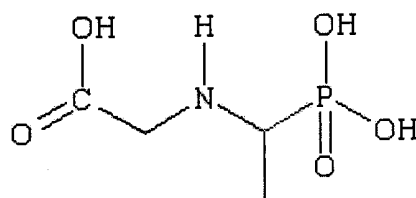
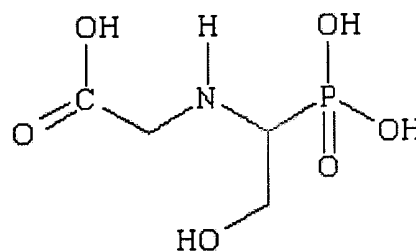


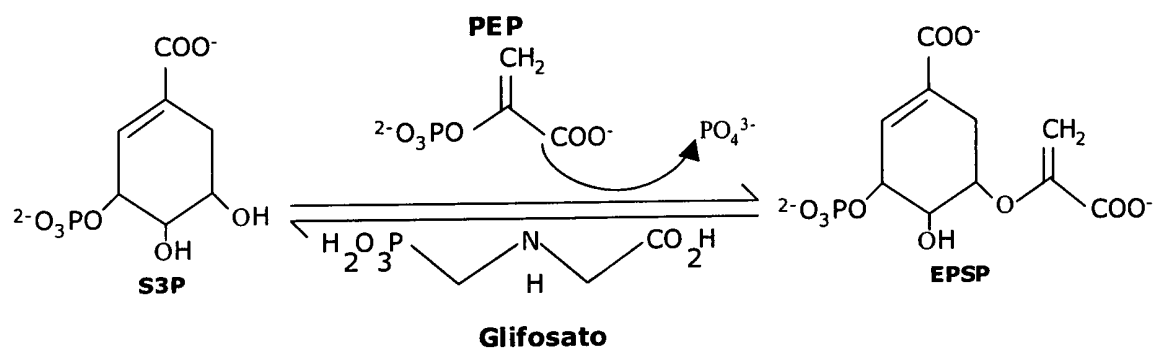
- Ou um correspondente sal ou solvato agronomicamente aceitável, onde X representa grupo metileno ou carbono ligado direta ou indiretamente a um ou dois substituintes polares ou não polares, consistindo de carbono duplamente ligado $=C(H)_2$ ou $C(R')_2$, oxigênio duplamente ligado ($=O$), hidroxila, alquila de 1 a 10 carbonos, alquenilas de 1 a 10 carbonos, grupo alquila substituído por grupo carregado, como $-S(R'')_2^+$, $-N(R'')_3^+$, $-P(R'')_3^+$ ou $-OSO_3^+$, alcóxila de 1 a 10 carbonos, arila de 6 a 10 carbonos; halogênios, halogenetos de metila, haletos de metileno ($=C_2$); epóxidos opcionalmente substituídos (ou oxirano); acila ($-CO-R'$); ($-CO_2-R'$); CH_2OH e hidrogênio; onde halogênio é F, Cl, Br e I; grupo polar ou apolar, ou grupos doadores e aceptores de elétrons, tal como metóxi ($-CH_2OH$) ou amina ($-CH_2NH_2$) substituindo um hidrogênio ligado ao carbono próximo ao grupo fosfato.

- 2- "COMPOSTOS INIBIDORES DA ENZIMA EPSP SINTASE COMO INGREDIENTES ATIVOS DE HERBICIDAS" de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pela** determinação das atividades biológicas (herbicida) desses compostos até duas vezes maior que as atividades biológicas experimentais de compostos derivados.

3- “COMPOSTOS INIBIDORES DA ENZIMA EPSP SINTASE COMO INGREDIENTES ATIVOS DE HERBICIDAS” de acordo com a reivindicação 1 e 2, **caracterizado pelo** uso dos estudos de *docking* para predição das atividades herbicidas das estruturas químicas propostas.

- 5 4- “COMPOSTOS INIBIDORES DA ENZIMA EPSP SINTASE COMO INGREDIENTES ATIVOS DE HERBICIDAS” de acordo com a reivindicação 1 a 3, **caracterizado por** constituir-se de compostos análogos ao glifosato, inibidores da enzima EPSP sintase (5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase), com as seguintes fórmulas ou correspondentes sais ou solvatos
- 10 agronomicamente aceitáveis:

**A****B**



Esquema 1

P10801904-5

RESUMO

**COMPOSTOS INIBIDORES DA ENZIMA EPSP SINTASE COMO
INGREDIENTES ATIVOS DE HERBICIDAS**

A presente invenção refere-se a estruturas químicas análogas ao
5 glifosato, inibidor da enzima EPSP sintase e principal ingrediente ativo do
herbicida Roundup®, obtidas por substituição de grupos funcionais que
proporcionam melhor interação com essa enzima. A substituição do átomo de
hidrogênio ligado ao carbono próximo ao grupo fosfato por um grupo metóxi ou
metil confere a um dos compostos uma melhor interação com o sítio ativo da
10 enzima alvo, sendo, portanto, um inibidor mais potente que o glifosato. A
tecnologia deve ser utilizada para erradicação de plantas daninhas em culturas
extensivas de difícil controle de plantas invasoras. Os dados referentes à
melhor interação da invenção com a enzima alvo em relação ao composto já
existente são baseados na simulação computacional do ancoramento
15 molecular ("docking"), técnica que se baseia em simular a afinidade de uma
droga ao sítio receptor de uma enzima.