

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

DANIELLY CAROLINE INACIO MARTARELLO

**TRIPTOFANO SINTASE E *o*-ACETILSERINA(TIOL) LIASE COMO ALVOS  
PARA A DESCOBERTA DE NOVAS MOLÉCULAS COM AÇÃO HERBICIDA**

Maringá  
2022

DANIELLY CAROLINE INACIO MARTARELLO

**TRIPTOFANO SINTASE E *o*-ACETILSERINA(TIOL) LIASE COMO ALVOS  
PARA A DESCOBERTA DE NOVAS MOLÉCULAS COM AÇÃO HERBICIDA**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (área de concentração – Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho.

Coorientador: Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos.

Maringá  
2022

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

M375t

Martarello, Danielly Caroline Inacio

Triptofano sintase e O-acetilserina(tiol) liase como alvos para a descoberta de novas moléculas com ação herbicida / Danielly Caroline Inacio Martarello. -- Maringá, PR, 2022.  
65 f.: il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese Filho.

Coorientador: Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2022.

1. Bioquímica de plantas. 2. Bioinformática. 3. Triptofano sintase. 4. Cisteína sintase. 5. Herbicidas. I. Ferrarese Filho, Osvaldo, orient. II. Santos, Wanderley Dantas dos, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Departamento de Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular). IV. Título.

CDD 23.ed. 572.46

DANIELLY CAROLINE INACIO MARTARELLO

**TRIPTOFANO SINTASE E *o*-ACETILSERINA(TIOL) LIASE COMO ALVOS  
PARA A DESCOBERTA DE NOVAS MOLÉCULAS COM AÇÃO HERBICIDA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Área de concentração – Biologia Celular e Molecular) da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas, sob apreciação da seguinte banca examinadora por webconferência:

Aprovado em: 26/08/2022

Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho  
Universidade Estadual de Maringá  
(presidente)

Profa. Dra. Marcela de Paiva Foletto-Felipe  
(membro examinador externo – UTFPR-DV)

Prof. Dr. Rogério Marchiosi  
(membro examinador – UEM)

Profa. Dra. Josielle Abrahão de Souza  
(membro examinador – UEM)

Prof. Dr. Paulo Sérgio Alves Bueno  
(membro examinador – UEM)

## BIOGRAFIA

**Danielly Caroline Inacio Martarello**, nasceu em Terra Boa-PR em 23/06/1994. Possui graduação em Ciências Biológicas, com habilitação em Licenciatura pela Universidade Estadual de Maringá (2016). Mestrado em Ciências Biológicas (área de concentração em Biologia Celular e Molecular) pelo programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – PBC (2018). Iniciou o Doutorado em Ciências Biológicas pelo mesmo programa em março de 2018. Tem experiência na área de Bioquímica, atuando principalmente nos temas relacionados à Bioquímica Vegetal, com ênfase em sacarificação enzimática e busca por novos herbicidas.

A seguir, publicações científicas realizadas durante o período do doutorado:

Martarello, Danielly Caroline Inacio; Almeida, Aline Marengoni; Sinzker, Renata Costa; Oliveira, Dyoni Matias de; Marchiosi, Rogério; Santos, Wanderley Dantas dos, Ferrarese-Filho, Osvaldo. *The known unknowns in lignin biosynthesis and its engineering to improve lignocellulosic saccharification efficiency*. Biomass Conversion and Biorefinery, 2021.

Constantin, Renato Polimeni; de Melo, Gabriele Sauthier Romano; Martarello, Danielly Caroline Inacio; Abrahão, Josielle; dos Santos, Wanderley Dantas; Ferrarese-Filho, Osvaldo; Marchiosi, Rogério. *Bromoacetic acid inhibits pyruvate orthophosphate dikinase and reduces photosynthetic activity in maize*. Acta Physiologiae Plantarum, v. 43, n. 54, 2021.

Martarello, Danielly Caroline Inacio; Tonete-Diniz, Débora Carvalho; Gonzaga, Diego, Eduardo Romero; Almeida, Aline Marengoni; Constantin, Renato, Polimeni; da Silva, Karla Gabriela; Constantin, Rodrigo Polimeni; Marchiosi, Rogério; Alves-Olher, Vanessa Guimarães; Rios, Fabiano Aparecido; Ferrarese-Filho, Osvaldo; dos Santos, Wanderley Dantas. *Treating maize plants with benzohydrazide increases saccharification of lignocellulose: A non-transgenic approach to improve cellulosic ethanol production*. Biomass Conversion and Biorefinery, 2021.

*Dedico este trabalho aos meus pais, Doroteia e Sergio Martarello, meus exemplos de fé e justiça, que me educaram no caminho do bem e sempre acreditaram em mim. Ao meu esposo, Marcus Vinicius, que não mediu esforços ou distância para ser meu suporte e apoio nos momentos mais difíceis.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, meu criador, por me sustentar, conceder paciência, determinação e perseverança durante toda a realização desse trabalho.

Ao meu esposo Marcus Vinicius, por todo amor, compreensão, paciência e palavras de incentivo, especialmente nos momentos de desânimo.

Aos meus pais, Sergio e Doroteia, a minha irmã Emanuely e a minha avó Maria por toda oração, apoio e confiança nos momentos difíceis. Pela compreensão em todas as vezes que me fiz ausente para me dedicar ao doutorado. E pelo amor incondicional que me dedicam todos os dias, mesmo estando longe.

Ao meu orientador professor Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pela confiança em mim depositada.

Ao professor Dr. Rogério Marchiosi, por ter me acompanhado durante todo o doutorado, pelo auxílio, ideias e exemplo de ser humano e profissional.

Ao professor Dr. Wanderley Dantas dos Santos, por toda a atenção e solicitude.

À professora Dra. Marcela de Paiva Foletto-Felipe, pelo apoio e confiança em me permitir dar continuidade ao seu trabalho de doutorado.

Aos professores Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas e Dr. Paulo Sérgio Alves Bueno pelo auxílio na área de Bioinformática.

Às amigas Aline, Josielle, Renata e Aparecida por toda a amizade, companheirismo e boas risadas durante esses anos.

Aos colegas do laboratório de Bioquímica de Plantas, especialmente Diego, Luiz, Breno, Gabriele e Renato por todo apoio, força e incentivo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e a Universidade Estadual de Maringá (UEM) pela estrutura e formação acadêmica ao longo desses mais de 10 anos.

## SUMÁRIO

<b>Apresentação.....</b>	<b>7</b>
<b>Resumo geral.....</b>	<b>8</b>
<b>General abstract.....</b>	<b>10</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>12</b>
Resumo.....	14
Introdução.....	15
Materiais e métodos.....	17
Resultados.....	19
Discussão.....	21
Conclusão.....	21
Agradecimentos.....	22
Referências.....	22
Lista de tabela.....	26
Tabela.....	27
Lista de figuras.....	28
Figuras.....	29
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>33</b>
Resumo.....	34
Introdução.....	35
Materiais e métodos.....	36
Resultados.....	41
Discussão.....	43
Conclusão.....	48
Agradecimentos.....	49
Referências.....	50
Lista de figuras.....	53
Figuras.....	55

## APRESENTAÇÃO

Esta Tese é composta por dois capítulos. O capítulo I é intitulado “Busca por novas moléculas com ação herbicida tendo como alvo a triptofano sintase”, no qual a subunidade  $\alpha$  da triptofano sintase (TSA) é usada como alvo para simulações de *virtual screening*, objetivando a seleção de novas moléculas com potencial herbicida. O capítulo II é denominado “S-Benzil-L-cisteína, inibidor da O-acetilserina(tiol) liase, induz dano oxidativo e reduz o crescimento e a fotossíntese em *Ipomoea grandifolia*”, que avalia os efeitos desse inibidor sobre o crescimento, estresse oxidativo e fotossíntese da planta daninha corda-de-viola.

\*O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

## RESUMO GERAL

**INTRODUÇÃO** - Desde o surgimento da agricultura, o homem teve que lidar com os fatores bióticos e abióticos. Dentre os fatores bióticos, as plantas daninhas, em especial, representam um sério problema para a agricultura mundial uma vez que elas competem por água, nutrientes, luz solar e espaço, afetando o crescimento e desenvolvimento das culturas e levando à redução dos rendimentos e da qualidade da produção. Práticas mecânicas, físicas, químicas e biológicas vêm sendo estudadas, discutidas e empregadas ao longo dos anos a fim de se obter sucesso no manejo das plantas daninhas. Dentre as práticas, o controle químico tem sido a mais adotada, econômica e efetiva para garantir a necessária continuidade da produção agrícola. No entanto, apesar das suas vantagens, o uso de substâncias com potencial herbicida apresenta pontos negativos em relação ao meio ambiente e a saúde humana, além do fato de que o seu uso intensivo, e muitas vezes indiscriminado, tem selecionado populações resistentes de forma muito rápida, dificultando cada vez mais o controle das plantas daninhas. Fica nítida, portanto, a necessidade da busca por novos mecanismos de ação, bem como o desenvolvimento de novas moléculas com ação herbicida, que sejam efetivas e viáveis em termos econômicos e menos tóxicas ao ambiente a fim de assegurar o modelo de produção agrícola atual. Assim, foram selecionadas duas enzimas: a triptofano sintase (TS), envolvida na síntese do aminoácido aromático triptofano, e a enzima *O*-acetilserina(tiol) liase (OAS-TL), que faz parte da via de assimilação do enxofre, para serem alvos de desenvolvimento de novas moléculas com ação herbicida.

**OBJETIVOS** – O presente trabalho teve como objetivos: 1) selecionar novas moléculas com potencial herbicida utilizando a subunidade  $\alpha$  da triptofano sintase (TSA) como alvo; 2) avaliar os efeitos de *S*-benzil-L-cisteína (SBC) sobre o crescimento, estresse oxidativo e fotossíntese de plantas de *I. grandifolia* após 14 dias de exposição.

**MATERIAL E MÉTODOS** – Foi realizada a modelagem por homologia da TSA de milho, seguida de sua validação por *redocking* utilizando os programas AutoDock versão 4.2.3, implementado na interface Pyrx-0.9 e também o programa Molegro virtual Docker 6.0. A *virtual screening* foi conduzida a partir de duas bibliotecas, uma construída com análogos de inibidores conhecidos da TS e outra com produtos comercializáveis da Sigma-Aldrich®. A seleção dos melhores ligantes ocorreu utilizando os dois programas, a fim de selecionar aqueles ligantes com reprodutibilidade e eliminar resultados falsos positivos. Utilizando OAS-TL como alvo foram conduzidos experimentos com *I. grandifolia* em vasos contendo substrato vermiculita e extrato de *Pinus* e adicionando SBC, via água ou solução nutritiva, nas concentrações de 1 mM, 2,5 mM e 5 mM a cada 2 dias por 14 dias. No 14º dia de cultivo foram realizados experimentos para verificar os parâmetros biométricos: comprimento, biomassa fresca e após secagem do material em estufa a 60º C, biomassa seca. Experimentos para verificar o conteúdo de espécies reativas de oxigênio utilizando 2',7',-diclorofluorescina diacetato (DCFDA), malondialdeído pelo método TBARS e dienos conjugados também foram realizados. E ainda determinação das atividades das enzimas: catalase (CAT), peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD). A atividade da POD foi determinada através da oxidação do guaiacol, a da CAT através do consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do meio reacional e a atividade da SOD utilizando o método fotoquímico do nitro azul tetrazólio

(NBT). Finalmente, a fotossíntese de plantas de *I. grandifolia* foi avaliada por meio de curvas de resposta à luz, curvas de resposta ao CO<sub>2</sub> e fluorescência da clorofila *a*.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO** – A modelagem da TS de milho permitiu selecionar 13 ligantes potencialmente inibidores da subunidade  $\alpha$  da enzima: Zinc312775470, Zinc64872, Zinc43761147, Zinc820898, Zinc1610272, Zinc33305667, Zinc265440, Zinc34461016, Zinc163292, Zinc355069, Zinc2573116, Zinc4795100, Zinc4831614, como bons candidatos. Tanto no programa Autodock quanto no Molegro esses ligantes foram ranqueados com um *score* menor do que o indol 3-glicerol fosfato (IGP) e apresentaram melhor pose no sítio ativo da subunidade  $\alpha$ . Utilizando OAS-TL como alvo, nós constatamos que após o tratamento com SBC as plantas apresentaram reduções significativas no crescimento e desenvolvimento. A 1 mM, SBC aumentou o conteúdo de espécies reativas de oxigênio (EROs) em 50%, o conteúdo de malondialdeído (MDA) em 30% e o conteúdo de dienos conjugados em 77%, além de comprometimento do sistema antioxidante. Na mesma concentração, nós observamos reduções nos parâmetros fotossintéticos: taxa de assimilação fotossintética líquida, condutância estomática, rendimento quântico do PSII, taxa de transporte de elétrons, coeficiente de extinção fotoquímico, velocidade máxima de carboxilação da Rubisco e uso de triose fosfato.

**CONCLUSÃO** – Utilizando TSA como alvo, nós selecionamos 13 ligantes como bons inibidores *in silico*, sendo necessários estudos posteriores como ensaios *in vitro* e *in vivo* para confirmar o potencial herbicida desses ligantes. Utilizando OAS-TL como alvo, nós constatamos que o seu inibidor, SBC, causou estresse oxidativo e redução da taxa fotossintética em plantas de *I. grandifolia* em decorrência do comprometimento dos complexos contendo enxofre, ferredoxina e citocromo *b<sub>6</sub>f*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Assimilação do enxofre, bioinformática, estresse oxidativo, fotossíntese, herbicidas, síntese de triptofano.

## GENERAL ABSTRACT

**INTRODUCTION** - Since the emergence of agriculture, man has had to deal with biotic and abiotic factors. Among the biotic factors, weeds, in particular, represent a severe problem for world agriculture since they compete for water, nutrients, sunlight, and space, affecting the growth and development of crops and leading to reduced yields and production quality. Mechanical, physical, chemical, and biological practices have been studied, discussed, and used over the years to succeed in weed management. Among the practices, chemical control has been the most adopted, economical, and practical to guarantee the necessary continuity of agricultural production. However, despite its advantages, using substances with herbicidal potential has negative effects on the environment and human health. In addition, its intensive and often indiscriminate use has selected resistant populations quickly, making it increasingly difficult to control weeds. It is clear, therefore, the need to search for new mechanisms of action and develop new molecules with herbicidal action, which are effective, economically viable, and less toxic to the environment to ensure the current agricultural production model. Thus, two enzymes were selected: tryptophan synthase (TS), which is involved in the synthesis of the aromatic amino acid tryptophan, and the enzyme *O*-acetylserine(thiol) lyase (OAS-TL), which is part of the sulfur assimilation pathway, to be targets for the development of new molecules with herbicidal action.

**OBJECTIVES** – The present work had the following objectives: 1) to select new molecules with herbicidal potential using the  $\alpha$  subunit of tryptophan synthase (TSA) as a target; 2) to evaluate the effects of *S*-benzyl-L-cysteine (SBC) on the growth, oxidative stress and photosynthesis of *I. grandifolia* plants after 14 days of exposure.

**MATERIAL AND METHODS** – The homology modeling of the corn TSA was carried out, followed by its validation by redocking using the AutoDock version 4.2.3 programs, implemented in the Pyrx-0.9 interface and the Molegro virtual Docker 6.0 program. Virtual screening was conducted using two libraries, one constructed with analogs of known TS inhibitors and the other with commercially available Sigma-Aldrich® products. The selection of the best ligands occurred using both programs, in order to select those ligands with reproducibility and eliminate false positive results. Using OAS-TL as a target, experiments were carried out with *I. grandifolia* in pots containing vermiculite substrate and *Pinus* extract and adding SBC via water or nutrient solution at 1 mM, 2.5 mM, and 5 mM every two days for 14 days. On the 14<sup>th</sup> day of cultivation, experiments were carried out to verify the biometric parameters: length, fresh biomass, and after drying the material in an oven at 60° C, dry biomass. Experiments to verify the content of reactive oxygen species using 2',7'-dichlorofluoresceine diacetate (DCFDA), malondialdehyde by the TBARS method and conjugated dienes were also carried out. The peroxidase (POD) activity was determined through the oxidation of guaiacol, the catalase (CAT) activity through the consumption of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the reaction medium and the superoxide dismutase (SOD) activity using the nitro blue tetrazolium (NBT) photochemical method. Finally, the photosynthesis of *I. grandifolia* plants was evaluated using light response curves, CO<sub>2</sub> response curves, and chlorophyll *a* fluorescence.

**RESULTS AND DISCUSSION** - The modeling of corn TS allowed the selection of thirteen ligands potentially inhibitory to the  $\alpha$  subunit of the enzyme: Zinc312775470, Zinc64872, Zinc43761147, Zinc820898, Zinc1610272, Zinc33305667, Zinc265440, Zinc34461016, Zinc163292, Zinc355069, Zinc2573116, Zinc4795100, Zinc48316, as good candidates. In the Autodock and Molegro programs, these ligands were ranked with a lower score than indole 3-glycerol phosphate (IGP) and presented a better pose in the active site of the  $\alpha$  subunit. Using OAS-TL as a target, we found that after SBC treatment, plants showed significant reductions in growth and development. At 1 mM, SBC increased the content of reactive oxygen species (ROS) by 50%, malondialdehyde (MDA) by 30%, and the content of conjugated dienes by 77%, in addition to impairing the antioxidant system. At the same concentration, we observed reductions in photosynthetic parameters: net photosynthetic assimilation rate, stomatal conductance, PSII quantum yield, electron transport rate, photochemical extinction coefficient, maximum rate of Rubisco carboxylation, and use of triose phosphate.

**CONCLUSION** – Using TSA as a target, we selected 13 ligands as suitable inhibitors *in silico*, requiring further studies such as *in vitro* and *in vivo* assays to confirm the herbicidal potential of these ligands. Using OAS-TL as a target, we found that its inhibitor, SBC, caused oxidative stress and reduced the photosynthetic rate in *I. grandifolia* plants because of the impairment of complexes containing sulfur, ferredoxin, and cytochrome b<sub>6</sub>f.

**Keywords:** Sulfur assimilation, bioinformatics, oxidative stress, photosynthesis, herbicides, tryptophan synthesis.

## Capítulo I

### ARTIGO

#### **BUSCA POR NOVAS MOLÉCULAS COM AÇÃO HERBICIDA TENDO COMO ALVO A TRIPTOFANO SINTASE**

Este artigo será submetido ao Periódico *Weed Biology and Management* (JCR 2021 = 1,815).

## **Artigo de pesquisa**

### **BUSCA POR NOVAS MOLÉCULAS COM AÇÃO HERBICIDA TENDO COMO ALVO A TRIPTOFANO SINTASE**

Danielly Caroline Inacio Martarello<sup>1</sup>, Wanderley Dantas dos Santos<sup>1</sup>, Flávio Augusto Vicente Seixas<sup>2</sup> e Osvaldo Ferrarese-Filho<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Bioquímica de Plantas, Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, 87020-900, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Maringá, Umuarama, PR, 87506-370, Brasil.

\*Autor para correspondência:

Osvaldo Ferrarese-Filho, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790 – Zona 7, Maringá, PR, 87020-900.

E-mail: [osferrarese@gmail.com](mailto:osferrarese@gmail.com)

## BUSCA POR NOVAS MOLÉCULAS COM AÇÃO HERBICIDA TENDO COMO ALVO A TRIPTOFANO SINTASE

### RESUMO

Em plantas, o triptofano é um aminoácido precursor do ácido 3-indol acético, alcaloides, glicosinolatos indólicos e fitoalexinas, além de ser componente proteico. A sua biossíntese ocorre a partir do corismato em seis reações cujas enzimas estão localizadas nos plastídeos. A triptofano sintase (TS) é um tetrâmero  $\alpha_2\beta_2$  que catalisa as duas últimas etapas de síntese de triptofano e, por não ocorrer em animais e sintetizar um componente proteico, é um interessante alvo para o desenvolvimento de antifúngicos, antibacterianos e herbicidas. Neste trabalho, a subunidade  $\alpha$  da triptofano sintase (TSA) foi modelada e usada como alvo para simulações de *virtual screening* objetivando a seleção de novas moléculas com potencial herbicida. Para tanto, após a modelagem, foram avaliadas duas bibliotecas, uma construída com análogos de inibidores conhecidos da TS e outra com produtos comercializáveis da Sigma-Aldrich®. A *virtual screening* selecionou os ligantes Zinc312775470, Zinc64872, Zinc43761147, Zinc820898, Zinc1610272, Zinc33305667, Zinc265440, Zinc34461016, Zinc163292, Zinc355069, Zinc2573116, Zinc4795100, Zinc4831614 como bons candidatos. Tanto no programa Autodock quanto no Molegro esses ligantes foram ranqueados com um *score* menor do que o indol 3-glicerol fosfato (IGP) e apresentaram melhor pose no sítio ativo da subunidade  $\alpha$ . Ao todo, foram selecionados 13 ligantes como bons inibidores da TSA, *in silico*, sendo necessários estudos posteriores como ensaios *in vitro* e *in vivo* para confirmar o potencial herbicida desses ligantes.

**Palavras-chave:** Triptofano, bioinformática, TSA.

## 1 INTRODUÇÃO

Em plantas, o aminoácido triptofano, além de componente proteico, é precursor do ácido 3-indol acético (AIA) (Zhao, 2012) e de vários compostos de defesa como glicosinolatos indólicos (Ishida, Hara, Fukino, Kakizaki & Morimitsu, 2014), alcaloides e fitoalexinas (Ahuja, Kissen & Bones, 2012). A sua biossíntese ocorre a partir do corismato (formado na via do chiquimato) e seis reações cujas enzimas estão localizadas nos plastídeos. São elas: 1) antranilato sintase (AS), 2) fosforibosilantranilato transferase (PAT), 3) fosforibosilantranilato isomerase (PAI), 4) indol-3-glicerol fosfato sintase (IGPS) e 5) triptofano sintase (TS) (Lynch & Dudareva, 2020; Maeda & Dudareva, 2012).

A triptofano sintase (TS) (EC 4.2.1.20) é um complexo enzimático que catalisa as duas últimas etapas da biossíntese do aminoácido triptofano em plantas, bactérias e fungos (Hyde, Ahmed, Padlan, Miles & Davies, 1988; Schupfner, Busch, Wysocki & Sterner, 2019). É encontrada geralmente na forma de tetrâmero  $\alpha_2\beta_2$  sendo que as subunidades  $\alpha$  (TSA) catalisam a formação reversível de indol e gliceraldeído-3-fosfato (G3P) a partir de indol-3-glicerol fosfato (IGP). As subunidades  $\beta$  (TSB) catalisam a condensação irreversível de indol e serina formando triptofano, em uma reação dependente do cofator piridoxal 5'-fosfato (PLP) (Miles, 2013; Raboni, Bettati & Mozzarelli, 2009). Cada sítio ativo da subunidade  $\alpha$  está conectado a um sítio ativo da subunidade  $\beta$  por um canal hidrofóbico de 25 Å que percorre o interior da enzima. Isto facilita a difusão do indol formado na subunidade  $\alpha$  diretamente para a subunidade  $\beta$  em um processo conhecido como canalização do substrato (Barends, Dunn & Schlichting, 2008; Dunn, 2012).

O complexo enzimático é caracterizado por ativação mútua da subunidade  $\alpha$  e  $\beta$  por meio de uma rede alostérica complexa (Ngo et al., 2007). Cada subunidade gera mudanças conformacionais que afetam a atividade catalítica da outra e, assim, a eficiência na atividade de uma subunidade depende da colaboração da outra (Schupfner et al., 2019). O ciclo catalítico da enzima inicia com a ligação do IGP na subunidade  $\alpha$  e a serina na subunidade  $\beta$ ; esta última rapidamente convertida no intermediário serina quinolina. O IGP ativa a formação do intermediário  $\alpha$ -aminoacrilato na subunidade  $\beta$  e esse intermediário ativa a clivagem do IGP em G3P e indol na subunidade  $\alpha$ . O indol é canalizado para a subunidade  $\beta$ , onde reage com o intermediário  $\alpha$ -aminoacrilato,

formando triptofano quinolina que, em seguida, é convertido em triptofano. G3P e triptofano são liberados da enzima (Loutchko, Eisbach & Mikhailov, 2017).

A enzima é um interessante alvo para o desenvolvimento de novas moléculas com ação herbicida, haja vista que plantas superiores possuem baixas reservas de triptofano e de mRNA para a biossíntese de triptofano sintase, o que indica relativamente baixa capacidade de síntese de triptofano (Finn et al., 1999). Além disso, mutantes de *Arabidopsis thaliana* nas subunidades  $\alpha$  (*trp3-1* e *trp3-2*) (Radwanski, Barczak & Last, 1996) e  $\beta$  (*trp 2-1*) (Last, Bissinger, Mahoney, Radwanski & Fink, 1991) são auxotróficos, ou seja, precisam de suplementação de triptofano e apresentam fenótipo condicionado à luz. Em condições de alta intensidade luminosa, as plantas do tipo selvagem crescem normalmente em meio sem triptofano, enquanto os mutantes morrem. Sob condições de baixa intensidade luminosa as plantas mutantes e do tipo selvagem apresentam crescimento similar. Acredita-se que a baixa produção de triptofano nos mutantes de *A. thaliana* pode sustentar o crescimento das plantas apenas em condições fotossintéticas muito baixas. Já, em condições de alta intensidade luminosa, o *turnover* de proteínas fotossintéticas aumenta o que gera uma demanda de triptofano que os mutantes não podem atender.

A busca de inibidores para a enzima visando ação herbicida tem sido realizada há anos. Testes em cultura de suspensão, por exemplo, mostraram que análogos de indol e triptofano inibiram o crescimento de células de cenoura (linha C1) e tabaco (linha TX1) e que a inibição de alguns análogos foi parcialmente reversível após suplementação com triptofano ou indol (Widholm, 1981). Testes *in vitro* da enzima com derivados de piridina, aminopiridina, indol e mercaptanos também foram realizados. Os dois compostos selecionados (4-(dimetilamino) piridina e 2-mercaptobenzimidazol) foram testados em plantas de arroz com 14 e 21 dias. O tratamento com 2-mercaptobenzimidazol resultou em inibição do crescimento e até morte das plantas com 21 dias (Shuto, Ohgai & Eto, 1989). Compostos também foram desenhados racionalmente tendo como ponto de partida o inibidor conhecido da subunidade  $\alpha$ , indol-3-propanol fosfato e derivados do intermediário reativo. Os testes *in vitro* e *in vivo* revelaram que os compostos são potentes inibidores da enzima, com atividade herbicida em pós-emergência (Rodaway et al., 2005). O modo de ação é típico de herbicidas que inibem a biossíntese de aminoácidos: lento, tendo por início a cessação do crescimento, e seguido de clorose e necrose (Finn et al., 1999).

Desse modo, com base 1) nos estudos que apontam a triptofano sintase como um alvo interessante a ser explorado, 2) no fato da via de síntese de triptofano ocorrer em plantas, bactérias e fungos, mas não em animais, 3) na existência de três vias de biossíntese de aminoácidos (aromáticos, de cadeia ramificada e glutamina) que são alvos de ação de herbicidas comerciais e 4) na escassez de estudos com plantas envolvendo inibidores para a enzima, nós decidimos utilizar a subunidade  $\alpha$  da triptofano sintase (TSA) como alvo para simulações de *virtual screening*, objetivando a seleção de novas moléculas com potencial herbicida.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Estudos *in silico*

As etapas de obtenção da sequência, modelagem e simulações de ancoragem da enzima TS foram realizadas pelo Laboratório de Bioquímica Estrutural na Universidade Estadual de Maringá – *Campus* Umuarama. As etapas de *virtual screening* a partir de bibliotecas foram realizadas no laboratório de Bioquímica de Plantas da Universidade Estadual de Maringá – *Campus* Sede.

#### 2.1.1 Obtenção da sequência e modelagem

A sequência de aminoácidos da TS de milho (*Zea mays* L.) foi obtida no banco de dados Uniprot (Magrane & Consortium, 2011) e foi usada para busca de moldes estruturais por meio de BLASTp (Mount, 2007) utilizando filtro para estruturas cristalográficas no *Protein Data Bank* (PDB) (Berman et al., 2002). Os modelos foram gerados por homologia pelo programa Modeller-9v14 (Eswar et al., 2006). Foram gerados 1000 modelos e selecionado os dez melhores com base no Modeller DOPE, onde o melhor modelo foi selecionado com base na qualidade estereoquímica avaliada pelo programa Procheck (Laskowski, Rullmannn, Macarthur, Kaptein & Thornton, 1996). Os resíduos de regiões proibidas do gráfico Ramachandram foram corrigidos por meio da modelagem pontual.

### 2.1.2 Simulações de dinâmica molecular e minimização de energia

A minimização de energia foi realizada usando o pacote de software NAMD2/VMD (Humphrey, Dalke, & Schulten, 1996; Phillips et al., 2005). A estrutura do dímero da enzima TS foi solvatada com água TIP3P em caixa periódica com limites de 10 Å de distância a partir da superfície da proteína. Íons Na<sup>+</sup> foram adicionados em quantidade suficiente para neutralização das cargas do sistema.

As simulações foram realizadas em etapas. Na primeira etapa, os átomos do indol 3-glicerol fosfato (IGP), triptofano e o cofator foram fixados no espaço, enquanto os da proteína e demais átomos do sistema foram mantidos livres para se mover. Neste ponto, o sistema foi submetido a 30.000 passos de minimização por Gradiente Conjugado (CG). Na segunda etapa, o triptofano e o cofator foram novamente fixados no espaço, e minimizados por 10.000 passos de CG. A estrutura resultante dessa etapa foi utilizada no *redocking* e *docking*.

### 2.1.3 Simulações de *redocking* e *virtual screening*

O protocolo de *docking* utilizado no *virtual screening* foi estabelecido por simulações de *redocking* do substrato indol 3-glicerol fosfato (IGP) na proteína usando o programa AutoDock versão 4.2.3 (Morris et al., 2009) implementado na interface Pyrx-0.9 (Dallakyan & Olson, 2015) e o programa Molegro virtual Docker 6.0 (Thomsen & Christensen, 2006). Os parâmetros usados no programa Autodock foram algoritmo padrão de busca (Lamarckian GA) e grid de 0,375 Å, com centro de busca em 4, 54, 90 e tamanho da caixa 40, 40, 40 em x, y e z, respectivamente e no programa Molegro o algoritmo de busca *Intered Simplex* em combinação com a função de classificação *PLANTS Score* e um raio de busca de 9 Å centrado no ligante.

Os ângulos de torção da enzima foram restringidos, mas permitiu-se a flexibilidade dos ligantes testados. Além disso, todas as moléculas de água, exceto as presentes no sítio de ligação da enzima, e os íons foram removidos da estrutura. Os protocolos foram considerados validados quando a pose do IGP exógeno se sobrepôs à posição do IGP modelado com a enzima, o qual apresentou RMSD menor que 2 Å.

Com o protocolo validado, foram realizadas simulações de *virtual screening* a partir de bibliotecas. Uma das bibliotecas utilizadas foi construída a partir de inibidores conhecidos da TS, depositados no banco de dados *Brenda enzymes* (Schomburg et al., 2013). Após a identificação dos inibidores conhecidos, foi utilizada a base de dados

Zinc15 (Irwin, Sterling, Mysinger, Bolstad & Coleman, 2012; Sterling & Irwin, 2015) para selecionar análogos estruturais utilizando o coeficiente de similaridade (índice de Tanimoto) maior que 70%. À biblioteca montada foi incluída a estrutura do IGP de modo que ao final da simulação, somente foram considerados os ligantes melhores ranqueados (menores *score*) que o encontrado para esse ligante. Todos os ligantes estavam no formato \*.sdf. Após a seleção inicial dos melhores ligantes no programa AutoDock, foram realizadas mais oito novas varreduras com estes ligantes no mesmo programa e quatro novas varreduras no Molegro a fim de selecionar aqueles com reprodutibilidade e eliminar resultados falso-positivos.

Outra biblioteca utilizada foi a dos produtos comercializáveis da Sigma-Aldrich® da base de dados Zinc 15. A estrutura do IGP foi incluída na biblioteca de modo que, ao final da simulação, somente os ligantes melhores ranqueados (menores *score*) que os encontrados para esse ligante fossem considerados. Após a seleção inicial dos melhores ligantes, foram realizadas quatro novas triagens com os selecionados no AutoDock e quatro novas triagens no Molegro.

Ao final das análises, a validação dos ligantes selecionados foi concluída aplicando as Regras de Lipinski (Lipinski, Lombardo, Dominy & Feeney, 2001) e critérios de toxicidade (ADMETox) através do programa DataWarrior (Homem et al., 2013).

### **3 RESULTADOS**

#### **3.1 Estudos *in silico***

##### **3.1.1 Obtenção da sequência e modelagem**

A sequência de aminoácidos da subunidade  $\alpha$  da enzima TS de milho (*Zea mays* L.) foi obtida no *Uniprot* (ID: P42390), contendo 347 resíduos e uma massa molecular de 36,52 kDa. Para a cadeia polipeptídica foi utilizada a TS de *Escherichia coli* (PDB: 5EY5) e para incluir os ligantes nas cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , foram utilizados os moldes do PDB com o código 2RHG e 6AM8, respectivamente. A partir dos moldes estruturais foi gerado o modelo tridimensional (Figura 1) da TS de milho, o qual foi utilizado para os estudos de *virtual screening*, após minimização e validação.

### 3.1.2 Simulações de *redocking* e *virtual screening*

Os protocolos de *docking* foram validados pelo método do *redocking* nos programas AutoDock e Molegro, que forneceram um RMSD de 0,91 Å (média de cinco simulações) e 0,5 Å (média de nove simulações) e *scores* médios -8,68 e -105,62, respectivamente. Mediante a reprodução dos resultados, a estrutura da TS e o protocolo de *docking* foram validados e puderam ser aplicados nas simulações de *virtual screening*.

A biblioteca de compostos com estruturas análogas aos inibidores conhecidos da enzima TS continha 816 moléculas. O protocolo final do AutoDock validado no *redocking* foi então aplicado na *virtual screening* da biblioteca criada. Na primeira triagem foram selecionados oito ligantes que apresentaram melhores posicionamentos de interação entre sítio ativo da enzima e ligante (pose) e melhores ranqueamentos que o IGP (Figura 2A). Os ligantes selecionados inicialmente passaram por mais oito triagens no AutoDock e mais quatro triagens no Molegro. Destas triagens, o ligante Zinc312775470 (Figura 2B) foi o melhor ranqueado em sete corridas do AutoDock e nas quatro realizadas no Molegro com um *score* médio de -9,70 Kcal.mol<sup>-1</sup> e -112,024 Kcal.mol<sup>-1</sup>, respectivamente. Esses valores foram menores que os obtidos com o IGP, que foi de -9,37 Kcal.mol<sup>-1</sup> no AutoDock e -103,742 Kcal.mol<sup>-1</sup> no Molegro.

Outra biblioteca utilizada para a *virtual screening* foi a da Sigma-Aldrich® do banco de dados Zinc 15, a qual continha 218.000 moléculas com disponibilidade para compra. As moléculas foram subdivididas em 109 pastas com 2.000 moléculas cada, mais a estrutura do IGP (exógeno). O protocolo final do AutoDock validado no *redocking* foi aplicado na *virtual screening* das pastas criadas. Na primeira triagem foram selecionadas 175 ligantes que ficaram melhores ranqueados que o IGP. Destes, os ligantes Zinc64872 (Figura 3A), Zinc43761147 (Figura 3B), Zinc820898 (Figura 3C), Zinc1610272 (Figura 3D), Zinc33305667 (Figura 3E), Zinc265440 (Figura 3F), Zinc34416016 (Figura 3G), Zinc163292 (Figura 3H), Zinc355069 (Figura 3I), Zinc2573116 (Figura 3J), Zinc4795100 (Figura 3K), Zinc4831614 (Figura 3L) foram melhores ranqueados apresentando reprodutibilidade em quatro novas triagens no AutoDock e quatro triagens no Molegro (Tabela 1).

## 4 DISCUSSÃO

Em nosso estudo, a estrutura da TS de milho modelada permitiu selecionar treze ligantes potencialmente inibidores da subunidade  $\alpha$  da enzima. O ligante Zinc312775470, análogo estrutural de inibidores conhecidos, possui peso molecular de 276,248 g/mol e logP 0,36, foi ranqueado com *score* menor do que o do IGP, tanto no programa AutoDock quanto no programa Molegro. Por isso, ele demonstrou melhor interação que o substrato *in silico*, e pode ser um bom inibidor *in vitro*, podendo ser usado em estudos de inibição da enzima alvo. No entanto, por apresentar uma ligação peptídica em sua estrutura, provavelmente nos testes *in vivo* seria clivado por peptidases formando glicerol e triptofano que são facilmente metabolizados pelas células.

A *virtual screening* da biblioteca da Sigma selecionou doze ligantes: Zinc64872, Zinc43761147, Zinc820898, Zinc1610272, Zinc33305667, Zinc265440, Zinc3441016, Zinc163292, Zinc355069, Zinc2573116, Zinc4795100, Zinc4831614. Eles possuem pesos moleculares de 347,399 g/mol, 347,164 g/mol, 366,16 g/mol, 306,211 g/mol, 313,317 g/mol, 307,227 g/mol, 379,507 g/mol, 307,227 g/mol, 442,493 g/mol, 333,344 g/mol, 334,332 g/mol, 316,364 g/mol e logP de 4,8; 3,75; 3,56; -0,36; 1,96; 3,96; 2,09; 3,96; 2,43; 2,02; 2,99; 0,003; respectivamente. Todos se apresentaram bons inibidores *in silico* uma vez que tanto o programa AutoDock quanto o Molegro os ranquearam com *score* menor do que o do IGP. Essas características fazem destes ligantes candidatos em potencial para a inibição da subunidade  $\alpha$  da TS, *in vitro* e *in vivo*. Apesar de estruturalmente diferente dos inibidores já selecionados e testados (Finn et al., 1999; Shuto et al., 1989; Widholm, 1981) para a enzima e da baixa solubilidade em água, o ligante Zinc64872 selecionado em nosso trabalho apresentou o melhor ranqueamento comparado com os demais ligantes em relação ao substrato. Por isso, ele seria o melhor candidato para realização de estudos posteriores.

## 5 CONCLUSÃO

Em nosso trabalho selecionamos 13 ligantes como bons inibidores da enzima triptofano sintase *in silico*. São eles: Zinc312775470, Zinc64872, Zinc43761147, Zinc820898, Zinc1610272, Zinc33305667, Zinc265440, Zinc3441016, Zinc163292, Zinc355069, Zinc2573116, Zinc4795100, Zinc4831614. Todos estes ligantes ficaram

melhores ranqueados e posicionados que o substrato da subunidade  $\alpha$ , IGP. Contudo, são necessários estudos posteriores como ensaios *in vitro* e *in vivo* para confirmar o potencial herbicida desses ligantes.

## AGRADECIMENTOS

Oswaldo Ferrarese-Filho, Wanderley Dantas dos Santos e Flávio Augusto Vicente Seixas são pesquisadores do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Danielly Caroline Inacio Martarello foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## DECLARAÇÃO DE DIVULGAÇÃO

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## REFERÊNCIAS

- Ahuja, I., Kissen, R., & Bones, A., M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science*, 17(2), 73–90. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.11.002>.
- Barends, T. R. M. & Dunn, M. F., & Schlichting, I. (2008). Tryptophan synthase , an allosteric molecular factory. *Current Opinion in Chemical Biology*, 12, 593–600. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.07.011>.
- Berman, H. M., Battistuz, T., Bhat, T. N., Bluhm, W., F., Bourne, P., E., ...& Zardecki, C. (2002). The protein data bank. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 58 (1).
- Dallakyan, S., Olson, A. (2015). Small-molecule library screening by dockin with PyRx. *Methods in Molecular Biology*. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2269-7\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2269-7_19).
- Dunn, M. F. (2012). Allosteric regulation of substrate channeling and catalysis in the tryptophan synthase bienzyme complex. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 519(2), 154–166. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.01.016>.

- Emsley, P. & Cowtan, K. (2004). *Coot*: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 60, 2126–2132. <https://doi.org/10.1107/S0907444904019158>.
- Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M.A., Madhusudhan, M. S., Eramian, D., ... Sali, Andrej. (2006). Comparative protein structure modeling using modeller. *Current Protocols in Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0506s15>.
- Finn, J., Langevine, C., Birk, I., Birk, J., Nickerson, K., & Rodaway, S. (1999). Rational herbicide design by inhibition of tryptophan biosynthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 9, 2297–2302.
- Hyde, C. C., Ahmed, S. A., Padlan, E. A., Miles, E. W., & Davies, D. R. (1988). Three-dimensional Structure of the Tryptophan Synthase  $\alpha_2\beta_2$  Multienzyme Complex from *Salmonella typhimurium*. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(33). [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)77913-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)77913-7).
- Homem, D., P., Flores, R., Tosqui, P., Rozada, T., de C., Basso, E., A., ... & Seixas, F., A., V. (2013). Homology modeling of dihydrofolate reductase from *T. gondii* bonded to antagonists: Molecular docking and molecular dynamics simulations. *Molecular. Biosystems*, 9, 1308–1315. <https://doi.org/10.1039/c3mb25530a> 761
- Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*. 14(1), 33–38 (1996). [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- Irwin, J. J., Sterling, T., Mysinger, M. M., Bolstad, E. S., & Coleman, R. G. (2012). ZINC: A free tool to discover chemistry for biology. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52(7), 1757–1768. <https://doi.org/10.1021/ci3001277>.
- Ishida, M., Hara, M., Fukino, N., Kakizaki, T., & Morimitsu, Y. (2014). Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. *Breeding Science*, 64, 48–59. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.64.48>.
- Laskowski, R., A., Rullmann, J., A., Macarthur, M., W., Kaptein, R., Thornton J., M. (1996). AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *Journal Biomolecular NMR*, 8(4). <https://doi.org/10.1007/BF00228148>.
- Last, R. L., Bissinger, P. H., Mahoney, D. J., Radwanski, E. R., & Fink, G. R. (1991). Tryptophan Mutants in *Arabidopsis* : The Consequences of Duplicated Tryptophan Synthase , 8 Genes. *The Plant Cell*, 3, 345–358.

- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *46*, 3–26.
- Loutchko, D., Eisbach, M., & Mikhailov, A. S. (2017). Stochastic thermodynamics of a chemical nanomachine: The channeling enzyme tryptophan synthase stochastic thermodynamics of a chemical nanomachine: The channeling enzyme tryptophan synthase. *The Journal of Chemical Physics*, *146*. <https://doi.org/10.1063/1.4973544>.
- Lynch, J. H., & Dudareva, N. (2020). Aromatic Amino Acids: A Complex Network Ripe for Future Exploration. *Trends in Plant Science*, *25*(7), 670–681. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.02.005>.
- Maeda, H., & Dudareva, N. (2012). The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, *63*, 73–105. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105439>.
- Magrane, M., Consortium, U. (2011). Knowledgebase: a hub of integrated protein data. *Database*. <https://doi.org/10.1093/database/bar009>.
- Miles, E. W. (2013). The Tryptophan Synthase  $\alpha_2\beta_2$  Complex: A model for substrate channeling, allosteric communication, and pyridoxal phosphate catalysis. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(14), 10084–10091. <https://doi.org/10.1074/jbc.X113.463331>.
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, *30*(16). <https://doi.org/10.1002/jcc>.
- Mount, D. W. (2007). Using the basic local alignment search tool (BLAST). *CSH Protocols*, *(7)*. <https://doi.org/10.1101/pdb.top17>.
- Ngo, H., Kimmich, N., Harris, R., Niks, D., Blumenstein, L., Kulik, V., ... & Dunn, M. F. (2007). Allosteric Regulation of Substrate Channeling in Tryptophan Synthase: Modulation of the L-Serine Reaction in Stage I of the  $\beta$ -Reaction by  $\alpha$ -Site Ligands. *Biochemistry*, *46*, 7740–7753. <https://doi.org/10.1021/bi7003872>.
- Phillips, J., C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., ... & Schulten, K. (2005). Scalable molecular dynamics with NAMD. *Journal of Computational Chemistry*, *26*(16), 1781–1802. <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>.

- Raboni, S., Bettati, S., & Mozzarelli, A. (2009). Tryptophan synthase: a mine for enzymologists. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 2391–2403. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0028-0>.
- Radwanski, E. R., Barczak, A. J., & Last, R. L. (1996). Characterization of tryptophan synthase alpha subunit mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics*, 253, 353–361.
- Rodaway, S., Ott, K.-H., Langevine, C. M., Kakefuda, G., & Finn, J. (2005). *Tryptophan synthase as a site of herbicide action*.
- Schomburg, I., Chang, A., Placzek, S., Söhngen, C., Rother, M., Lang, M., ... & Schomburg, D. (2013). BRENDA in 2013: Integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: New options and contents in BRENDA. *Nucleic Acids Research*, 41, 764–772. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1049>.
- Schupfner, M., Busch, F., Wysocki, V. H., & Sterner, R. (2019). Generation of a Stand-Alone Tryptophan Synthase  $\alpha$ -Subunit by Mimicking an Evolutionary Blueprint. *Chembiochem Communications*, 20, 2747–2751. <https://doi.org/10.1002/cbic.201900323>.
- Shuto, A., Ohgai, M., & Eto, M. (1989). Screening of Tryptophan Synthase Inhibitors as Leads of Herbicide Candidates. *Journal Pesticide Science*, 74, 69–74.
- Sterling, T., & Irwin, J. J. (2015). ZINC 15 - Ligand discovery for everyone. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 55(11), 2324–2337. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00559>.
- Thomsen, R., & Christensen, M. H. (2006). MolDock: A new technique for high-accuracy molecular docking. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49(11), 3315–3321. <https://doi.org/10.1021/jm051197e>.
- Widholm, J. M. (1981). Utilization of Indole Analogs by Carrot and Tobacco Cell Tryptophan Synthase *in vivo* and *in vitro*. *Plant Physiology*, 67(6), 1101–1104.
- Zhao, Y. (2012). Auxin Biosynthesis: A Simple Two-Step Pathway Converts Tryptophan to Indole-3-Acetic Acid in Plants. *Molecular Plant*, 5(2), 334–338. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr104>.

## **Lista de tabela**

**Tabela 1.** Compostos melhores ranqueados da biblioteca da Sigma Aldrich com seus respectivos números Zinc e *score* médio no programa Autodock e Molegro.

**Tabela 1**

<b>Zinc</b>	<b>AutoDock (Kcal.mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>Molegro (Kcal.mol<sup>-1</sup>)</b>
64872	-10,72	-110,70
43761147	-10,65	-107,655
820898	-10,60	-106,855
1610272	-10,23	-118,64
33305667	-10,06	-105,882
265440	-9,9	-120,365
3441016	-9,91	-107,677
163292	-9,91	-105,479
355069	-9,87	-106,190
2573116	-9,82	-116,304
4795100	-9,65	-105,813
4831614	-9,44	-106,677
IGP	-9,24	-103,432

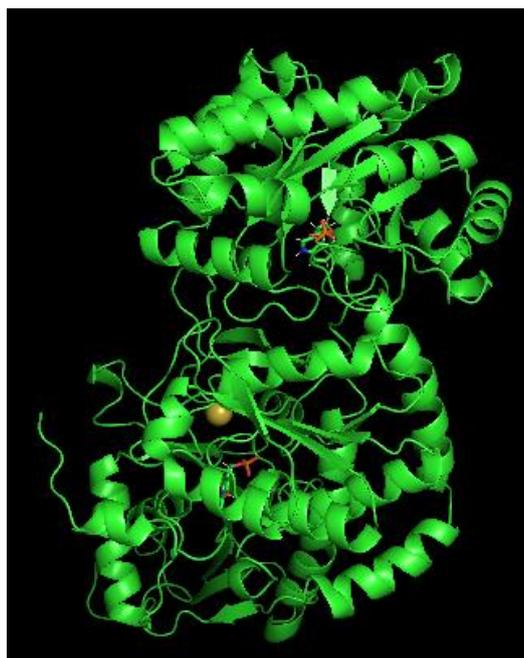
## Lista de figuras

**Figura 1.** Representação em fita da estrutura da TS ligada ao cofator piridoxal 5'-fosfato (amarelo) e ao IGP e triptofano.

**Figura 2.** (A) Estrutura do indol 3- glicerol fosfato (IGP), substrato da subunidade  $\alpha$  da triptofano sintase e (B) estrutura do composto selecionado pela *drug repositioning* Zinc312775470.

**Figura 3.** Compostos selecionados por *virtual screening*. (A) Zinc64872. (B) Zinc43761147. (C) Zinc820898. (D) Zinc1610272. (E) Zinc33305667. (F) Zinc265440. (G) Zinc3441016. (H) Zinc163292. (I) Zinc355069. (J) Zinc2573116. (K) Zinc4795100. (L) Zinc4831614.

**Figura 1**



**Figura 2**

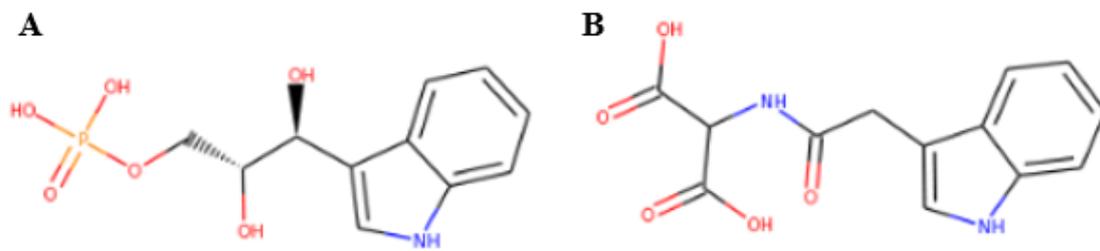
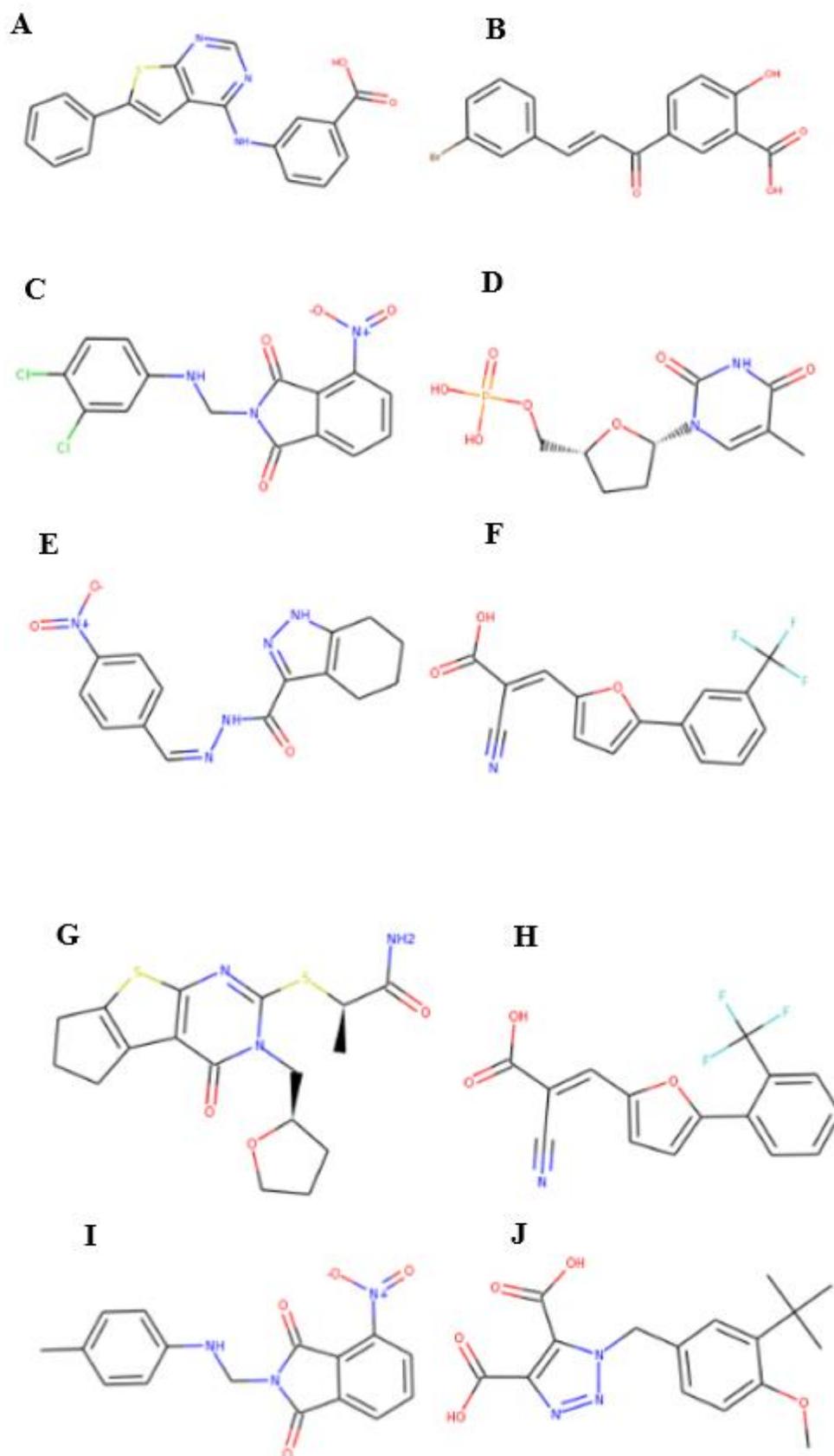
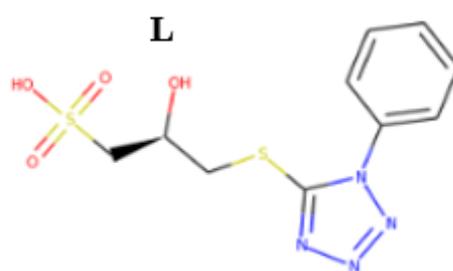
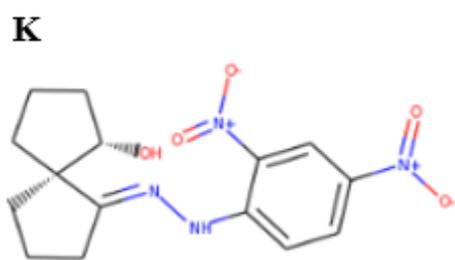


Figura 2





## Capítulo II

ARTIGO:

**S-BENZIL-L-CISTEÍNA, INIBIDOR DA *o*-ACETILSERINA(TIOL) LIASE, INDUZ DANO OXIDATIVO E REDUZ O CRESCIMENTO E FOTOSSÍNTESE EM *Ipomoea grandifolia***

Esse artigo será submetido ao Periódico *Weed Science* (JCR 2021 = 2,580).

**S-Benzil-L-cisteína, inibidor da O-Acetilserina(tiol) liase, induz dano oxidativo e reduz o crescimento e a fotossíntese em *Ipomoea grandifolia***

Danielly Caroline Inacio Martarello<sup>1</sup>, Luiz Henryque Escher Grizza<sup>2</sup>, Wanderley Dantas dos Santos<sup>3</sup>, Osvaldo Ferrarese-Filho<sup>4</sup>.

**RESUMO**

Cisteína é o primeiro composto orgânico contendo enxofre sendo, portanto, precursor de vários outros compostos importantes para as plantas como metionina, glutatona, S-adenosilmetionina e glicosinolatos, além de ser constituinte das proteínas. A sua síntese ocorre nos plastídeos, mitocôndrias e citoplasma por ação do complexo cisteína sintase formado pela O-acetilserina(tiol) liase (OAS-TL) e serina acetiltransferase (SAT). S-Benzil-L-cisteína (SBC), selecionado *in silico* como inibidor da OAS-TL, mostrou ação herbicida promissora em estudos com milho e plântulas de *Ipomoea grandifolia*. Com base nisso, nós avaliamos os efeitos de SBC sobre o crescimento, estresse oxidativo e fotossíntese de plantas de *I. grandifolia* após 14 dias de exposição. As plantas tratadas com 1 mM, 2,5 mM e 5 mM de SBC apresentaram alterações significativas no crescimento e desenvolvimento. A 1 mM, as plantas mostraram aumentos de até 50% no conteúdo de espécies reativas de oxigênio (EROs), 30% no conteúdo de malondialdeído (MDA) e de até 77% no conteúdo de dienos conjugados, além de comprometimento do sistema antioxidante. Nós observamos também reduções de 24% na taxa de assimilação fotossintética líquida ( $P_N$ ), 34% na condutância estomática ( $g_s$ ), 19% no rendimento quântico do PSII ( $\Phi_{PSII}$ ), 19% na taxa de transporte de elétrons (ETR), e 12% no coeficiente de extinção fotoquímico (qP). Com relação aos parâmetros derivados das curvas A/C<sub>i</sub>, a velocidade máxima de carboxilação da Rubisco ( $V_{cmáx}$ ) foi reduzida em 23%, a taxa de transporte de elétrons ( $J$ ) em 19% e do uso de triose fosfato (TPU) em 20%. No conjunto, os nossos dados sugerem que o estresse oxidativo e a redução na taxa fotossintética líquida é causada, principalmente, pela redução no transporte de elétrons, em decorrência do comprometimento dos complexos contendo enxofre, ferredoxina e citocromo b<sub>6</sub>f.

**Palavras-chave:** Cisteína, via de assimilação do enxofre, herbicidas.

---

<sup>1,2</sup>Doutorandos em Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - PBC, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR-Brasil. <sup>3</sup>Professor Associado da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR-Brasil. <sup>4</sup>Professor Titular da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR-Brasil.

E-mail do autor para correspondência: osferrarese@gmail.com.

## INTRODUÇÃO

O enxofre é considerado o quarto elemento nutriente mais importante para as plantas e seu conteúdo varia de 0,1% a 6% do peso seco entre as espécies (0,03 a 2 mmol g<sup>-1</sup>) (Schnug e De kok 2005). Ele tem importante função na fotossíntese, respiração e membranas celulares, uma vez que é constituinte de aminoácidos (cisteína e metionina), vitaminas, grupos prostéticos e cloroplastos (Li et al. 2020). Além disso, desempenha papel importante na resistência das plantas ao estresse e desintoxicação de metais pesados por meio da glutathione e fitoquelatinas, e está relacionado aos rendimentos e à qualidade da colheita (Huang et al. 2019, Jez et al. 2016, Li et al. 2020).

Apesar das folhas conseguirem absorver SO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>S gasoso, a principal fonte de enxofre para as plantas é o sulfato inorgânico presente no solo (Li et al. 2020). Após ser absorvido, o sulfato precisa ser ativado em adenosina 5'-fosfosulfato (APS) a partir da reação com ATP pela ação da ATP sulfurilase (ATPS) e, seguindo a via metabólica secundária do enxofre, pode ser fosforilado pela APS quinase (APK) e formar 3-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS), o qual é utilizado na síntese de metabólitos sulfatados (Jez et al. 2016, Koprivova e Kopriva 2016).

A via principal do metabolismo do enxofre em plantas reduz o sulfato para a síntese de cisteína e compostos derivados. A redução do sulfato ocorre exclusivamente nos plastídeos e depende de duas etapas: APS é reduzido a sulfeto e AMP pela adenosina 5-fosfosulfato redutase (APR) e, depois, a sulfeto pela ação de sulfeto redutase (SIR) (Li et al. 2020). Diferentemente da redução do sulfato, a síntese de cisteína pode ocorrer nos plastídeos, mitocôndrias e citoplasma. O primeiro composto orgânico contendo enxofre é então sintetizado a partir do sulfeto e *o*-acetilserina (OAS) pela ação da *o*-acetilserina(tiol) liase (EC 2.5.1.47; OAS-TL) (Jez 2019).

A OAS-TL, também conhecida como *o*-acetilserina sulfidrilase (OASS), possui a estrutura tridimensional funcional, contendo duas subunidades idênticas, formando um homodímero com um cofator piridoxal 5'-fosfato (PLP) em cada monômero. Para a síntese de cisteína ocorre a β-substituição do grupo acetoxi da *o*-acetilserina por sulfeto (Jez 2019). Para a reação, é necessário, o sulfeto livre, fornecido pela via de redução do sulfato, e *o*-acetilserina (OAS), formada pela serina acetiltransferase (SAT), que transfere o grupo acetato da acetil-coenzima A para a serina (Jez e Dey 2013).

A modelagem por homologia da OAS-TL de milho, seguida da triagem virtual, selecionou *S*-benzil-L-cisteína (SBC) como inibidor enzimático. Estudos com milho e plântulas de *Ipomoea grandifolia* mostraram que SBC, nas várias concentrações testadas inibiu significativamente o crescimento das raízes. Além disso, verificou-se que plantas de milho, após 14 dias de exposição a SBC, tiveram o crescimento drasticamente reduzido associado com redução na assimilação fotossintética de CO<sub>2</sub> (Foletto-Felipe 2021).

*Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Donnell, mais conhecida popularmente como corda-de-viola, é uma espécie pertencente à família Convolvulaceae, eudicotiledônea e com metabolismo fotossintético C<sub>3</sub> (Lourenzi e Souza 2001). Esta planta daninha representa um sério problema para a agricultura, uma vez que é tolerante ao glifosato, ou seja, apresenta resistência natural devido, provavelmente, a menor translocação do herbicida na planta (Monquero et al. 2004). Não obstante, o uso acentuado do glifosato tem aumentado os níveis de tolerância, indicando uma evolução da resistência natural dessas plantas ao herbicida (Pazuch et al. 2017).

Diante dos resultados obtidos a partir dos tratamentos com SBC em milho e em ensaios iniciais com *I. grandifolia*, bem como o fato desta planta daninha representar um sério problema para a agricultura, nós avaliamos os efeitos de SBC sobre o crescimento, estresse oxidativo e fotossíntese de plantas de *I. grandifolia* após 14 dias de exposição.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Germinação e cultivo**

Sementes de *I. grandifolia* foram adquiridas de um fornecedor comercial (Cosmos Agrícolas Produção e Serviços Rurais Ltda, São Paulo, Brasil) e escarificadas com ácido sulfúrico concentrado por 45 min a fim de quebrar a dormência. Após lavagem com água destilada, as sementes foram colocadas em vasos plásticos escuros de 415 mL contendo 100 g de substrato vermiculita expandida (Urimamã Mineração Ltda) e Mec Plant (Mec Prec – Indústria e comércio Ltda) (1:1) e em seguida foram adicionados 130 mL de água no controle e 130 mL de SBC dissolvido em água nas concentrações de 1 mM, 2,5 mM e 5 mM, estabelecidas com base no trabalho de

Foletto-Felipe (2021). A cada dois dias foram adicionados 50 mL de água contendo SBC, ou não, e após a emergência das folhas, 50 mL de solução nutritiva de Hoagland (Hoagland e Arnon 1950) ajustada para pH 6,0 contendo SBC ou não. O sistema experimental permaneceu em bancadas de cultivo programada com fotoperíodo de 12h claro/12h escuro, densidade de fluxo de fótons de aproximadamente  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , em temperatura de  $\pm 25^\circ\text{C}$  por 14 dias. SBC foi comprado junto à Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e os demais reagentes utilizados foram adquiridos com o maior grau de pureza disponível.

### **Parâmetros biométricos**

No 14º dia de incubação, as plantas de *I. grandifolia* foram retiradas do sistema experimental para a medição dos parâmetros biométricos. As plantas tratadas com 2,5 e 5 mM foram apenas fotografadas e nas plantas tratadas com 1 mM de SBC foram realizadas as medidas de comprimento da nervura central das primeiras folhas verdadeiras, comprimento de caules e raízes, bem como determinadas as biomassas frescas. O material foi colocado em estufa a  $60^\circ \text{C}$  para secagem, por aproximadamente 72 h, procedendo-se a partir de então, a determinação da biomassa seca.

Os dados de comprimento das folhas, caules e raízes foram expressos em centímetros (cm) e os dados de biomassa fresca e seca foram expressos em gramas (g).

### **Análise dos parâmetros de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e índice SPAD**

Os parâmetros de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e índice SPAD foram obtidos a partir de plantas com 14 dias de cultivo. As análises foram realizadas na primeira folha verdadeira adaptada por cerca de 20 min em ambiente de luz, com câmara foliar de  $2 \text{ cm}^2$ ,  $\text{CO}_2$  fixado em  $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ , fluxo  $700 \mu\text{mol s}^{-1}$ , umidade relativa do ar em 65% e temperatura  $25^\circ\text{C}$ , utilizando o sistema portátil de fotossíntese com fluorômetro acoplado Li-6800-F2 (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, EUA).

As curvas de resposta a luz foram construídas com os seguintes pontos: 2500, 2250, 2000, 1750, 1500, 1400, 1200, 1000, 800, 600, 400, 200, 175, 150, 125, 100, 75, 50, 25,  $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , respeitando o intervalo de 60 a 120 segundos para o alcance do

estado de equilíbrio da planta. O ajuste das curvas para plantas C3 foi realizado com base em Lobo et al. (2013), abordagem de Ye (2007). Foram selecionados os seguintes parâmetros para avaliar a vitalidade das plantas: 1) Taxa fotossintética líquida máxima obtida em  $I=I_{\max}$  ( $P_N(I_{\max})$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), 2) Ponto de saturação da luz ( $I_{\max}$ ,  $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), 3) Ponto de compensação da luz ( $I_{\text{comp.}}$ ,  $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), 4) Respiração na ausência de luz ( $R_d$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), 5) Rendimento quântico em  $I=0$   $\mu\text{mol}$  ( $\Phi_{(I_0)}$  ( $\mu\text{mol de CO}_2 \mu\text{mol}^{-1}$  de fóton).

As curvas de resposta ao  $\text{CO}_2$  foram obtidas utilizando os seguintes pontos de concentração do  $\text{CO}_2$ : 400, 200, 25, 50, 75, 125, 175, 225, 275, 325, 350, 400, 400, 500, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ , sob intensidade luminosa de 800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Em cada ponto, os dados foram registrados quando a concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  se equilibrava entre 60 a 120 s. O ajuste das curvas para plantas C3 foi realizado com base em Sharkey (2016) e determinados os seguintes parâmetros: 1) Velocidade máxima de carboxilação da ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) ( $V_{\text{cmáx}}$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), 2) Taxa de transporte de elétrons fotossintéticos ( $J$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), 3) Respiração diurna ( $R_d$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), 4) Uso de triose fosfato ( $TPU$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e 5) Condutância mesofílica ( $g_m$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

A partir das medidas pontuais foram obtidos os valores referentes a transpiração ( $E$ ,  $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), rendimento quântico do fotossistema II ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ), taxa de transporte de elétrons ( $ETR$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), eficiência fotoquímica máxima efetiva ( $F_v'/F_m'$ ), coeficiente de extinção fotoquímico ( $qP$ ) e coeficiente de extinção não fotoquímico ( $NPQ$ ) sob intensidade luminosa de 800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

Para as análises de fluorescência da clorofila *a* no escuro, as plantas permaneceram 10 h adaptadas à ausência de luz. A fluorescência mínima ( $F_0$ ) foi registrada na ausência de luz e a fluorescência máxima ( $F_m$ ) foi obtida após flash retangular de luz na intensidade de 8000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . O rendimento quântico máximo do PSII ( $F_v/F_m$ ), dado pela equação  $(F_m - F_0)/F_m$  também foi calculado (Marchiosi et al. 2016).

A determinação do teor de clorofila foi realizada utilizando o SPAD-502 (Konica Minolta, Ramsey, NJ, EUA), e obtida através da média da coleta de cinco pontos na primeira folha verdadeira de *I. grandifolia*.

## **Análise de emissão de fluorescência rápida ou polifásica (OJIP)**

As plantas de *I. grandifolia* adaptadas por 10 h no escuro foram submetidas a análise de emissão de fluorescência rápida ou polifásica da clorofila *a*. Uma área de 2 cm<sup>2</sup> da região central da primeira folha verdadeira foi exposta a um pico de luz vermelha de 2500 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> com duração de 1 s (Stirbet et al. 2018). O tempo foi colocado em escala logarítmica para obter a curva OJIP, em que a fluorescência inicial (F<sub>0</sub>), correspondente a intensidade de fluorescência em que os centros de reação estão abertos, ou seja, o *pool* de quinona (Q<sub>A</sub>) está no estado oxidado, foi considerada no tempo de 50 μs e corresponde ao O e a fluorescência máxima (F<sub>m</sub>), corresponde a intensidade de fluorescência em que todas as moléculas de Q<sub>A</sub> estão no estado reduzido, e os centros de reação estão fechados, representada pelo P. Foi também exibida a fluorescência em mais dois passos entre o F<sub>0</sub> e o F<sub>m</sub>: no tempo de 2 ms, representado pelo J e no tempo de 30 ms, representado pelo I.

## **Determinação das atividades enzimáticas**

Para a determinação da atividade da catalase (CAT), peroxidase solúvel (POD) e superóxido dismutase (SOD) foi realizada uma extração genérica. As folhas e raízes frescas (1 g) foram homogeneizadas com nitrogênio líquido e em seguida com 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5, contendo 3 mM de DTT, 1 mM de EDTA e 0,01 g de PVP (Azevedo et al. 1998). O homogenato foi centrifugado a 18.000 g por 30 min a 4° C e o sobrenadante foi utilizado para determinação das atividades enzimáticas.

A atividade da CAT foi determinada pelo consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do meio reacional contendo tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,0, extrato enzimático, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 60 mM, diluído em tampão fosfato de sódio 60 mM, pH 7,4 e molibdato de amônio 34,4 mM para parar a reação. O ensaio foi realizado em banho-maria a 38° C e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 405 nm (Tománková et al. 2006). Os resultados foram expressos como μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> de biomassa fresca.

A atividade da POD foi determinada através da oxidação do guaiacol do meio reacional. Esse meio continha tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 35%, guaiacol e o extrato diluído em tampão fosfato de potássio 67 mM, pH 7,0. As amostras

foram lidas em espectrofotômetro a 470 nm, após 5 min da adição do extrato no meio (Dos Santos et al. 2008). A atividade foi calculada usando o coeficiente de extinção molar do tetraguaiacol,  $25,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Rama Devi e Prasad 1996) e os resultados foram expressos como  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de biomassa fresca.

A atividade da SOD foi mensurada em um meio contendo tampão fosfato de potássio 50 mM com EDTA 1 mM, pH 7,8, extrato enzimático, L-metionina 389 mM, nitroazul tetrazólio (NBT) 75  $\mu\text{M}$  e riboflavina 60,6  $\mu\text{M}$ . A reação iniciou com a exposição a luz (aproximadamente  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e foi mantida por 5 min. Uma unidade de SOD (U) foi definida como a quantidade da enzima necessária para causar a inibição de 50% da redução do NBT a 560 nm. Os resultados foram expressos em U  $\text{mg}^{-1}$  de biomassa fresca (Giannopolitis e Ries 1977).

### **Determinação da peroxidação lipídica e conteúdo de espécies reativas de oxigênio (EROs)**

O conteúdo de malondialdeído (MDA) foi determinado macerando 0,6 g de folhas e raízes com 4 mL de etanol 96% a 4° C. Uma alíquota de 3 mL desse material foi transferida para um tubo Falcon e em seguida adicionado 3 mL de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,5% dissolvido em 10% de ácido tricloroacético (TCA). Os tubos foram incubados a 95° C por 30 min. A reação foi paralisada em banho de gelo e as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 min. O sobrenadante foi utilizado para medir a absorbância do MDA a 532 nm e absorbância inespecífica a 600 nm. A diferença entre os dois comprimentos de onda foi utilizada para o cálculo do conteúdo de MDA. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de biomassa fresca (Heath e Packer 1968).

Para a determinação do conteúdo de dienos conjugados, uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  do homogenato inicial foi misturada com 1 mL de etanol 96 % em tubo eppendorf e centrifugado a 20.000 g por 20 min (Buege e Aust 1978). A absorbância do sobrenadante foi registrada em espectrofotômetro 234 nm e a 500 nm para absorbância inespecífica. A diferença entre esses comprimentos de onda foi usada para calcular a concentração de dienos conjugados. Os resultados foram expressos como  $\text{nmol g}^{-1}$  de biomassa fresca.

Para a determinação do conteúdo de espécies reativas de oxigênio (EROs), 0,15 g de raízes e folhas foram maceradas com 1 mL de tampão Tris-HCL, 10 mM, pH 7,2 e em seguida centrifugadas a 12.000 g por 20 min a 4° C. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos de vidro e diluídos com o mesmo tampão. Para iniciar a reação de fluorescência com EROs foram adicionados 10 µL de 2',7',-diclorofluorescina diacetato (DCFDA) (1 mM, preparado em dimetil sulfóxido – DMSO) em cada tubo, rapidamente homogeneizado e deixado no escuro por aproximadamente 10 min. As amostras foram lidas no fluorômetro, a 504 nm para excitação e 526 nm para emissão (Jambunathan 2010). O conteúdo de EROs foi expresso em unidade de fluorescência por micrograma de biomassa fresca.

### **Análise estatística**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em que cada parcela foi correspondente por um vaso contendo uma planta. Os resultados foram expressos como a média de 5 a 10 amostras, dependendo da análise realizada  $\pm$  o erro padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas usando o pacote *GraphPad Prism*<sup>®</sup> (Versão 7.0, GraphPad Software Inc., USA) e as diferenças entre os parâmetros foram avaliadas pelo teste *t*-Student, com  $p \leq 0,05$  considerado estatisticamente significativo.

## **RESULTADOS**

### **Efeitos de SBC sobre o crescimento de plantas de *I. grandifolia***

O tratamento com SBC, nas três concentrações avaliadas, reduziu o crescimento de plantas de *I. grandifolia*, sendo os efeitos observados nas plantas tratadas com as concentrações de 2,5 mM e 5 mM muito maiores em relação àquelas tratadas com 1 mM; por esse motivo essas plantas foram apenas fotografadas (Figura 1A). As plantas tratadas com 1 mM apresentaram clorose internerval nas primeiras folhas verdadeiras (Figura 1B). Além disso, o comprimento das folhas reduziu em 27% (Figura 2A), dos caules em 41% (Figura 2B) e das raízes em 28% (Figura 2C). As biomassas frescas e secas também reduziram nas folhas (55% e 49%) (Figura 2D, G), caules (60% e 57%) (Figura 2E, H) e raízes (55% e 55%) (Figura 2F, I), respectivamente.

## **Análise dos parâmetros de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e índice SPAD**

A 1 mM, SBC reduziu parâmetros de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e índice SPAD. A  $P_N(I_{max})$  (Figura 3A) reduziu em 24% e  $I_{max}$  (Figura 3B) em 22%. Por outro lado, o composto não alterou significativamente o  $I_{comp}$ . (Figura 3C), a  $R_d$  (Figura 3D) e o  $\phi_{(10)}$  (Figura 3E). A partir da curva de resposta à luz o  $I_{max}$  obtido foi  $800 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , ponto de irradiância estabelecida para as demais análises realizadas como as medidas pontuais, fluorescência modulada da clorofila *a* e curva de resposta ao  $\text{CO}_2$ .

O tratamento com 1 mM de SBC resultou em alterações significativas nas medidas pontuais. Com relação as trocas gasosas, o parâmetro  $g_s$  (Figura 4C) foi reduzido em 34%, enquanto  $E$  (Figura 4A) e  $C_i$  (Figura 4B) não apresentaram alterações significativas. Com relação a fluorescência modulada da clorofila, o  $\phi_{PSII}$  (Figura 5A), a ETR (Figura 5B) e o  $qP$  (Figura 5C) foram reduzidos em 19%, 19% e 12%, respectivamente. Por outro lado, o NQP (Figura 5D) e a  $F_v'/F_m'$  (Figura 5E) não apresentaram alterações significativas. Nas análises de fluorescência realizadas no escuro ocorreu uma redução de 14% na  $F_m$  (Figura 6B) e de 15% na  $F_v$  (Figura 6C), enquanto a  $F_o$  (Figura 6A) e a  $F_v/F_m$  (Figura 8D) não foram alteradas. O teor de clorofila, obtido a partir do índice SPAD, foi reduzido em 15% nas plantas tratadas com SBC (Figura 7).

Os parâmetros derivados da curva de resposta ao  $\text{CO}_2$  também foram reduzidos nas plantas de *I. grandifolia* tratadas com SBC. O parâmetro  $V_{cmáx}$  (Figura 8A) reduziu em 23%,  $J$  (Figura 8B) em 19% e TPU (Figura 8C) em 20% em relação ao controle.  $R_d$  (Figura 8D) e  $g_m$  (Figura 8E) não revelaram alterações significativas.

A análise da curva da emissão de fluorescência rápida ou polifásica (Figura 9) composta pelos pontos O, J, I e P, que representam os níveis de fluorescência  $F_o$ ,  $F_J$ ,  $F_I$  e  $F_P$ , correspondente aos tempos  $50 \mu\text{s}$ , 2 ms, 30 ms e  $t_{Fm}$ , respectivamente, mostrou uma redução da elevação da curva quando comparada ao transiente OJIP do controle em virtude da redução significativa dos valores de  $F_I$  e  $F_P$ .

## **Determinação da peroxidação lipídica e conteúdo de espécies reativas de oxigênio (EROs)**

O tratamento com 1 mM de SBC aumentou significativamente EROs e a peroxidação lipídica. O conteúdo de EROs aumentou em 38% nas raízes (Figura 10F) e 50% nas folhas (Figura 10E). Da mesma forma, os marcadores de peroxidação lipídica, como dienos conjugados, aumentaram em 77% nas folhas (Figura 10A) e 61% nas raízes (Figura 10B) e o malondialdeído aumentou em 30% nas raízes (Figura 10D), sem alteração significativa nas folhas (Figura 10C).

## **Determinação das atividades enzimáticas**

As atividades das enzimas do sistema antioxidante (CAT, POD e SOD) (Figura 11) avaliadas em folhas e raízes não foram alteradas após os tratamentos com 1 mM de SBC. A exceção foi a atividade da POD nas raízes (Figura 11D) que aumentou 26%, em comparação com o controle.

## **DISCUSSÃO**

O tratamento com SBC reduziu significativamente o crescimento de *I. grandifolia* em todas as concentrações avaliadas. Na concentração de 1 mM, nós observamos redução nos parâmetros fotossintéticos:  $P_N$ ,  $g_s$ ,  $\phi_{PSII}$ , ETR, qP,  $V_{cm\acute{a}x}$ ,  $J$  e TPU e aumento das EROs e marcadores de estresse oxidativo em folhas e raízes. Como já verificado em trabalho anterior, SBC inibe a enzima OAS-TL, afetando a síntese de L-cisteína e conseqüentemente dos compostos derivados e constituídos por esse aminoácido (Foletto-Felipe, 2021). Ao prejudicar a síntese de L-cisteína, fica comprometida a assimilação do enxofre, macronutriente que é essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas, juntamente com o nitrogênio, fósforo e potássio. A falta de enxofre na planta, seja por deficiência exógena ou não assimilação causa sérios prejuízos como redução da altura e clorose nas folhas, principalmente, as mais novas (Li et al. 2020), tal como vimos em arroz (Lunde et al. 2008), no milho (Foletto-Felipe, 2021) e agora em *I. grandifolia*. De fato, o comprimento das folhas, caules e raízes, bem como a biomassa fresca e biomassa seca das plantas tratadas com 1

mM reduziram em relação ao controle, e nas maiores concentrações avaliadas, 2,5 mM e 5 mM as plantas não se desenvolveram. Além disso, as primeiras folhas verdadeiras apresentaram clorose internerval.

A falta de enxofre também interfere na síntese de enzimas-chaves responsáveis pelo metabolismo do carbono, diminui a taxa de fotossíntese e leva ao acúmulo de EROS (Li et al. 2020). Ao avaliarmos a fotossíntese, verificamos que nas plantas de *I. grandifolia* ocorreu redução na  $P_N(I_{max})$  e em concordância, no  $I_{max}$ . A  $P_N$  depende de processos biofísicos que correspondem ao transporte de  $CO_2$  através das folhas e estômatos e processos bioquímicos que se localizam nas membranas dos tilacoides, estroma, mitocôndrias e citoplasma da célula (Sharkey et al. 2007). Portanto, reduções na  $P_N$  podem ser decorrentes de redução da  $g_s$  e/ou interferência nas reações de assimilação de  $CO_2$ .

A análise das medidas pontuais de trocas gasosas nas plantas de *I. grandifolia* não alterou significativamente  $E$  e  $C_i$ , mas reduziu  $g_s$ . Em consonância com estes dados, plantas de soja quando tratadas com benzoxazolinona (Parizotto et al. 2017) e com o aleloquímico L-DOPA ou extrato aquoso de *Mucuna pruriens* (Marchiosi et al. 2016) apresentaram redução da  $P_N$  associada a redução da  $g_s$ . Contudo, diferentemente, no tratamento com L-DOPA foi observada redução significativa da  $E$  e aumento da  $C_i$ . Sabe-se que em situações de limitação estomática da fotossíntese há redução da  $g_s$  e  $C_i$  (Zhou e Yu 2006, Bortolo et al. 2018); este último parâmetro não observado em nossos dados. A inalteração de  $C_i$ , apesar da redução de  $g_s$ , pode ser devido à redução de  $V_{cmáx}$ , dado que veremos mais a frente e que implica em aumento no conteúdo de  $C_i$ .

Além da limitação estomática, a fotossíntese pode ser reduzida também por limitações não estomáticas como depressão na atividade do PSII ou inibição do transporte de elétrons (Everard et al. 1994). Nesta linha de raciocínio, a fluorescência da clorofila pode ser utilizada para obter informações sobre a estrutura e funções do aparelho fotossintético, sendo uma medida não invasiva da atividade do PSII (Murchie e Lawson 2013, Stirbet et al. 2018). Como resultado da análise da fluorescência modulada da clorofila, nossos dados mostraram redução significativa do  $\phi_{PSII}$ , parâmetro usado para mensurar a proporção de luz absorvida pela clorofila associada ao PSII e que é usada nas reações fotoquímicas (Maxwell e Johnson 2000). De modo similar aos nossos dados, Lunde et al. (2008) também verificaram redução em plantas de arroz privadas de enxofre e Marchiosi et al. (2016), Parizotto et al. (2017) e Bortolo et al. (2018) em

plantas de soja submetidas ao L-DOPA, benzoxazolinona e ácido *trans*-aconítico, respectivamente.

Uma redução no rendimento quântico representa uma baixa eficiência do centro de reação do PSII e conseqüentemente, mudanças na taxa de transporte de elétrons, conforme verificado em nossos dados. Desse modo, por ser usado para estimar a taxa de transporte de elétrons, o rendimento quântico do PSII pode funcionar como uma indicação geral da fotossíntese, visto que há uma forte relação entre este parâmetro e a eficiência da fixação do carbono (Maxwell e Johnson 2000). Além disso, o rendimento quântico do PSII pode ser dividido em dois produtos: o  $qP$  e a  $Fv'/Fm'$  (Murchie e Lawson 2013). O  $qP$  confere uma ideia da proporção dos centros de reação do PSII que estão abertos e foi reduzido em 12% nas plantas tratadas com SBC. Uma redução no  $qP$  indica que maior proporção dos centros de reação está fechada, ou seja, há um aumento da fração de  $Q_A$  reduzida ( $Q_A^-$ ), e uma diminuição da energia de excitação usada para a fotoquímica, aumentando a suscetibilidade à fotoinibição (Hussain e Reigosa 2011). Já a  $Fv'/Fm'$  que descreve a eficiência operacional máxima do PSII na luz, não foi alterada (Murchie e Lawson 2013). Da mesma forma, o parâmetro de extinção não fotoquímica, NPQ, que compete com a fluorescência e a extinção fotoquímica, também não foi alterado. Apesar das reduções observadas no rendimento quântico do PSII e a taxa de transporte de elétrons, a  $Fv/Fm$ , uma medida da integridade estrutural do PSII não foi alterada. Todavia, as plantas de *I. grandifolia* apresentaram redução em seu conteúdo de clorofila aferido pelo índice SPAD, da mesma forma que as plantas de arroz privadas de enxofre (Lunde et al. 2008).

Ainda com relação a clorofila, a curva OJIP possibilita a análise da mudança na cinética da fluorescência da clorofila *a*, a qual permite descrever os processos de oxidação-redução e reações subjacentes ao transporte de elétrons desde a excitação da clorofila até a redução dos aceptores finais (Lazár 2006, Bussotti et al. 2012). A curva OJIP, portanto, pode ser utilizada para caracterizar o rendimento quântico fotoquímico do PSII e o transporte de elétrons (Stirbet e Govindjee 2012). A primeira fase da curva (O-J) expressa os eventos fotoquímicos e está relacionada a redução de  $Q_A$ , o acceptor primário de elétrons do PSII. Nessa fase, o aumento da fluorescência depende fortemente do número de fótons absorvidos (Stirbet e Govindjee 2012). A segunda (J-I) representa a redução do *pool* de plastoquinona, indicando a redução completa de  $Q_B$ , seguida da reoxidação de  $PQ_BH_2$  pelo citocromo  $b_6/f$  (Bussotti et al. 2012). Finalmente a

última fase (I-P) representa a redução dos aceptores finais de elétrons do lado acceptor do PSI, NADP<sup>+</sup> e ferredoxina. A análise do transiente de fluorescência OJIP mostrou que as plantas de *I. grandifolia* expostas a SBC reduziram as fases J-I e I-P, acusando uma diminuição da reoxidação de PQ<sub>B</sub>H<sub>2</sub> e da redução dos aceptores finais, etapas que são realizadas pelo citocromo b<sub>6</sub>f, PSI e ferredoxina. A alteração nessas etapas é um efeito secundário esperado nas plantas tratadas com SBC, uma vez que, a inibição da OAS-TL prejudica a síntese de cisteína, efeito primário, que confere grupamentos enxofre para a formação desses complexos fotossintéticos: citocromo b<sub>6</sub>f possui um centro 2Fe-2S e uma proteína de Rieske, PSI apresenta três centros Fe-S (Fx, Fa, Fb) e a ferredoxina apresenta um centro 4Fe-4S.

Outro método para compreender como a fotossíntese C3 responde às diferentes perturbações, em nosso caso ao tratamento com SBC, é o desenvolvido por Farquhar, Caemmerer and Berry (1980). Esse método descreve a fotossíntese como três estados: Rubisco limitada, RuBP limitada e TPU limitada. No primeiro estado, “Rubisco limitada”, assume-se um suprimento saturante da ribulose 1,5-bifosfato (RuBP), de modo que a limitação da enzima está mais associada a baixa concentração de CO<sub>2</sub> do que a sua V<sub>max</sub>. O segundo estado definido como “RuBP limitada”, a fotossíntese está limitada pela regeneração da RuBP, assim, em condições de concentração de CO<sub>2</sub> mais altas, a taxa na qual a Rubisco usa RuBP excede a capacidade de regeneração que envolve as outras enzimas do ciclo de Calvin. E o terceiro estado, “TPU limitada”, adicionado por Sharkey (1985), ocorre quando as reações do cloroplasto geram produtos em ordem superior a capacidade da folha de utilizá-los, principalmente, mas não exclusivamente, triose fosfato. As curvas A/C<sub>i</sub> permitem avaliar esses três mecanismos, os quais podem definir o limite superior da taxa de fotossíntese (Sharkey 2016). A análise das curvas A/C<sub>i</sub> mostrou que a 1 mM, SBC reduziu a V<sub>cmáx</sub>, a J e a TPU e, portanto, os três parâmetros representativos das principais limitações da fotossíntese na saturação de luz (Long e Bernacchi 2003).

Um declínio observado na fotossíntese pode ser devido à redução na atividade da Rubisco causada, na maioria dos casos, pelo fechamento estomático que resulta em menor concentração de CO<sub>2</sub> intercelular (Ashraf e Harris 2013) ou redução no conteúdo da própria Rubisco, conforme visto em plantas de arroz privadas de enxofre (Lunde et al. 2008), e o que parece ser nosso caso. O segundo parâmetro, a taxa de transporte de elétrons, J, que apoia a redução de NADP<sup>+</sup> usado durante as reações de regeneração da

ribulose 1,5-bifosfato, foi reduzida. Vários herbicidas comerciais matam a planta bloqueando a transferência de elétrons. É o caso dos herbicidas do grupo C, como a atrazine, metribuzin e diuron que se ligam ao sítio da  $Q_B$ , na proteína D1 do PSII, bloqueando o transporte de elétrons de  $Q_A$  para  $Q_B$  afetando a produção de NADPH e ATP usados nas reações do Ciclo de Calvin (Oliveira Jr et al. 2011). O bloqueio no transporte de elétrons prejudica também a ativação indireta pela luz de quatro enzimas desse ciclo (ribulose-5-fosfato-cinase, frutose-1,6-bifosfatase, sedoepulose-1,7-bifosfatase e a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase) através do sistema ferredoxina-tiorredoxina. Em condições normais, na presença de luz, os elétrons do PSI reduzem a ferredoxina, a qual doa elétrons a tiorredoxina que na sua forma reduzida doa elétrons para a redução das ligações dissulfeto das enzimas do Ciclo de Calvin, que se tornam ativas. Assim, a redução do terceiro parâmetro, TPU, vista em nosso estudo, ocorre tanto em decorrência da redução de  $J$ , quanto pelo comprometimento do sistema ferredoxina-tiorredoxina e das enzimas do ciclo que apresentam ligações dissulfeto entre dois resíduos de Cys críticos às atividades catalíticas. De fato e em concordância, Foletto-Felipe (2021), por meio de análise proteômica de folhas, verificou que as plantas de milho tratadas com SBC reduziram a expressão das enzimas do ciclo de Calvin

Em se tratando do transporte de elétrons ainda, é sabido que seu bloqueio pode gerar um estado energético excitado da clorofila, chamado estado triplete o qual é capaz de formar radicais lipídicos nos ácidos graxos insaturados constituintes de membranas ou reagir com o oxigênio, e formar o oxigênio singlet (Fuerst e Norman 1991, Krieger-Liszkay, 2004). O aumento de EROS gera sérios danos celulares, uma vez que degradam biomoléculas como proteínas, lipídeos, carboidratos e o DNA o que, em última instância, causa morte celular (Das e Roychoudhury 2014). De fato, verificamos em nossos dados, aumentos expressivos de EROs, tanto nas raízes como nas folhas, uma vez que o cloroplasto é a maior fonte de EROs (Das and Roychoudhury 2014). Como uma consequência, nós observamos aumentos nos indicadores bioquímicos de peroxidação lipídica como malondialdeído (MDA) em raízes e dienos conjugados em folhas e raízes.

Para evitar os danos oxidativos causados pelas EROs, as plantas possuem um sistema composto por várias enzimas antioxidantes, como SOD, POD, CAT, APX e GR e compostos antioxidantes não-enzimáticos como glutatona, ascorbato,  $\alpha$ -tocoferol,

prolina e flavonoides (Das e Roychoudhury 2014). Nós avaliamos as atividades da SOD, POD e CAT. A SOD atua na primeira linha de defesa contra as EROs efetuando a dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$ , e CAT e POD detoxificando  $H_2O_2$  a  $H_2O$  (Apel e Hirt 2004). Interessantemente as atividades das enzimas SOD, POD e CAT permaneceram inalteradas tanto em folhas como em raízes, o que explica o aumento verificado no conteúdo de EROs e os danos oxidativos. A exceção foi a atividade da POD que aumentou nas raízes. Essa não ativação do sistema antioxidante pode ser devido à redução de L-cisteína e L-metionina, comprometendo a estrutura tridimensional ativa de proteínas, em decorrência do efeito inibitório de SBC sobre OAS-TL.

Apesar de SBC não ser um inibidor direto da fotossíntese apresenta modo de ação semelhante aos herbicidas inibidores do PSII, uma vez que acarreta prejuízos no transporte de elétrons fotossintéticos, aumenta EROs e a peroxidação lipídica (Oliveira Jr et al. 2011). Os herbicidas comerciais do grupo C têm levado a diferentes respostas nas enzimas antioxidantes, especialmente, em virtude da dose aplicada. Em plantas de milho tratadas com diferentes concentrações de atrazina (0–32,5 mg kg<sup>-1</sup>), um herbicida inibidor do PSII, os teores de EROs e malondialdeído aumentaram nas maiores concentrações avaliadas, bem como as atividades da POD e APX, ambas peroxidases, enquanto que as atividades da CAT e da SOD diminuíram (Sher et al. 2021). Em plantas de trigo tratadas com diferentes concentrações de prometryne (0–24 mg kg<sup>-1</sup> de solo), outro herbicida inibidor do PSII, foi verificado aumento no conteúdo de malondialdeído, um indicador de dano oxidativo. Já, as atividades das enzimas antioxidantes (SOD, POD, CAT, APX, GST), em geral, aumentaram em doses baixas do herbicida e diminuíram nas doses altas (Jiang e Yang 2009). Dessa forma, fica evidente que herbicidas inibidores do PSII, e em conformidade com os nossos dados, SBC, ao prejudicarem o transporte de elétrons fotossintéticos, podem comprometer o sistema de defesa antioxidante, especialmente em doses altas, em virtude da alta produção de EROs, que culminam, dentre outras consequências, na degradação de proteínas.

## CONCLUSÃO

O tratamento com SBC resultou em reduções no crescimento e desenvolvimento de plantas de *I. grandifolia* com 14 dias, afetando todos os parâmetros biométricos

avaliados. A análise fotossintética dessas plantas mostrou redução na taxa fotossintética líquida causada pela redução no transporte de elétrons, possivelmente, em decorrência do comprometimento dos complexos contendo enxofre, ferredoxina e citocromo *b<sub>6</sub>f*. Em virtude dos prejuízos no transporte de elétrons fotossintéticos, nós constatamos aumentos nas EROs, na peroxidação lipídica e comprometimento do sistema de defesa antioxidante.

Levando em conta a dificuldade em realizar o controle da *I. grandifolia* no campo, nossos achados mostram uma nova perspectiva na busca por novos herbicidas. Isso porque exploram uma via que ainda não tem sido utilizada como mecanismo de ação de herbicidas comerciais e apresentam um composto que afeta o crescimento, fotossíntese e sistema antioxidante dessa planta daninha.

## **AGRADECIMENTOS**

Oswaldo Ferrarese-Filho e Wanderley Dantas dos Santos são pesquisadores do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Danielly Caroline Inacio Martarello foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## **DECLARAÇÃO DE DIVULGAÇÃO**

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## REFERÊNCIAS

- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373–399
- Ashraf M, Harris PJC (2013) Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynth* 51:163–190
- Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ, Lea PJ (1998) Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiol Plant* 104:280–292
- Bortolo T da SC, Marchiosi R, Viganó J, Siqueira-Soares R de C, Ferro AP, Barreto GE, Bido G de S, Abrahão J, dos Santos WD, Ferrarese-Filho O (2018) Transaconitic acid inhibits the growth and photosynthesis of *Glycine max*. *Plant Physiol Biochem* 132:490–496
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52:302–310
- Bussotti F, Kalaji MH, Desotgiu R, Pollastrini M, Loboda T, Bosa K (2012) Misurare la vitalità delle piante per mezzo della fluorescenza della clorofila. Firenze: Firenze University Press, 2012.
- Das K, Roychoudhury A (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front Environ Sci* 2:1–13
- Everard JD, Gucci R, Kann SC, Flore JA, Loescher WH (1994) Gas exchange and carbon partitioning in the leaves of celery (*Apium graveolens* L.) at various levels of root zone salinity. *Plant Physiol* 106:281–292
- Farquhar GD, Caemmerer S von, Berry JA (1980) A biochemical model of photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation in leaves of C<sub>3</sub> species. *Planta* 149:78-90
- Foletto-Felipe M de P (2021) O-acetilserina(tiol) liase: estudos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Maringá. 98p.
- Fuerst EP, Norman MA (1991) Interactions of herbicides with photosynthetic electron transport. *Weed Sci* 39:458-464
- Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutases. *Plant Physiol* 59:309–314
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Arch Biochem Biophys* 125:189–198
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) Preparing the nutrient solution. *Water-Culture Method Grow Plants without Soil* 347:29–31
- Huang XY, Li M, Luo R, Zhao FJ, Salt DE (2019) Epigenetic regulation of sulfur homeostasis in plants. *J Exp Bot* 70:4171–4182
- Hussain MI, Reigosa MJ (2011) Allelochemical stress inhibits growth, leaf water relations, PSII photochemistry, non-photochemical fluorescence quenching, and heat energy dissipation in three C<sub>3</sub> perennial species. *J Exp Bot* 62:4533–4545

- Jambunathan, N (2010) Determination and detection of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and electrolyte leakage in plants. In R. Sunkar (Ed.), *Plant stress tolerance: Methods in molecular biology*. Pp 291–297
- Jez JM (2019) Structural biology of plant sulfur metabolism: From sulfate to glutathione. *J Exp Bot* 70:4089–4103
- Jez JM, Dey S (2013) The cysteine regulatory complex from plants and microbes: What was old is new again. *Curr Opin Struct Biol* 23:302–310
- Jez JM, Ravilious GE, Herrmann J (2016) Structural biology and regulation of the plant sulfation pathway. *Chem Biol Interact* 259:31–38
- Jiang L, Yang H (2009) Prometryne-induced oxidative stress and impact on antioxidant enzymes in wheat. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:1687–1693
- Koprivova A, Kopriva S (2016) Sulfation pathways in plants. *Chem Biol Interact* 259:23–30
- Krieger-Liszkay A (2004) Singlet oxygen production in photosynthesis. *J Exp Bot* 56:337–346
- Lazár D (2006) The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Funct Plant Biol* 33:9–30
- Li Q, Gao Y, Yang A (2020) Sulfur homeostasis in plants. *Int J Mol Sci* 21:1–16
- Lobo F de A, de Barros MP, Dalmagro HJ, Dalmolin ÂC, Pereira WE, de Souza ÉC, Vourlitis GL, Rodríguez Ortíz CE (2013) Fitting net photosynthetic light-response curves with Microsoft Excel - a critical look at the models. *Photosynth* 51:445–456
- Long SP, Bernacchi CJ (2003) Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error. *J Exp Bot* 54:2393–2401
- Lorenzi H, Souza VC (2001) *Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras*. 3ª edição. Nova Odessa: Plantarum. 448 p.
- Lunde C, Zygadlo A, Simonsen HT, Nielsen PL, Blennow A, Haldrup A (2008) Sulfur starvation in rice: The effect on photosynthesis, carbohydrate metabolism, and oxidative stress protective pathways. *Physiol Plant* 134:508–521
- Marchiosi R, de Souza Bido G, Böhm PAF, Soares AR, da Silva HA, Ferro AP, de Lourdes Lucio Ferrarese M, Ferrarese-Filho O (2016) Photosynthetic response of soybean to L-DOPA and aqueous extracts of velvet bean. *Plant Growth Regul* 80:171–182
- Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J Exp Bot* 51:659–668
- Monquero PA, Christoffoleti PJ, Osuna MD, De Prado RA (2004) Absorção, translocação e metabolismo do glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. *Planta Daninha* 22:445–451
- Murchie EH, Lawson T (2013) Chlorophyll fluorescence analysis: A guide to good practice and understanding some new applications. *J Exp Bot* 64:3983–3998
- Nelson DL, Cox MM (2014) *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed. 1298 p.
- Oliveira JR RS, Constantin J, Inoue HM (2011) *Biologia e manejo de plantas daninhas*.

- Curitiba:Omnipax. 348 p.
- Parizotto A V., Marchiosi R, Bubna GA, Bevilaqua JM, Ferro AP, Ferrarese MLL, Ferrarese-Filho O (2017) Benzoxazolin-2-(3H)-one reduces photosynthetic activity and chlorophyll fluorescence in soybean. *Photosynthetica* 55:386–390
- Pazuch D, Trezzi MM, Guimarães ACD, Barancelli MVJ, Pasini R, Vidal RA (2017) Evolução da tolerância ao glyphosate em populações de corda-de-viola. *Planta Daninha* 35
- Rama Devi S, Prasad MNV (1996) Ferulic acid mediated changes in oxidative enzymes of maize seedlings: Implications in growth. *Biol Plant* 38:387–395
- Resurreccion AP, Makino A, Bennett J, Mae T (2002) Effect of light intensity on the growth and photosynthesis of rice under different sulfur concentrations. *Soil Sci Plant Nutr* 48:71–77
- Dos Santos WD, Ferrarese MLL, Nakamura C V., Mourão KSM, Mangolin CA, Ferrarese-Filho O (2008) Soybean (*Glycine max*) root lignification induced by ferulic acid. The possible mode of action. *J Chem Ecol* 34:1230–1241
- Schnug E, De kok LJ (2005) Proceedings of the 1st Sino-German Workshop on Aspects of Sulfur Nutrition of Plants 23 - 27 May 2004 in Shenyang, China. Page Nutrition
- Sharkey TD (1985) Photosynthesis in intact leaves of C3 plants: Physics, physiology and rate limitations. *Bot Rev* 51:53–105
- Sharkey TD (2016) What gas exchange data can tell us about photosynthesis. *Plant Cell Environ* 39:1161–1163
- Sharkey TD, Bernacchi CJ, Farquhar GD, Singsaas EL (2007) Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. *Plant, Cell Environ* 30:1035–1040
- Sher A, Mudassir Maqbool M, Iqbal J, Nadeem M, Faiz S, Noor H, Hamid Y, Yuan X, pingyi G (2021) The Growth, physiological and biochemical response of foxtail millet to atrazine herbicide. *Saudi J Biol Sci* 28:6471–6479
- Stirbet A, Govindjee (2012) Chlorophyll *a* fluorescence induction: A personal perspective of the thermal phase, the J-I-P rise. *Photosynth Res.* 15–61 p
- Stirbet A, Lazár D, Kromdijk J, Govindjee (2018) Chlorophyll *a* fluorescence induction: Can just a one-second measurement be used to quantify abiotic stress responses? *Photosynth* 56:86–104
- Tománková K, Luhová L, Petřivalský M, Peč P, Lebeda A (2006) Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. *Physiol Mol Plant Pathol* 68:22–32
- Ye ZP (2007) A new model for relationship between irradiance and the rate of photosynthesis in *Oryza sativa*. *Photosynth* 45:637–640
- Zhou YH, Yu JQ (2006) Allelochemicals and photosynthesis. In: Reigosa MJ, Pedrol N, González L. (ed.): *Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications*. Springer, Dordrecht. Pp. 127- 139

## Lista de figuras

**Figura 1.** Efeitos de *s*-benzil-L-cisteína (SBC) (0, 1, 2,5 e 5 mM) sobre o crescimento de plantas de *I. grandifolia* após 14 dias de cultivo.

**Figura 2.** Efeitos de SBC (1 mM) sobre os parâmetros biométricos: comprimento das folhas (**A**), caules (**B**) e raízes (**C**), biomassa fresca das folhas (**D**), caules (**E**) e raízes (**F**) e biomassa seca de folhas (**G**), caules (**H**) e raízes (**I**) de *I. grandifolia* após 14 dias de cultivo. Valores médios  $\pm$  erro padrão da média (n=10), onde (\*) representa valores significativamente diferentes de acordo com o teste *t* ( $p \leq 0,05$ ).

**Figura 3.** Efeitos de SBC (1 mM) na taxa fotossintética líquida máxima ( $P_N(I_{max})$ ,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (**A**), no ponto de saturação da luz ( $I_{max}$ ,  $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (**B**), no ponto de compensação da luz ( $I_{comp.}$ ,  $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (**C**), respiração na ausência de luz ( $R_d$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (**D**) e rendimento quântico ( $\phi_{(10)}$ ,  $\mu\text{mol de CO}_2 \mu\text{mol}^{-1}$  de fótons) (**E**) de plantas de *I. grandifolia* com 14 dias de cultivo. Valores médios  $\pm$  erro padrão da média (n=5), onde (\*) representa valores significativamente diferentes de acordo com o teste *t* ( $p \leq 0,05$ ).

**Figura 4.** Efeitos de SBC (1 mM) nos parâmetros de trocas gasosas: transpiração ( $E$ ,  $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (**A**), concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ) (**B**) e condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (**C**) de *I. grandifolia* após 14 dias de cultivo. Valores médios  $\pm$  erro padrão da média (n=6), onde (\*) representa valores significativamente diferentes de acordo com o teste *t* ( $p \leq 0,05$ ).

**Figura 5.** Efeitos de SBC (1 mM) no rendimento quântico do PSII ( $\phi_{PSII}$ ) (**A**), na taxa de transporte de elétrons (ETR,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) (**B**), no *quenching* fotoquímico (qP) (**C**), no *quenching* não fotoquímico (NQP) (**D**) e eficiência fotoquímica máxima efetiva ( $F_v'/F_m'$ ) (**E**) de *I. grandifolia* após 14 dias de cultivo. Valores médios  $\pm$  erro padrão da média (n=6), onde (\*) representa valores significativamente diferentes de acordo com o teste *t* ( $p \leq 0,05$ ).

**Figura 6.** Efeitos de SBC (1 mM) na fluorescência mínima ( $F_0$ ) (**A**), fluorescência máxima ( $F_m$ ) (**B**), fluorescência variável ( $F_v$ ) (**C**) e eficiência fotoquímica máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ) (**D**) de *I. grandifolia* após 14 dias de cultivo. Valores médios  $\pm$  erro padrão da média (n=8), onde (\*) representa valores significativamente diferentes de acordo com o teste  $t$  ( $p \leq 0,05$ ).

**Figura 7.** Efeitos de SBC (1 mM) no teor de clorofila de *I. grandifolia* após 14 dias de cultivo. Valores médios  $\pm$  erro padrão da média (n=8), onde (\*) representa valores significativamente diferentes de acordo com o teste  $t$  ( $p \leq 0,05$ ).

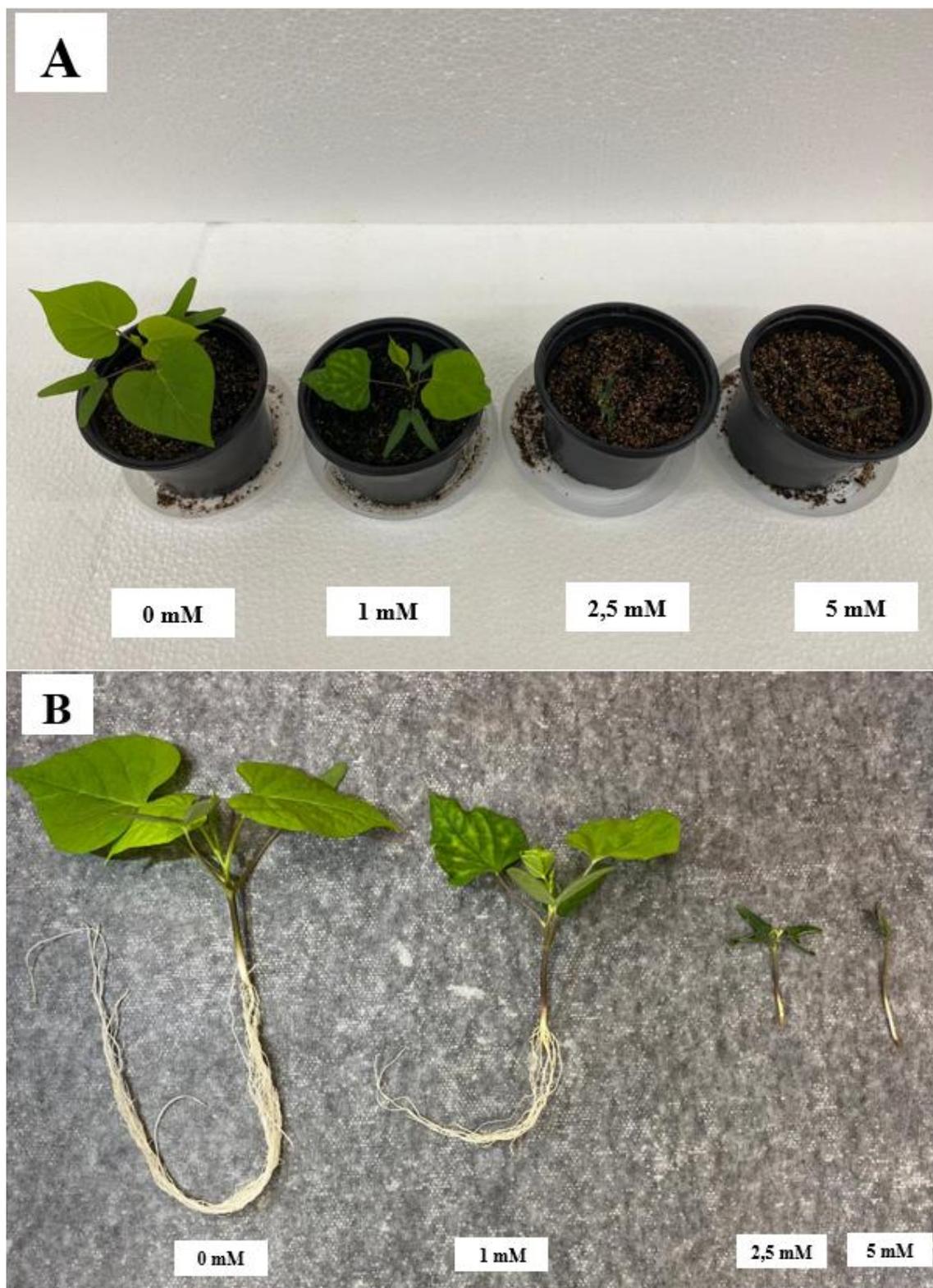
**Figura 8.** Efeitos de SBC (1 mM) na velocidade máxima de carboxilação da ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) ( $V_{cmáx}$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (**A**), na taxa de transporte de elétrons fotossintéticos ( $J$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (**B**), no uso de triose fosfato ( $TPU$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (**C**), na respiração diurna ( $R_d$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (**D**) e na condutância mesofílica ( $g_m$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (**E**) de plantas de *I. grandifolia* com 14 dias de cultivo. Valores médios  $\pm$  erro padrão da média (n=6), onde (\*) representa valores significativamente diferentes de acordo com o teste  $t$  ( $p \leq 0,05$ ).

**Figura 9.** Efeitos de SBC (1 mM) na emissão de fluorescência rápida ou polifásica (OJIP). Valores médios  $\pm$  erro padrão da média (n=11), onde (\*) representa valores significativamente diferentes de acordo com o teste  $t$  ( $p \leq 0,05$ ).

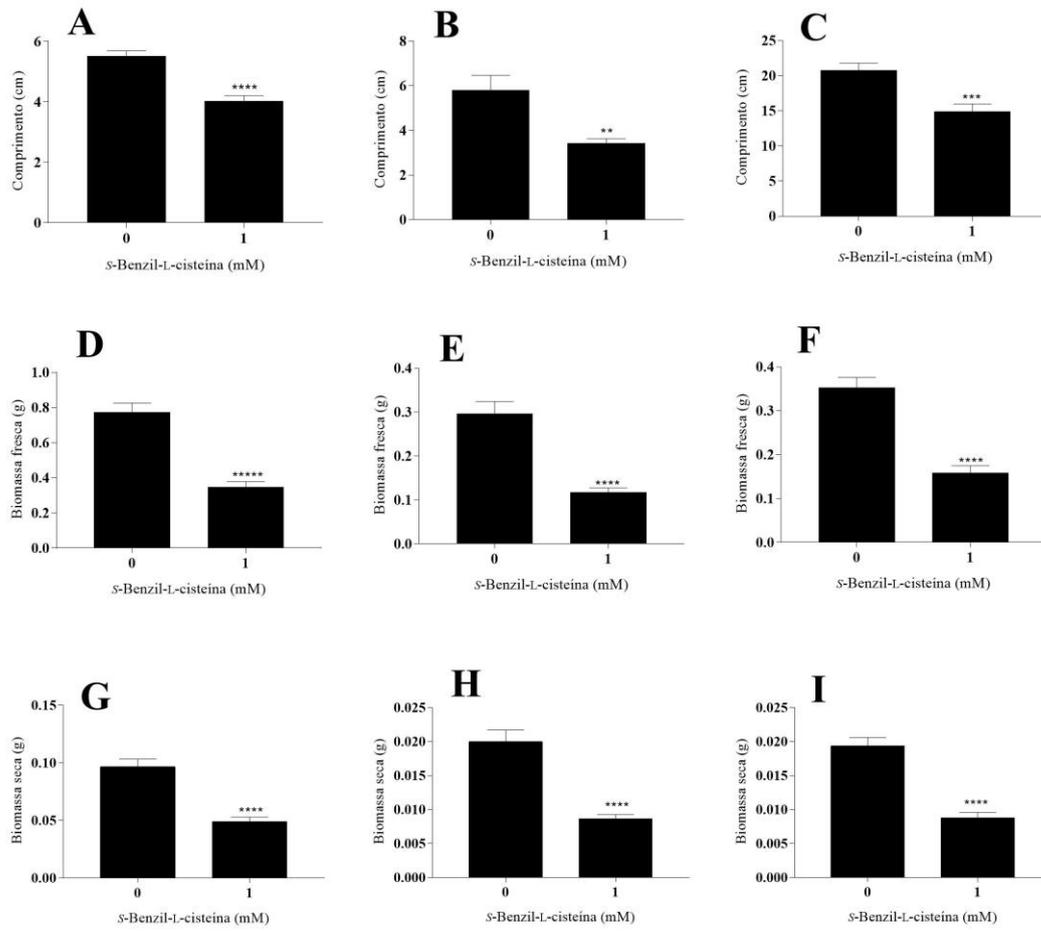
**Figura 10.** Efeitos de SBC (1 mM) sobre o conteúdo de dienos conjugados em folhas (**A**) e raízes (**B**), malondialdeído (MDA) em folhas (**C**) e raízes (**D**) e espécies reativas de oxigênio (EROs) em folhas (**E**) e raízes (**F**) de plantas de *I. grandifolia* após 14 dias de cultivo. Valores médios  $\pm$  erro padrão da média (n=5), onde (\*) representa valores significativamente diferentes de acordo com o teste  $t$  ( $p \leq 0,05$ ).

**Figura 11.** Efeitos de SBC (1 mM) sobre a atividade da catalase em folhas (**A**) e raízes (**B**), da peroxidase em folhas (**C**) e raízes (**D**) e da superóxido dismutase em folhas (**E**) e raízes (**F**) de plantas de *I. grandifolia* após 14 dias de cultivo. Valores médios  $\pm$  erro padrão da média (n=5-8), onde (\*) representa valores significativamente diferentes de acordo com o teste  $t$  ( $p \leq 0,05$ ).

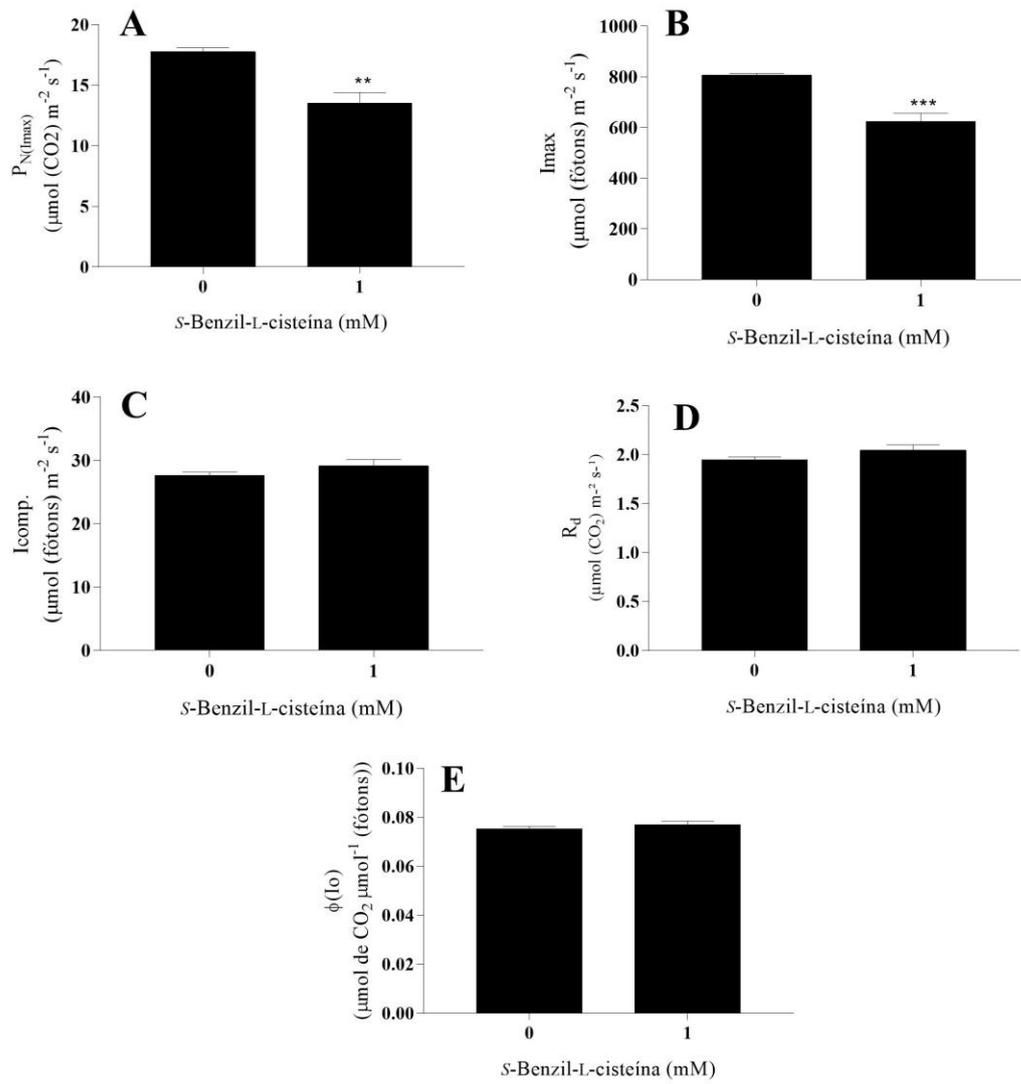
**Figura 1**



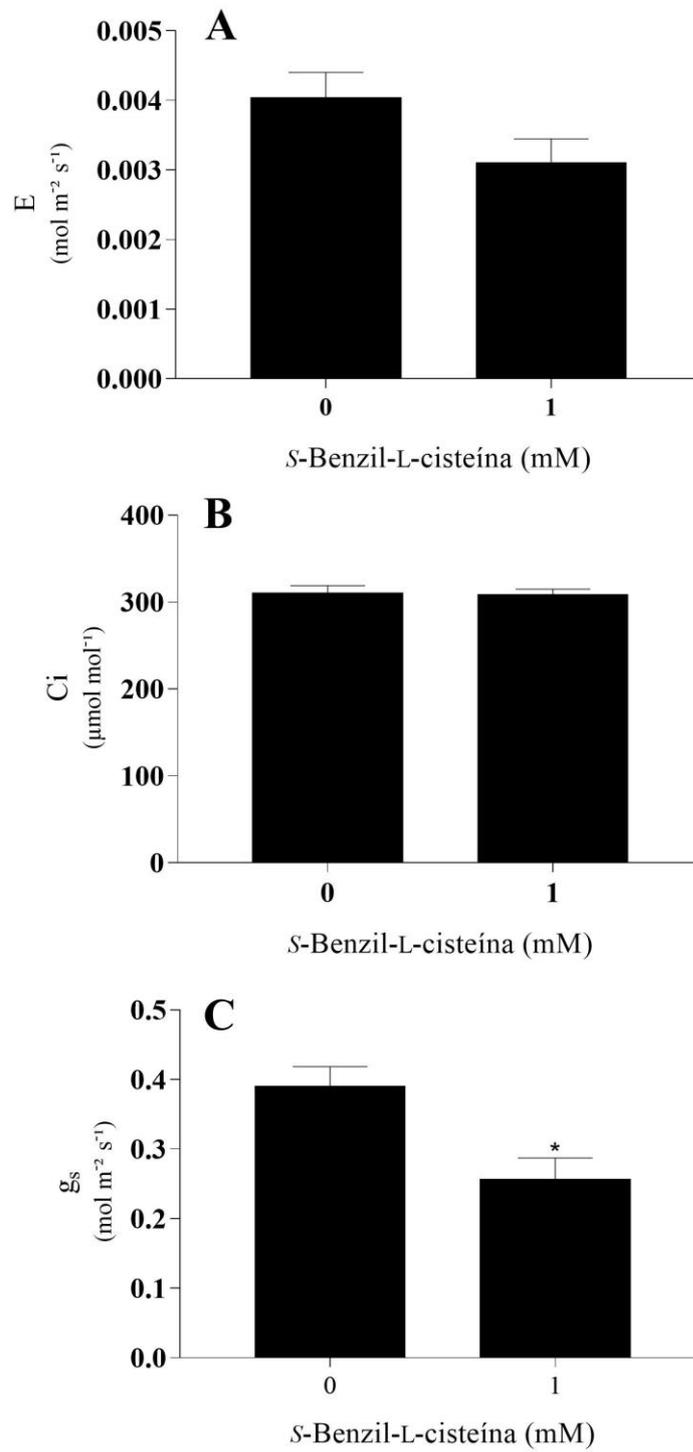
**Figura 2**



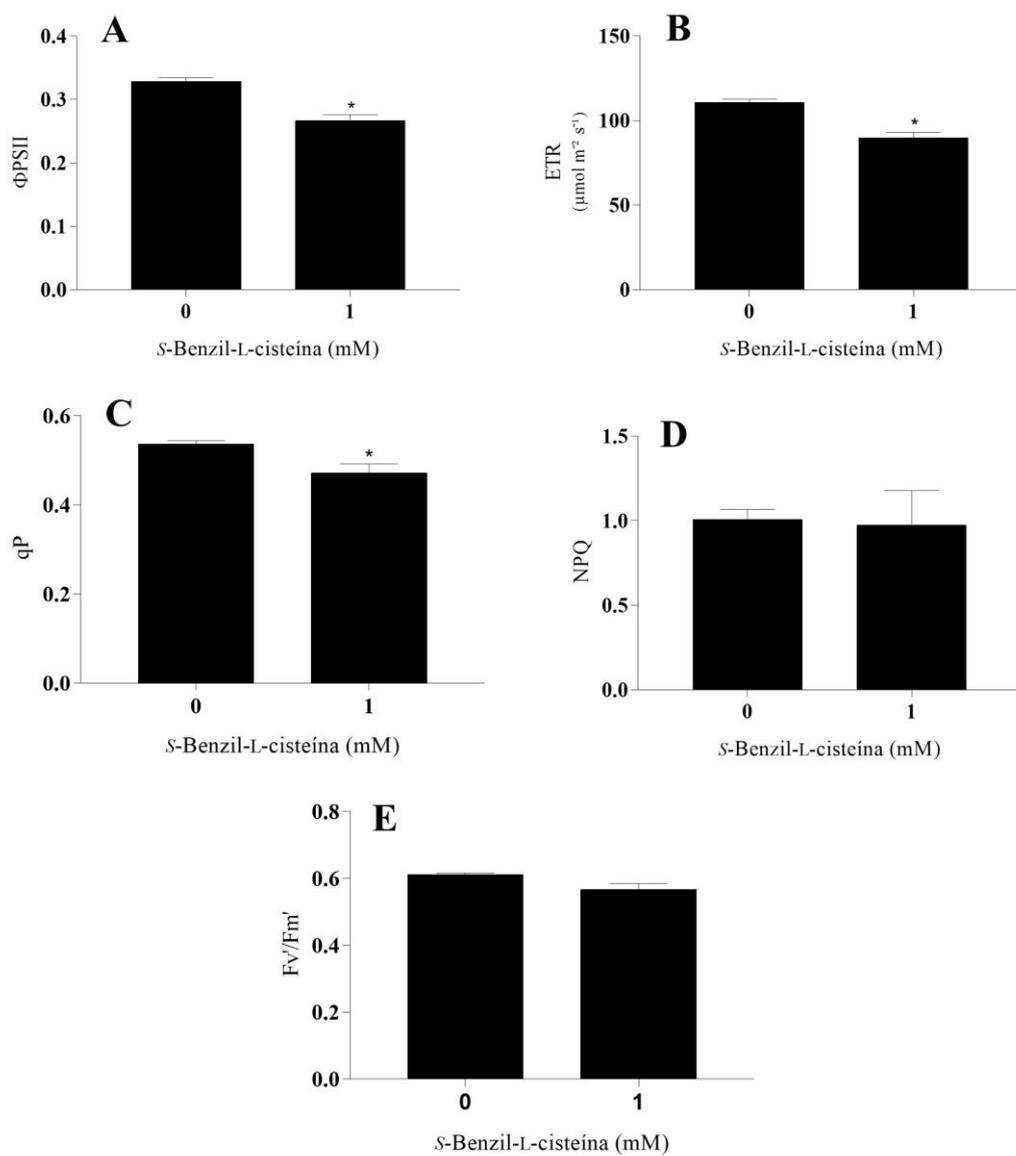
**Figura 3**



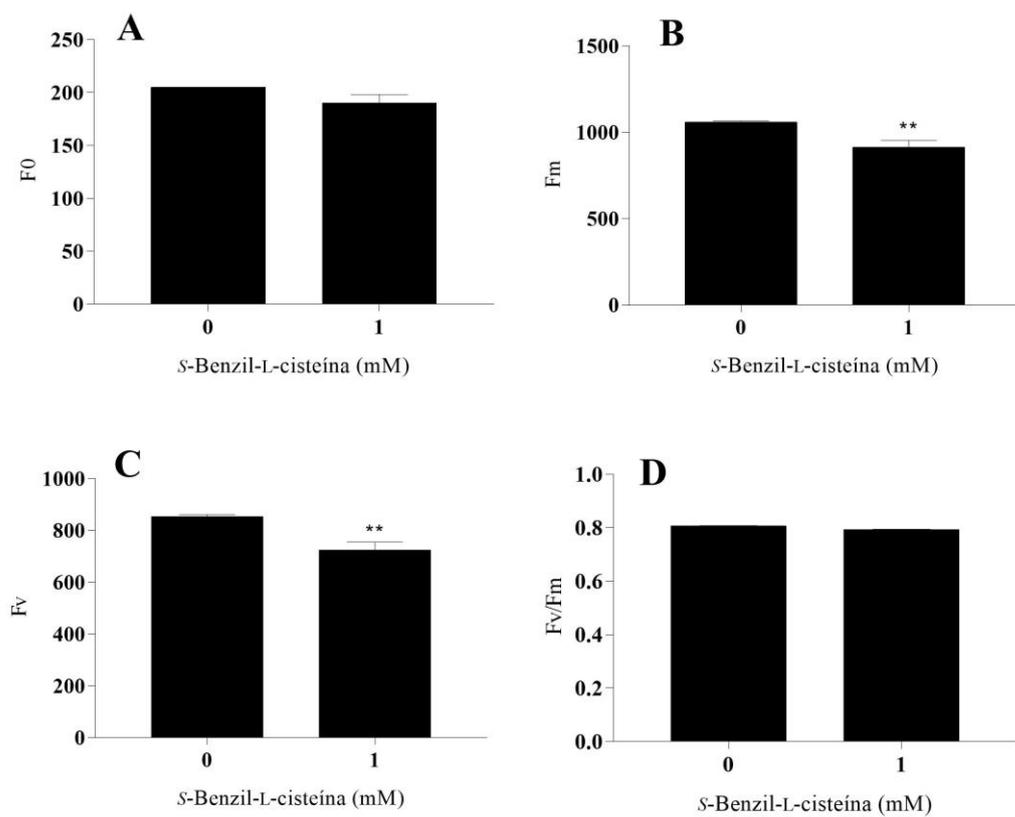
**Figura 4**



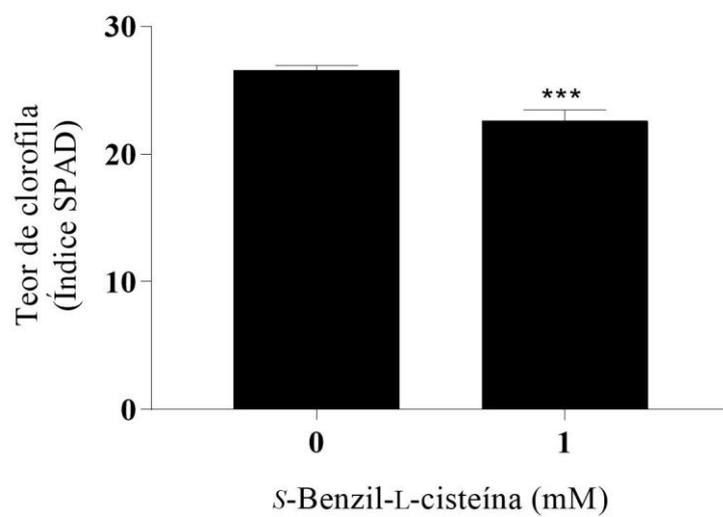
**Figura 5**



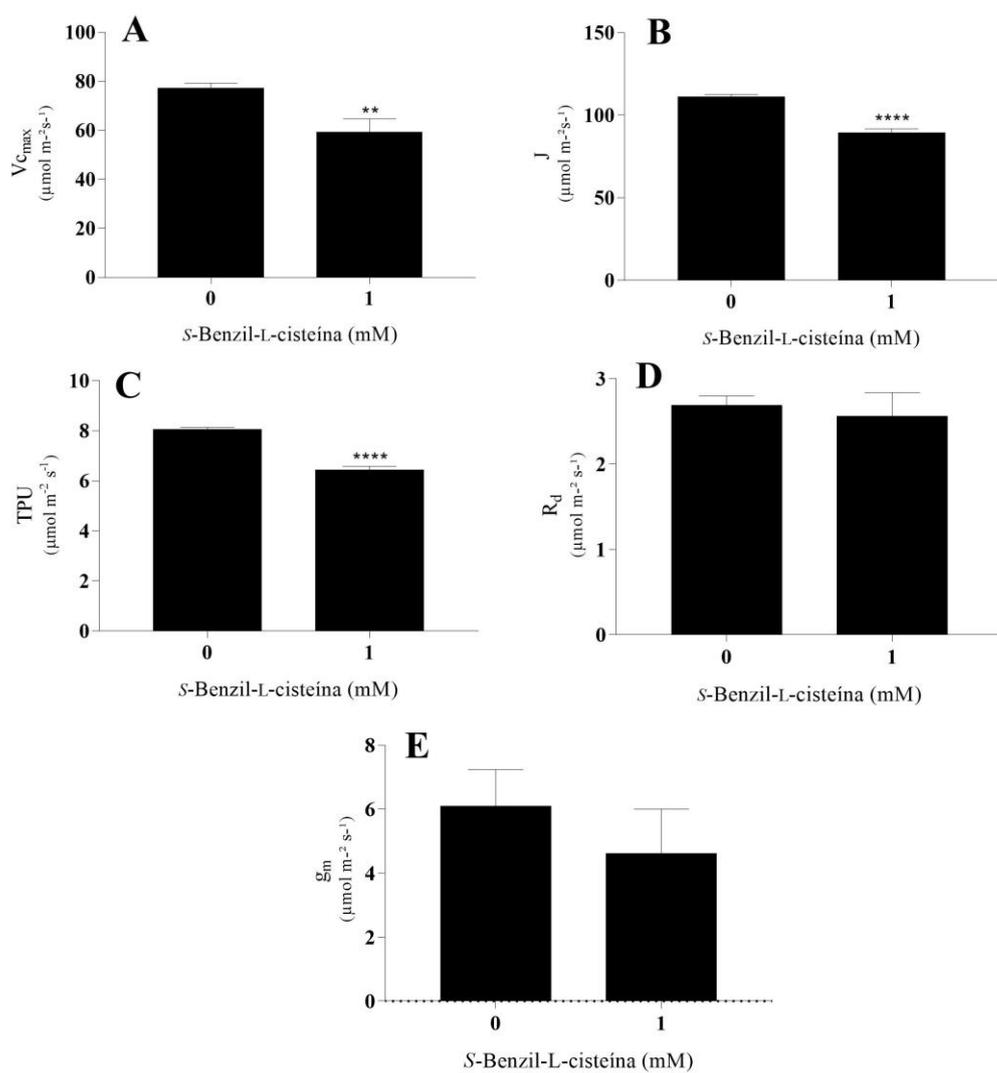
**Figura 6**



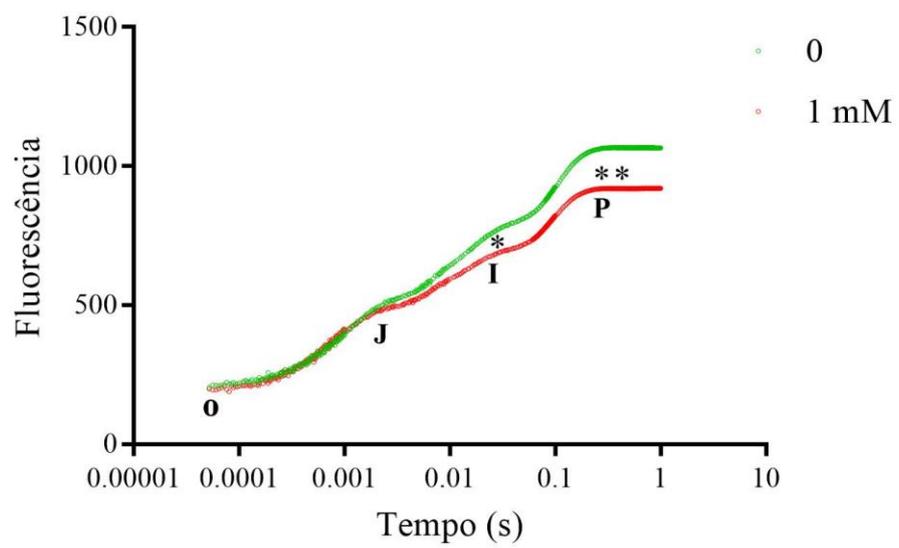
**Figura 7**



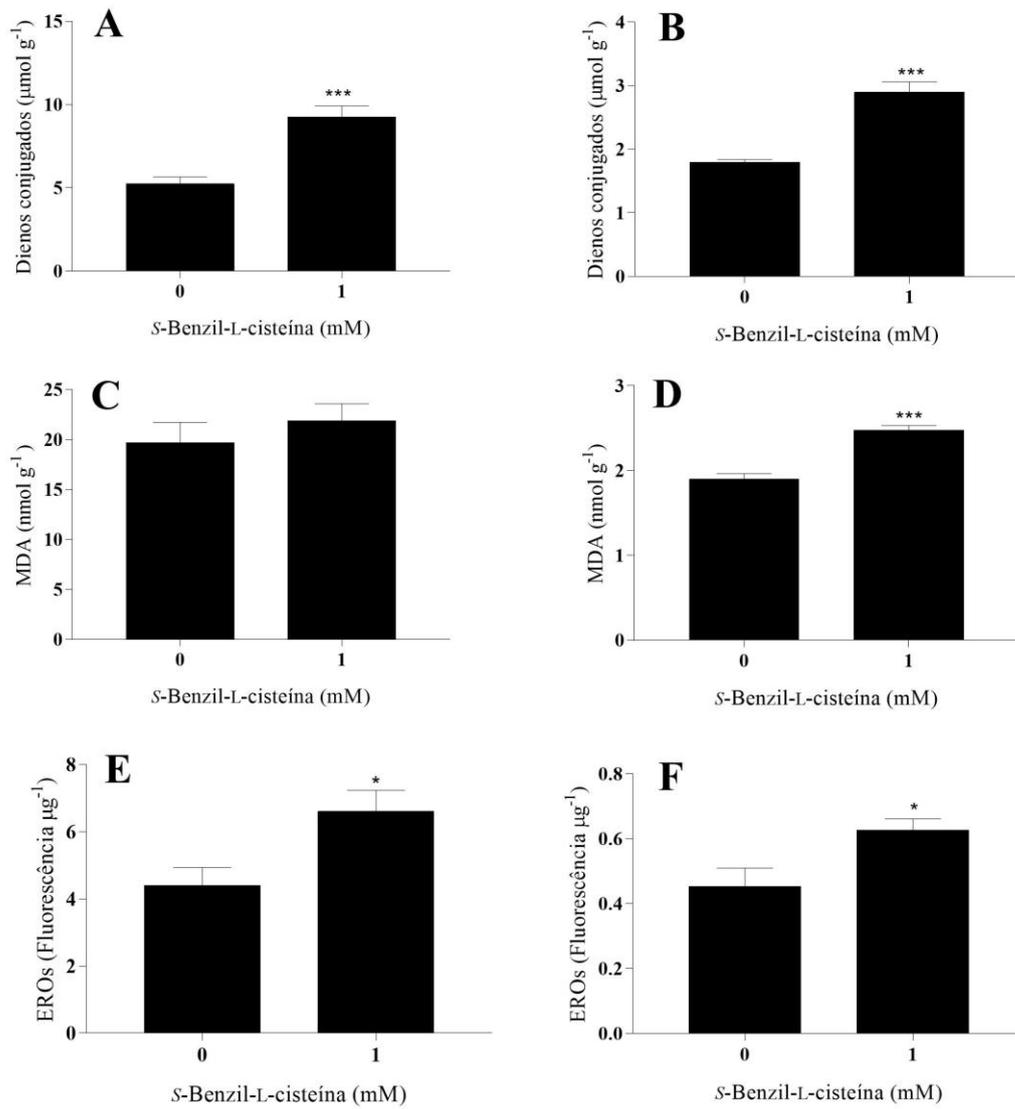
**Figura 8**



**Figura 9**



**Figura 10**



**Figura 11**

