



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

RENATO POLIMENI CONSTANTIN

**MODELAGEM E PROSPECÇÃO DE INIBIDORES PARA A PIRUVATO  
ORTOFOSFATO DICINASE**

Efeito herbicida do ácido bromoacético

Maringá  
2018

RENATO POLIMENI CONSTANTIN

**MODELAGEM E PROSPECÇÃO DE INIBIDORES PARA A PIRUVATO  
ORTOFOSFATO DICINASE**  
Efeito herbicida do ácido bromoacético

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

Orientador: Prof. Dr. Rogério Marchiosi  
Coorientador: Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho

Maringá  
2018

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

Constantin, Renato Polimeni

C758m      Modelagem e prospecção de inibidores para a  
piruvato ortofosfato dicinase: efeito herbicida do  
ácido bromoacético/ . -- Maringá, 2018.  
35 f. : il. color., figs.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Marchiosi.  
Coorientador: Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de  
Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2018.

1. Prospecção de inibidores. 2. Bioquímica  
vegetal. 3. Piruvato ortofosfato dicinase. 4.  
Modelagem molecular. 5. *Diglitaria sanguinalis*. 6.  
Ancoramento molecular. 7. Herbicidas. I. Marchiosi,  
Rogério, orient. II. Ferrarese-Filho, Osvaldo,  
coorient. III. Universidade Estadual de Maringá.  
Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDD 22. ED.571.2

JLM-001931

RENATO POLIMENI CONSTANTIN

**MODELAGEM E PROSPECÇÃO DE INIBIDORES PARA A PIRUVATO  
ORTOFOSFATO DICINASE**

Efeito herbicida do ácido bromoacético

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

Aprovado em: ...../...../20

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Rogério Marchiosi  
Universidade Estadual de Maringá

---

Profa. Dra. Patrícia da Costa Zonetti  
Universidade Federal do Paraná (UFPR/Palotina)

---

Profa. Dra. Graciene de Souza Bido  
Unicesumar

## BIOGRAFIA

**Renato Polimeni Constantin** nasceu em Maringá-PR em 04 de maio de 1990. Possui graduação em Farmácia pela Universidade Estadual de Maringá (2013). Foi estagiário do Laboratório de Metabolismo Hepático, Departamento de Bioquímica (2009-2013) e estagiário do Laboratório de Bioquímica de Plantas - BIOPLAN, Departamento de Bioquímica (2015). Iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – área de concentração Biologia Celular e Molecular – em março de 2016, desenvolvendo o trabalho “**MODELAGEM E PROSPECÇÃO DE INIBIDORES PARA A PIRUVATO ORTOFOSFATO DICINASE: Efeito herbicida do ácido bromoacético**”, com defesa da dissertação marcada para 26 de fevereiro de 2018.

Primeiro agradeço e dedico a Deus  
Divino e misericordioso  
Segundo a minha família  
Que para mim sempre foram bondosos  
A todos os amigos e parentes  
Quero os agradecer  
Os presentes e os ausentes  
A todos  
Quero dizer muito obrigado

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento  
envolvido. Não na vitória propriamente dita.”  
Mahatma Gandhi

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe e meu irmão que convivem dia a dia comigo e me apoiam em todos os sentidos.

Ao meu pai pelo incentivo e pelo carinho.

Ao professor Rogério, meu orientador, pela oportunidade e por todos os ensinamentos e diretrizes, não somente científicos, mas também com palavras sábias que sempre levarei comigo.

À professora Jorgete, pelo exemplo de pessoa que sempre foi em minha vida, me direcionando para bons caminhos.

À Cidinha, que sempre de bem com a vida, espalhando alegria, até mesmo em momentos difíceis, me ajudou muito.

À professora Emy pelas palavras amigas.

Ao professor Osvaldo e ao professor Wanderley pelo apoio intelectual.

À Érica, pela atenção em todos os momentos que precisei.

À professora Cida, que tem dirigido tão bem o Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas.

Aos amigos dos laboratórios de Bioquímica de Plantas e Oxidações Biológicas, funcionários, professores, pós-graduandos e bolsistas, pelo carinho e amizade de todos.

## APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta por um artigo científico que trata da modelagem e prospecção de inibidores para a piruvato ortofosfato dicinase como uma estratégia para o desenvolvimento de novos herbicidas. O artigo será submetido à revista **Pest Management Science** (IF = 3,253), Qualis B1.

Renato Polimeni Constantin, Danielly Caroline Inacio Martarello, Gabriele Sauthier Romano de Melo, Paulo Sergio Alves Bueno, Wanderley Dantas dos Santos, Osvaldo Ferrarese-Filho, Flavio Augusto Vicente Seixas and Rogério Marchiosi. Modelagem e prospecção de inibidores para a piruvato ortofosfato dicinase: Efeito herbicida do ácido bromoacético.

## RESUMO GERAL

**INTRODUÇÃO E OBJETIVOS** – As plantas daninhas constituem um dos principais empecilhos à produção agrícola, podendo ocasionar perdas de até 80%. Isso porque elas competem com as culturas por recursos naturais tais como luz, água, nutrientes e espaço. Adicionalmente, problemas como a redução da qualidade e a maturação desuniforme dos grãos também são consequências da presença de plantas daninhas, que em casos extremos, podem até inviabilizar a colheita. A seleção de biótipos resistentes apresentado por algumas plantas daninhas é ocasionado pela persistente aplicação ou uso indiscriminado de um dado herbicida sobre uma população. Dessa forma, plantas que expressam uma dada característica que a habilita crescer na presença do herbicida podem tornar-se a população dominante. Adicionalmente, a pequena diversidade de herbicidas utilizando um reduzido número de mecanismos de ação está aumentando a ocorrência de resistência aos herbicidas. A seleção de plantas daninhas resistentes a herbicidas vem sendo descrito desde 1957 e, atualmente, estima-se que existam 300 biótipos que apresentam resistência para algum mecanismo de ação. O problema do surgimento de espécies resistentes a herbicidas é agravado pelo fato de surgirem biótipos resistentes a mais de um mecanismo de ação, o que tem limitado as formas de controle disponíveis para algumas espécies. O caso da resistência do capim-amargoso (*Digitaria insularis*) ao glifosato merece especial atenção. Especificamente no caso do capim-amargoso, o principal problema tem sido a seleção de biótipos resistentes ao glifosato, um dos mais importantes herbicidas do sistema de produção de grãos. É uma espécie de gramínea de ciclo perene com metabolismo fotossintético do tipo C<sub>4</sub>, porém apresenta crescimento inicial lento até 45 dias após a emergência (DAE). Dos 45 aos 105 DAE o seu crescimento é acelerado, apresentando aumento exponencial de matéria seca. Na fase de crescimento exponencial, parte do incremento de massa seca das raízes a partir dos 45 DAE se deve à formação dos rizomas. Plantas que utilizam a via fotossintética C<sub>4</sub> são altamente representadas como as piores plantas daninhas do mundo, com apenas quatro espécies de plantas C<sub>4</sub> sendo agriculturalmente produtivas (milho, sorgo, milheto e cana-de-açúcar). Existem três variações do metabolismo C<sub>4</sub>, e as plantas C<sub>4</sub> foram classificadas em três grupos de acordo com a reação de descarboxilação localizada nas células da bainha do feixe vascular. Independentemente da via presente, a enzima piruvato ortofosfato dicinase (PPDK) é crucial para o funcionamento do metabolismo C<sub>4</sub>. A PPDK catalisa um passo limitante da velocidade no ciclo C<sub>4</sub>, fazendo-se um alvo extremamente atrativo para o desenvolvimento de herbicidas seletivos que bloqueiem o crescimento de plantas daninhas C<sub>4</sub>. Além disso, esta enzima não foi, até o momento, descrita em animais, reduzindo a probabilidade de que compostos inibidores da PPDK tenham efeitos toxicológicos adversos ou mesmo impactos ambientais. Embora a estrutura tridimensional da PPDK de *Digitaria insularis* ainda não tenha sido determinada por nenhum método experimental, a sequência de aminoácidos que codifica esta proteína em *Digitaria sanguinalis* já possui *status* confirmado na base de dados Uniprot. Além disso, já existem estruturas cristalográficas da PPDK depositadas no Protein Data Bank (PDB), como a de *Zea mays*, a qual compartilha 91% de identidade com a enzima homóloga de *Digitaria sanguinalis*. Estas características nos permitiram modelar, por substituição, a PPDK de *Digitaria sanguinalis* a partir da PPDK de *Zea mays*, de modo a utilizá-la em estudos de ancoragem e triagem virtual, com o intuito de descobrir novas moléculas candidatas a herbicidas, que possam ser utilizados em capim-amargoso e outras plantas daninhas que apresentem metabolismo fotossintético C<sub>4</sub>. Além disso, foi adquirido o ácido bromoacético, um composto que possui atividade inibitória conhecida sobre a PPDK de *Clostridium symbiosum*, o qual teve seus efeitos avaliados *in vivo* e *in vitro* em plantas de milho.

**MÉTODOS** – A sequência de aminoácidos da PPDK escolhida foi a de *Digitaria sanguinalis*, existente do banco de dados Uniprot. Esta sequência foi utilizada na busca de moldes estruturais por meio de BLASTp com filtro para estruturas cristalográficas no PDB. As simulações de dinâmica (DM) foram realizadas com o pacote de programas NAMD2/VMD. A estrutura do monômero obtida com a substituição dos aminoácidos foi solvatada com água TIP3P em uma caixa periódica com limites de 10 Å de distância a partir da superfície mais externa da proteína.

O protocolo de ancoragem foi estabelecido por estudos de redocking do ligante fosfoenolpiruvato no complexo proteína-cofator minimizado (terceira etapa da DM) usando o programa AutoDock 4.2.3, implementado na interface gráfica do programa Pyrx-0.9. Para as simulações de varredura virtual foi construída uma biblioteca. A biblioteca utilizada foi a dos produtos comercializáveis da Sigma-Aldrich® da base de dados Zinc. Neste trabalho, o ácido bromoacético, conhecido inibidor para PPDK de *Clostridium symbiosum*, foi utilizado para realização de testes *in vitro* e *in vivo*. Como planta modelo com metabolismo fotossintético C<sub>4</sub> foi utilizado o milho. Sementes de milho (*Zea mays L.*), cv. IPR-164, foram esterilizadas com hipoclorito de sódio (NaClO) a 2%, lavadas abundantemente com água deionizada e germinadas no escuro a 25°C entre duas folhas de papel Germitest® previamente umedecidos. Plântulas uniformes com dois dias de desenvolvimento foram selecionadas e transferidas para recipientes de plástico de 500 mL contendo uma mistura vermiculita/substrato na proporção de 1:1. As plantas foram periodicamente regadas com 50 mL de solução nutritiva (pH 6,0). Os recipientes contendo as plantas foram mantidos por 16 ou 28 dias em sala de crescimento com temperatura de 25°C, fotoperíodo de 12h/12h (claro/escuro) e uma irradiância de 300 µmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. No 14º dia de cultivo, as plantas foram aspergidas com 15 mL de uma solução aquosa contendo ácido bromoacético nas concentrações de 0, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 e 10 mM. No 16º dia de cultivo as plantas foram retiradas do sistema experimental e utilizadas para determinação da biomassa fresca das folhas, após a determinação do índice SPAD. O teor endógeno de piruvato foi determinado no 15º e 16º dia de cultivo, ou seja, 24 e 48 h após a aplicação do ácido bromoacético. Os efeitos *in vitro* do ácido bromoacético sobre a atividade da PPDK foram realizados após extração da enzima a partir de plantas controle com 28 dias de desenvolvimento. Para a determinação do índice de clorofila foi utilizado o clorofilômetro portátil SPAD-502 (Minolta®). O conteúdo endógeno de piruvato foi determinado através da técnica da lactato desidrogenase (LDH) medindo-se, espectrofotometricamente, o desaparecimento do NADH a 340 nm. Um analisador de gás por infravermelho (ADC BioScientific Ltd., Hertfordshire, UK) foi utilizado para monitorar os parâmetros de trocas gasosas. A atividade da PPDK (EC 2.7.9.1) foi estimada cromatograficamente através da produção do AMP e consumo do ATP a partir do meio reacional. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para testar a significância das diferenças observadas usando o pacote de software GraphPad Prism® (versão 6.0 GraphPad Software Inc., EUA).

**RESULTADOS** - Os principais resultados foram os seguintes:

- 1) A sequência de aminoácidos da PPDK de *Digitaria sanguinalis* foi obtida no Uniprot (Uniprot id: H8WIFY2), contendo 844 resíduos e, de acordo com o servidor ProtParam, possui peso molecular de 91,947 kDa e ponto isoeletrico (pI) teórico de 4,90.
- 2) A análise da sequência de aminoácidos pelo Blastp forneceu dois moldes estruturais, a partir dos quais foi gerado o modelo tridimensional de PPDK de *Digitaria sanguinalis*.
- 3) A viabilidade de utilização da PPDK de *Digitaria sanguinalis* em estudos de triagem virtual, bem como a validação do protocolo de docking, foram realizadas pelo método de redocking utilizando os programas AutoDock e Molegro, os quais forneceram um RMSD de 0,68 Å (média de sete simulações) e 0,57 Å, respectivamente.
- 4) Para a triagem virtual, foi utilizada a biblioteca da Sigma-Aldrich® do banco de dados Zinc Data Base. A biblioteca continha 71.569 moléculas com disponibilidade comercial. Destas moléculas, duas moléculas foram selecionadas: ZINC388362 e ZINC391120.
- 5) Todas as concentrações de ácido bromoacético utilizadas causaram reduções significativas na atividade da PPDK *in vitro*.
- 6) Para ambos os tempos de tratamento, 24 e 48 h, não foram observadas alterações dos teores foliares de piruvato com concentrações de até 2,5 mM do ácido bromoacético. Contudo, houve expressivo aumento dos teores de piruvato nas folhas das plantas tratadas com 5,0 e 10 mM de ácido bromoacético.
- 7) O ácido bromoacético reduziu marcadamente a A, a G<sub>s</sub> e a E, embora tenha aumentado a C<sub>i</sub>.

- 8) Os danos causados às plantas de milho foram diretamente relacionados com a dose de ácido bromoacético aplicado, sendo o principal sintoma observado a desidratação das folhas.
- 9) Quando comparado com o controle, os tratamentos com as concentrações de 0,5, 1,0 e 2,5 mM não alteraram significativamente a biomassa fresca das plantas de milho. Entretanto, os tratamentos realizados com 5,0 e 10,0 mM de ácido bromoacético reduziram em 17% e 52%, respectivamente, a biomassa fresca das plantas.

**DISCUSSÃO E CONCLUSÕES** - É sabido que sequências de proteínas com identidade maior do que 25% possuem similaridade de estruturas tridimensionais. O molde 1VBH representa a unidade biológica da enzima PPDK, que possui a cadeia polipeptídica, o ligante e o cofator. Entretanto, por falta de densidade eletrônica da região, os resíduos 280 a 288 e 451 a 458 estavam faltando. O molde 1VBG foi utilizado para a modelagem destas regiões. A PPDK possui duas conformações distintas do sítio ativo. Sendo assim, a proteína foi modelada como um monômero, sua mais provável unidade biológica. Após os estudos de ancoragem, dois ligantes foram selecionados: ZINC388362 e ZINC391120. Os ligantes ZINC388362 e ZINC391120 possuem um peso molecular de 146,125 e 172,092 g/mol e logP de 1,58 e -2,25, respectivamente. O programa Autodock ranqueou estes dois compostos com um  $\Delta G_{\text{ligação}}$  menor do que o PEP. A segunda parte deste trabalho avaliou o efeito herbicida do ácido bromoacético sobre plantas de milho. Os dados indicam que o ácido bromoacético afeta negativamente o metabolismo e o crescimento do milho através da inibição da enzima PPDK e, conseqüentemente, dos processos fotossintéticos, dos quais a planta é extremamente dependente. A PPDK catalisa uma etapa importante da via do metabolismo fotossintético C<sub>4</sub>. Sendo assim, qualquer interferência na atividade normal da PPDK pode afetar negativamente os processos fotossintético em plantas com metabolismo do tipo C<sub>4</sub>. A inibição *in vitro* da PPDK e o acúmulo de piruvato endógeno das folhas do milho, principalmente nas doses mais altas do composto, é um indicativo muito forte que os efeitos deletérios apresentados nos experimentos *in vivo*, são também decorrentes de uma inibição na PPDK. Além disso, o ácido bromoacético reduziu marcadamente a A, a G<sub>s</sub> e a E. Entretanto, o ácido bromoacético aumentou a C<sub>i</sub>, o que fortalece a hipótese que os efeitos causados pelo composto são oriundos da inibição da PPDK. Concluindo, este trabalho apresenta a modelagem, estudos de docagem e dinâmica molecular para enzima PPDK de *Digitaria sanguinalis*. Ainda, os resultados neste trabalho permitem concluir que o ácido bromoacético causa efeitos deletérios sobre as plantas de milho devido as limitações fotossintéticas induzidas pela inibição da PPDK.

**Palavras-chave:** Piruvato ortofosfato dicinase, modelagem molecular, *Digitaria sanguinalis*, ancoramento molecular, herbicidas.

## GENERAL ABSTRACT

**INTRODUCTION AND OBJECTIVES** – Weeds are one of the main obstacles to agricultural production, which can lead to losses of up to 80%. This is because they compete with cultures for natural resources such as light, water, nutrients and space. In addition, problems such as the reduction of quality and the uniform maturation of grains are also consequences of the presence of weeds, which in extreme cases may even make harvesting unviable. The selection of resistant biotypes presented by some weeds is caused by the persistent application or indiscriminate use of a given herbicide on a population. Thus, plants that express a given characteristic that enables it to grow in the presence of the herbicide may become the dominant population. In addition, the small diversity of herbicides utilizing a reduced number of mechanisms of action is increasing the occurrence of herbicide resistance. The selection of herbicide-resistant weeds has been described since 1957 and, currently, it is estimated that there are 300 biotypes that show resistance to some mechanism of action. The problem of the emergence of herbicide-resistant species is aggravated by the emergence of biotypes resistant to more than one mechanism of action, which has limited the forms of control available to some species. The case of resistance of sourgrass (*Digitaria insularis*) to glyphosate deserves special attention. Specifically, in the case of bittergrass, the main problem has been the selection of biotypes resistant to glyphosate, one of the most important herbicides in the grain production system. It is a species of perennial cycle grass with C<sub>4</sub> photosynthetic metabolism, but presents slow initial growth up to 45 days after emergence (DAE). From 45 to 105 DAE its growth is accelerated, with exponential increase of dry matter. In the exponential growth phase, part of the increment of dry mass of roots from 45 DAE is due to the formation of rhizomes. Plants using the C<sub>4</sub> photosynthetic pathway are highly represented with the world's worst weeds, with only four species of C<sub>4</sub> plants being agriculturally productive (maize, sorghum, pearl millet, and sugarcane). There are three variations of the C<sub>4</sub> metabolism, and the C<sub>4</sub> plants were classified into three groups according to the decarboxylation reaction located in the sheath cells of the vascular bundle. Regardless of this pathway, the enzyme pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) and phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) are crucial for the functioning of C<sub>4</sub> metabolism. PPDK catalyzes a rate-limiting step in the C<sub>4</sub> cycle, making it an extremely attractive target for the development of selective herbicides that block the growth of C<sub>4</sub> weeds. In addition, this enzyme has not been described in animals to date, reducing the likelihood that PPDK inhibitor compounds will have adverse toxicological or even environmental impacts. Although the three-dimensional structure of *Digitaria insularis* of PPDK has not yet been determined by any experimental method, the amino acid sequence encoding this protein in *Digitaria sanguinalis* already has confirmed status in the Uniprot database. In addition, there are already crystallographic structures of PPDK deposited in the Protein Data Bank (PDB), such as *Zea mays*, which shares 91% identity with the homologous enzyme of *Digitaria sanguinalis*. These characteristics allowed us to model, by substitution, the PPDK of *Digitaria sanguinalis* from the PPDK of *Zea mays* to use it in anchorage and virtual screening studies, in order to discover new herbicide candidate molecules that can be used on bittergrass and other weeds that exhibit C<sub>4</sub> photosynthetic metabolism. In addition, bromoacetic acid, a compound having known inhibitory activity on PPDK of *Clostridium symbiosum*, was evaluated *in vivo* and *in vitro* in maize plants.

**METHODS** – The amino acid sequence of the PPDK chosen was that of *Digitaria sanguinalis*, existing from the Uniprot database. This sequence was used in the search of structural molds through BLASTp with filter for crystallographic structures in the PDB. Dynamics simulations (MD) were performed with the NAMD2/VMD program package. The structure of the monomer obtained with the amino acid substitution was solvated with TIP3P water in a periodic box with limits of 10 Å of distance from the outermost surface of the protein. The anchorage protocol was established by redocking studies of the phosphoenolpyruvate ligand in the minimized protein-cofactor complex (third step of MD) using the AutoDock 4.2.3 program, implemented in the Pyrx-0.9 program interface. For the virtual scan simulations, a library was built. The library used was the Sigma- Aldrich® marketable products of the Zinc database. In this work, bromoacetic acid, a

known inhibitor of PPDK of *Clostridium symbiosum*, was used for *in vitro* and *in vivo* tests. Maize was used as a model plant with C<sub>4</sub> photosynthetic metabolism. Seeds of maize (*Zea mays L.*), cv. IPR-164, were sanitized with 2% sodium hypochlorite (NaClO), washed extensively with deionized water and germinated in the dark at 25°C between two sheets of Germitest® paper previously moistened. Uniform seedlings with two days of development were selected and transferred to 500 mL plastic containers containing a mixture of vermiculite/substrate in the 1:1 ratio. The plants were periodically watered with 50 mL of nutrient solution (pH 6.0). The containers containing the plants were kept for 16 or 28 days in a growth room with a temperature of 25°C, 12h/12h photoperiod (light/dark) and an irradiance of 300 µmol photons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. On the 14th day of cultivation, the plants were sprayed with 15 mL of an aqueous solution containing bromoacetic acid at concentrations of 0, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 and 10 mM. On the 16th day of cultivation, the plants were removed from the experimental system and used to determine the fresh leaf biomass, after determination of the SPAD index. The endogenous pyruvate content was determined on the 15th and 16th day of culture, i. e., 24 and 48 h after bromoacetic acid application. The *in vitro* effects of bromoacetic acid on PPDK activity were performed after extraction of the enzyme from control plants with 28 days of development. A chlorophyll meter SPAD-502 (Minolta®) was used to determine the chlorophyll index. The endogenous pyruvate content was determined by the lactate dehydrogenase (LDH) method by spectrophotometrically measuring the disappearance of NADH at 340 nm. An infrared gas analyzer (ADC BioScientific Ltd., Hertfordshire, UK) was used to monitor the gas exchange parameters of maize plants. The activity of PPDK (EC 2.7.9.1) was estimated, chromatographically, through the production of AMP and consumption of ATP from the reaction medium. Analysis of variance (ANOVA) was performed to test the significance of observed differences using the GraphPad Prism® software package (version 6.0 GraphPad Software Inc., USA).

**RESULTS** – The main results were as follows:

- 1) The amino acid sequence of PPDK of *Digitaria sanguinalis* was obtained from Uniprot (Uniprot id: H8WFY2) containing 844 residues and, according to the ProtParam server, has a molecular weight of 91.947 kDa and theoretical isoelectric point (pI) of 4.90.
- 2) Analysis of the amino acid sequence by Blastp provided two structural templates, from which the three-dimensional model of *Digitaria sanguinalis* PPDK was generated.
- 3) The feasibility of using *Digitaria sanguinalis* PPDK in virtual screening studies, as well as the validation of the docking protocol, were performed by the redocking method using the AutoDock and Molegro programs, which provided a RMSD of 0.68 Å (mean of seven simulations) and 0.57 Å, respectively.
- 4) For virtual screening, the Sigma-Aldrich® library of the Zinc database was used. The library contained 71,569 molecules with commercial availability. Of these molecules, two molecules were selected: ZINC388362 and ZINC391120.
- 5) All concentrations of bromoacetic acid used caused significant reductions in PPDK activity.
- 6) For both treatment times, 24 and 48 h, no changes were observed in the leaf content of pyruvate with concentrations up to 2.5 mM of bromoacetic acid. However, there was an expressive increase of the pyruvate contents in the leaves of the plants treated with 5.0 and 10 mM bromoacetic acid.
- 7) As noted, the bromoacetic acid markedly reduced the *A*, *G*<sub>s</sub> and *E*, although it increased the *C*<sub>i</sub>.
- 8) The damage caused to the maize plants was directly related to the dose of bromoacetic acid applied, being the dehydration of the leaves, the main symptom observed.
- 9) When compared to the control, treatments with concentrations of 0.5, 1.0 and 2.5 mM did not significantly alter the fresh weights of maize plants. However, treatments with

5.0 and 10.0 mM of bromoacetic acid reduced the fresh weight the plants by 17% and 52%, respectively.

**DISCUSSION AND CONCLUSIONS** – It is known that protein sequences with identity greater than 25% have similarity of three-dimensional structures. The 1VBH template represents the biological unit of the enzyme, which has the polypeptide chain, the ligand and the cofactor. However, due to lack of electronic density of the region, the residues 280 to 288 and 451 to 458 were lacking. The 1VBG template was used to model these regions. PPDK has two distinct conformations of the active site. Thus, the protein was modeled as a monomer, its most likely biological unit. After the anchorage studies, two ligands were selected: ZINC388362 and ZINC391120. Ligands ZINC388362 and ZINC391120 have a molecular weight of 146.1225 and 172.092 g/mol and logP of 1.58 and -2.25, respectively. The Autodock program ranked these two compounds with minor  $\Delta G_{\text{ligation}}$  than PEP. The second part of this work evaluated the herbicide effects of bromoacetic acid on maize plants. The data indicate that bromoacetic acid adversely affects the metabolism and growth of maize by inhibiting the enzyme pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) and, consequently, the photosynthetic processes, of which the plants are extremely dependent. PPDK catalyzes an important step in the photosynthesis  $C_4$ . Therefore, any interference on the normal PPDK activity may adversely affect photosynthetic processes in plants with  $C_4$  metabolism. *In vitro* inhibition of PPDK and the accumulation of endogenous pyruvate from maize leaves, especially at higher doses of the compound, is a strong indication that the deleterious effects presented in experiments *in vivo* are also due to inhibition in PPDK. Furthermore, the bromoacetic acid markedly reduced  $A$ ,  $G_s$  and  $E$ . However, bromoacetic acid increased the  $C_i$ , which strengthens the hypothesis that the effects caused by the compound are a consequence of the inhibition of PPDK. In conclusion, this work presents the modeling and the docking molecular dynamics studies for enzyme PPDK from *Digitaria sanguinalis*. Furthermore, the results obtained in this work allow us to conclude that bromoacetic acid causes deleterious effects on maize plants due to the photosynthetic limitations induced by the inhibition of PPDK.

**Keywords:** Pyruvate orthophosphate dikinase, molecular modeling, *Digitaria sanguinalis*, molecular anchorage, herbicides.

## **Modelagem e prospecção de inibidores para a piruvato ortofosfato dicinase: Efeito herbicida do ácido bromoacético**

*Renato Polimeni Constantin<sup>1</sup>, Danielly Caroline Inacio Martarello<sup>1</sup>, Gabriele Sauthier Romano de Melo<sup>1</sup>, Paulo Sergio Alves Bueno<sup>1</sup>, Wanderley Dantas dos Santos<sup>1</sup>, Osvaldo Ferrarese-Filho<sup>1</sup>, Flavio Augusto Vicente Seixas<sup>1</sup> and Rogério Marchiosi<sup>1</sup>.*

Laboratório de Bioquímica de Plantas, Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

### **RESUMO**

A piruvato ortofosfato dicinase (PPDK) é uma enzima que desempenha um papel importante em plantas com metabolismo fotossintético C<sub>4</sub>, constituindo um alvo interessante para o desenvolvimento de novos herbicidas. Sendo assim, neste trabalho, foi realizado a modelagem molecular da PPDK de *Digitaria sanguinalis* através de técnicas de bioinformática e, buscou-se por meio de varredura virtual compostos que apresentam potencial inibitório sobre essa enzima. Além disso, foi testado os efeitos do ácido bromoacético – composto que possui atividade inibitória conhecida sobre a PPDK de *Clostridium symbiosum* – *in vivo* e *in vitro* em plantas de milho (*Zea mays*). A sequência de aminoácidos da PPDK de *D. sanguinalis* foi modelada tridimensionalmente a partir de um molde de PPDK de *Z. mays*. A proteína foi modelada como um monômero, minimizada e utilizada nos estudos de ancoragem virtual. Após os estudos de ancoragem, dois ligantes foram selecionados, ZINC388362 e ZINC391120 e, ambos possuem  $\Delta G_{\text{ligação}}$  menor do que o ligante da enzima. Na segunda parte do trabalho, o ácido bromoacético reduziu de forma dose-dependente a atividade da PPDK *in vitro* e causou um acúmulo de seu substrato (piruvato) nos experimentos *in vivo*. Nas determinações de trocas gasosas, o ácido bromoacético reduziu marcadamente a taxa fotossintética (*A*), a condutância estomática (*G<sub>s</sub>*) e a transpiração (*E*), embora tenha aumentado a concentração intercelular de CO<sub>2</sub> (*C<sub>i</sub>*). Os dados permitem afirmar que o ácido bromoacético exerce potente efeito herbicida sobre uma planta de metabolismo fotossintético C<sub>4</sub>, o milho, sendo o seu mais provável mecanismo de ação a inibição da enzima PPDK.

**Palavras-chave:** Piruvato ortofosfato dicinase, modelagem molecular, *Digitaria sanguinalis*, ancoragem molecular, herbicidas.

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas daninhas constituem um dos principais empecilhos à produção agrícola, podendo ocasionar perdas de até 80%. Isso porque elas competem com as culturas por recursos naturais tais como luz, água, nutrientes e espaço<sup>1</sup>. Adicionalmente, problemas como a redução da qualidade e a maturação desuniforme dos grãos também são consequências da presença de plantas daninhas, que em casos extremos, podem até inviabilizar a colheita. Dentre as plantas daninhas que infestam a cultura da soja destaca-se a corda-de-viola (*Ipomoea* spp.), amendoim-bravo ou leiteiro (*Euphorbia heterophylla*), capim-marmelada (*Brachiaria plantaginea*), grama-seda (*Cynodon dactylon*), caruru (*Amaranthus retroflexus*) e capim-amargoso (*Digitaria insularis*). A presença de corda-de-viola, capim-amargoso, azevém (*Lolium perenne*) e buva (*Conyza* spp.) tem se tornado comum principalmente em lavouras de soja transgênica, nas quais essas espécies são selecionadas devido à tolerância ao glifosato<sup>1,2</sup>. Isso mostra que apesar do sucesso de controle das plantas daninhas obtido com os herbicidas, algumas espécies desenvolveram resistência a determinados mecanismos de ação, como nos citados casos.

A seleção de biótipos resistentes apresentado por algumas plantas daninhas é ocasionado pela persistente aplicação ou uso indiscriminado de um dado herbicida sobre uma população<sup>3</sup>. Dessa forma, plantas que expressam uma dada característica que a habilita crescer na presença do herbicida podem tornar-se a população dominante<sup>4</sup>. Adicionalmente, a pequena diversidade de herbicidas utilizando um reduzido número de mecanismos de ação está aumentando a ocorrência de resistência aos herbicidas<sup>5</sup>. É importante ressaltar que a sensibilidade a um dado herbicida varia muito entre as espécies de plantas daninhas, sendo algumas naturalmente tolerantes. Um exemplo é a *Ipomoea* spp., que nunca foi controlada pelo glifosato<sup>1</sup>.

A seleção de plantas daninhas resistentes a herbicidas vem sendo descrito desde 1957 e, atualmente, estima-se que existam 300 biótipos que apresentam resistência para algum mecanismo de ação. Os herbicidas do grupo das triazinas e inibidores da acetolactato sintase (ALS) são os que apresentam o maior número de casos de resistência, o que está relacionado ao fato de estes herbicidas serem aplicados em grandes áreas e também por serem muito específicos e eficientes<sup>1</sup>. Por outro lado, herbicidas inibidores da protoporfirinogênio oxidase (PROTOX) são os que apresentam, até o momento, o menor número de espécies resistentes, embora as razões para isso não estejam bem

estabelecidas<sup>1</sup>. O problema do surgimento de espécies resistentes a herbicidas é agravado pelo fato de surgirem biótipos resistentes a mais de um mecanismo de ação, o que tem limitado as formas de controle disponíveis para algumas espécies<sup>6</sup>. Juntos, esses fatos sugerem que a procura por novas moléculas ativas ou mecanismos de ação constituem assunto de fundamental importância, que pode ser essencial para o controle de plantas daninhas nos sistemas agrícolas e necessário para alcançar maiores rendimentos na produção agrícola.

O caso da resistência do capim-amargoso (*Digitaria insularis*) ao glifosato merece especial atenção. O capim-amargoso é uma espécie nativa de regiões tropicais e subtropicais da América, onde é frequentemente encontrado em pastagens, cafezais, pomares e em áreas rurais como beira de estradas e terrenos baldios<sup>7</sup>. Especificamente no caso do capim-amargoso, o principal problema tem sido a seleção de biótipos resistentes ao glifosato, um dos mais importantes herbicidas do sistema de produção de grãos.

Nas últimas décadas, principalmente após o advento do sistema de plantio direto, esta espécie vem apresentando maior relevância dentro da agricultura, sendo este aumento de ocorrência relacionado às suas características de agressividade. Entre elas destaca-se a capacidade de formação de rizomas, que apesar de curtos são bem evidentes, formando notáveis touceiras e a capacidade de disseminação de propágulos (sementes) praticamente durante todo o ano<sup>8</sup>. As sementes desta espécie são revestidas por muitos pelos, os quais auxiliam sua dispersão a longas distâncias o que, aliado ao grande percentual germinativo, permite que essa planta se dissemine com grande facilidade<sup>8-10</sup>. É uma espécie de gramínea de ciclo perene com metabolismo fotossintético do tipo C<sub>4</sub><sup>8</sup>, porém apresenta crescimento inicial lento até 45 dias após a emergência (DAE). Dos 45 aos 105 DAE o seu crescimento é acelerado, apresentando aumento exponencial de matéria seca. Na fase de crescimento exponencial, parte do incremento de massa seca das raízes a partir dos 45 DAE se deve à formação dos rizomas<sup>11</sup>. Em comparação com outras 18 espécies de gramíneas, o capim-amargoso apresenta o maior potencial competitivo em relação às espécies cultivadas, especialmente em função do seu rápido crescimento<sup>2</sup>. Quando em competição com a soja e o milho, por exemplo, a interferência do capim-amargoso pode reduzir a produtividade em até 32% e 44%, respectivamente<sup>11,12</sup>.

Plantas que utilizam a via fotossintética C<sub>4</sub> são altamente representadas como as piores plantas daninhas do mundo, com apenas quatro espécies de plantas C<sub>4</sub> sendo agriculturalmente produtivas (milho, sorgo, milheto e cana-de-açúcar). Nestas plantas, o

ciclo C<sub>4</sub> funciona como um apêndice do metabolismo C<sub>3</sub>. Dessa forma, as enzimas suplementares envolvidas na fotossíntese C<sub>4</sub> representam um alvo atrativo para o desenvolvimento de herbicidas seletivos para plantas daninhas C<sub>4</sub><sup>13</sup>. Existem três variações do metabolismo C<sub>4</sub>, e as plantas C<sub>4</sub> foram classificadas em três grupos de acordo com a reação de descarboxilação localizada nas células da bainha do feixe vascular. Independentemente da via presente, as enzimas piruvato ortofosfato dicinase (PPDK) e fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) são cruciais para o funcionamento do metabolismo C<sub>4</sub>. Nas plantas contendo enzima NADP-málica, a PPDK catalisa a conversão do piruvato em fosfoenolpiruvato. Após a anidrase carbônica catalisar a hidratação do CO<sub>2</sub> atmosférico em bicarbonato, a PEPC catalisa a carboxilação do fosfoenolpiruvato para produzir o oxaloacetato. Este é convertido rapidamente em malato pela malato desidrogenase e subsequentemente transportado para o interior dos cloroplastos das células envoltórias do feixe vascular<sup>14-16</sup>. A descarboxilação do malato pela enzima NADP-málica produz CO<sub>2</sub>, que é posteriormente fixado pela Rubisco e incorporado na via C<sub>3</sub>. Desse modo, a interrupção do ciclo do ácido C<sub>4</sub> deverá afetar negativamente a fotossíntese total em plantas C<sub>4</sub>.

A PPDK catalisa um passo limitante da velocidade no ciclo C<sub>4</sub>, fazendo-se um alvo extremamente atrativo para o desenvolvimento de herbicidas seletivos que bloqueiem o crescimento de plantas daninhas C<sub>4</sub>. Além disso, esta enzima não foi, até o momento, descrita em animais, reduzindo a probabilidade de que compostos inibidores da PPDK tenham efeitos toxicológicos adversos ou mesmo impactos ambientais<sup>13</sup>. Tentativas anteriores que visaram desenvolver um herbicida seletivo para plantas C<sub>4</sub> envolveram a concepção de análogos estruturais de substratos de enzimas do ciclo C<sub>4</sub><sup>17</sup>. O único composto relatado que inibiu especificamente uma enzima do metabolismo C<sub>4</sub> foi o 3,3-dicloro-2-(di-hidroxifosfinoilmetil)-propenoato (DCDP), que atua sobre a PEPC. Infelizmente, este composto não apresentou nenhum efeito sobre o crescimento de plantas C<sub>4</sub>. No entanto, inibir enzimas específicas do metabolismo C<sub>4</sub> continua sendo uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos herbicidas. Por exemplo, plantas C<sub>4</sub> modificadas para diminuir os níveis de PPDK ou PEPC foram incapazes de sobreviver, a menos que crescidas em condições de alto CO<sub>2</sub> para compensar a inatividade destas enzimas<sup>18</sup>. Dessa forma, compostos que inibam especificamente PPDK ou PEPC podem funcionar como um herbicida eficiente e seletivo, impedindo efeitos deletérios de plantas daninhas C<sub>4</sub> em culturas C<sub>3</sub>.

Embora a estrutura tridimensional da PPDK de *Digitaria insularis* ainda não tenha sido determinada por nenhum método experimental, a sequência de aminoácidos que codifica esta proteína em *Digitaria sanguinalis* já possui *status* confirmado na base de dados Uniprot<sup>19</sup>. Além disso, já existem estruturas cristalográficas da PPDK depositadas no Protein Data Bank (PDB)<sup>20</sup>, como a de *Zea mays*, a qual compartilha 91% de identidade com a enzima homóloga de *Digitaria sanguinalis*. Estas características nos permitiram modelar por substituição a PPDK de *Digitaria sanguinalis* a partir da PPDK de *Zea mays*. O modelo gerado foi utilizado em estudos de ancoragem e triagem virtual com o intuito de descobrir novas moléculas candidatas a herbicidas, as quais poderão ser utilizadas sobre o capim-amargoso e outras plantas daninhas que apresentem metabolismo fotossintético C<sub>4</sub>. Além disso, foi adquirido o ácido bromoacético, um composto que possui atividade inibitória conhecida sobre a PPDK de *Clostridium symbiosum*, o qual teve seus efeitos avaliados *in vivo* e *in vitro* em plantas de milho.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção da sequência e modelagem

A sequência de aminoácidos da PPDK escolhida foi a de *Digitaria sanguinalis*, existente do banco de dados Uniprot<sup>19</sup>. Esta sequência foi utilizada na busca de moldes estruturais por meio de BLASTp<sup>21</sup> com filtro para estruturas cristalográficas no PDB. Em seguida, as sequências do molde e modelo foram alinhadas pelo programa Modeller 9v14<sup>22</sup>. Foi utilizado o programa Coot<sup>23</sup> para a substituição dos aminoácidos divergentes no molde pelos aminoácidos do modelo.

### 2.2 Simulações de dinâmica molecular

As simulações de dinâmica (MD) foram realizadas com o pacote de programas NAMD2/VMD<sup>24,25</sup>. A estrutura do monômero obtida com a substituição dos aminoácidos foi solvatada com água TIP3P em uma caixa periódica com limites de 10 Å de distância a partir da superfície mais externa da proteína. Íons Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> foram adicionados em quantidade suficiente para neutralização das cargas do sistema. O processo de DM ocorreu em três etapas. Na primeira etapa, os átomos do ligante e do cofator foram fixados

no espaço, enquanto que os resíduos de aminoácidos 378 a 514 da proteína e demais átomos do sistema foram mantidos livres para se movimentar. Neste ponto, o sistema foi submetido a 10.000 passos de minimização por Gradiente Conjugado (CG). Na segunda etapa, todos os átomos do sistema, exceto o ligante que ficou fixo no espaço, foram novamente minimizados por 20.000 passos de CG. Na terceira etapa, todos os átomos do sistema foram novamente minimizados por 10.000 passos de CG.

### **2.3 Simulações de ancoragem**

O protocolo de ancoragem foi estabelecido por estudos de redocking do ligante fosfoenolpiruvato (PEP) no complexo proteína-cofator minimizado (terceira etapa da DM) usando o programa AutoDock 4.2.3<sup>26</sup>, implementado na interface gráfica do programa Pyrx-0.9<sup>27</sup>. Os parâmetros usados foram algoritmo padrão de busca (Lamarckian GA) e grid de 0,375 Å, com centro de busca em 15, 46, 0, tamanho da caixa 30, 30, 30 em x, y e z respectivamente. Foram restringidos os ângulos de torção da enzima e do cofator, mas permitiu-se a flexibilidade dos ligantes testados. Todas as moléculas de água (exceto as que estão presentes no sítio de ligação da enzima) e os íons foram removidos da estrutura.

Os protocolos foram considerados validados quando a pose do fosfoenolpiruvato se sobrepôs à pose modelada com RMSD menor que 0,8 Å. De acordo com a literatura, é aceitável um RMSD de até 2.0 Å<sup>28</sup>.

### **2.4 Varredura virtual**

Para as simulações de varredura virtual foi construída uma biblioteca. A biblioteca utilizada foi a dos produtos comercializáveis da Sigma-Aldrich<sup>®</sup> da base de dados Zinc<sup>29</sup>. Foi incluído na biblioteca a estrutura do fosfoenolpiruvato de modo que ao final da simulação, somente os compostos melhores ranqueados (menores  $\Delta G_{\text{ligação}}$  teóricos) que o encontrado para esse ligante fossem considerados. Todas as moléculas estavam no formato \*.sdf.

Os resultados de três novas varreduras com estas bibliotecas (repetições) foram utilizados para selecionar os compostos com reprodutibilidade, de modo a eliminar resultados falso-positivos.

## 2.5 Material vegetal e procedimentos gerais

Neste trabalho, o ácido bromoacético (Figura 1), conhecido inibidor para PPDK de *Clostridium symbiosum*<sup>30</sup>, foi utilizado para realização de testes *in vitro* e *in vivo*. Como planta modelo com metabolismo fotossintético C<sub>4</sub> foi utilizado o milho. Sementes de milho (*Zea mays* L.), cv. IPR-164, foram esterilizadas com hipoclorito de sódio (NaClO) a 2%, lavadas abundantemente com água deionizada e germinadas no escuro a 25°C entre duas folhas de papel Germitest<sup>®</sup> previamente umedecidos. Plântulas uniformes com dois dias de desenvolvimento foram selecionadas e transferidas para recipientes de plástico de 500 mL contendo uma mistura vermiculita/substrato de pinus na proporção de 1:1. As plantas foram periodicamente regadas com 50 mL de solução nutritiva de Hoogland (pH 6.0). Os recipientes contendo as plantas foram mantidos por 16 ou 28 dias em sala de crescimento com temperatura de 25°C, fotoperíodo de 12h/12h (claro/escuro) e uma irradiância de 300  $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). No 14º dia de cultivo, as plantas foram aspergidas com 15 mL de uma solução aquosa contendo ácido bromoacético nas concentrações de 0, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 e 10 mM. No 16º dia de cultivo as plantas foram retiradas do sistema experimental e utilizadas para determinação da biomassa fresca das folhas e teor endógeno de piruvato (15º e 16º dias). Os efeitos *in vitro* do ácido bromoacético sobre a atividade da PPDK foram realizados após extração da enzima a partir de plantas controle com 28 dias de desenvolvimento.

O ácido bromoacético foi adquirido da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), e todos os outros reagentes utilizados foram adquiridos das fontes mais confiáveis disponíveis.

## 2.6 Determinação da biomassa fresca das folhas

A biomassa fresca das folhas de plantas de milho foi estimada no 16º dia de cultivo com auxílio de balança previamente calibrada.

## 2.7 Determinação do conteúdo endógeno de piruvato

O conteúdo endógeno de piruvato foi determinado nas folhas de plantas de milho 24 e 48 h após a aspersão do ácido bromoacético. Para isso, foi utilizado o método da enzima

lactato desidrogenase<sup>31</sup>, monitorando-se espectrofotometricamente o desaparecimento do NADH a 340 nm.

## 2.8 Avaliação das trocas gasosas

Um analisador de gás por infravermelho (ADC BioScientific Ltd., Hertfordshire, UK) foi utilizado para monitorar a taxa fotossintética (*A*), condutância estomática (*G*<sub>s</sub>), transpiração (*E*) e concentração intercelular de CO<sub>2</sub> (*C*<sub>i</sub>) 24 e 48 h após o tratamento. As medições foram realizadas a 25°C sob uma densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) de 1200 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> das 7:00 às 11:30 h<sup>32</sup>.

## 2.9 Determinação da atividade da PPK

A atividade da PPK (EC 2.7.9.1) foi estimada cromatograficamente através da produção do AMP e consumo do ATP a partir do meio reacional<sup>33,34</sup>. Para isso, folhas (4 g) de plantas de milho com 28 dias de desenvolvimento foram homogeneizadas em 4 mL de tampão HEPES-KOH 50 mM (pH 7.0) e, em seguida, centrifugadas a 3000 × g durante 15 min a 4°C. O sobrenadante obtido foi reservado em frasco âmbar e considerado como extrato enzimático da PPK. Tubos de ensaio contendo 650 μL de tampão HEPES-KOH 50 mM (pH 7.0), 100 μL da preparação enzimática e 100 μL de piruvato 2 mM foram incubados em temperatura ambiente durante 5 min. A reação foi iniciada pela adição de 50 μL de ATP 1,25 mM e interrompida, após 20 min, com a transferência dos tubos para um banho maria a 90°C. As amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para análises em cromatógrafo líquido (HPLC Prominence, Shimadzu<sup>®</sup>, Tóquio, Japão) equipado com uma bomba de gradiente quaternário (LC-20AT), um autoinjeter (SIL-20A), detector de fotodiodos (SPD-M20A), forno para coluna (CTO-20A), desgasificador (DGU-20A), módulo de comunicação (CBM-20A) e estação de trabalho LcSolution (versão 1.25). A separação do AMP foi realizada com auxílio de uma coluna de fase reversa CLC-ODS (M) (250 × 4,6 mm, com partículas de 5 μm) equipada com pré-coluna compatível (10 × 4,6 mm) a 35°C. A fase móvel foi aplicada sob um fluxo de 0,8 mL min<sup>-1</sup> utilizando-se um gradiente entre as fases Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,044 M pH 6.0 (A) e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,044 M + metanol 100% pH 7.0 (1:1) (B). Em porcentagem de metanol, o gradiente foi realizado da seguinte maneira: em 0 min, 0%; em 2,5 min, 0.5%; em 5 min,

3%; em 7 min, 5%; em 8 min, 12%; em 10 min, 15%; em 12 min, 20%; em 20 min, 28%; e em 30 min, 0%. A absorção do AMP foi monitorada a 254 nm utilizando-se padrão Sigma-Aldrich®. Os resultados foram expressos como nmol piruvato  $\times$  min<sup>-1</sup>  $\times$  g<sup>-1</sup> de biomassa fresca.

## 2.10 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, no qual cada plote representa um recipiente contendo uma planta. Os dados foram expressos como média de quatro a sete experimentos independentes  $\pm$  erro padrão da média. A análise de variância (ANOVA) foi realizada para testar a significância das diferenças observadas usando o pacote de software GraphPad Prism® (versão 6.0 GraphPad Software Inc., EUA). As diferenças entre os parâmetros foram avaliadas pelo teste de comparação múltipla de Dunnett e os valores de  $p \leq 0,05$  considerados estatisticamente significativos.

## 3 RESULTADOS

### 3.1 Análise da sequência da PPDK

A sequência de aminoácidos da PPDK de *Digitaria sanguinalis* foi obtida no Uniprot (Uniprot id: H8WFY2), contendo 844 resíduos e, de acordo com o servidor ProtParam<sup>35</sup>, possui peso molecular de 91,947 kDa e ponto isoelétrico (pI) teórico de 4,90.

### 3.2 Modelagem molecular e validação da estrutura da PPDK

A análise da sequência de aminoácidos pelo Blastp forneceu dois moldes estruturais. Para a cadeia polipeptídica foi utilizada a PPDK de *Zea mays* (PDB ID: 1VBG)<sup>36</sup> com 91% de identidade. As coordenadas do produto fosfoenolpiruvato (PEP) e do cofator Mg<sup>2+</sup> foram obtidas na estrutura de uma segunda PPDK de *Zea mays* (PDB ID: 1VBH)<sup>36</sup> com 88% de identidade. A partir destes dois moldes estruturais, foi gerado o modelo tridimensional (Fig. 2) de PPDK de *Digitaria sanguinalis*, o qual pode ser utilizado, após a minimização e validação, para os estudos de triagem virtual.

O modelo gerado apresentou 3 resíduos em posições não favoráveis no gráfico de Ramachandran, os quais não comprometeram a qualidade do modelo, pois nenhum destes resíduos estavam em contato direto com o ligante ou cofator. A estrutura final modelada apresentou 99,6% dos seus resíduos em regiões permitidas, apresentando excelente qualidade estereoquímica.

A viabilidade de utilização da PPKK de *Digitaria sanguinalis* em estudos de triagem virtual, bem como a validação do protocolo de *docking* foi realizada pelo método de *redocking* (Fig. 3), utilizando o programa AutoDock e Molegro, os quais forneceram um RMSD de 0,68 Å (média de sete simulações) e 0,57 Å, respectivamente. Uma vez que os resultados foram reprodutíveis, a estrutura da PPKK e o protocolo de ancoragem foram validados e puderam ser aplicados nas simulações de triagem virtual.

### 3.3 Triagem virtual

Para a triagem virtual, foi utilizada a biblioteca da Sigma-Aldrich® do banco de dados Zinc Data Base. A biblioteca continha 71.569 moléculas com disponibilidade comercial. Os candidatos foram subdivididos em pastas com aproximadamente 2.000 compostos cada, mais a estrutura do PEP (exógeno). O protocolo final do AutoDock validado no *redocking* foi então aplicado na triagem virtual das bibliotecas criadas. Na primeira triagem foram selecionadas as 126 moléculas melhores ranqueadas que o PEP. Destas moléculas, foram selecionados os 40 compostos melhores ranqueados que apresentaram reprodutibilidade em três novas triagens e, em todas as repetições, duas moléculas, ZINC388362 e ZINC391120, ficaram bem ranqueadas, com um valor médio de  $\Delta G_{\text{ligação}}$  de  $-7,70 \text{ Kcal.mol}^{-1}$  e  $-7,69 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ , respectivamente. Esses valores foram menores que o obtido com o PEP, que foi de  $-7,19 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ .

Com o intuito de confirmar a reprodutibilidade dos compostos selecionados, também foi realizada a triagem virtual dos 126 compostos melhores ranqueados no AutoDock no outro protocolo validado no programa Molegro e, esses dois compostos foram os únicos que ficaram bem ranqueados nos dois protocolos.

### **3.4 Efeitos de diferentes concentrações de ácido bromoacético sobre a atividade *in vitro* da PPDK em folhas de *Zea mays***

A figura 4 mostra os efeitos de diferentes concentrações de ácido bromoacético sobre a atividade da PPDK de folhas de milho. Para determinação dos efeitos *in vitro* do ácido bromoacético foi utilizado um extrato rico em PPDK obtido a partir das folhas de plantas de milho com 28 dias de desenvolvimento. A atividade enzimática foi monitorada cromatograficamente através da produção de AMP do meio de reação (Fig. 4). Todas as concentrações de ácido bromoacético utilizadas causaram reduções significativas na atividade da PPDK. Na máxima concentração de ácido bromoacético utilizada a produção de AMP diminuiu em 74%, quando comparado com o controle.

### **3.5 Efeitos do ácido bromoacético sobre o conteúdo endógeno de piruvato em folhas de milho**

A figura 5 mostra o conteúdo endógeno de piruvato em folhas de milho 24 h e 48 h após a aspersão foliar de ácido bromoacético. Para ambos os tempos, não foram observadas alterações dos teores foliares de piruvato com concentrações de até 2,5 mM do ácido bromoacético. Contudo, houve expressivo aumento dos teores de piruvato nas folhas das plantas tratadas com 5,0 e 10 mM de ácido bromoacético. No tempo 24 h, o incremento nos teores de piruvato foliares alcançaram 69% e 156% nos tratamentos com 5,0 e 10 mM, respectivamente. No tempo 48 h, os conteúdos de piruvato aumentaram em 63% e 121% após aplicação de 5,0 e 10 mM de ácido bromoacético.

### **3.6 Efeitos do ácido bromoacético sobre as trocas gasosas**

Os efeitos do ácido bromoacético sobre as trocas gasosas de plantas de milho são mostrados na figura 6. Quando comparado com o controle, não foram observadas alterações na *A* de plantas de milho 24 h e 48 h após a aspersão foliar com 0,5, 1,0 e 2,5 mM de ácido bromoacético (Fig. 6A). Entretanto, a *A* foi reduzida em 83% após 24 h da aplicação de 10,0 mM de ácido bromoacético. Além disso, as plantas que foram aspergidas com 5,0 e 10,0 mM de ácido bromoacético apresentaram reduções de 30% e 88% na *A* após 48 h, respectivamente.

A figura 6B mostra os efeitos do ácido bromoacético sobre a  $G_s$  de plantas de milho. Nas concentrações de 0,5, 1,0, 2,5 e 5,0 mM, as plantas apresentaram, inicialmente, um aumento na  $G_s$ , porém, não foram significativos. Por sua vez, a concentração de 10,0 mM causou redução acentuada da  $G_s$ , chegando a 78% e 85% de inibição após 24 h e 48 h, respectivamente, da aplicação da maior concentração utilizada.

A  $E$  das plantas de milho apresentou o mesmo padrão de inibição da  $A$  em resposta ao tratamento com ácido bromoacético (Fig. 6C). Nas plantas avaliadas 24 h após a aplicação do composto, não ocorreram mudanças significativas na  $E$  em nenhuma das concentrações testadas, exceto por uma redução de 57% observada na concentração de 10 mM. Adicionalmente, 48 h após o tratamento, a  $E$  foi significativamente reduzida em 25% e 68%, respectivamente, após tratamento com 5,0 mM e 10,0 mM.

Os efeitos do ácido bromoacético sobre a  $C_i$  são mostrados na figura 6D. O ácido bromoacético, nas concentrações de 0,5, 1,0, 2,5 e 5,0 mM, não influenciou significativamente a  $C_i$  de plantas de milho em ambos os tempos analisados, 24 h e 48 h. Entretanto, incrementos de 58% e 87% na  $C_i$  foram observados 24 h e 48 h, respectivamente, após a aplicação de 10 mM de ácido bromoacético.

### **3.7 Impactos do ácido bromoacético sobre o desenvolvimento de plantas de milho**

Os efeitos da aspersão foliar de ácido bromoacético (0 – 10 mM) sobre os aspectos morfológicos de folhas de milho é mostrado pela figura 7. É possível verificar que, quanto mais aumentamos a dose de ácido bromoacético, mais visíveis são os danos causados, sendo que, o principal sintoma é representado pela desidratação das folhas.

Os efeitos da aspersão foliar de ácido bromoacético (0 – 10 mM) sobre a biomassa fresca de folhas de milho é mostrado pela figura 8. Quando comparado com o controle, os tratamentos com as concentrações de 0,5, 1,0, 2,5 e 5,0 mM não alteraram significativamente a biomassa fresca das plantas de milho. Entretanto, o tratamento realizado com 10,0 mM de ácido bromoacético reduziu em 52% a biomassa fresca das plantas.

## 4 DISCUSSÃO

É sabido que sequências de proteínas com identidade maior do que 25% possuem similaridade de estruturas tridimensionais<sup>37,38</sup>. O molde 1VBH representa a unidade biológica da enzima PPK, possuindo a cadeia polipeptídica, o ligante e o cofator. Entretanto, por falta de densidade eletrônica da região, os resíduos 280 a 288 e 451 a 458 estavam faltando. O molde 1VBG foi utilizado para a modelagem destas regiões. A PPK possui duas conformações distintas do sítio ativo. Na forma Apo, o sítio está em uma conformação aberta, enquanto que na presença do ligante, possui conformação fechada (ativa). A utilização do molde 1VBH permitiu que a PPK fosse modelada na forma fechada, na presença do cofator  $Mg^{2+}$  e do produto PEP.

Sendo assim, a proteína foi modelada como um monômero, sua mais provável unidade biológica, para que, dessa forma, fossem impostas restrições que diminuíssem as possíveis interferências ao objetivo principal deste trabalho, que foi a modelagem da proteína para estudos de varredura virtual. Depois de modelada e minimizada, a proteína foi utilizada nos estudos de ancoragem.

Após os estudos de ancoragem, dois ligantes foram selecionados: ZINC388362 e ZINC391120. Os ligantes ZINC388362 e ZINC391120 possuem pesos moleculares de 146,125 e 172,092 g/mol e logP de 1,58 e -2,25, respectivamente. O programa Autodock ranqueou estes dois compostos com um  $\Delta G_{\text{ligação}}$  menor do que o PEP. Essas características fazem destes dois ligantes candidatos em potencial para a inibição específica da PPK.

Na segunda parte deste trabalho foram avaliados os efeitos do ácido bromoacético sobre plantas de milho. Os dados indicam que o ácido bromoacético afeta negativamente o metabolismo e o crescimento do milho através da inibição da enzima PPK e, conseqüentemente, dos processos fotossintéticos, dos quais a planta é extremamente dependente. A PPK catalisa uma etapa importante da via do metabolismo fotossintético  $C_4$ . A enzima se encontra nas células do mesófilo das folhas que apresentam esse tipo de metabolismo e é responsável pela conversão de piruvato em PEP, o qual, é o substrato da próxima enzima da via, a fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC)<sup>39</sup>. Por conseguinte, a PEPC incorpora uma molécula de  $CO_2$  no PEP, convertendo-o em oxaloacetato. Por sua vez, o oxaloacetato é transportado para as células da bainha do feixe na forma de malato ou aspartato. No milho, o  $CO_2$  é liberado dentro dos cloroplastos das células da bainha do

feixe, nas quais o malato é descarboxilado liberando o CO<sub>2</sub> e criando um microambiente de alta concentração de CO<sub>2</sub> para ser assimilado pela RuBisCO<sup>40</sup>. O Piruvato é, então, regenerado e transportado de volta as células do mesófilo para iniciar novamente o ciclo<sup>39</sup>. Sendo assim, qualquer interferência na atividade normal da PPDK pode afetar negativamente os processos fotossintético em plantas com metabolismo do tipo C<sub>4</sub>.

A principal evidência de que o ácido bromoacético exerce efeitos deletérios sobre plantas de milho através da inibição da PPDK é o teste de atividade enzimática *in vitro*. Na figura 4 é possível visualizar que a atividade da PPDK foi reduzida de modo dose-dependente na presença de concentrações crescentes de ácido bromoacético. Além disso, o acúmulo de piruvato endógeno nas folhas do milho (Fig. 5), principalmente nas doses mais altas do composto, é um indicativo muito forte de que os efeitos deletérios apresentados nos experimentos *in vivo* são também decorrentes da inibição da PPDK, uma vez que o substrato dessa enzima é o próprio piruvato. De maneira semelhante ao nosso trabalho, Motti et al. 2007<sup>40</sup> avaliaram os efeitos de um composto isolado de um extrato fúngico, o unguinol, sobre a atividade *in vitro* da enzima PPDK e sobre o crescimento de *Digitaria ciliaris*, espécie modelo de planta com metabolismo fotossintético C<sub>4</sub>. A análise cinética revelou que o unguinol se apresentou como um inibidor não competitivo misto de PPDK, em relação aos substratos piruvato e ATP, e um inibidor incompetitivo em relação ao fosfato. Além disso, o unguinol causou efeitos deletérios no crescimento da planta modelo. Em outro estudo, Haines et al. 2005<sup>41</sup>, identificaram 83 extratos de organismos marinhos que inibiram seletivamente a PPDK. Ainda, esses extratos, também foram avaliados quanto à sua capacidade de exibir efeitos deletérios sobre as plantas C<sub>4</sub> capim-colchão (*Digitaria ciliaris*) e capim-arroz (*Echinochloa crus-galli*). Avaliações com eletrodo de oxigênio revelaram que mais da metade desses extratos inibiram o metabolismo C<sub>4</sub> em fatias de folhas e dezessete extratos apresentaram efeitos deletérios sobre plantas C<sub>4</sub>, *in vivo*, dentro de 24 horas.

Para corroborar que os efeitos negativos do ácido bromoacético sobre o milho são provenientes da inibição da PPDK, com conseqüente redução do processo fotossintético global, foram realizadas determinações de trocas gasosas com auxílio de um analisador de gás por infravermelho (IRGA). Conforme observado, o ácido bromoacético reduziu marcadamente a *A*, a *G<sub>s</sub>* e a *E*, embora tenha aumentado a *C<sub>i</sub>* (Fig. 6).

A *A* das plantas de milho foi reduzida significativamente principalmente nas doses mais altas de ácido bromoacético utilizadas (Fig. 6A). Em alguns casos, a redução da *A*

pode estar associada ao comprometimento das reações de assimilação do carbono<sup>32</sup>. Nas plantas com metabolismo C<sub>4</sub>, a PPDK é responsável por catalisar a reação que produz PEP, o substrato ao qual o CO<sub>2</sub> atmosférico é incorporado por ação da PEPC. Sendo assim, a redução na atividade da PPDK pelo ácido bromoacético pode limitar a disponibilidade de PEP e, conseqüentemente, de CO<sub>2</sub> que pode ser assimilado pela RuBisCO nas células da bainha do feixe, causando, por conseguinte, a diminuição de *A* das plantas de milho.

Além disso, embora a redução da *G<sub>s</sub>* frequentemente possa influenciar negativamente a *A*, este não parece ser caso para as plantas de milho expostas ao ácido bromoacético. Em casos em que a limitação estomática é responsável por afetar a fotossíntese, a redução de *G<sub>s</sub>* geralmente é acompanhada por uma diminuição de *C<sub>i</sub>*<sup>42</sup>, o que não foi observado nas plantas de milho expostas ao ácido bromoacético. Aliás, houve incremento acentuado da *C<sub>i</sub>* mesmo com reduções acentuadas da *G<sub>s</sub>*, revelando o expressivo poder inibitório do ácido bromoacético sobre as reações de assimilação do carbono nas plantas de milho.

A *G<sub>s</sub>* reduzida está também relacionada com uma baixa taxa de transpiração (*E*)<sup>43</sup>. De fato, o fechamento estomático pode ser uma resposta da planta para reduzir a *E* em situações de déficit hídrico<sup>44</sup>. O equilíbrio de água das plantas e das células é determinado pela perda de água através da transpiração para a atmosfera e da absorção de água do solo<sup>45</sup>. Além disso, deficiência de água em plantas forrageiras intervém na morfologia e fisiologia, causando uma diminuição da sua sobrevivência<sup>46</sup>. A baixa disponibilidade de água causa desidratação, reduzindo o crescimento, pois reduz a fotossíntese e a taxa de expansão da folha. Estes fatores fisiológicos também interferem nos parâmetros anatômicos, uma vez que as plantas estressadas desenvolvem mecanismos de adaptação à falta de água, como fechamento de estômatos, espessamento de cutícula, ajuste da parede celular, produção de folhas mais pequenas, redução da área foliar e aumento da densidade radicular<sup>47</sup>. Contudo, no presente estudo, é possível que o ácido bromoacético tenha afetado a absorção de água pelas plantas de milho através da indução do fechamento estomático, hipótese que é reforçada pela observada redução da biomassa fresca das plantas (Fig. 8) e pelo principal sintoma morfológico visualizado, a desidratação (Fig. 7). Estado de hidratação, concentração de íons K<sup>+</sup> e teor de ácido abscísico são fatores que conhecidamente regulam o fechamento dos estômatos<sup>48</sup>. Entretanto, como não existem evidências de que o ácido bromoacético possa influenciar diretamente o funcionamento

dos estômatos, é plausível supor que este composto afete, indiretamente, o estado hídrico das plantas.

## 5 CONCLUSÃO

Este trabalho apresenta a modelagem, estudos de docagem e dinâmica molecular para enzima PPDK de *Digitaria sanguinalis*. A análise da estrutura modelada demonstrou uma boa qualidade do modelo proposto e a sua validação para utilização nas simulações de docagem molecular. Em adição, os compostos ZINC388362 e ZINC391120, obtidos na varredura em larga escala, mostraram-se bons candidatos a inibidores da PPDK.

Nossos dados também permitem afirmar que o ácido bromoacético exerce efeito herbicida sobre uma planta de metabolismo fotossintético C<sub>4</sub>, o milho, sendo o seu mais provável mecanismo de ação a inibição da enzima PPDK. Favorecem esta hipótese o significativo acúmulo de piruvato nas folhas e a marcante redução da A.

Embora a alta toxicidade do ácido bromoacético o impeça de ser futuramente utilizado como herbicida comercial, a sua utilização no presente estudo mostra de modo contundente que inibidores da PPDK podem atuar como herbicidas para plantas daninhas com metabolismo fotossintético C<sub>4</sub>. Em outras palavras, isto significa dizer que o presente estudo revela a PPDK como um novo alvo de ação para herbicidas.

## 6 REFERÊNCIAS

- 1 Vargas L and Roman ES, Resistência de plantas daninhas a herbicidas: conceitos, origem e evolução, Passo Fundo Embrapa Trigo (Embrapa Trigo Doc Online, 58):22 (2006).
- 2 Carvalho LB, Bianco S, and Guzzo CD, Interference of *Euphorbia heterophylla* in the growth and macronutrient accumulation of soybean, *Planta Daninha* **28**:33–39 (2010).
- 3 Burnside OC, Rationale for developing herbicide-resistant crops, *Weed Technol* **6**:621–625 (1992).
- 4 Powles SB, Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: Lessons to be learnt, *Pest Manag Sci* **64**, 360–365 (2008).
- 5 Lein W, Börnke F, Reindl A, Ehrhardt T, Stitt M, and Sonnewald U, Target-based discovery of novel herbicides, *Curr Opin Plant Biol* **7**:219–225 (2004).
- 6 Christoffoleti PJ, Victoria Filho R, and Silva CB, Resistência De Planta S Daninhas Aos Herbicidas, *Planta Daninha* **12**:13–20 (1994).
- 7 Machado AFLI, Meira RMS, Ferreira LR, Ferreira FA, Tuffi Santos LD, Fialho CMT V, *et al.*, Anatomical Characterization of the Leaf, Stem and Rhizome of *Digitaria insularis*, 1–8 (2008).
- 8 Kissmann KG and Groth D, *Plantas infestantes e nocivas*, 3rded., BASF, São Paulo (1995).
- 9 Mondo VHV, Carvalho SJP De, Dias ACR, and Marcos Filho J, Efeitos da luz e temperatura na germinação de sementes de quatro espécies de plantas daninhas do gênero *Digitaria*, *Rev Bras Sementes* **32**:131–137 (2010).
- 10 de Mendonça GS, Martins CC, Martins D, and da Costa NV, Ecophysiology of seed germination in *Digitaria insularis* ((L.) Fedde), *Rev Cienc Agron* **45**:823–832 (2014).
- 11 Gemelli A, Oliveira Junior RS de, Constantin J, Braz GBP, Jumes TM de C, Oliveira Neto AM de, *et al.*, Aspectos da biologia de *Digitaria insularis* resistente ao glyphosate e implicações para o seu controle, *Rev Bras Herbic* **11**:231 (2012).
- 12 Gazziero DL., Adegas FS, Fornarolli D, Vargas L, Karam D, and Balbinot JR AAVE, Um alerta sobre a resistência de plantas daninhas ao glifosato, VI Congr Bras Soja, 3 (2012).

- 13 Doyle JR, Burnell JN, Haines DS, Llewellyn LE, Motti CA, and Tapiolas DM, A rapid screening method to detect specific inhibitors of pyruvate orthophosphate dikinase as leads for C4 plant-selective herbicides, *J Biomol Screen* **10**:67–75 (2005).
- 14 Nelson DL and Cox MM, *Lehninger Principles of Biochemistry* 6th ed., Book (2013).
- 15 Taiz L and Zeiger E, *Plant Physiology*, Fifth Edition, Cell **1**:782 (2010).
- 16 Buchanan BB, Gruissem W, and Jones RL, *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, *J Chem Inf Model* **53** (2015).
- 17 Jenkins CL, Effects of the Phosphoenolpyruvate Carboxylase Inhibitor 3,3-Dichloro-2-(Dihydroxyphosphinoylmethyl)propenoate on Photosynthesis: C(4) Selectivity and Studies on C(4) Photosynthesis., *Plant Physiol* **89**:1231–1237 (1989).
- 18 Maroco JP, Ku MSB, Lea PJ, Dever L V, Leegood RC, Furbank RT, *et al.*, Oxygen requirement and inhibition of C4 photosynthesis, *Plant Physiol* **116**:823–832 (1998).
- 19 Hunter S, Apweiler R, Attwood TK, Bairoch A, Bateman A, Binns D, *et al.*, InterPro: The integrative protein signature database, *Nucleic Acids Res* **37** (2009).
- 20 Berman HM, Battistuz T, Bhat TN, Bluhm WF, Bourne PE, Burkhardt K, *et al.*, The protein data bank, *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* **58**:899–907 (2002).
- 21 Mount DW, Using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)., *CSH Protoc* **2007**:pdb.top17 (2007).
- 22 Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen M-Y, *et al.*, Comparative protein structure modeling using MODELLER., *Curr Protoc Protein Sci* **Chapter 2**:Unit 2.9 (2007).
- 23 Emsley P and Cowtan K, Coot: Model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* **60**:2126–2132 (2004).
- 24 Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, *et al.*, Scalable molecular dynamics with NAMD, *J Comput Chem* **26**:1781–1802 (2005).
- 25 Humphrey W, Dalke A, and Schulten K, VMD: Visual molecular dynamics, *J Mol Graph* **14**:33–38 (1996).
- 26 Morris G and Huey R, AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with

- selective receptor flexibility, J ... **30**:2785–2791 (2009).
- 27 Dallakyan S and Olson AJ, Small-molecule library screening by docking with PyRx, *Methods Mol Biol* **1263**:243–250 (2015).
- 28 Claußen H, Buning C, Rarey M, and Lengauer T, FLEXE: Efficient molecular docking considering protein structure variations, *J Mol Biol* **308**:377–395 (2001).
- 29 Sterling T and Irwin JJ, ZINC 15 - Ligand Discovery for Everyone, *J Chem Inf Model* **55**:2324–2337 (2015).
- 30 Yoshida H and Wood HG, Crystalline pyruvate, phosphate dikinase from *Bacteroides symbiosus*. Modification of essential histidyl residues and bromopyruvate inactivation., *J Biol Chem* **253**:7650–7655 (1978).
- 31 Bernt E and Hess B, *Methods of Enzymatic Analysis*, *Methods Enzym Anal* (1965).
- 32 Marchiosi R, de Souza Bido G, Böhm PAF, Soares AR, da Silva HA, Ferro AP, *et al.*, Photosynthetic response of soybean to L-DOPA and aqueous extracts of velvet bean, *Plant Growth Regul* **80**:171–182 (2016).
- 33 Colturato CP, Constantin RP, Maeda AS, Constantin RP, Yamamoto NS, Bracht A, *et al.*, Metabolic effects of silibinin in the rat liver, *Chem Biol Interact* **195**:119–132 (2012).
- 34 Wu C, Dunaway-Mariano D, and Mariano PS, Design, synthesis, and evaluation of inhibitors of pyruvate phosphate dikinase, *J Org Chem* **78**:1910–1922 (2013).
- 35 Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, *et al.*, Protein identification and analysis tools in the ExPASy server., *Methods Mol Biol* **112**:531–552 (1999).
- 36 Nakanishi T, Nakatsu T, Matsuoka M, Sakata K, and Kato H, Crystal structures of pyruvate phosphate dikinase from maize revealed an alternative conformation in the swiveling-domain motion, *Biochemistry* **44**:1136–1144 (2005).
- 37 Yang A-S and Honig B, An integrated approach to the analysis and modeling of protein sequences and structures. I. Protein structural alignment and a quantitative measure for protein structural distance, *J Mol Biol* **301**:665–678 (2000).
- 38 Rost B, Twilight zone of protein sequence alignments., *Protein Eng* **12**:85–94 (1999).
- 39 Pribil M and Leister D, Photosynthesis, *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, pp. 90–95 (2017).

- 40 Motti CA, Bourne DG, Burnell JN, Doyle JR, Haines DS, Liptrot CH, *et al.*, Screening marine fungi for inhibitors of the C<sub>4</sub> plant enzyme pyruvate phosphate dikinase: Uinguinol as a potential novel herbicide candidate, *Appl Environ Microbiol* **73**:1921–1927 (2007).
- 41 Haines DS, Burnell JN, Doyle JR, Llewellyn LE, Motti C a, and Tapiolas DM, Translation of in vitro inhibition by marine natural products of the C<sub>4</sub> acid cycle enzyme pyruvate P(i) dikinase to in vivo C<sub>4</sub> plant tissue death, *J Agric Food Chem* **53**:3856–3862 (2005).
- 42 Centritto M, Loreto F, and Chartzoulakis K, The use of low [CO<sub>2</sub>] to estimate diffusional and non-diffusional limitations of photosynthetic capacity of salt-stressed olive saplings, *Plant, Cell Environ* **26**:585–594 (2003).
- 43 Zhou YH and Yu JQ, Allelochemicals and photosynthesis, *Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications*, pp. 127–139 (2006).
- 44 Yip DY, Developing a Better Understanding of the Relationship Between Transpiration and Water Uptake in Plants., *J Sci Educ Technol* **12**:13–19 (2003).
- 45 Lawlor DW, Limitation to photosynthesis in water-stressed leaves: Stomata vs. Metabolism and the role of ATP, *Ann Bot* **89**:871–885 (2002).
- 46 De Mattos JLS, Gomide JA, and Martinez y Huaman CA, Crescimento de espécies do gênero *Brachiaria* sob alagamento em casa de vegetação, *Rev Bras Zootec* **34**:765–773 (2005).
- 47 Pereira MRR, Martins AR, Martins D, Sasso G, and Silva JR AC, Effect of Sethoxydim Herbicide in the Leaf Anatomy and Physiology of *Brachiaria* Grass Under Water Stress, *Planta Daninha* **35**:2–9 (2017).
- 48 Farquhar GD and Sharkey TD, Stomatal Conductance and Photosynthesis, *Annu Rev Plant Physiol* **33**:317–345 (1982).

## LEGENDAS DAS FIGURAS

**Figura 1.** Estrutura molecular do ácido bromoacético.

**Figura 2.** Representação em fita da estrutura monomérica da PPDK ligada ao cofator  $Mg^{2+}$  (verde) e ao produto fosfoenolpiruvato (PEP).

**Figura 3.** Redocking do PEP pelo programa Autodock. Estrutura de referência modelada sobrepostas pelas poses encontradas por redocking.

**Figura 4.** Efeito inibitório do ácido bromoacético sobre a atividade *in vitro* da PPDK de folhas de plantas de milho com 28 dias de desenvolvimento. A atividade da enzima está apresentada como funções do consumo de ATP e produção de AMP. Médias ( $n = 4-7 \pm$  EPM) seguidas por asterisco (\*) são estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnet ( $p \leq 0,05$ ).

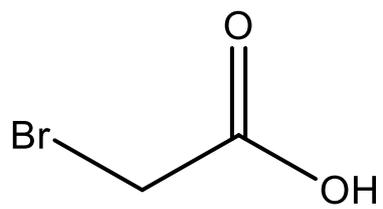
**Figura 5.** Efeitos do ácido bromoacético sobre o conteúdo endógeno de piruvato em folhas de plantas de milho. Médias ( $n = 4-7 \pm$  EPM) seguidas por asterisco (\*) são estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnet ( $p \leq 0,05$ ).

**Figura 6.** Efeitos do ácido bromoacético sobre as trocas gasosas de plantas de milho. (A) Taxa fotossintética –  $A$ , (B) condutância estomática –  $G_s$ , (C) transpiração –  $E$  e (D) concentração intercelular de  $CO_2$  –  $C_i$ . Médias ( $n = 4-7 \pm$  EPM) seguidas por asterisco (\*) são estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnet ( $p \leq 0,05$ ).

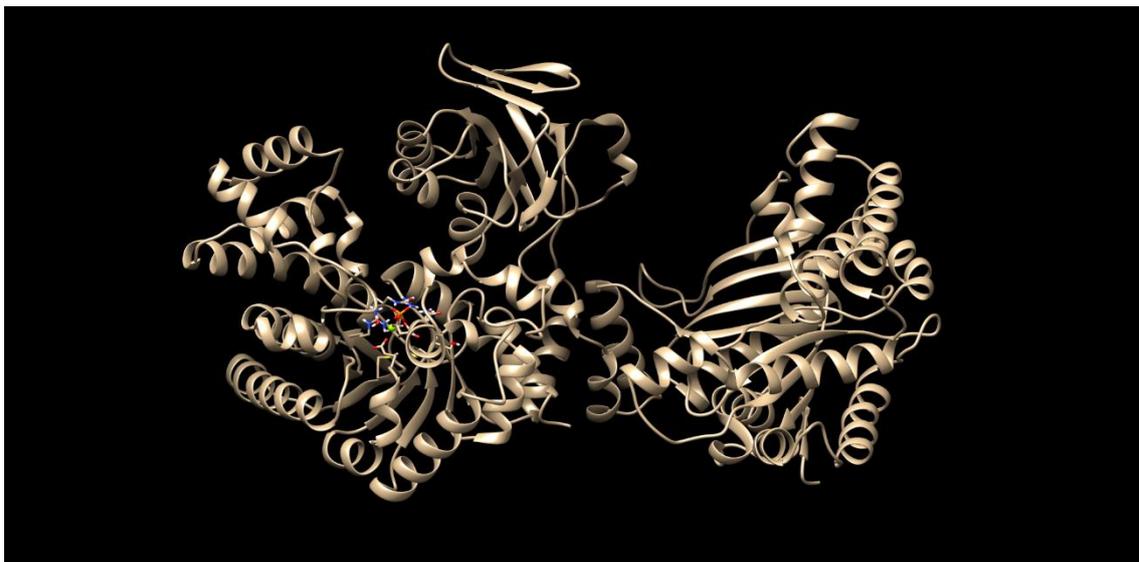
**Figura 7.** Efeitos da aspersão foliar de ácido bromoacético (0 – 10 mM) sobre os aspectos morfológicos de folhas de milho.

**Figura 8.** Efeitos do ácido bromoacético sobre a biomassa fresca de plantas de milho. Médias ( $n = 4-7 \pm$  EPM) seguidas por asterisco (\*) são estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnet ( $p \leq 0,05$ ).

**Figura 1**



**Figura 2**



**Figura 3**

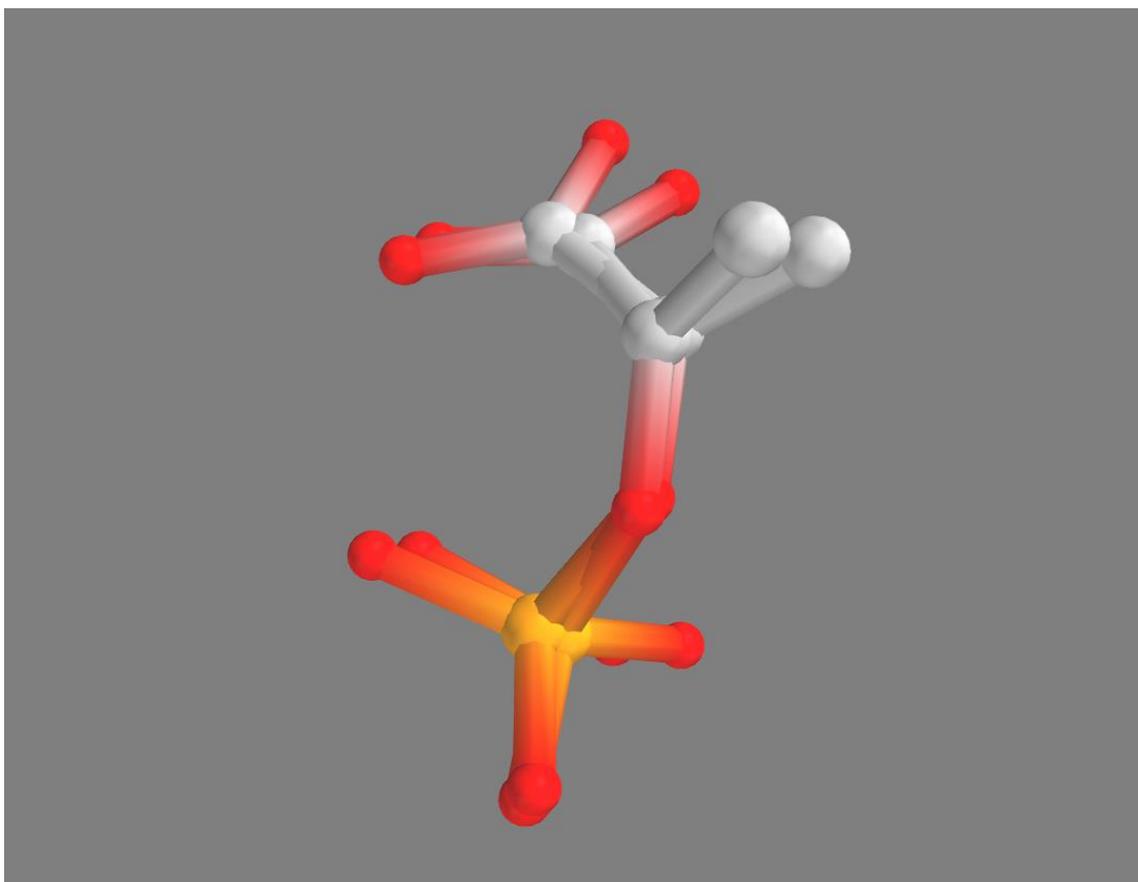


Figura 4

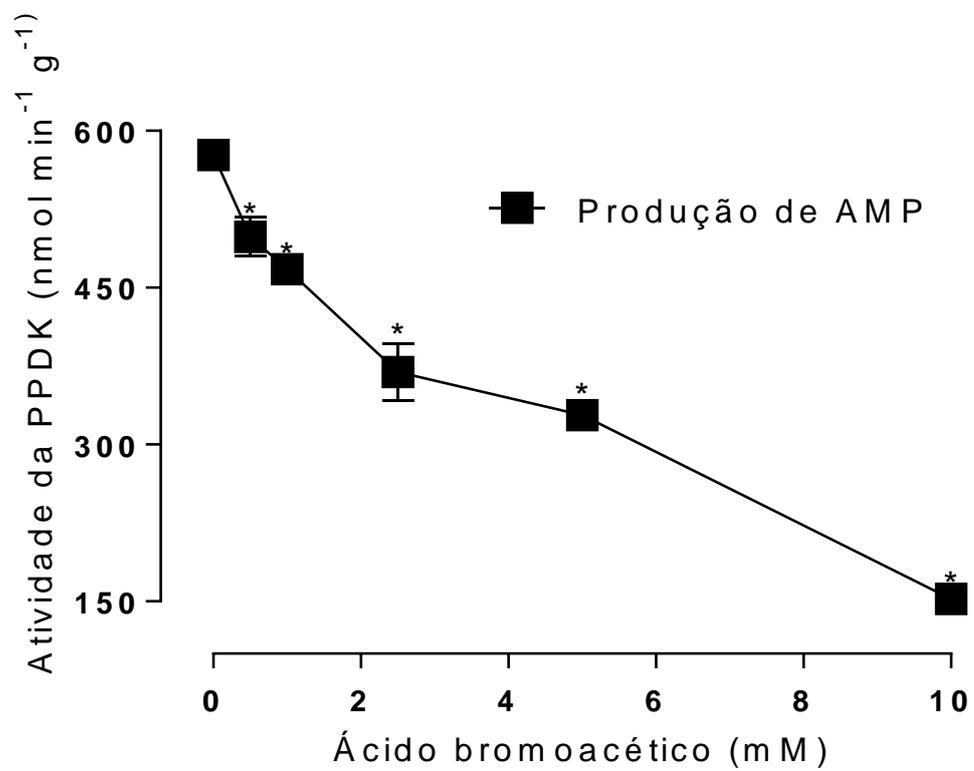
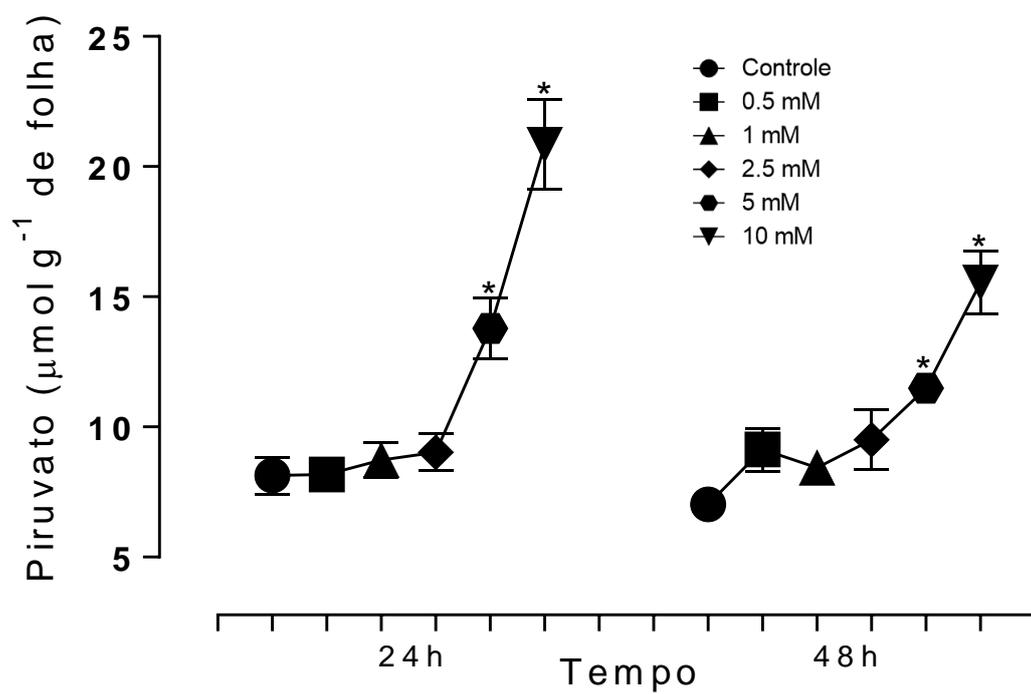
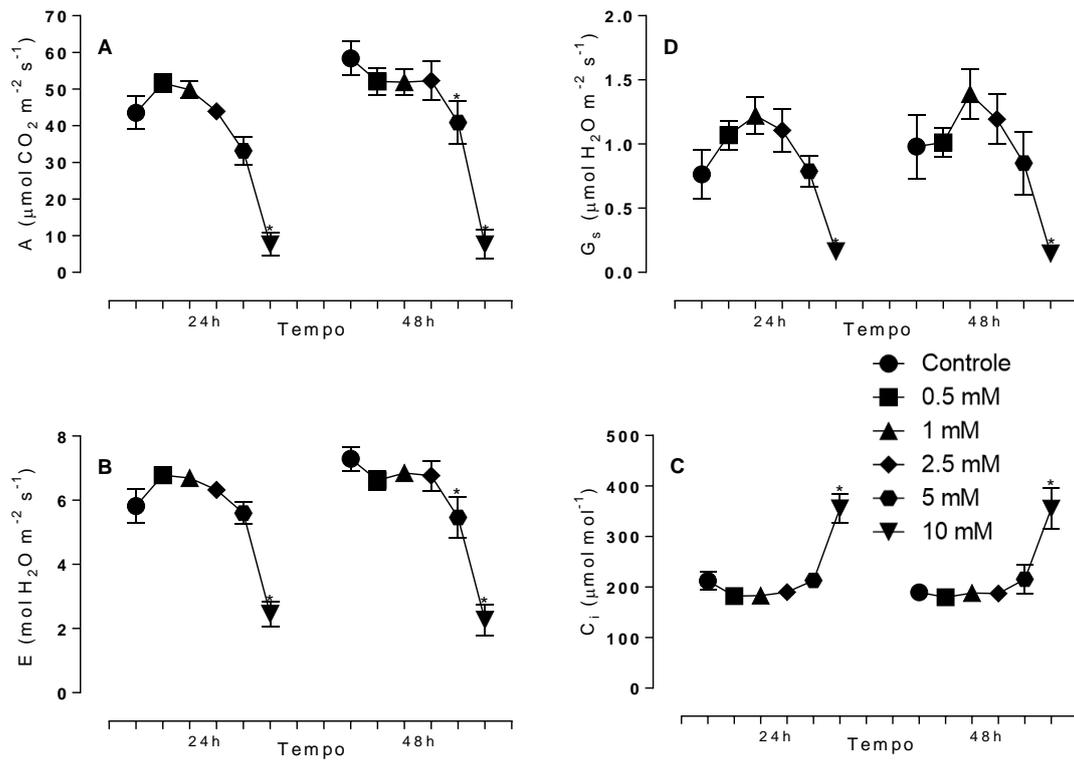


Figura 5



**Figura 6**



**Figura 7**

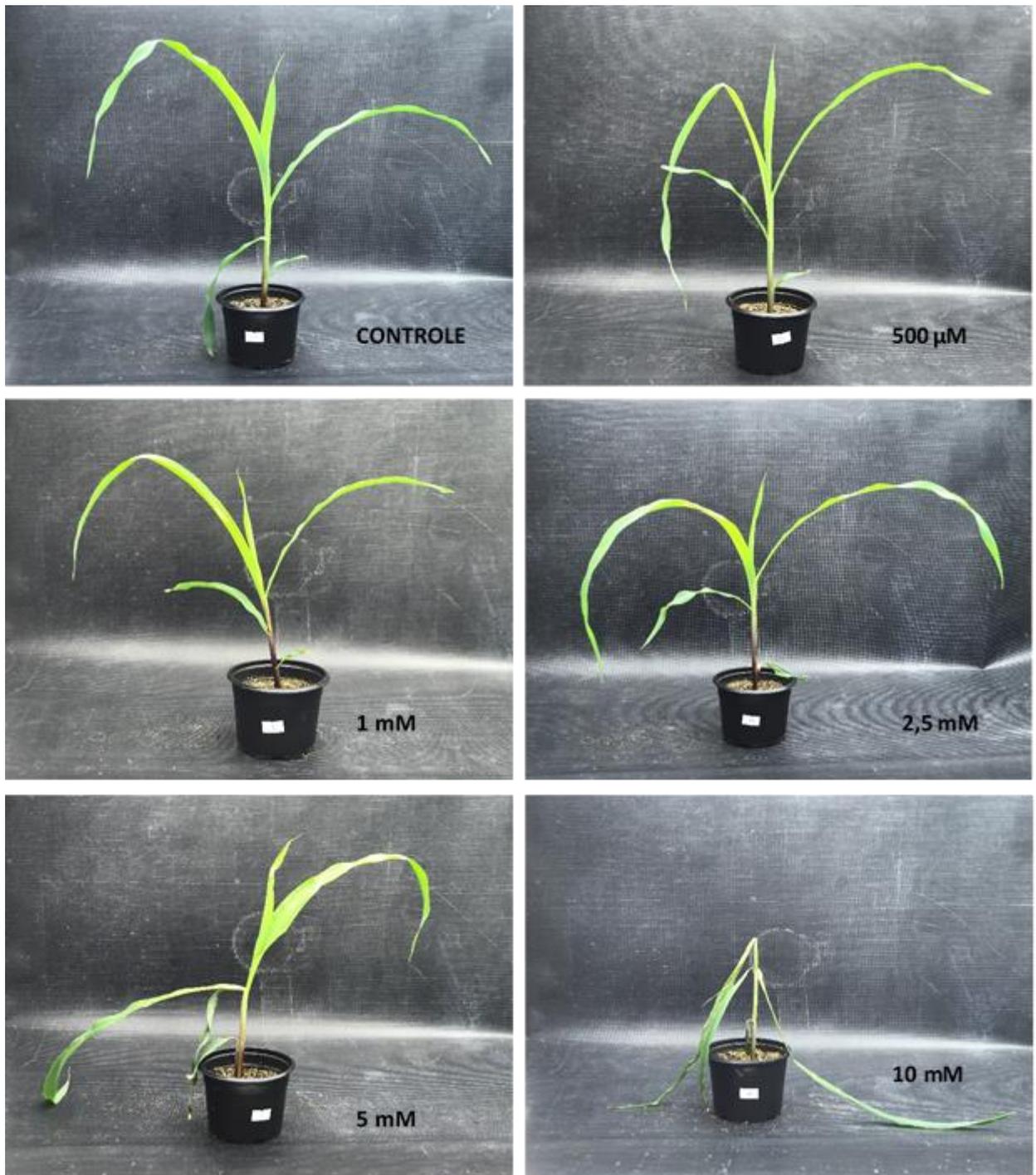


Figura 8

