



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

**RENATO POLIMENI CONSTANTIN**

**ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO E DO POTENCIAL HERBICIDA DA  
FLORETINA EM MILHO**

**Maringá  
2022**

**RENATO POLIMENI CONSTANTIN**

**ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO E DO POTENCIAL HERBICIDA DA  
FLORETINA EM MILHO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

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

**Maringá  
2022**

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

C758e

Constantin, Renato Polimeni

Estudo do mecanismo de ação e do potencial herbicida da floretina em milho / Renato Polimeni Constantin. -- Maringá, PR, 2022.

79 f.: il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Marchiosi.

Coorientador: Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese Filho.

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

1. Alelopatia. 2. Estresse oxidativo. 3. Floretina. 4. Fotossíntese. 5. Metabolismo energético. I. Marchiosi, Rogério, orient. II. Ferrarese Filho, Osvaldo, 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. 572.43

**RENATO POLIMENI CONSTANTIN**

**ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO E DO POTENCIAL HERBICIDA DO  
FLORETINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas pela banca examinadora composta pelos membros:

**Aprovado em:** 14 de março de 2022.

**COMISSÃO JULGADORA**

---

**Prof. Dr. Rogério Marchiosi**  
(Presidente – UEM)

---

**Prof. Dr. Paulo Alfredo Feitoza Böhm**  
(membro examinador externo – UNESPAR)

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Paula Ferro**  
(membro examinador – UEM)

---

**Prof. Dr. Márcio Shigueaki Mito**  
(membro examinador – UEM)

---

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

## **BIOGRAFIA**

Renato Polimeni Constantin nasceu em Maringá-PR em 04 de maio de 1990. Possui graduação em Farmácia pela Universidade Estadual de Maringá (2013). Foi estagiário do Laboratório de Metabolismo Hepático, Departamento de Bioquímica (2009-2013) e estagiário do Laboratório de Bioquímica de Plantas - BIOPLAN, Departamento de Bioquímica (2015). É mestre em Ciências Biológicas (2018) com enfoque em Bioquímica de Plantas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, no qual desenvolveu o trabalho “MODELAGEM E PROSPECÇÃO DE INIBIDORES PARA A PIRUVATO ORTOFOSFATO DICINASE: Efeito herbicida do ácido bromoacético”. Iniciou o curso de Doutorado em Ciências Biológicas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá em março de 2018, desenvolvendo o trabalho “ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO E DO POTENCIAL HERBICIDA DO FLORETINA”, com defesa da tese marcada para 14 de março de 2022.

*Em primeiro lugar dedico a Deus, divino e misericordioso. Segundo a minha família, que para mim sempre foram bondosos. Dedico ao meu orientador, que me guiou durante essa jornada. Agradeço a todos os amigos e parentes, os presentes e os ausentes. A todos quero dizer muito obrigado.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser luz em minha vida e por me conceder as virtudes necessárias para o cumprimento dos meus deveres.

À minha esposa, por estar comigo em todos os momentos e sempre me incentivar a melhorar.

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

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

Ao meu pai pelo incentivo e pelo carinho.

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

À professora Emy pelas palavras amigas.

Ao professor Osvaldo e ao professor Wanderley pelo apoio intelectual.

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

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

## APRESENTAÇÃO

Esta tese foi elaborada em dois capítulos. O primeiro capítulo é composto por um artigo que trata dos efeitos alelopáticos da floretina sobre plântulas de milho, com o objetivo de evidenciar quais são os mecanismos pelos quais esse composto polifenólico exerce seus efeitos fitotóxicos e o lançar como um bom candidato a herbicida. Este artigo foi intitulado “**Efeitos alelopáticos e o potencial herbicida da floretina em plântulas de milho**” e será submetido à revista *New Phytologist* (IF = 10.151), Qualis A1. O segundo capítulo é composto por um artigo que trata dos efeitos deletérios da floretina sobre o metabolismo fotossintético de uma planta C<sub>4</sub>, o milho. O título deste artigo é “**Resposta fotossintética do milho ao tratamento com floretina**” e será submetido à revista *Plant Physiology and Biochemistry* (IF = 4.27), Qualis B1.

**Capítulo I** – Renato Polimeni Constantin, Rodrigo Polimeni Constantin, Wanderley Dantas dos Santos, Osvaldo Ferrarese-Filho e Rogério Marchiosi. Efeitos alelopáticos e o potencial herbicida da floretina em plântulas de milho. Será submetido ao Periódico *New Phytologist* (Fator de impacto: 10.151)

(<https://nph.onlinelibrary.wiley.com/journal/14698137>)

**Capítulo II** – Renato Polimeni Constantin, Rodrigo Polimeni Constantin, Wanderley Dantas dos Santos, Osvaldo Ferrarese-Filho e Rogério Marchiosi. Resposta fotossintética do milho ao tratamento com floretina. Será submetido ao Periódico *Plant Physiology and Biochemistry* (Fator de impacto: 4.27).

(<https://www.journals.elsevier.com/plant-physiology-and-biochemistry>).

## RESUMO GERAL

**INTRODUÇÃO** – Aleloquímicos são substâncias não nutritivas produzidas principalmente como metabólitos secundários de plantas, microrganismos ou outros seres e que não são necessários para o metabolismo primário. Entre os metabólitos secundários, a família das chalconas (também conhecidas como chalconoides) atrai muito interesse, não apenas pelas perspectivas sintética e biossintética, mas também devido às suas atividades biológicas. A floretina é uma chalcona que ocorre naturalmente e pertence à classe química diidrochalcona, que consiste em uma estrutura esquelética C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (dois anéis aromáticos conectados por uma cadeia de três carbonos). Esse composto é encontrado principalmente em maçãs, peras e outras frutas suculentas e apresenta diversas atividades biológicas e farmacológicas, como atividades anti-inflamatória, anticancerígena, antimutagênica e anticarcinogênica, e tem sido utilizada como ingrediente cosmecêutico. Entretanto, os efeitos da floretina em plantas ainda são pouco conhecidos.

**OBJETIVOS** – O aumento do interesse pela proteção de cultivos, juntamente com o uso extensivo de agroquímicos e os problemas associados ao seu uso levaram à busca por novos produtos naturais biologicamente ativos. A descoberta de novos aleloquímicos é uma alternativa atraente aos herbicidas convencionais usados no controle de plantas daninhas. Neste contexto, os compostos secundários de plantas são bons candidatos como aleloquímicos para uso futuro na agricultura. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi de avaliar os efeitos alelopáticos e o potencial herbicida da floretina sobre o metabolismo do milho.

**MATERIAL E MÉTODOS** – Para isso, as sementes de milho (*Zea mays* L.), cv. IPR-164 foram germinadas por 72 h e as plântulas foram transferidas para sistemas de hidroponia, os quais foram cultivadas na presença da floretina (0-500µM) por 48 h. As plântulas tratadas foram submetidas a diversas análises, como por exemplo, a avaliação do crescimento inicial e das biomassas fresca e seca. O consumo de oxigênio em tecidos íntegros e de mitocôndrias isoladas de *Zea mays* foi avaliado polarograficamente. Para a determinação do conteúdo de adenina nucleotídeos, as raízes germinadas foram retiradas dos sistemas e 0,5 g foram pesados e rapidamente congelados em nitrogênio líquido e pulverizados com gral e pistilo. Então, foram adicionados 1,2 ml de HClO<sub>4</sub> 10% para inativação enzimática. Após a neutralização do pH, as amostras foram devidamente preparadas e ATP, ADP e AMP foram dosados através de cromatografia líquida de alta

eficiência (HPLC). Para a avaliação das atividades das enzimas do metabolismo antioxidante (CAT, POD e SOD) foi, primeiramente, preparado um extrato bruto a partir das raízes cultivadas em hidroponia e, posteriormente, suas atividades foram avaliadas espectrofotometricamente. Outros parâmetros relacionados ao metabolismo antioxidante, como a quantificação de espécies reativas de oxigênio totais,  $H_2O_2$ , malonaldeído e dienos conjugados foram dosados a partir de técnicas já padronizadas. Além disso, no presente estudo, o tratamento com 500  $\mu M$  de floretina foi o que mais evidentemente alterou o crescimento, as enzimas do metabolismo antioxidante, a produção de EROs e o metabolismo energético de plantas de milho, sendo, portanto, o tratamento selecionado para a realização do estudo do proteoma de raízes de milho. Ainda, realizamos uma análise combinada da ação da floretina 500  $\mu M$  sobre as trocas gasosas e a fluorescência da clorofila *a*, bem como a quantificação do conteúdo de piruvato das folhas. Para isso, as sementes foram germinadas por 72 h e as plântulas foram transferidas para sistemas de hidroponia, os quais foram cultivadas por 14 dias e, depois, foi adicionado nas soluções floretina na concentração de 500  $\mu M$  e o tratamento teve duração de 48h. Estes parâmetros foram analisados utilizando-se do sistema portátil de fotossíntese com fluorômetro acoplado Li-6800-F2 (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA). As medidas de trocas gasosas foram realizadas entre às 7:00 e 12:00 h. A técnica enzimática da lactado desidrogenase foi utilizada para determinar o conteúdo endógeno de piruvato de plantas de milho 48 h após o tratamento com floretina.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO** – Em plântulas, a floretina reduziu o crescimento das raízes de forma dose-dependente. A respiração KCN-sensível e a respiração mitocondrial foram reduzidas significativamente, mostrando que a mais provável causa na redução do consumo de oxigênio é a inibição da ATP sintase. Concomitantemente à mudança nos padrões respiratórios, ocorreu um aumento na atividade das enzimas do metabolismo antioxidante, nos níveis de EROs (principalmente  $H_2O_2$ ), MDA e dienos conjugados. Além disso, a floretina se mostrou como um agente pró-oxidante. Adicionalmente, nas plantas, a floretina afetou os processos fotossintéticos. A  $g_s$  reduzida juntamente com a redução no conteúdo de piruvato, restringiram a entrada de  $CO_2$  nos espaços subestomáticos, o que poderia limitar sua assimilação. Ainda, a redução de  $\Phi_{PSII}$  indicou que o fluxo de elétrons no PSII estava comprometido e o  $CO_2$  não estava sendo consumido de forma eficiente pelas plantas submetidas a floretina.

**CONCLUSÃO** – Os resultados do presente trabalho revelaram que a floretina apresentou efeito fitotóxico em raízes de plântulas de milho, o qual parece ser causado por uma

inibição da síntese de ATP pelas mitocôndrias e pela elevada produção de EROs e o consequente estado de estresse oxidativo. Ainda, nossos dados indicaram que os efeitos negativos da floretina sobre a fotossíntese do milho ocorreram principalmente devido à redução de  $g_s$ , do conteúdo de piruvato e diminuição da eficiência do transporte de elétrons nas reações fotoquímicas. Essas informações contribuem para o conhecimento dos efeitos dessa chalcona em plantas e destacam esse aleloquímico como um bom candidato com potencial herbicida.

**Palavras chave:** Alelopatia, floretina, metabolismo energético, estresse oxidativo, fotossíntese.

## GENERAL ABSTRACT

**INTRODUCTION** – Allelochemicals are non-nutritive substances produced mainly as secondary metabolites of plants, microorganisms or other beings which are not necessary for primary metabolism. Among secondary metabolites, the family of chalcones (also known as chalconoids) attracts much interest, not only from the synthetic and biosynthetic perspectives, but also because of their biological activities. Floretina is a naturally occurring chalcone and belongs to the chemical class dihydrochalcone, which consists of a C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> skeletal structure (two aromatic rings connected by a three-carbon chain). This compound is found mainly in apples, pears and other succulent fruits and has several biological and pharmacological activities, such as anti-inflammatory, anticancer, antimutagenic and anticarcinogenic activities, and has been used as a cosmeceutical ingredient. However, the effects of floretina in plants are still poorly understood.

**OBJECTIVES** – The increased interest in crop protection, together with the extensive use of agrochemicals and the problems associated with their use, have led to the search for new biologically active natural products. The discovery of new allelochemicals is an attractive alternative to conventional herbicides used to control weeds. In this context, secondary plant compounds are good candidates as allelochemicals for future use in agriculture. Therefore, the objective of the present work was to evaluate the allelopathic effects and the herbicide potential of floretina on corn metabolism.

**MATERIAL AND METHODS** – For this, the seeds of corn (*Zea mays* L.), cv. IPR-164 were germinated for 72 h and the seedlings were transferred to hydroponics systems, which were cultivated in the presence of floretina (0-500µM) for 48 h. The treated seedlings were submitted to several analyses, such as the evaluation of initial growth and fresh and dry weight. Oxygen consumption in intact tissues and in isolated mitochondria from *Zea mays* was evaluated polarographically. To determine the content of adenine nucleotides, the germinated roots were removed from the systems and 0.5 g were weighed and quickly frozen in liquid nitrogen and powdered with a mortar and pestle. Then, 1.2 ml of 10% HClO<sub>4</sub> was added for enzyme inactivation. After pH neutralization, the samples were properly prepared and ATP, ADP and AMP were measured using high performance liquid chromatography (HPLC). For the evaluation of the activities of antioxidant metabolism enzymes (CAT, POD and SOD) a crude extract was first prepared from the roots grown in hydroponics and, later, its activities were evaluated spectrophotometrically. Other parameters related to antioxidant metabolism, such as the

quantification of total reactive oxygen species, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, malonaldehyde and conjugated dienes were measured using standardized techniques. Furthermore, in the present study, the treatment with 500 µM of floretina was the one that most evidently altered the growth, antioxidant metabolism enzymes, ROS production and energy metabolism of maize plants, being, therefore, the treatment selected for carrying out the study of the maize root proteome. Furthermore, we performed a combined analysis of the action of floretina 500 µM on gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence, as well as the quantification of the pyruvate content of the leaves. For this, the seeds were germinated for 72 h and the seedlings were transferred to hydroponics systems, which were cultivated for 14 days and then floretina was added at a concentration of 500 µM in the solutions and the treatment lasted 48 h. These parameters were analyzed using a portable photosynthesis system with a Li-6800-F2 coupled fluorometer (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA). Gas exchange measurements were performed between 7:00 and 12:00 h. Lactate dehydrogenase enzymatic technique was used to determine the endogenous pyruvate content of maize plants 48 h after floretina treatment.

**RESULTS AND DISCUSSION** – In seedlings, floretina reduced root growth in a dose-dependent manner. KCN-sensitive respiration and mitochondrial respiration were significantly reduced, showing that the most likely cause of reduced oxygen consumption is inhibition of ATP synthase. Concomitantly with the change in respiratory patterns, there was an increase in the activity of antioxidant metabolism enzymes, in the levels of ROS (mainly H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), MDA and conjugated dienes. In addition, floretina was shown to be a pro-oxidant agent. Additionally, in plants, floretina affected photosynthetic processes. The reduced *g<sub>s</sub>*, together with the reduction in pyruvate content restricted the entry of CO<sub>2</sub> into the substomatal spaces, which could limit its assimilation. Furthermore, the reduction of Φ<sub>PSII</sub> indicated that the electron flow in PSII was compromised and CO<sub>2</sub> was not being efficiently consumed by plants subjected to floretina.

**CONCLUSION** – The results of the present work revealed that floretina had a phytotoxic effect on corn seedling roots, which seems to be caused by an inhibition of ATP synthesis by mitochondria and by the high production of ROS and the consequent state of oxidative stress. Furthermore, our data indicated that the negative effects of floretina on corn photosynthesis were mainly due to the reduction of *g<sub>s</sub>*, pyruvate content and decreased electron transport efficiency in photochemical reactions. This information contributes to the knowledge of the effects of this chalcone on plants and highlights this allelochemical as a good candidate with herbicide potential.

Keywords: Allelopathy, phloretin, energy metabolism, oxidative stress, photosynthesis.

## **Efeitos alelopáticos e o potencial herbicida da floretina em plântulas de milho**

*Renato Polimeni Constantin<sup>1</sup>, Rodrigo Polimeni Constantin<sup>2</sup>, Wanderley Dantas dos Santos<sup>1</sup>, Osvaldo Ferrarese-Filho<sup>1</sup> e Rogério Marchiosi<sup>1</sup>.*

<sup>1</sup>Laboratório de Bioquímica de Plantas, Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Oxidações Biológicas e Laboratório de Esteatose Experimental, Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

### **RESUMO**

No presente trabalho, nós investigamos as causas dos efeitos fitotóxicos da floretina em raízes de plântulas de milho. Para isso avaliamos sua ação sobre as enzimas do metabolismo antioxidante, os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e parte do metabolismo mitocondrial. As sementes foram germinadas por 72 h e as plântulas foram transferidas para sistemas de hidroponia, os quais foram cultivadas na presença da floretina (0-500  $\mu$ M) por 48h. A floretina reduziu o crescimento e as biomassas frescas e secas das raízes de forma dose-dependente. A respiração KCN-sensível e a respiração mitocondrial foram reduzidas significativamente, mostrando que a mais provável causa na redução do consumo de oxigênio é a inibição da ATP sintase. Concomitantemente à mudança nos padrões respiratórios, ocorreu um aumento na atividade das enzimas do metabolismo antioxidante, nos níveis de EROs (principalmente  $H_2O_2$ ), MDA e dienos conjugados. Além disso, a floretina se mostrou como um agente pró-oxidante. Os resultados sugerem que a floretina interferiu na produção de ATP pelas mitocôndrias e induziu as células das raízes a um estado de estresse oxidativo, os quais parecem ser os responsáveis pelos efeitos fitotóxicos que levaram a redução no crescimento.

### **INTRODUÇÃO**

Os organismos vivos, desde microrganismos a seres mais complexos como os mamíferos, encontram comida, procuram parceiros, afastam predadores e se defendem contra doenças por meio de interações químicas (Zimdahl, 2018). A alelopatia é um tipo de interação química que se refere a qualquer processo que envolva a produção de compostos químicos (aleloquímicos) por plantas, microrganismos, vírus e fungos que influenciam o crescimento e desenvolvimento de sistemas agrícolas e biológicos (Cheng & Cheng, 2015).

Aleloquímicos são substâncias não nutritivas produzidas principalmente como metabólitos secundários de plantas, microrganismos ou outros seres e que não são

necessários para o metabolismo primário (Gross, 2009; Cheng & Cheng, 2015). Além disso, os aleloquímicos consistem de moléculas simples até compostos mais complexos que pertencem a várias famílias de substâncias e são classificados em diferentes categorias com base na similaridade química (RICE, 1984; Zimdahl, 2018). As principais são: ácidos orgânicos solúveis em água, álcoois de cadeia simples, aldeídos alifáticos e cetonas; lactonas insaturadas simples; ácidos graxos de cadeia longa e poliacetilenos; benzoquinonas, antraquinonas e quinonas complexas; fenóis simples, ácido benzóico e seus derivados; ácido cinâmico e seus derivados; cumarinas; chalconas; flavonóides; taninos; terpenóides e esteróides; aminoácidos e peptídeos; alcaloides e ciano-hidrinas; sulfureto e glucosinolatos; purinas e nucleósidos. Reguladores de crescimento de plantas, incluindo ácido salicílico, ácido giberélico e etileno, também são considerados aleloquímicos (RICE, 1984; Pagare *et al.*, 2015).

Entre os metabólitos secundários, a família das chalconas (também conhecidas como chalconóides) atrai muito interesse, não apenas pelas perspectivas sintética e biossintética, mas também devido às suas atividades biológicas (Zhuang *et al.*, 2017). Geralmente, a estrutura química das chalconas, em particular a característica ligação dupla  $\alpha$ ,  $\beta$  e a presença e posições dos grupos hidroxila (ou seus compostos substituintes), determina a maioria de suas atividades biológicas (Orlikova *et al.*, 2011). As chalconas são moléculas multifuncionais, sendo assim, uma estrutura particular pode apresentar múltiplas atividades biológicas. Por exemplo, foi mostrado que a licochalcona A contribui à grande capacidade antioxidante do alcaçuz e possui efeito bactericida, anti-leishmania, antimalárico, anti-inflamatório e inibidor do ciclo celular (Friis-Møller *et al.*, 2002; Furusawa *et al.*, 2009).

A floretina é uma chalcona que ocorre naturalmente e pertence à classe química diidrochalcona, que consiste em uma estrutura esquelética  $C_6-C_3-C_6$  (dois anéis aromáticos conectados por uma cadeia de três carbonos (Figura 1) (Boyer & Liu, 2004; Gosch *et al.*, 2010). Esse composto é encontrado principalmente em maçãs, peras e outras frutas suculentas e apresenta diversas atividades biológicas e farmacológicas, como atividades anti-inflamatória, anticancerígena, antimutagênica e anticarcinogênica, e tem sido utilizada como ingrediente cosmeceútico (Wang *et al.*, 2014). Entretanto, os efeitos da floretina em plantas ainda são pouco conhecidos.

O aumento do interesse pela proteção de cultivos, juntamente com o uso extensivo de agroquímicos e os problemas associados ao seu uso levaram à busca por novos produtos naturais biologicamente ativos (Dayan *et al.*, 2009). A descoberta de novos

aleloquímicos é uma alternativa atraente aos herbicidas convencionais usados no controle de plantas daninhas. Herbicidas comerciais causaram mudanças nas populações de espécies invasoras, poluição ambiental e eles também interferem no fenômeno da resistência (Macías *et al.*, 1997). Neste contexto, os compostos secundários de plantas são bons candidatos como aleloquímicos para uso futuro na agricultura. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi de avaliar os efeitos alelopáticos e o potencial herbicida da floretina sobre o metabolismo de plântulas de milho.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Material vegetal e procedimentos gerais*

Sementes de milho (*Zea mays* L.), cv. IPR-164, foram sanitizadas com hipoclorito de sódio (NaClO) a 2%, lavadas abundantemente com água deionizada e germinadas no escuro a 25°C entre duas folhas de papel Germitest® previamente umedecidos. Plântulas uniformes com 72 h de desenvolvimento foram selecionadas e transferidas para os sistemas de hidroponia contendo 250 mL de solução nutritiva de Dong com um quarto da força iônica. Nessas mesmas soluções, a floretina foi dissolvida em concentrações finais de 50, 100, 250 e 500 µM. Os sistemas contendo as plântulas foram mantidos por 48 h em sala de crescimento com temperatura de 25°C, fotoperíodo de 12h/12h (claro/escuro) e uma irradiância de 300 µmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

### *Crescimento inicial, biomassa fresca e seca*

As sementes germinadas por 72 h tiveram o crescimento inicial medidos e foram transferidas para os sistemas de hidroponia. Ao final das 48 h, as plântulas foram retiradas dos sistemas de hidroponia e as raízes novamente foram submetidas a avaliação biométrica, na qual foi medido o crescimento final. A taxa de crescimento foi dada subtraindo o crescimento final do crescimento inicial. Além disso, foram determinados os valores das biomassas fresca e seca utilizando uma balança analítica. Os resultados foram expressos em cm para o crescimento inicial e em g para as biomassas fresca e seca.

### *Consumo de oxigênio por tecidos íntegros de ápices de plantas*

O consumo de oxigênio em tecidos íntegros de *Zea mays* foi avaliado polarograficamente a 25 °C com um eletrodo do tipo Clark (Probe Oxygen sensor 5331, Yelow Springs, Ohio, USA). As raízes primárias foram cortadas em segmentos de 3-5

mm de comprimento. Os ápices foram fragmentados com tesoura e colocados imediatamente na câmara com eletrodo de Clark contendo solução nutritiva (pH 5.8) constituída por: 2 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 2 mM  $\text{KNO}_3$ , 27  $\mu\text{M}$   $\text{FeCl}_3$ , 0,43 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,75 mM  $\text{MgSO}_4$  e 20  $\mu\text{M}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Larkin, 1987). A floretina foi dissolvida no meio em concentrações finais de 50, 100, 250 e 500  $\mu\text{M}$ . As taxas de consumo de oxigênio foram calculadas a partir de registros polarográficos, considerando a concentração inicial de oxigênio dissolvido ser 240  $\mu\text{M}$  a 25 °C (Estabrook, 1967). Para estimar a contribuição da via do citocromo oxidase (COX; respiração KCN-sensível), oxidase alternativa (AOX; respiração SHAM-sensível), e/ou oxidases extramitocondriais (respiração KCN-insensível) para o consumo total de  $\text{O}_2$ , KCN (Bendall & Bonner Jr., 1971) 200  $\mu\text{M}$  ou ácido salicilhidroxâmico (Popov *et al.*, 1997) 2 mM (dissolvido em 2-metoxietanol) foi adicionado ao meio de reação. O consumo de oxigênio foi expresso em  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de biomassa fresca.

#### *Isolamento de mitocôndrias de raízes de plântulas de milho*

As mitocôndrias foram isoladas de raízes primárias de plântulas de milho germinadas por 72 h. As raízes primárias (aproximadamente 10 g) foram cortadas e colocadas em dois volumes de meio de extração gelado que continha tampão TRIS-HCl 50 mM (pH 7,2), manitol 0,4 M, EDTA 1,0 mM,  $\text{MgCl}_2$  1,0 mM, cisteína 0,1% (m/v), e albumina bovina livre de ácidos graxos 0,5% (m/v). Na sequência, as raízes foram homogeneizadas com triturador de alta velocidade (Walita RI-1350, Philips, Brasil) a 3600 rpm por 15 s. O homogenato foi filtrado em algumas camadas de gaze e o pH foi ajustado para 7,2 com KOH e o filtrado foi centrifugado a 1400g por 10 min. O sobrenadante foi retirado e centrifugado a 20000 g por 10 min e o sedimento foi coletado (preparação bruta de mitocôndrias).

Na sequência, a preparação bruta de mitocôndrias foi purificada em gradiente de Percoll de acordo com o procedimento descrito por Jackson *et al.* (Jackson *et al.*, 1979) A banda resultante foi lavada e ressuspensa em um volume de 30 mL de meio contendo tampão HEPES 20 mM (pH 7,2), manitol 0,3 M, EDTA 1,0 mM, e albumina bovina livre de ácidos graxos 0,2% (m/v), e então foi novamente centrifugado a 20000 g por 10 min. As preparações purificadas de milho foram utilizadas para medidas polarográficas do consumo de oxigênio. Todos os procedimentos foram realizados a 4° C.

#### *Determinação dos parâmetros respiratórios de mitocôndrias isoladas de milho*

O consumo de oxigênio em mitocôndrias de *Zea mays* foi avaliado polarograficamente a 25 °C com um eletrodo do tipo Clark, como descrito acima para medidas de respiração de ápices. O meio de reação continha tampão TRIS-HCl 10 mM (pH 7,2), manitol 0,4 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5,0 mM, MgCl<sub>2</sub> 5,0 mM, albumina bovina livre de ácidos graxos 1,0% (m/v), e mitocôndrias isoladas em diversas quantidades (Abrahim *et al.*, 2000, 2003). A respiração das mitocôndrias isoladas foi iniciada pela adição dos seguintes substratos e cofatores: NADH 1,0 mM; succinato 10 mM + ATP 1,0 mM ou L-malato 10 mM + NAD<sup>+</sup> 1,0 mM (Abrahim *et al.*, 2003). O consumo de oxigênio foi acompanhado por aproximadamente 5 min. Depois desse tempo, ADP foi adicionado a uma concentração final de 25 μM. A razão ADP/O foi calculada de acordo com Chance & Williams (CHANCE & WILLIAMS, 1955) e representa a quantidade de ADP adicionada ao meio de incubação dividido pela quantidade de oxigênio consumida durante a fase ativa da respiração (estado III). O controle respiratório (RC) foi dado pela taxa de respiração que segue a adição de ADP (estado III) dividida pela taxa de respiração após o consumo do ADP (estado IV). A floretina foi dissolvida em uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO) e foi adicionada ao meio de incubação antes da adição do substrato, nas concentrações finais de 50, 100, 250 e 500 μM. A concentração máxima de DMSO foi fixada em 0,2% (v/v). Para cada preparação mitocondrial diferente, foram feitos controles para excluir os efeitos do DMSO.

#### *Determinação dos conteúdos de ATP, ADP e AMP*

Para a determinação do conteúdo de adenina nucleotídeos (Bergman *et al.*, 2000), as raízes germinadas por 72 h foram retiradas dos sistemas e 0,5 g foram pesados e rapidamente congelados em nitrogênio líquido e pulverizados com gral e pistilo. Então, foram adicionados 1,2 ml de HClO<sub>4</sub> 10% para desproteíntização. Em seguida, as amostras foram neutralizadas com KOH 5 M/trietanolamina 1 M, centrifugadas a 20.000 g por 10 minutos e os sobrenadantes foram utilizados para dosagem de adenina nucleotídeos em cromatógrafo líquido (Colturato *et al.*, 2012) (HPLC Prominence, Shimadzu<sup>®</sup>, Tóquio, Japão) equipado com uma bomba de gradiente quaternário (LC-20AT), um auto injetor (SIL-20A), detector de fotodiodos (SPD-M20A), forno para coluna (CTO-20A), desgasificador (DGU-20A), módulo de comunicação (CBM-20A) e estação de trabalho LcSolution (versão 1.25). A separação do ATP, ADP e AMP foi realizada com auxílio de uma coluna de fase reversa CLC-ODS (M) (250 × 4,6 mm, com partículas de 5 μm) equipada com pré-coluna compatível (10 × 4,6 mm) a 35°C. A fase móvel foi aplicada

sob um fluxo de  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$  utilizando-se um gradiente entre as fases  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   $0,044 \text{ M}$  pH 6.0 (A) e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   $0,044 \text{ M}$  + metanol 100% pH 7.0 (1:1) (B). Em porcentagem de metanol, o gradiente foi realizado da seguinte maneira: em 0 min, 0%; em 2,5 min, 0.5%; em 5 min, 3%; em 7 min, 5%; em 8 min, 12%; em 10 min, 15%; em 12 min, 20%; em 20 min, 28%; e em 30 min, 0%. A absorbância do ATP, ADP e do AMP foi monitorada a 254 nm utilizando-se padrão Sigma-Aldrich®. Os resultados foram expressos como  $\text{nmol g}^{-1}$  de biomassa fresca.

#### *Atividade da catalase, peroxidase e superóxido dismutase*

Para a avaliação das atividades enzimáticas foi, primeiramente, preparado um extrato bruto a partir das raízes cultivadas em hidroponia. Para isso, 1 g de raiz de milho foi triturada com nitrogênio líquido e, em seguida, homogeneizada com 1,5 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 7.5) contendo DTT 3 mM, EDTA 1 mM e 0,01 g de PVP (Azevedo *et al.*, 1998). As amostras foram centrifugadas por 30 min a  $20.034 \text{ g}$  e o sobrenadante utilizado como extrato enzimático para avaliar a atividade da catalase, peroxidase e superóxido dismutase.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada através do consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  da reação a 405 nm (Tománková *et al.*, 2006). A reação (1,1 mL) continha 50  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0), 50  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático e  $\text{H}_2\text{O}_2$  27 mM. A reação foi iniciada pela adição de 0,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  60 mM e interrompida, após 4 min, com a adição de 0,5 mL de molibdato de amônio 0,34 mM. Os resultados foram expressos como  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  biomassa fresca.

A determinação da atividade da peroxidase solúvel (POD) foi realizada conforme descrito por dos Santos et al (Dos Santos *et al.*, 2008). O meio de reação (3 mL) continha tampão fosfato 25 mM (pH 6,8),  $\text{H}_2\text{O}_2$  2,58 mM e guaiacol 10 mM. A reação foi iniciada pela adição de 0,2 mL do extrato enzimático preparado como descrito acima, diluído em tampão fosfato 67 mM (pH 7,0). A oxidação do guaiacol foi acompanhada em espectrofotômetro a 470 nm durante 5 min. A atividade da peroxidase foi calculada usando o coeficiente de extinção molar do tetraguaiacol de  $25,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Rama Devi & Prasad, 1996). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de biomassa fresca<sup>-1</sup>.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada de acordo com o método de Giannopolitis e Ries (Giannopolitis & Ries, 1977), tendo como base a capacidade da enzima converter o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e oxigênio molecular. O meio de reação continha tampão fosfato 50 mM (pH 7,8), NBT 75

$\mu\text{M}$ , L-metionina 13 mM, riboflavina 4  $\mu\text{M}$  e 20  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático de folha, totalizando 1,5 mL. A mistura de reação foi mantida a 25 °C, sob iluminação, por um período de 10 min. A redução do NBT foi monitorada em espectrofotômetro a 560 nm. Uma unidade de enzima (U) para SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar 50% de inibição da taxa de redução de NBT medida a 560 nm. Os resultados foram expressos como U  $\text{g}^{-1}$  de biomassa fresca.

#### *Determinação de EROs total e quantificação de $\text{H}_2\text{O}_2$*

A quantidade total de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi determinada conforme descrito por Jambunathan (Jambunathan, 2010). Para isso, 0,225 g de raiz provenientes das plantas cultivadas em hidroponia foram trituradas com nitrogênio líquido, transferidas para um tubo eppendorf, nos quais foram adicionados 1,5 mL de tampão TRIS 10 mM pH 7.2. A amostra foi centrifugada a 12.000 g por 20 minutos a 4 °C, a qual o sobrenadante foi utilizado para realizar a análise. As amostras foram previamente diluídas e a elas foi adicionado 10  $\mu\text{L}$  de DCFDA 1 mM. Após, as amostras foram homogeneizadas e incubadas no escuro durante 10 minutos. Por último, as amostras foram lidas em fluorímetro e o resultado foi expressado em unidades relativas de fluorescência  $\text{mg}^{-1}$  de biomassa fresca.

A determinação do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) foi realizada de acordo com Sergiev (Sergiev *et al.*, 1997). 1 g de raiz fresca foi homogeneizada com 3 mL de TCA 0,1% e centrifugadas a 2186 g por 20 minutos. 500  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi reagido com 250  $\mu\text{L}$  de iodeto de potássio e 500  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 10 mM (pH 7,0) durante 1 minuto, e a absorbância foi determinada a 390 nm. A quantidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi expressa em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de biomassa fresca.

#### *Determinação do conteúdo de malondialdeído (MDA) e dienos conjugados em raízes primárias*

Para a determinação de MDA, 0,6 g de raiz das plântulas foram retiradas e maceradas com 4 mL de etanol 96 % a 4 °C. Em seguida, uma alíquota de 3 mL foi transferida para um tubo tipo Falcon. Ao tubo foi adicionado 3 mL de ácido 2-tiobarbitúrico dissolvido em 10 % de TCA e incubado, a 95 °C, por 30 min. A reação foi paralisada em banho de gelo. A amostra foi centrifugada 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 ( $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de biomassa fresca (Heath & Packer, 1968).

Para determinar o conteúdo de dienos conjugados, uma alíquota de 500  $\mu\text{l}$  do homogenato inicial foi misturada com 1000  $\mu\text{l}$  de etanol 96 % em tubo do tipo Eppendorf e, em seguida, centrifugado a 20.000 g por 20 minutos. A absorvância do sobrenadante foi registrada em espectrofotômetro a 234 nm e a 500 nm, para absorvância inespecífica. A diferença entre esses dois comprimentos de onda foi utilizada para o cálculo da concentração dos dienos conjugados, usando  $\epsilon = 2,65 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de biomassa fresca (Boveris *et al.*, 1980).

#### *Medição da oxidação do NADH em um sistema livre de células*

O efeito da floretina na oxidação do NADH em um sistema livre de células foi medido de acordo com o método de Chan *et al.* (Chan *et al.*, 1999). As misturas de reação continham tampão tris-HCl 0,1 M/1,0 mM EDTA (pH 7,4),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (25  $\mu\text{M}$ ), NADH (200  $\mu\text{M}$ ) e peroxidase de rábano (HRP) tipo VI-A (0,1  $\mu\text{M}$ ). A floretina (5–500  $\mu\text{M}$ ) foi adicionada ao meio de incubação dissolvido em DMSO. As reações foram iniciadas pela adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e a oxidação do NADH foi acompanhada em 340 nm usando um espectrofotômetro. Experimentos de controle foram realizados para excluir efeitos de solventes.

#### *Extração de proteínas totais para estudo de proteoma*

No presente estudo, o tratamento com 500  $\mu\text{M}$  de floretina foi o que mais evidentemente alterou o crescimento, as enzimas do metabolismo antioxidante, a produção de EROs e o metabolismo energético de plantas de milho, sendo, portanto, o tratamento selecionado para a realização do estudo do proteoma de raízes de milho. Para isso, raízes (1 g) foram homogeneizadas em 4 mL de meio de extração gelado contendo tampão Tris-HCl 20 mM (pH 8,3), KCl 1,5 mM, DTT 10 mM, PMSF 1 mM e dodecil sulfato de sódio 0,1%. Em seguida, a amostra foi sonicada por 10 s a uma amplitude de 40%. Este procedimento foi repetido por mais nove vezes, estabelecendo-se um intervalo de repouso de 1 min em banho de gelo entre as sonicações. Então, a amostra foi transferida para eppendorf e centrifugada (18000 g, 10 min, 4 °C) e o sobrenadante reservado em um tubo falcon gelado. A amostra foi fracionada em cinco alíquotas de 300  $\mu\text{L}$  e, a cada uma das frações, foi adicionado 1,2 mL de acetona pura gelada, permitindo-se que a precipitação das proteínas procedesse *overnight*. No dia seguinte, as alíquotas foram

centrifugadas (18000 g, 10 min, a 4 °C) e os sobrenadantes descartados. Os pellets foram gentilmente ressuspensos em 150 µL de bicarbonato de amônio 50 mM contendo ureia 8 M. As alíquotas foram combinadas e a quantificação das proteínas realizada através do método de Bradford (Bradford, 1976). Então, a amostra foi finalmente diluída com bicarbonato de amônio 50 mM para uma concentração final de proteína de 1 µg µL<sup>-1</sup> e uma concentração final de ureia de 1,6 M. Foram utilizadas 3 repetições por tratamento.

#### *Preparação de amostra para aquisição NanoUPLC-MS<sup>E</sup>*

Uma alíquota de 50 µL da amostra de proteínas a 1 µg µL<sup>-1</sup> foi mantida em banho seco a 60 °C por 30 min e, então, adicionados 2,5 µL de DTT 100 mM. Em seguida, a amostra foi resfriada a temperatura ambiente antes da adição de 2,5 µL de iodoacetamida 300 mM. Após 30 min no escuro e à temperatura ambiente, foram adicionados 10 µL de tripsina 0,05 µg µL<sup>-1</sup> (razão 1:100), com leve homogeneização. As amostras foram digeridas a 37 °C em banho seco por 16–20 h. A reação foi interrompida pela adição de 10 µL de ácido trifluoroacético 5%. Após incubação por 1 h, as amostras foram centrifugadas a 10000 g, por 15 min a 4 °C (Villén & Gygi, 2008). O sobrenadante foi transferido para um eppendorf e reservado em banho de gelo até o momento da análise por NanoUPLC-MS<sup>E</sup>.

#### *Aquisição NanoUPLC-MS<sup>E</sup>*

A separação dos peptídeos trípticos em cromatografia líquida (LC) nano escala foi realizada usando um sistema nano ACQUITY<sup>TM</sup> (Waters Corporation, EUA) equipado com uma coluna de fase reversa C18 1,7 µm × 100 µm × 100 mm. As amostras de proteínas digeridas foram transferidas para a coluna usando uma solução aquosa de ácido fórmico 0,1% sob um fluxo de 6 µL min<sup>-1</sup> durante 2 min. Então, os peptídeos foram separados usando um gradiente de 0–40% da fase B (acetonitrila) em relação a fase A (ácido fórmico 0,1%) por 103 min sob um fluxo de 6 µL min<sup>-1</sup>, seguido por um enxague de 10 min com 85% da fase B. A coluna foi reequilibrada com as condições iniciais durante 20 min, sendo a temperatura da coluna mantida em 35 °C durante a corrida. O carregamento da coluna com a amostra foi de 2 a 4 µg de proteína. Todas as análises foram realizadas usando nano-ionização *electrospray* no modo positivo e uma fonte de ionização *NanoLockSpray* (Waters, EUA). A calibração inicial do espectrômetro de massas foi realizada com uma solução de leucina encefalina 200 fmol µL<sup>-1</sup> fornecida pela

fonte de ionização *NanoLockSpray*, enquanto a calibração final foi realizada com formiato de sódio  $100 \text{ fmol } \mu\text{L}^{-1}$  fornecido através do sistema da fluídica. O *spray* de referência foi amostrado a cada 30 s durante as corridas. Os dados de tempo exato de retenção de massa nanoLC-MS<sup>E</sup> foram coletados em um modo alternado de aquisição de baixa energia e elevada energia. O tempo de aquisição de espectros contínuos em cada modo foi de 1,5 s com um atraso *interscan* de 0,1 s. No modo MS de baixa energia, os dados foram coletados com energia de colisão constante de 3 eV. No modo MS de energia elevada, a energia de colisão foi aumentada de 12 para 45 eV durante cada espectro de 1,5 s (Murad & Rech, 2012; Silva *et al.*, 2017).

### *Processamento de dados e identificação de proteínas*

Após a identificação das proteínas, os dados quantitativos foram empacotados usando algoritmos dedicados e pesquisando em um banco de dados com parâmetros padrão para contabilizar os íons. Os bancos de dados usados foram revertidos "*on-the fly*" durante as consultas ao banco de dados e anexados ao banco de dados original para avaliar a taxa de descobertas falso positivas (FDR) durante a identificação. Os programas *ProteinLynx Global Server<sup>TM</sup>* (PLGS) v.3.0.3, com *Identity<sup>E</sup>* e *Expression<sup>E</sup>* v.3.0.3 (Waters), foram usados para o adequado processamento dos espectros e condições de pesquisa de banco de dados. Um banco de dados manualmente revisado de *Zea mays* (UP000007305) disponível na *Uniprot* foi usado para identificação das proteínas, após a sua randomização com PLGS 3.0.3 para gerar um banco de dados concatenado. O máximo de clivagens perdidas pela tripsina foi de até uma e as tolerâncias de erro para íons precursores e fragmentos foram determinadas automaticamente.

Os critérios de identificação de proteínas também incluíram a detecção de pelo menos dois íons de fragmento por peptídeo, cinco fragmentos por proteína e a determinação de pelo menos um peptídeo por proteína. A identificação da proteína foi permitida com uma FDR de 4% em pelo menos três réplicas de injeções técnicas, isto é, cada uma das amostras foi injetada três vezes. Foi especificada como modificação fixa a carbamidometilação de cisteínas e como modificação variável a oxidação de metioninas. As proteínas coletadas foram organizadas pelo algoritmo da ferramenta PLGS *Expression<sup>E</sup>* em uma lista estatisticamente significativa que correspondeu a taxas de regulação mais alta ou mais baixa entre os grupos controle e 500  $\mu\text{M}$  de Floretina. Apenas proteínas com uma razão de  $\log_2$  de expressão diferencial entre as duas condições maior ou igual a 1,2 foram consideradas (Murad & Rech, 2012; Silva *et al.*, 2017).

### *Análise de anotação funcional das proteínas*

Anotação funcional das proteínas e identificação das vias metabólicas foi realizada usando Kobas 3.0 (<http://bioinfo.org/kobas/>) (Bu *et al.*, 2021).

### *Análise estatística*

Os dados foram expressos como média dos experimentos independentes  $\pm$  erro padrão da média e as repetições variaram por metodologia, sempre considerando um mínimo de quatro parcelas experimentais para cada condição (controle e tratado). A análise de variância (ANOVA) foi realizada para testar a significância das diferenças observadas usando o pacote de software GraphPad Prism<sup>®</sup> (versão 7.0 GraphPad Software Inc., EUA). As diferenças entre os parâmetros foram avaliadas pelo teste de comparação múltipla de Dunnett e os valores de  $p \leq 0,05$  considerados estatisticamente significativos.

## **RESULTADOS**

### *Efeitos da floretina sobre o crescimento inicial, biomassa fresca e seca de raízes de plântulas de milho*

A figura 2 mostra os efeitos das diferentes concentrações de floretina sobre o crescimento das raízes em plântulas de milho, cultivadas em hidroponia por 48 h. Quando comparados com o controle, as concentrações de 100, 250 e 500  $\mu\text{M}$  foram capazes de causar uma redução significativa no crescimento das raízes do milho. A floretina foi capaz de reduzir o crescimento das raízes em 19,07% na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , 36,23% na concentração de 250  $\mu\text{M}$  e 93,02% na concentração de 500  $\mu\text{M}$ .

Os efeitos das diferentes concentrações de floretina sobre o conteúdo de biomassa fresca e seca podem ser observados nas figuras 3. As diferentes concentrações de floretina foram capazes de reduzir significativamente o conteúdo de biomassa fresca das raízes em 20,58%, 23,24% e 32,34% nas concentrações de 100, 250 e 500  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Entretanto, a floretina causou um aumento significativo no conteúdo de biomassa seca na concentração de 50  $\mu\text{M}$ , a qual apresentou um aumento de biomassa das raízes em 14,54%. Por outro lado, a concentrações de 500  $\mu\text{M}$ , causou uma redução significativa no conteúdo de biomassa seca, chegando em uma diminuição de 23,88%.

### *Efeitos da floretina sobre o consumo de oxigênio por tecidos íntegros de ápices de plântulas de milho*

Foram avaliados os efeitos de diferentes concentrações de floretina sobre a respiração total, KCN-sensível, KCN-insensível, SHAM-sensível e SHAM-insensível. Esses resultados podem ser observados nas figuras 4 e 5, respectivamente.

Na figura 4, podemos observar que a floretina foi capaz de diminuir significativamente a respiração total nas concentrações de 50, 100, 250 e 500  $\mu\text{M}$ , chegando a uma inibição máxima de 36,10% na concentração de 500  $\mu\text{M}$ . Além disso, as concentrações de 50, 100, 250 e 500  $\mu\text{M}$  também causaram inibição na respiração KCN-sensível, inibindo 57,09% na concentração de 500  $\mu\text{M}$ . Por outro lado, a floretina não causou alterações na respiração KCN-insensível.

Ademais, na figura 5 podemos verificar que a floretina reduziu significativamente a respiração SHAM-insensível em todas as concentrações utilizadas, apresentando inibição máxima de 49,36% na concentração de 500  $\mu\text{M}$ . Em contrapartida, a floretina não causou nenhum efeito significativo na respiração SHAM-sensível.

### *Efeitos da floretina sobre mitocôndrias isoladas de raízes de plântulas de milho*

Após o isolamento das mitocôndrias, a taxa de consumo de oxigênio foi medida na presença de diferentes substratos, são eles: L-malato, succinato e NADH (figura 4). O consumo de oxigênio foi medido antes da adição de ADP (respiração basal), na presença de ADP (estado III) e depois do consumo do ADP adicionado (estado IV).

A adição de floretina nas concentrações de 50-500  $\mu\text{M}$  não causaram mudanças significativas na respiração basal e no estado IV com L-malato, succinato, ou NADH como substratos. Entretanto, a respiração no estado III foi reduzida quando L-malato foi utilizado como substrato. Uma inibição significativa pode ser observada na presença das concentrações de 250 e 500  $\mu\text{M}$  de floretina, quando comparadas com o controle. Uma redução de 62,53% foi alcançada a 500  $\mu\text{M}$  (figura 4A). Efeitos similares podem ser observados na respiração do estado III quando succinato foi utilizado como substrato, mas uma inibição significativa de 48,62% pode somente ser observada na concentração mais alta de 500  $\mu\text{M}$  (figura 4B). Quando foi utilizado NADH como substrato, o estado III da respiração mitocondrial apresentou uma tendência a reduzir, mas nenhuma significância estatística foi encontrada quando comparado com o controle (figura 4C). Ainda, a floretina não modificou as razões ADP/O de nenhum dos três substratos oxidados pelas mitocôndrias (figura 4D-F). Entretanto, uma redução significativa foi

observada no controle respiratório (RC) quando L-malato e succinato (figura 4D, E) foram utilizados como substratos na presença da concentração mais alta de floretina (500  $\mu\text{M}$ ).

#### *Efeitos da floretina sobre o conteúdo de ATP, ADP e AMP das raízes de milho*

Os efeitos do tratamento com diferentes concentrações de floretina sobre o conteúdo de ATP, ADP e AMP, bem como as razões ATP/ADP e ATP/AMP podem ser observadas na figura 7A e 7B, respectivamente.

Podemos observar na figura 7A que o tratamento com a floretina causou um aumento nos níveis de ADP e AMP nas raízes de plantas de milho. As concentrações de 250 e 500  $\mu\text{M}$  elevaram os conteúdos de ADP em 28,37% e 46,99% respectivamente. Além disso, o conteúdo de AMP foi aumentado significativamente nas concentrações de 100, 250 e 500  $\mu\text{M}$ , chegando a um aumento máximo de 982% na concentração de 500  $\mu\text{M}$ . Entretanto, o conteúdo de ATP das raízes não foi alterado por nenhuma das concentrações de floretina.

A figura 7B mostra os efeitos da floretina sobre as razões ATP/ADP e ATP/AMP das raízes de plântulas de milho. A razão ATP/ADP foi reduzida significativamente na concentração de 500  $\mu\text{M}$  em 41,73%. Ademais, a razão ATP/AMP diminuiu significativamente com o tratamento de floretina 100, 250 e 500  $\mu\text{M}$ , reduzindo 91,60% na maior concentração.

#### *Efeitos da floretina sobre a atividade da catalase (CAT), peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD) de raízes de plântulas de milho*

Os efeitos das diferentes concentrações de floretina sobre a atividade da CAT, POD e SOD podem ser observados na figura 8. Podemos observar que floretina aumentou a atividade das enzimas catalase e peroxidase. As concentrações de 250 e 500  $\mu\text{M}$  foram capazes de estimular a atividade da catalase em 57 e 137%. Adicionalmente, as mesmas concentrações foram capazes de aumentar a atividade da peroxidase em 54 e 60%. Em contrapartida, todas as concentrações de floretina foram capazes de reduzir a atividade da superóxido dismutase, chegando a uma inibição máxima de e 39% na concentração de 500  $\mu\text{M}$ .

#### *Efeitos da floretina sobre a quantidade de EROs total, $\text{H}_2\text{O}_2$ , MDA e dienos conjugados nas raízes*

A figura 9 mostra os efeitos das diferentes concentrações de floretina sobre o conteúdo total de EROs das raízes em plântulas de milho. Como pode ser observado, a floretina aumentou significativamente o conteúdo de EROs total nas concentrações de 100, 250 e 500  $\mu\text{M}$ . O aumento máximo ocorreu na concentração de 500  $\mu\text{M}$ , chegando a aproximadamente 60%.

Os efeitos das diferentes concentrações de floretina sobre o conteúdo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  podem ser observados na figura 10. A floretina, nas concentrações de 100 e 250  $\mu\text{M}$  foram capazes de aumentar significativamente o conteúdo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em aproximadamente 30 e 33%. Por outro lado, na concentração de 500  $\mu\text{M}$ , ocorreu uma diminuição no conteúdo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em aproximadamente 29,69%.

A figura 11 mostra os efeitos do tratamento da floretina sobre o conteúdo de MDA e dienos conjugados em raízes de plântulas de milho. As concentrações de 250 e 500  $\mu\text{M}$  foram capazes de elevar os níveis de MDA em 60,56 % e 65,87%, respectivamente. Adicionalmente, a floretina causou um aumento significativo no conteúdo de dienos conjugados nas concentrações de 100, 250 e 500  $\mu\text{M}$ , elevando os níveis de dienos conjugados em 13,34%, 19,92% e 22,27%, respectivamente.

#### *Efeitos da floretina sobre a oxidação catalítica do NADH*

A floretina promoveu a oxidação no NADH na presença da peroxidase e de quantidades catalíticas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (figura 12). Essa oxidação é compatível com estudos anteriores que indicam que esse composto é capaz de formar metabolitos pró-oxidantes que oxidam outras substâncias (Chan *et al.*, 1999).

#### *Impactos da floretina no proteoma de raízes e identificação das vias metabólicas das proteínas envolvidas*

Neste estudo, nós realizamos uma análise proteômica livre de marcação (LC/MSE) para identificar as alterações no proteoma de raízes de plântulas de milho expostas ao tratamento com floretina 500  $\mu\text{M}$  durante 48 h. Um total de 119 proteínas não redundantes foram identificadas, 86 das quais expressas em ambos os tratamentos, controle e floretina 500  $\mu\text{M}$  (figura 13A). Cinquenta e duas (52) proteínas foram diferencialmente expressas entre as raízes das plântulas controle e tratadas com 500  $\mu\text{M}$  de floretina, sendo 29 downreguladas e 23 upreguladas (figura 13B).

Para obter informações sobre processos biológicos afetados pelo tratamento das plântulas de milho com floretina, nós examinamos as proteínas diferencialmente usando

Kobas 3.0 (KEGG Orthology Based Annotation System). A tabela 1 classifica as proteínas diferencialmente reguladas entre as raízes de plantas controle e tratadas com floretina 500  $\mu$ M em termos de vias metabólicas. Assim sendo, é possível verificar que as proteínas upreguladas foram associadas com 5 vias metabólicas relevantes para a compreensão dos efeitos da floretina. São elas: Glicólise e gliconeogênese, metabolismo do piruvato, fosforilação oxidativa, metabolismo da sacarose e metabolismo da glutatona. Dessa maneira, na glicólise e gliconeogênese três proteínas foram upreguladas pela floretina (P08735, Q09054 e Q43247), correspondendo a gliceraldeído desidrogenases citosólicas. Ainda, no metabolismo do piruvato uma proteína foi upregulada pela floretina (Q08062), a malato desidrogenase citosólica. Com o tratamento da floretina, a fosforilação oxidativa apresentou duas proteínas upreguladas (P19023 e Q41898), sendo estas as subunidades  $\beta$  e  $\epsilon$  da ATP sintase. No metabolismo da sacarose uma proteína foi upregulada (P04712), a sacarose sintase. E por fim, duas proteínas do metabolismo da glutatona foram upreguladas (P12653 e P46420), glutatona S-transferase 1 e glutatona S-transferase 4.

Por outro lado, as proteínas downreguladas nas raízes de plântulas de milho tratadas com floretina foram associadas com 4 vias metabólicas significativas: glicólise e gliconeogênese, metabolismo da sacarose, metabolismo da pirimidina e transportadores de membrana. Na glicólise e na gliconeogênese duas proteínas foram downreguladas (P08440 e P42895), frutose bifosfato aldolase citoplasmática e enolase 2. Já no metabolismo da sacarose, uma proteína foi downregulada com o tratamento de floretina (Q6XZ78), que corresponde a frutoquinase-2. No metabolismo da pirimidina, também encontramos uma proteína downregulada (B4FK49), denominada de nucleosídeo difosfato quinase 1. E por último, 7 proteínas classificadas como transportadores foram downreguladas pelo tratamento (Q84RL7, Q9ATM4, Q9ATM5, Q9ATM7, Q9ATM8, Q9XF58 e Q9XF59), sendo todas aquaporinas.

## **DISCUSSÃO**

Os resultados deste trabalho revelaram que a aplicação exógena de floretina apresentou efeitos inibitórios significantes sobre o crescimento das raízes de plântulas de milho. Nesse sentido, uma interferência no metabolismo energético mitocondrial provavelmente contribuiu para os efeitos citotóxicos causados pelo tratamento. A inibição da respiração KCN-sensível observada nas raízes primárias de milho na presença de floretina indicou uma diminuição na eficiência do transporte de elétrons mitocondrial pela

via da citocromo-oxidase e/ou uma interferência ligada a síntese do ATP (Bender, 2003). Essa suposição foi corroborada pelos resultados observados em mitocôndrias isoladas, os quais mostraram que a floretina causou uma diminuição das taxas respiratórias, indicando o comprometimento da fosforilação do ADP. Essa hipótese é compatível com a redução da respiração celular causada pela floretina em mitocôndrias isoladas de fígado de rato (De Jonge *et al.*, 1983). Adicionalmente, os efeitos nas mitocôndrias e o fato da floretina apresentar uma característica pró-oxidante levaram as células a um estado de estresse oxidativo, o qual também contribuiu para os efeitos negativos causados nas plântulas.

A floretina não afetou a via alternativa de transporte de elétrons (não-fosforilante), como demonstrado pela falta de efeito significativo na respiração sensível ao SHAM, um inibidor de oxidase alternativa (Popov *et al.*, 1997).

Os dados obtidos em mitocôndrias isoladas de raízes primárias de milho nos permitiram distinguir que o modo de ação da floretina nas mitocôndrias vegetais ocorre por uma inibição da atividade da ATP sintase. Em mitocôndrias intactas, a floretina não teve efeitos significativos sobre a respiração basal ou estado IV quando os substratos eram malato, succinato ou NADH. O malato é oxidado pela malato desidrogenase, produzindo NADH na matriz mitocondrial. Posteriormente, o NADH pode ser oxidado pela NADH-desidrogenase, um componente do complexo I. O succinato também é oxidado na matriz mitocondrial pela succinato desidrogenase, doando elétrons para o complexo II. Ao contrário do malato e do succinato, o NADH não permeia membranas mitocondriais internas e é oxidado fora das mitocôndrias pela NADH desidrogenase externa.

As descobertas de que a respiração basal e o estado IV não foram modificados pela ação da floretina, independentemente do substrato, mostra que a droga não exerceu influência sobre a respiração mitocondrial em condições nas quais o consumo de oxigênio é controlado pelo gradiente eletroquímico de prótons (Nicholls & Ferguson, 2013). Entretanto, a floretina inibiu significativamente a respiração acoplada à síntese de ATP (estado III) sem alterar a razão ADP/O, o que sugeriu uma interferência no complexo da  $F_0F_1$ ATP sintase ou da adenina nucleotídeo translocase. Uma ação direta da floretina na  $F_0F_1$ ATP sintase foi demonstrada em mitocôndrias de mamíferos (Zheng & Ramirez, 2000). Ainda, a relevância dos efeitos sobre as mitocôndrias é reforçada pela alteração dos níveis de adenina nucleotídeos e pela análise do proteoma das raízes do milho.

Os efeitos causados pela floretina na mitocôndria resultaram em uma significativa redução na capacidade da formação de ATP. Embora os níveis de ATP das raízes não tenham sofrido nenhuma redução significativa, os níveis de AMP aumentaram

significativamente. Isso se deve, provavelmente, a atividade da enzima adenilato cinase, a qual catalisa a transferência de um grupamento fosfato de uma molécula de ADP para outra e produz ATP na mitocôndria ( $2\text{ADP} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$ ) (Klepinin *et al.*, 2020). A adenilato cinase é uma enzima chave na homeostase energética envolvida na síntese, equilíbrio e regulação de adenina nucleotídeos, transformando pequenas mudanças no equilíbrio entre ATP e ADP em mudanças relativamente substanciais na concentração de AMP (Dzeja & Terzic, 2009), como pode ser observado no conteúdo total de AMP bem como a razão ATP/AMP das raízes de milho. Além disso, o aumento dos níveis de AMP devido à atividade da adenilato cinase, pode modular a atividade de outras vias sintetizadoras de ATP, como a glicólise, a fim de ajustar rapidamente as demandas energéticas celulares. Nesse sentido, podemos observar na análise proteômica que a enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase está upregulada. Por fim, complementando a hipótese de que a ATP sintase está inibida pela floretina, a análise do proteoma revela que duas subunidades dessa enzima ( $\beta$  e  $\epsilon$ ) se apresentaram upreguladas.

Os ápices radiculares são compostos por tecidos com alta atividade metabólica (Abraham *et al.*, 2003), e nesta condição, a respiração mitocondrial é limitada por níveis de ADP, uma condição equivalente ao estado III respiração de mitocôndrias isoladas (Nicholls & Ferguson, 2013). A respiração no estado III de mitocôndrias isoladas de raízes intactas foram inibidas pela floretina, sugerindo que a redução da fosforilação do ADP contribuiu para o efeito fitotóxico da chalcona no crescimento das raízes de milho.

Também é importante mencionar que, concomitantemente à mudança no padrão da atividade respiratória, a floretina induziu estresse oxidativo nas células das raízes do milho, fato que podemos comprovar através do aumento na atividade das enzimas do metabolismo antioxidante, aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) totais,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , aumento no conteúdo de malonaldeído (MDA) e dienos conjugados, todos marcadores de estresse oxidativo.

De modo geral, vários tipos de estresses ambientais causam estresse oxidativo mediante a formação de espécies reativas de oxigênio. Esses estresses ambientais podem ser originados pela exposição das plantas à xenobióticos, herbicidas ou até mesmo quando são submetidas à estresses abióticos (Smirnov, 1998; Blokhina *et al.*, 2003). Sendo assim, a formação de EROs e o consequente estresse oxidativo é proposto como um dos mecanismos de ação de inibição do crescimento de plantas causados por compostos aleloquímicos (Weir *et al.*, 2004). As espécies reativas de oxigênio, como os radicais superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), radicais hidroxila ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) são

moléculas altamente reativas e tóxicas, que podem causar danos oxidativos em membranas, proteínas, DNA, lipídeos e pigmentos fotossintéticos (Apel & Hirt, 2004).

Nas plântulas, a mitocôndria é o principal local onde ocorre a produção de EROs, na qual os complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial são os maiores produtores (Braidot *et al.*, 1999; Moller, 2001). Aproximadamente, 2% de todo o oxigênio consumido pela mitocôndria é convertido em EROs e, esses valores podem aumentar significativamente quando as plantas estão submetidas a algum tipo de estresse (Braidot *et al.*, 1999). Contudo, a principal espécie reativa de oxigênio formada nas mitocôndrias é o radical superóxido, que, por sua vez, produz  $H_2O_2$  a partir da dismutação catalisada pela SOD (Murphy, 2009).

Existem dois modos principais pelos quais levam as mitocôndrias isoladas a um extenso efluxo de  $H_2O_2$ . O primeiro modo ocorre quando há uma alta razão  $NADH/NAD^+$  na matriz. O segundo modo é quando há uma quantidade altamente reduzida de coenzima Q ( $CoQH_2$ ) em relação a sua forma oxidada ( $CoQ$ ), juntamente com a máxima força próton-motriz ( $\Delta p$ ) sem a síntese de ATP. No primeiro modo, o complexo I isolado, na presença de  $NADH$ , produz  $O_2^{\bullet-}$  e a sua formação pode ser aumentada pela presença de um inibidor, como a rotenona, que se liga no sítio de ligação da coenzima Q. Então, o complexo I produz  $O_2^{\bullet-}$  através da reação do  $O_2$  com o FMN totalmente reduzido, e a proporção de FMN reduzido é dada pela razão  $NADH/NAD^+$ . Embora a limitação dos nossos experimentos com mitocôndrias não tenham mostrado que a floretina inibiu o complexo I mitocondrial, existem diversos trabalhos que mostram que diversos flavonoides e chalconas são inibidores da  $NADH$  oxidase e induzem a produção de EROs (Hodnick *et al.*, 1986, 1987; Bohmont *et al.*, 1987). No segundo modo, um alto  $\Delta p$  e uma alta razão  $CoQH_2/CoQ$  leva a um fluxo de elétrons invertido e uma alta produção de  $O_2^{\bullet-}$  pelo complexo I. O local onde ocorre essa reação não está totalmente esclarecido, porém, esta situação pode ocorrer quando a ATP sintase (fosforilação oxidativa) está inibida, fato que os nossos experimentos demonstraram.

A floretina também se apresentou como um agente pró-oxidante, sendo capaz de oxidar o  $NADH$  na presença de peroxidase e  $H_2O_2$  *in vitro*. Esta atividade pró-oxidante é provavelmente causada pela formação de derivados de radicais livres como o-hemiquinonas e o-quinonas e a subsequente oxidação do  $NADH$  (Chan *et al.*, 1999; Oleszek *et al.*, 2019). É provável que esses eventos também possam ocorrer *in vivo* com a ajuda da catalase, que atua como peroxidase em baixas concentrações de  $H_2O_2$  (Buss *et*

*al.*, 2005). Isso faz com que a floretina também possa ser diretamente responsável por parte da formação de EROs.

Os compostos polifenólicos são conhecidos pela sua atividade antioxidante (Scalbert *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2019). Entretanto, em determinadas condições podem atuar como pró-oxidantes e promover a oxidação de outros compostos (Procházková *et al.*, 2011). Nesse sentido, Motani *et al.* (Motani *et al.*, 2008) mostraram que o xantoangelol, uma chalcona, causou estresse oxidativo pela formação de EROs e induziu apoptose celular. Em outro estudo, Nabi e Liu (Nabi & Liu, 2012) demonstraram que os efeitos das ferrocenil chalconas sobre a oxidação do DNA dependem dos iniciadores da oxidação. As ferrocenil chalconas agem como pró-oxidantes na oxidação do DNA induzida por  $\text{Cu}^{2+}/\text{GSH}$  e  $\text{OH}^\bullet$ . Um outro exemplo pode ser encontrado no trabalho de Guzy *et al.* (Guzy *et al.*, 2010), no qual alguns compostos derivados da 4-hidroxicalcona foram capazes de estimular a atividade mitocondrial e aumentar a produção de EROs.

Os efeitos pró-oxidantes dos compostos fenólicos parecem ser diretamente proporcionais ao número de grupamentos hidroxila na molécula do composto (Cao *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2012). Por exemplo, uma série de flavonoides que apresentam um ou dois grupos hidroxila substituídos não apresentaram atividade pró-oxidante. Por outro lado, aqueles que possuíam múltiplos grupos hidroxilas substituídos foram capazes de aumentar a produção de radicais hidroxila através da reação de Fenton (Hanasaki *et al.*, 1994; Heim *et al.*, 2002). A Floretina é uma chalcona (derivados de flavonoides) pertencente à classe das diidrochalconas e possui grupos hidroxila substituídos nos anéis aromáticos nas posições 4, 2', 4' e 6' apresentando-se, portanto, como um composto polifenólico (Liu *et al.*, 2016). Sendo assim, quando observamos a estrutura química da floretina, podemos observar que a molécula apresenta quatro grupamentos hidroxila substituídos, o que faz com que esse composto apresente um grande potencial pró-oxidante. Além disso, as propriedades pró-oxidantes dos compostos fenólicos parecem ser dependentes da concentração. Nesse sentido, nosso trabalho mostrou que a floretina foi capaz de aumentar a produção de EROs de maneira dose-dependente e, quanto maior a concentração utilizada nos tratamentos, maior foi a inibição do crescimento apresentada pelas raízes das plântulas de milho. Yen *et al.* (Yen *et al.*, 2003) avaliou os efeitos pró-oxidantes da quercetina, naringenina, hesperetina e morina em linfócitos humanos e concluiu que a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  aumentou proporcionalmente à concentração desses flavonoides.

A literatura é ampla quando se trata do estudo da floretina em microrganismos, células animais e seu grande potencial farmacológico. Por exemplo, Liu et al. (Liu *et al.*, 2021) mostraram que a floretina foi capaz de diminuir a patogenicidade e os fatores de virulência contra *Candida albicans in vivo* e *in vitro*. Ainda, Wu et al. (Wu *et al.*, 2018) mostrou que diversas concentrações de floretina foram capazes de inibir a migração e a proliferação de células de câncer de mama. Hsiao et al. (Hsiao *et al.*, 2019) demonstraram em seu trabalho que a floretina inibe a habilidade metastática e angiogênica de células cancerígenas, demonstrando a chalcona como um promissor agente terapêutico. Por fim, com uma relação maior com os resultados encontrados no nosso estudo, os trabalhos de Liu et al. (Liu *et al.*, 2016) e Kim et al. (Kim *et al.*, 2020) demonstraram que os efeitos citotóxicos causados pela floretina em células cancerígenas ocorreram através do aumento da produção de EROs. Semelhantes a esses, encontramos muitos outros que evidenciam o potencial terapêutico da floretina. Entretanto, pouco se sabe sobre seus efeitos em plantas. Este fato faz com que o nosso trabalho seja uma contribuição valiosa para o estudo deste metabólito secundário, principalmente no que diz respeito a seus efeitos fitotóxicos.

Os herbicidas, por definição, causam estresse abiótico nas plantas e, são utilizados como principal método de controle de plantas daninhas no cultivo de culturas economicamente importantes (Heap, 2014). De modo geral, os efeitos fitotóxicos causados pelos herbicidas, apesar de seu seletivo mecanismo de ação, está relacionado, na maioria dos casos, com a formação de EROs e o consequente estresse oxidativo (Cobb & Reade, 2010). Há uma grande variedade de herbicidas com diferentes modos de ação que podem ser utilizados. O modo de ação de um herbicida compreende os efeitos fisiológicos e bioquímicos que estão relacionados ao seu tratamento. Os diferentes modos de ação consistem em um alvo específico, que normalmente é uma enzima, a qual é inibida pelo herbicida em nível molecular. Depois que o herbicida causa a inibição da enzima alvo de uma planta suscetível, algum processo biológico vital é interrompido causando uma série de efeitos secundários que, no fim das contas, leva a morte da planta (Cobb & Reade, 2010). Por exemplo, em plantas suscetíveis, o mecanismo de ação do glifosato consiste na inibição de uma enzima da via do chiquimato chamada 5-enolpiruvilchiquimato 3-fosfato sintase (EPSPS). Por outro lado, o modo de ação do glifosato envolve processos que ocorrem após a inibição da enzima, como a inibição da via do chiquimato e a biossíntese de aminoácidos aromáticos, acúmulo de ácido chiquímico, formação de EROs, estresse oxidativo e a consequente morte da planta entre

7 e 15 dias após o tratamento (Servaites *et al.*, 1987; Dayan *et al.*, 2009; Maroli *et al.*, 2015).

O modo de ação de alguns herbicidas induz a formação de EROs nas plantas como efeitos secundários, após a inibição da enzima alvo. Nesse caso, o estresse oxidativo gerado é responsável por parte significativa do dano causado nas células e nos tecidos. Levando isso em consideração, nosso trabalho mostrou que, embora o mecanismo de ação da floretina não esteja completamente elucidado, o modo de ação desse aleloquímico causou uma expressiva formação de EROs e o consequente estresse oxidativo, o qual parece ser, além de outros fatores, responsável pela inibição do crescimento das raízes. Sendo assim, a floretina é lançada como um composto com grande potencial herbicida, pelo menos nos estágios iniciais de desenvolvimento das plantas. Entretanto, mais estudos são necessários, a fim de que novas descobertas sejam feitas sobre seu mecanismo de ação e os demais efeitos bioquímicos e fisiológicos que este composto pode causar nas plantas.

## CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho revelaram que a floretina apresentou efeito fitotóxico em raízes de plântulas de milho, o qual parece ser causado por uma inibição da síntese de ATP pelas mitocôndrias e pela elevada produção de EROs e o consequente estado de estresse oxidativo. Essas informações contribuem para o conhecimento dos efeitos dessa chalcona em plantas e destacam esse aleloquímico como um bom candidato com potencial herbicida. Referente a isso, mais estudos para elucidar o mecanismo de ação e o modo de ação da floretina são de extrema importância.

## REFERÊNCIAS

- Abraham D, Braguini WL, Kelmer-Bracht AM, Ishii-Iwamoto EL. 2000.** Effects of Four Monoterpenes on Germination, Primary Root Growth, and Mitochondrial Respiration of Maize. *Journal of Chemical Ecology* **26**: 611–624.
- Abraham D, Francischini AC, Pergo EM, Kelmer-Bracht AM, Ishii-Iwamoto EL. 2003.** Effects of  $\alpha$ -pinene on the mitochondrial respiration of maize seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**: 985–991.
- Apel K, Hirt H. 2004.** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual review of plant biology* **55**: 373–399.
- 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. *Physiologia Plantarum*.
- Bendall DS, Bonner Jr. WD. 1971.** Cyanide-insensitive Respiration in Plant Mitochondria 1. *Plant Physiology* **47**: 236–245.

- Bender DA. 2003.** OXIDATIVE PHOSPHORYLATION. In: Caballero BBT-E of FS and N (Second E, ed. Oxford: Academic Press, 4295–4301.
- Bergman P, Edqvist J, Farbos I, Glimelius K. 2000.** Male-sterile tobacco displays abnormal mitochondrial atp1 transcript accumulation and reduced floral ATP/ADP ratio. *Plant molecular biology* **42**: 531–544.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt K V. 2003.** Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Annals of Botany* **91**: 179–194.
- Bohmont C, Aaronson LM, Mann K, Pardini RS. 1987.** Inhibition of Mitochondrial NADH Oxidase, Succinoxidase, and ATPase by Naturally Occurring Flavonoids. *Journal of Natural Products* **50**: 427–433.
- Boveris A, Cadenas E, Chance B. 1980.** Low-level chemiluminescence of the lipoxygenase reaction. *Photobiology and Photobiophysics* **1**: 175–182.
- Boyer J, Liu RH. 2004.** Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254.
- Braidot E, Petrusa E, Vianello A, Macri F. 1999.** Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidizing complex I or complex II substrates. *FEBS letters* **451**: 347–350.
- Bu D, Luo H, Huo P, Wang Z, Zhang S, He Z, Wu Y, Zhao L, Liu J, Guo J, et al. 2021.** KOBAS-i: intelligent prioritization and exploratory visualization of biological functions for gene enrichment analysis. *Nucleic Acids Research* **49**: W317–W325.
- Buss GD, Constantin J, de Lima LC, Teodoro GR, Comar JF, Ishii-Iwamoto EL, Bracht A. 2005.** The action of quercetin on the mitochondrial NADH to NAD(+) ratio in the isolated perfused rat liver. *Planta medica* **71**: 1118–1122.
- Cao G, Sofic E, Prior RL. 1997.** Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free radical biology & medicine* **22**: 749–760.
- Chan T, Galati G, O'Brien PJ. 1999.** Oxygen activation during peroxidase catalysed metabolism of flavones or flavanones. *Chemico-biological interactions* **122**: 15–25.
- CHANCE B, WILLIAMS GR. 1955.** A Simple and Rapid Assay of Oxidative Phosphorylation. *Nature* **175**: 1120–1121.
- Cheng F, Cheng Z. 2015.** Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy. *Frontiers in Plant Science*.
- Cobb A, Reade J. 2010.** *Herbicides and Plant Physiology: Second Edition*.
- Colturato CP, Constantin RP, Maeda ASJ, Constantin RP, Yamamoto NS, Bracht A, Ishii-Iwamoto EL, Constantin J. 2012.** Metabolic effects of silibinin in the rat liver. *Chemico-biological interactions* **195**: 119–132.
- Dayan FE, Cantrell CL, Duke SO. 2009.** Natural products in crop protection. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*.
- Dzeja P, Terzic A. 2009.** Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing. *International journal of molecular sciences* **10**: 1729–1772.
- Estabrook RW. 1967.** [7] Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP : O ratios. *Methods in Enzymology*.
- Friis-Møller A, Chen M, Fursted K, Christensen SB, Kharazmi A. 2002.** In vitro antimycobacterial and antilegionella activity of licochalcone A from Chinese licorice roots. *Planta Medica*.
- Furusawa J ichi, Funakoshi-Tago M, Mashino T, Tago K, Inoue H, Sonoda Y,**

- Kasahara T. 2009.** Glycyrrhiza inflata-derived chalcones, Licochalcone A, Licochalcone B and Licochalcone D, inhibit phosphorylation of NF- $\kappa$ B p65 in LPS signaling pathway. *International Immunopharmacology*.
- Giannopolitis C, Ries S. 1977.** Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. *Plant Physiology*.
- Gosch C, Halbwirth H, Stich K. 2010.** Phloridzin: Biosynthesis, distribution and physiological relevance in plants. *Phytochemistry*.
- Gross EM. 2009.** Allelochemical Reactions. In: Encyclopedia of Inland Waters.
- Guzy J, Vašková-Kubálková J, Rozmer Z, Fodor K, Mareková M, Poškrobová M, Perjési P. 2010.** Activation of oxidative stress response by hydroxyl substituted chalcones and cyclic chalcone analogues in mitochondria. *FEBS Letters* **584**: 567–570.
- Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S. 1994.** The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free radical biology & medicine* **16**: 845–850.
- Heap I. 2014.** Global perspective of herbicide-resistant weeds. *Pest management science* **70**: 1306–1315.
- Heath RL, Packer L. 1968.** Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. 2002.** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry* **13**: 572–584.
- Hodnick WF, Bohmont CW, Capps C, Pardini RS. 1987.** Inhibition of the mitochondrial NADH-oxidase (NADH-coenzyme Q oxido-reductase) enzyme system by flavonoids: a structure-activity study. *Biochemical pharmacology* **36**: 2873–2874.
- Hodnick WF, Roettger WJ, Kung FS, Bohmont CW, Pardini RS. 1986.** Inhibition of mitochondrial respiration and production of superoxide and hydrogen peroxide by flavonoids: a structure activity study. *Progress in clinical and biological research* **213**: 249–252.
- Hsiao Y-H, Hsieh M-J, Yang S-F, Chen S-P, Tsai W-C, Chen P-N. 2019.** Phloretin suppresses metastasis by targeting protease and inhibits cancer stemness and angiogenesis in human cervical cancer cells. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* **62**: 152964.
- Jackson C, Dench JE, Hall DO, Moore AL. 1979.** Separation of Mitochondria from Contaminating Subcellular Structures Utilizing Silica Sol Gradient Centrifugation 1. *Plant Physiology* **64**: 150–153.
- Jambunathan N. 2010.** Determination and detection of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and electrolyte leakage in plants. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*.
- De Jonge PC, Wieringa T, Van Putten JP, Krans HM, Van Dam K. 1983.** Phloretin - an uncoupler and an inhibitor of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochimica et biophysica acta* **722**: 219–225.
- Khan MK, Paniwnyk L, Hassan S. 2019.** Polyphenols as Natural Antioxidants: Sources, Extraction and Applications in Food, Cosmetics and Drugs. In: Li Y, Chemat F, eds. Plant Based ``Green Chemistry 2.0``: Moving from Evolutionary to Revolutionary. Singapore: Springer Singapore, 197–235.
- Kim U, Kim C-Y, Lee JM, Oh H, Ryu B, Kim J, Park J-H. 2020.** Phloretin Inhibits the Human Prostate Cancer Cells Through the Generation of Reactive Oxygen Species. *Pathology oncology research : POR* **26**: 977–984.
- Klepinin A, Zhang S, Klepinina L, Rebane-Klemm E, Terzic A, Kaambre T, Dzeja P. 2020.** Adenylate Kinase and Metabolic Signaling in Cancer Cells . *Frontiers in*

*Oncology* **10**.

**Larkin P. 1987.** Calmodulin Levels Are Not Responsible for Aluminium Tolerance in Wheat. *Functional Plant Biology*.

**Liu Y, Fan C, Pu L, Wei C, Jin H, Teng Y, Zhao M, Yu ACH, Jiang F, Shu J, et al. 2016.** Phloretin induces cell cycle arrest and apoptosis of human glioblastoma cells through the generation of reactive oxygen species. *Journal of neuro-oncology* **128**: 217–223.

**Liu N, Zhang N, Zhang S, Zhang L, Liu Q. 2021.** Phloretin inhibited the pathogenicity and virulence factors against *Candida albicans*. *Bioengineered* **12**: 2420–2431.

**Macías FA, Molinillo JMG, Torres A, Varela RM, Castellano D. 1997.** Bioactive flavonoids from *Helianthus annuus* cultivars. *Phytochemistry*.

**Maroli AS, Nandula VK, Dayan FE, Duke SO, Gerard P, Tharayil N. 2015.** Metabolic Profiling and Enzyme Analyses Indicate a Potential Role of Antioxidant Systems in Complementing Glyphosate Resistance in an *Amaranthus palmeri* Biotype. *Journal of agricultural and food chemistry* **63**: 9199–9209.

**Moller IM. 2001.** PLANT MITOCHONDRIA AND OXIDATIVE STRESS: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **52**: 561–591.

**Motani K, Tabata K, Kimura Y, Okano S, Shibata Y, Abiko Y, Nagai H, Akihisa T, Suzuki T. 2008.** Proteomic analysis of apoptosis induced by xanthoangelol, a major constituent of *Angelica keiskei*, in neuroblastoma. *Biological & pharmaceutical bulletin* **31**: 618–626.

**Murad AM, Rech EL. 2012.** NanoUPLC-MSE proteomic data assessment of soybean seeds using the Uniprot database. *BMC Biotechnology* **12**: 82.

**Murphy MP. 2009.** How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal* **417**: 1–13.

**Nabi G, Liu Z-Q. 2012.** Ferrocenyl chalcones: antioxidants or prooxidants in radical-induced oxidation of DNA? *Medicinal Chemistry Research* **21**: 3015–3020.

**Nicholls DG, Ferguson SJ. 2013.** 5 - Respiratory Chains. In: Nicholls DG, Ferguson SJBT-B (Fourth E, eds. Boston: Academic Press, 91–157.

**Oleszek M, Pecio Ł, Kozachok S, Lachowska-Filipiuk Ż, Oszust K, Fraç M. 2019.** Phytochemicals of Apple Pomace as Prospect Bio-Fungicide Agents against Mycotoxigenic Fungal Species-In Vitro Experiments. *Toxins* **11**.

**Orlikova B, Tasdemir D, Golais F, Dicato M, Diederich M. 2011.** Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential. *Genes and Nutrition*.

**Pagare S, Bhatia M, Tripathi N, Pagare S, Bansal YK. 2015.** Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*.

**Popov VN, Simonian RA, Skulachev VP, Starkov AA. 1997.** Inhibition of the alternative oxidase stimulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in plant mitochondria. *FEBS Letters* **415**: 87–90.

**Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. 2011.** Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* **82**: 513–523.

**Rama Devi S, Prasad MNV. 1996.** Ferulic acid mediated changes in oxidative enzymes of maize seedlings: Implications in growth. *Biologia Plantarum*.

**RICE EL. 1984.** Chemical Nature of Allelopathic Agents. In: Allelopathy.

**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. *Journal of Chemical Ecology*.

**Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. 2005.** Polyphenols: antioxidants and beyond.

*The American Journal of Clinical Nutrition* **81**: 215S-217S.

**Sergiev I, Alexieva V, Karanov E. 1997.** Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Proceedings of the Bulgarian Academy of Sciences*.

**Servaites JC, Tucci MA, Geiger DR. 1987.** Glyphosate effects on carbon assimilation, ribulose biphosphate carboxylase activity, and metabolite levels in sugar beet leaves. *Plant physiology* **85**: 370–374.

**Silva WM, Folador EL, Soares SC, Souza GHMFMF, Santos A V., Sousa CS, Figueiredo H, Miyoshi A, Le Loir Y, Silva A, et al. 2017.** Label-free quantitative proteomics of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates reveals differences between *Biovars ovis* and *equi* strains. *BMC Genomics* **18**: 451.

**Smirnoff N. 1998.** Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology* **9**: 214–219.

**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*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*.

**Villén J, Gygi SP. 2008.** The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. *Nature protocols* **3**: 1630–1638.

**Wang L, Li ZW, Zhang W, Xu R, Gao F, Liu YF, Li YJ. 2014.** Synthesis, crystal structure, and biological evaluation of a series of phloretin derivatives. *Molecules*.

**Weir TL, Park S-W, Vivanco JM. 2004.** Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 472–479.

**Wu K-H, Ho C-T, Chen Z-F, Chen L-C, Whang-Peng J, Lin T-N, Ho Y-S. 2018.** The apple polyphenol phloretin inhibits breast cancer cell migration and proliferation via inhibition of signals by type 2 glucose transporter. *Journal of food and drug analysis* **26**: 221–231.

**Yang B, Chen F, Hua Y, Huang S-S, Lin S, Wen L, Jiang Y. 2012.** Prooxidant activities of quercetin, p-coumaric acid and their derivatives analysed by quantitative structure–activity relationship. *Food Chemistry* **131**: 508–512.

**Yen G-C, Duh P-D, Tsai H-L, Huang S-L. 2003.** Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **67**: 1215–1222.

**Zheng J, Ramirez VD. 2000.** Inhibition of mitochondrial proton F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *British journal of pharmacology* **130**: 1115–1123.

**Zhuang C, Zhang W, Sheng C, Zhang W, Xing C, Miao Z. 2017.** Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. *Chemical Reviews*.

**Zimdahl R. 2018.** Chapter 9 - Allelopathy. *Fundamentals of Weed Science (Fifth Edition)*.

Figura 1. Estrutura química da floretina.

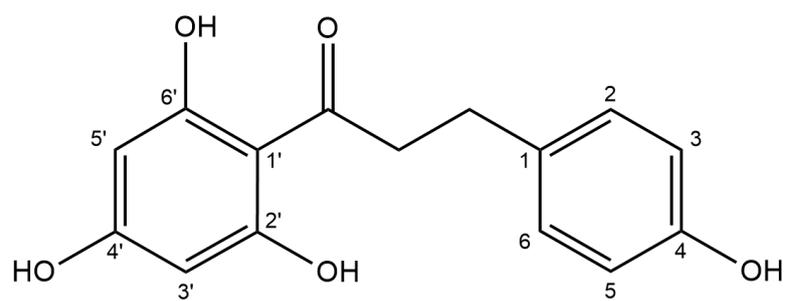


Figura 2. Efeitos de diferentes concentrações de floretina sobre o crescimento inicial das raízes de plântulas de milho. Médias ( $n = 6 \pm \text{EPM}$ ) seguidas por asterisco (\*) são estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnet ( $p \leq 0,05$ ).

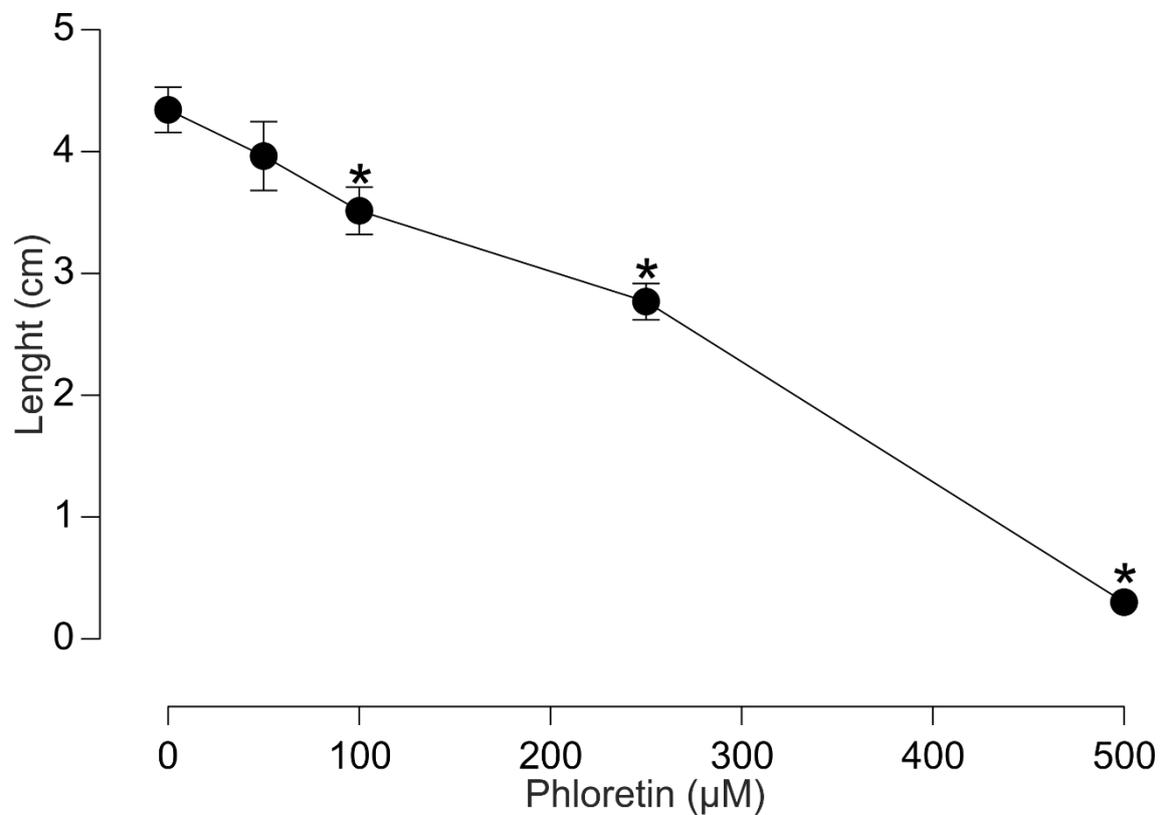


Figura 3. Efeitos de diferentes concentrações de floretina sobre o conteúdo de biomassa fresca e seca de raízes de milho. Médias ( $n = 6 \pm \text{EPM}$ ) seguidas por asterisco (\*) são estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnet ( $p \leq 0,05$ ).

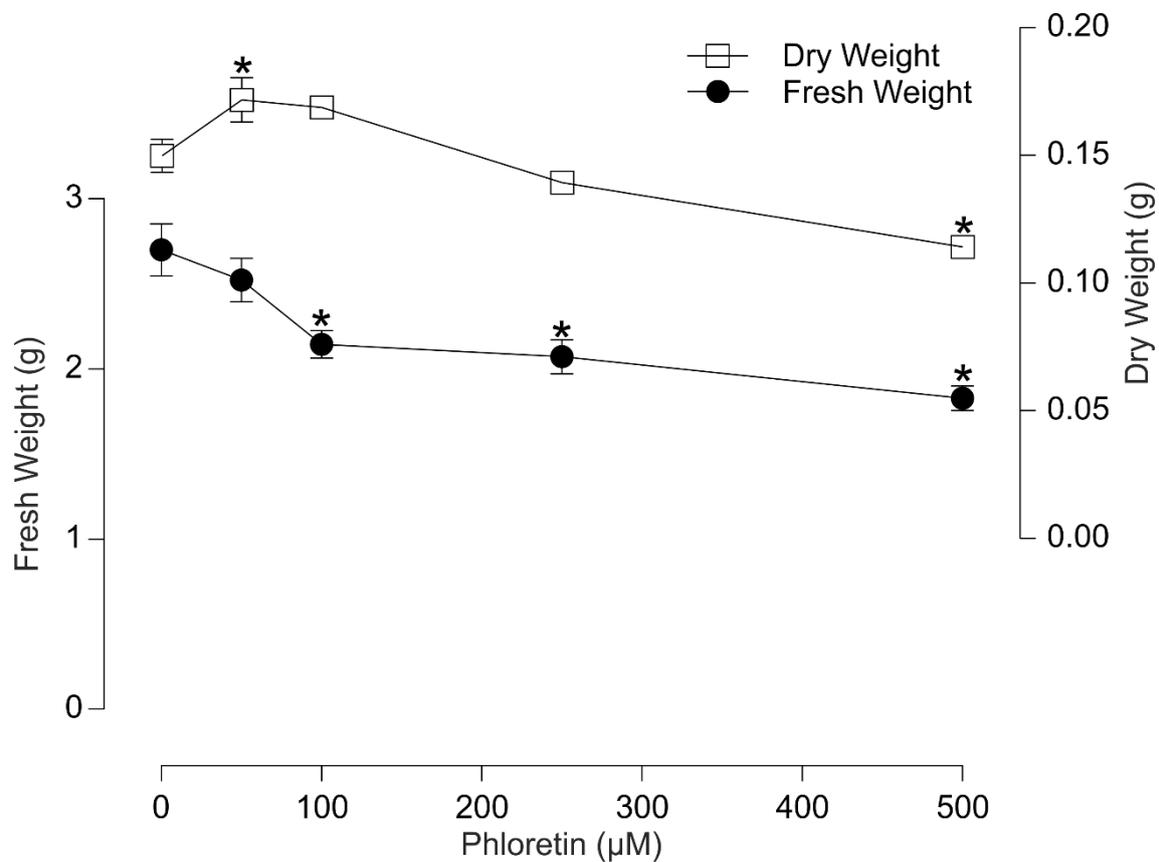


Figura 4. Efeitos de diferentes concentrações de floretina sobre a respiração total, KCN-sensível e KCN-insensível de raízes de milho. Médias ( $n = 6 \pm \text{EPM}$ ) seguidas por asterisco (\*) são estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnet ( $p \leq 0,05$ ).

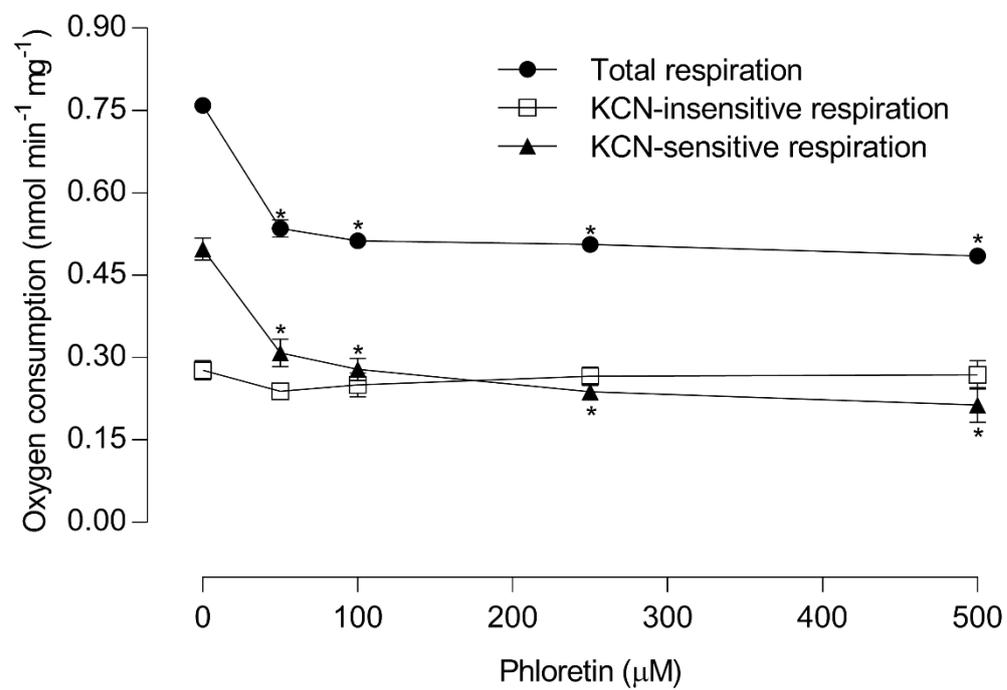


Figura 5. Efeitos de diferentes concentrações de floretina sobre a respiração total, SHAM-sensível e SHAM-insensível de raízes de milho. Médias ( $n = 6 \pm \text{EPM}$ ) seguidas por asterisco (\*) são estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnet ( $p \leq 0,05$ ).

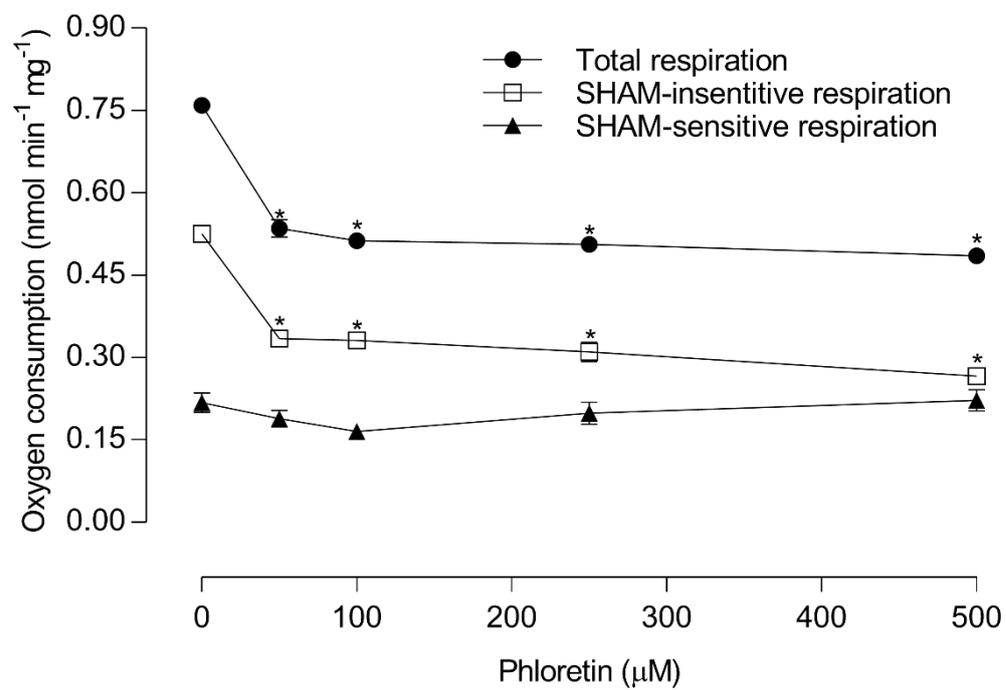


Figura 6. Efeitos da floretina sobre a atividade respiratória de mitocôndrias isoladas de raízes de milho. O consumo de oxigênio foi medido na presença de L-malato 10 mM + NAD<sup>+</sup> 1.0 mM (A), succinato 10 mM + ATP 1,0 mM (B) ou NADH 1,0 mM (C), e na ausência (respiração basal ●), na presença de ADP (estado III □) ou após o consumo de ADP (estado IV ▲). A floretina (50 a 500 μM) foi adicionada antes do substrato. Os painéis D, E e F representam os valores da razão ADP/O e do controle respiratório (RC) calculados dos experimentos das figuras A, B e C, respectivamente. Médias (n = 5 ± EPM) seguidas por asterisco (\*) são estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnet (p ≤ 0,05).

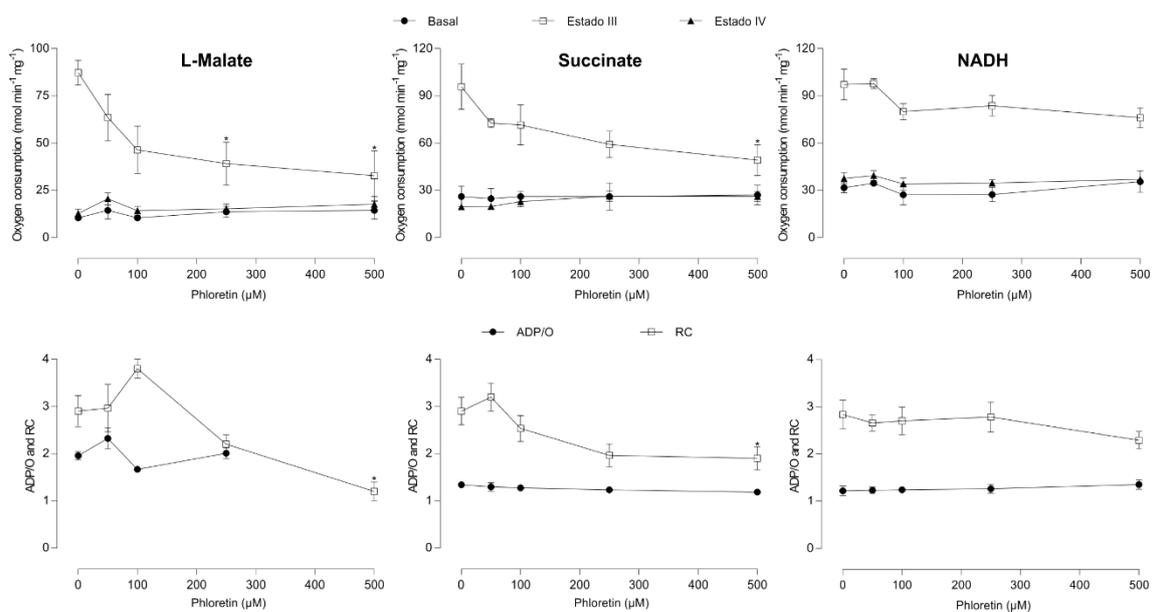


Figura 7. Efeitos de diferentes concentrações de floretina sobre o conteúdo de ATP, ADP e AMP (A) e as razões ATP/ADP e ATP/AMP (B) em raízes de plântulas de milho. Médias ( $n = 4 \pm \text{EPM}$ ) seguidas por asterisco (\*) são estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnet ( $p \leq 0,05$ ).

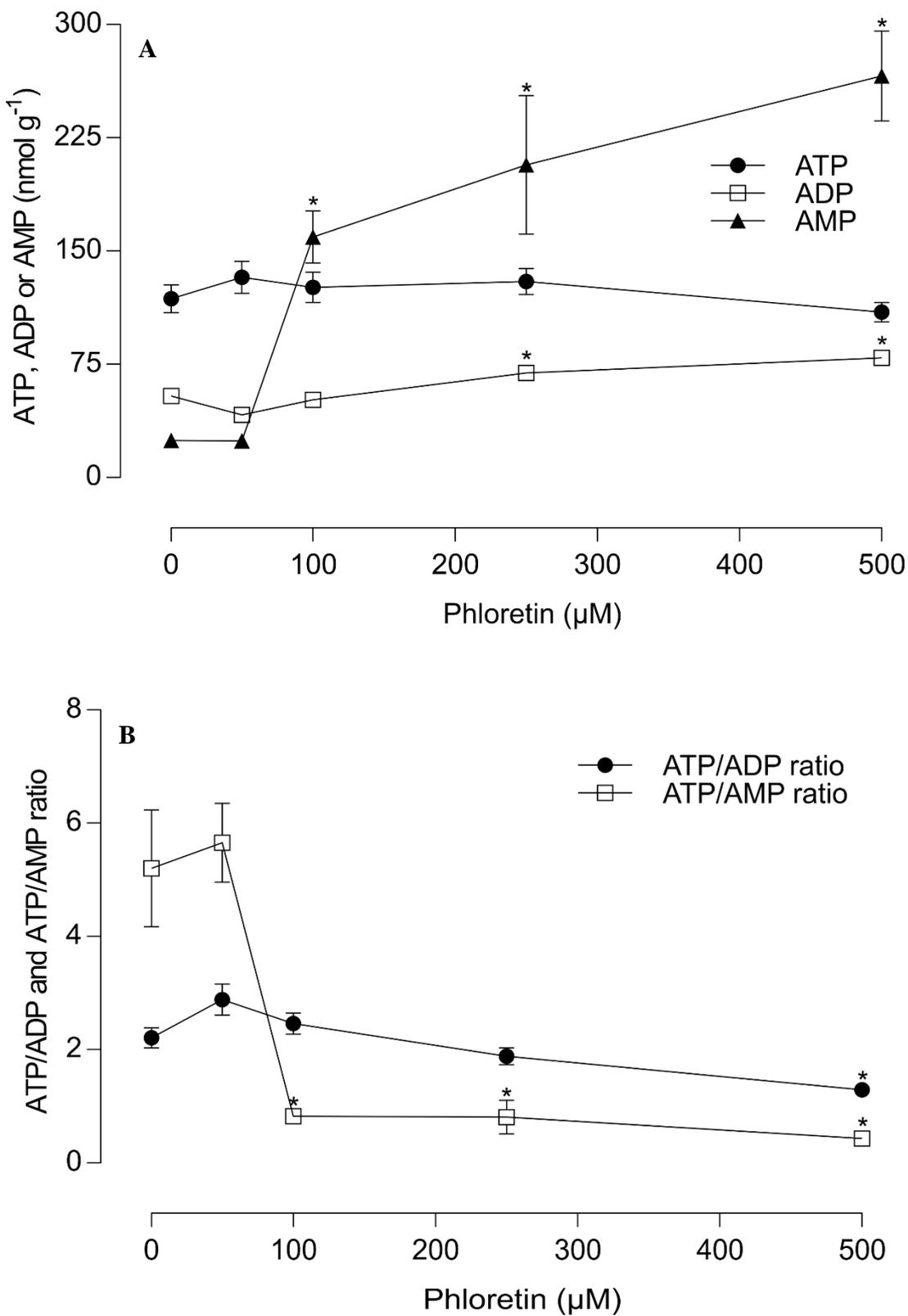


Figura 8. Efeitos de diferentes concentrações de floretina sobre a atividade da CAT, POD e SOD de raízes de milho. Médias ( $n = 6 \pm \text{EPM}$ ) seguidas por asterisco (\*) são estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnet ( $p \leq 0,05$ ).

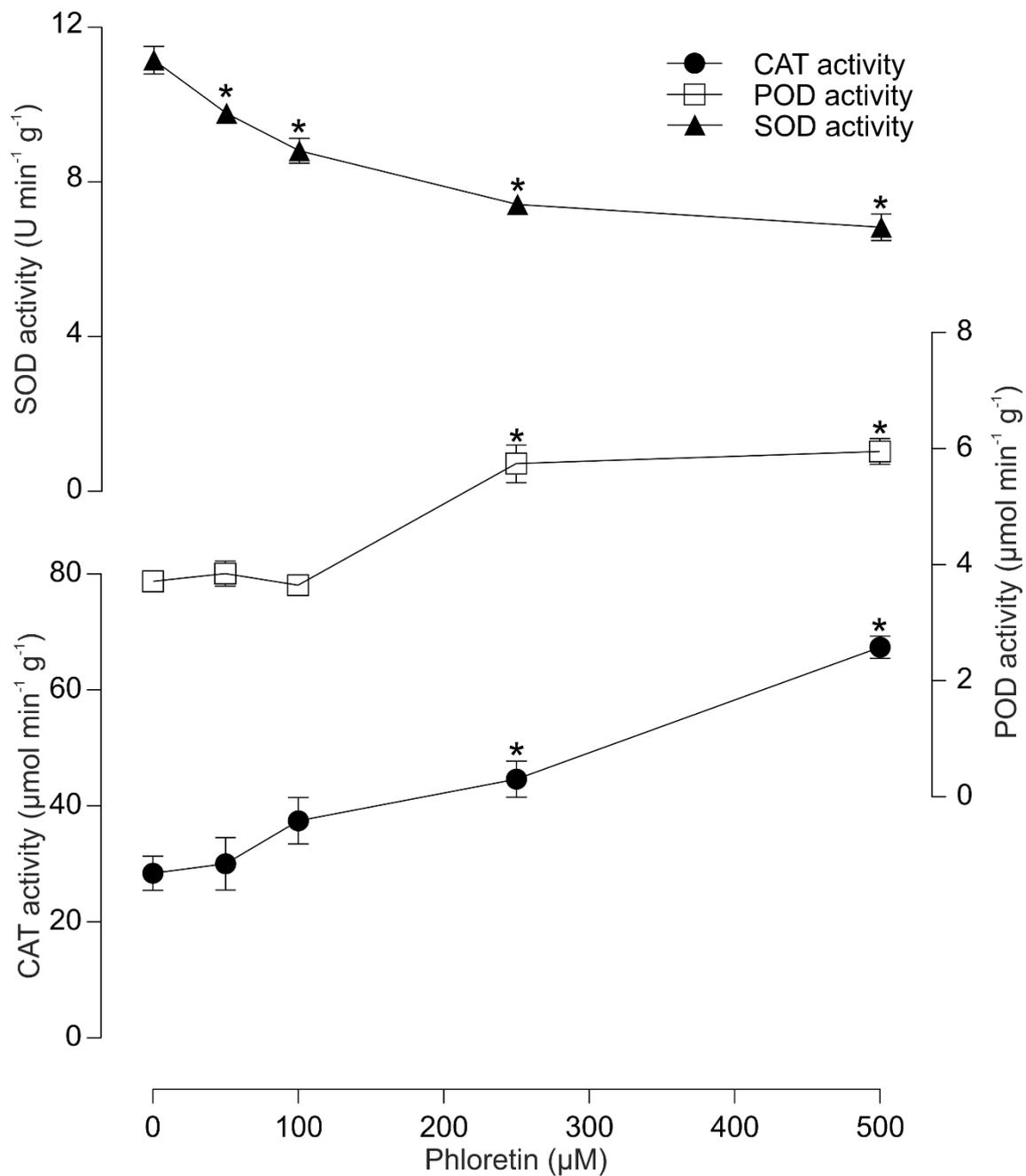


Figura 9. Efeitos de diferentes concentrações de floretina sobre o conteúdo de EROs total em raízes de milho. Médias ( $n = 4 \pm \text{EPM}$ ) seguidas por asterisco (\*) são estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnet ( $p \leq 0,05$ ).

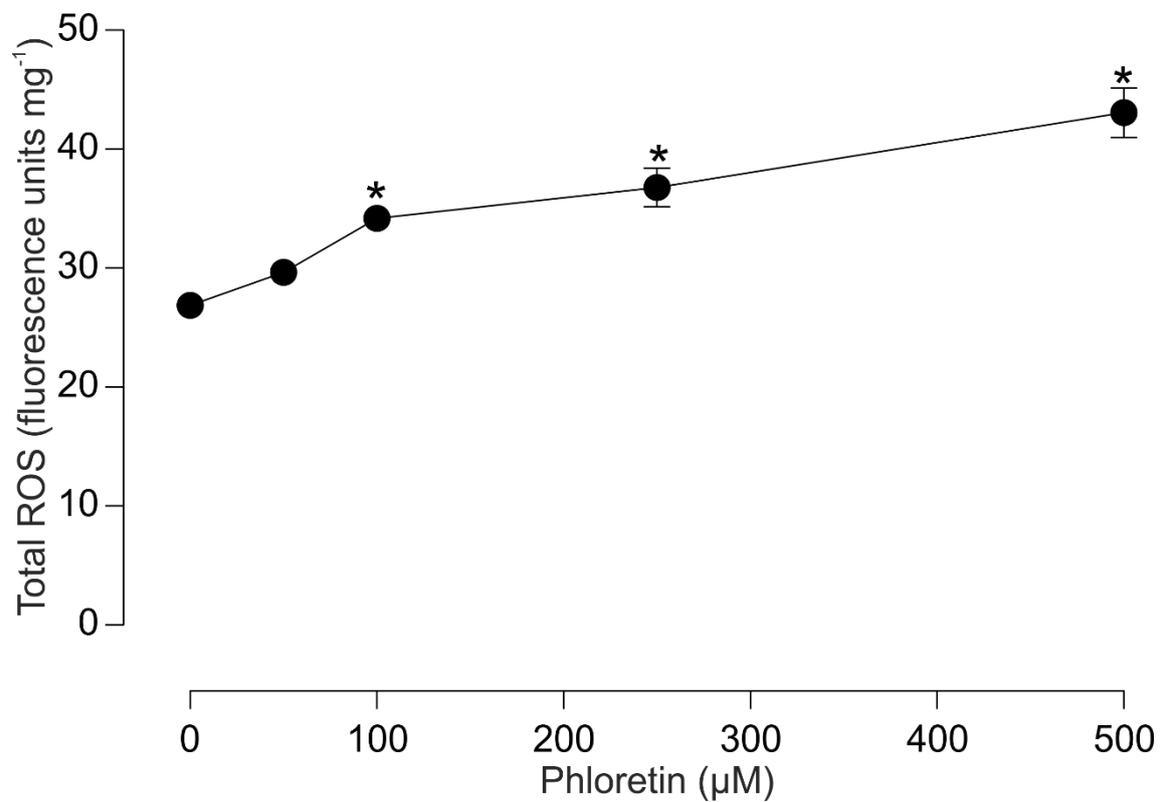


Figura 10. Efeitos de diferentes concentrações de floretina sobre o conteúdo de  $H_2O_2$  em raízes de milho. Médias ( $n = 6 \pm EPM$ ) seguidas por asterisco (\*) são estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnet ( $p \leq 0,05$ ).

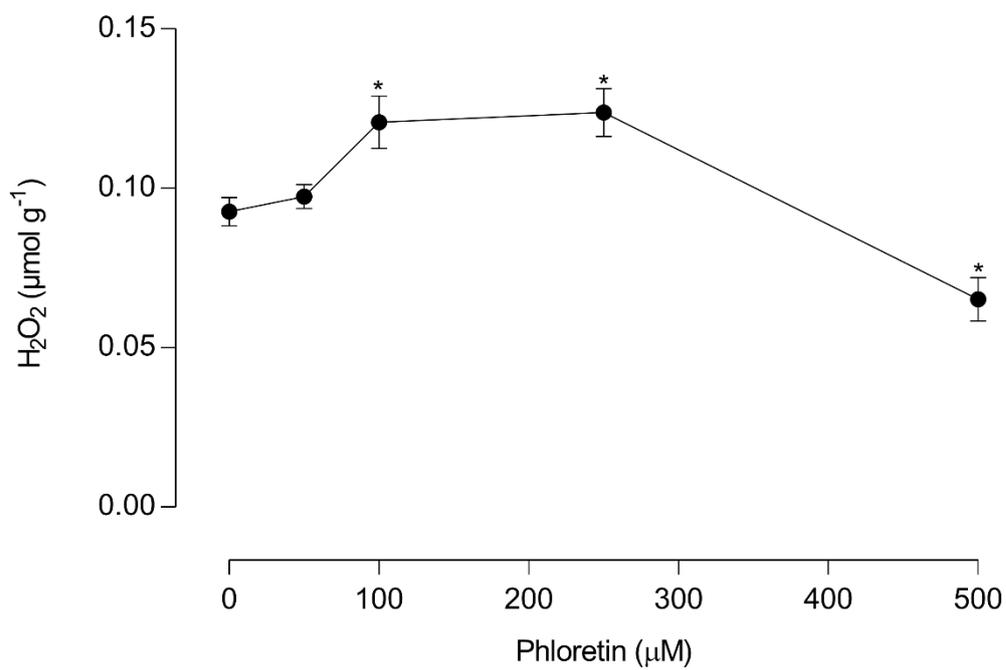


Figura 11. Efeitos de diferentes concentrações de floretina sobre o conteúdo de MDA e dienos conjugados em raízes de milho. Médias ( $n = 6 \pm \text{EPM}$ ) seguidas por asterisco (\*) são estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnet ( $p \leq 0,05$ ).

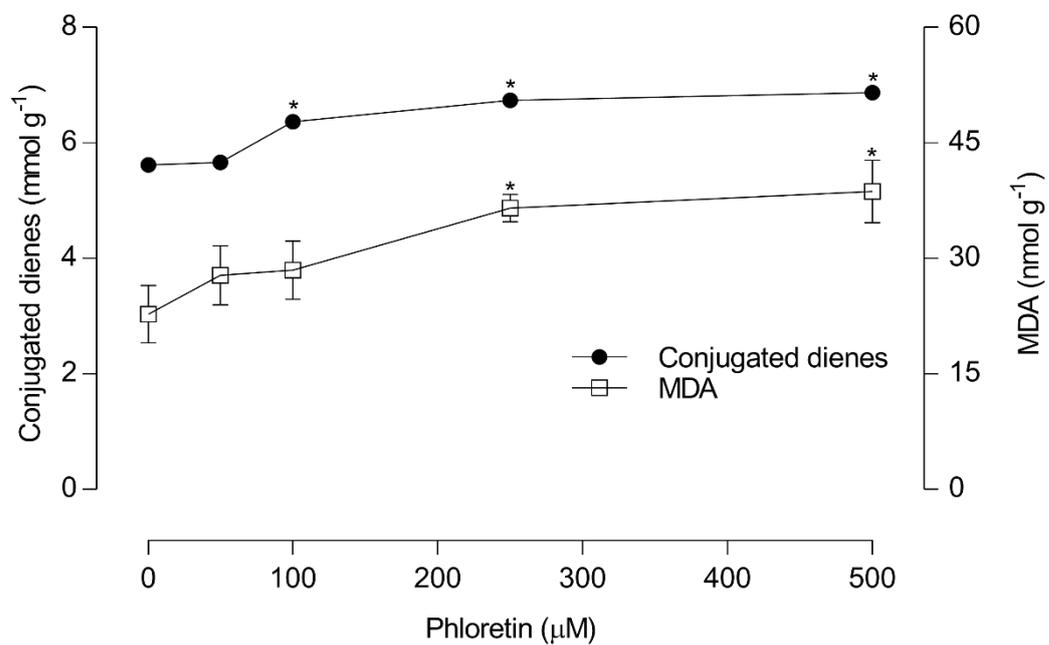


Figura 12. Efeitos das diferentes concentrações de floretina sobre a taxa de oxidação do NADH dependente da catalise da peroxidase. Médias ( $n = 3 \pm \text{EPM}$ ) seguidas por asterisco (\*) são estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste de Dunnet ( $p \leq 0,05$ ).

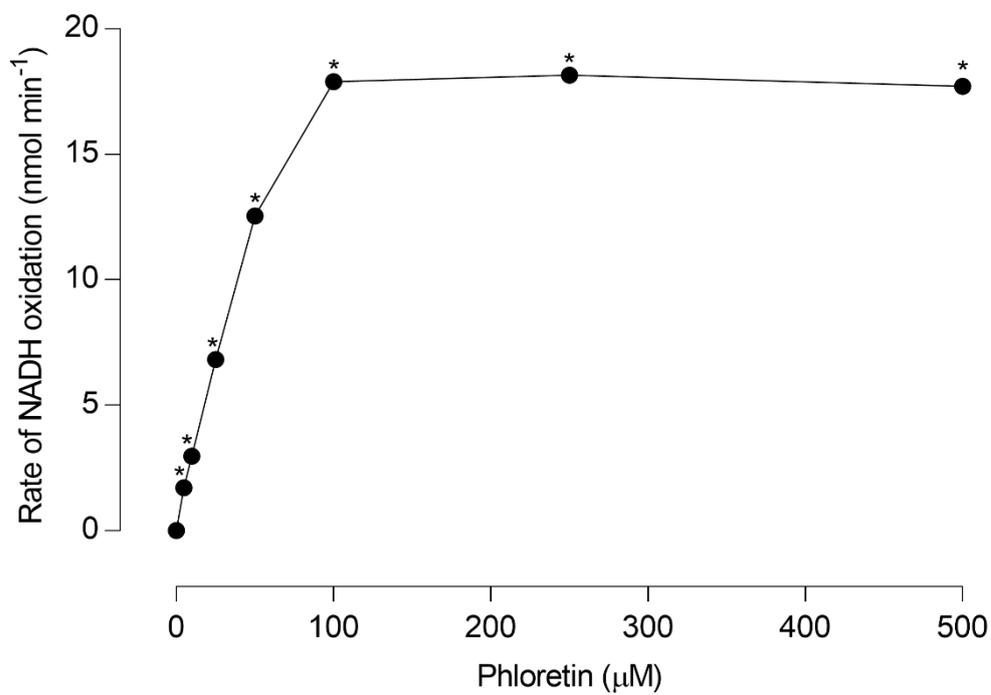


Figura 13. Resumo das alterações no proteoma de raízes de plântulas de milho tratadas com floretina 500  $\mu\text{M}$ . Distribuição das proteínas identificadas no proteoma de raízes de plantas de milho controle e tratadas com floretina representadas pelo diagrama de Venn (A). Número de proteínas significativamente alteradas (B), downreguladas e upreguladas.

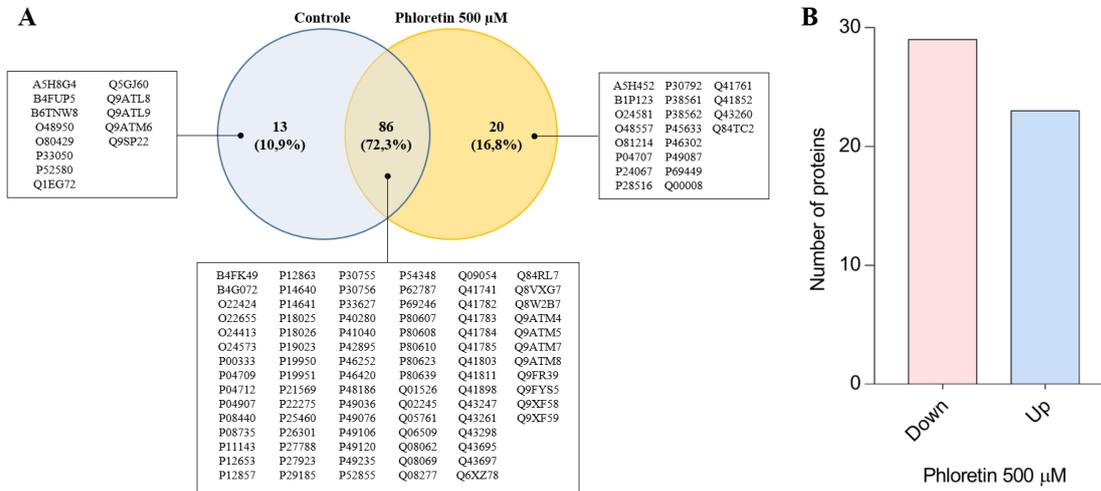


Tabela 1. Proteínas reguladas diferencialmente (upreguladas e downreguladas) entre raízes de plântulas de milho tratadas na ausência (controle) e presença de Floretina 500  $\mu$ M. O pós-processamento de informações foi realizado no KobaS 3.0 (<http://bioinfo.org/kobas/>) e a expressão em ProteinLynx Global SERVERTM (PLGS):Waters.

Acesso (Uniprot)	Descrição	Score	Floretina:Controle Razão Log(e)	Valor P
<b><i>Cytoskeleton proteins (zma0481)</i></b>				
P14640	Tubulin alpha-1 chain	1649,84	0,17	0,99
P14641	Tubulin alpha-2 chain	1604,34	0,21	1
P22275	Tubulin alpha-3 chain	1036,6	0,14	0,96
Q41782	Tubulin beta-4 chain	2253,38	-0,18	0,02
Q41784	Tubulin beta-7 chain	2140,32	-0,29	0
<b><i>Glycolysis/Gluconeogenesis (zma01100)</i></b>				
P08440	Fructose-bisphosphate aldolase cytoplasmic isozyme	12500,45	-0,36	0
P08735	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 cytosolic	5088,44	0,46	1
P42895	Enolase 2	1364,79	-0,41	0
Q09054	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2 cytosolic	5836,16	0,41	1
Q43247	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3 cytosolic	9376,83	0,29	1
<b><i>Starch and sucrose metabolism (zma00500)</i></b>				
P04712	Sucrose synthase 1	828,38	0,33	0,98
Q6XZ78	Fructokinase-2	3467,95	-0,28	0
<b><i>Glutathione metabolism (zma00480)</i></b>				
P04907	Glutathione S-transferase 3	4590,74	-0,18	0,02
P12653	Glutathione S-transferase 1	13000,3	0,18	1
P46420	Glutathione S-transferase 4	715,83	0,86	1
<b><i>Oxidative phosphorylation (zma00190)</i></b>				
P19023	ATP synthase subunit beta mitochondrial	2835,84	0,32	1
Q41898	ATP synthase subunit epsilon mitochondrial	1982,36	1,12	0,99
<b><i>Pyrimidine metabolism (zma00240)</i></b>				
B4FK49	Nucleoside diphosphate kinase 1	4112,44	-0,28	0

<b><i>Pyruvate metabolism (zma00620)</i></b>				
Q08062	Malate dehydrogenase cytoplasmic	3766,94	0,11	0,99
<b><i>Ribosomal proteins (zma03010)</i></b>				
P19950	40S ribosomal protein S14	2046,86	-0,21	0
P19951	40S ribosomal protein S14	1929,43	-0,15	0,03
P46252	60S acidic ribosomal protein P2A	855,74	-1	0
Q05761	40S ribosomal protein S13	4153,97	-0,43	0
<b><i>Chromosome and associated proteins (zma03036)</i></b>				
P30755	Histone H2B.1	7576,77	0,3	1
P30756	Histone H2B.2	8358,54	0,27	1
P40280	Histone H2A	2596,51	-0,69	0
P49120	Histone H2B.4	7498,64	0,29	1
P54348	Histone H2B.5	7518,43	0,29	1
P62787	Histone H4	12053,63	-0,19	0
P69246	Histone H3.2	8723,62	-0,14	0
Q41811	Histone H4.3	12053,63	-0,2	0
Q43261	Histone H2B.3	7326,97	0,31	1
<b><i>DNA repair and recombination proteins (zma03400)</i></b>				
P49106	14-3-3-like protein GF14-6	4035,01	-0,33	0
Q01526	14-3-3-like protein GF14-12	3966,62	-0,35	0
Q41741	Eukaryotic initiation factor 4A	1451,19	0,3	1
Q41803	Elongation factor 1-alpha	3981,41	-0,36	0
<b><i>Transporters (zma02000)</i></b>				
Q84RL7	Aquaporin PIP2-1	1620,19	-1,15	0
Q9ATM4	Aquaporin PIP2-7	1482,6	-0,66	0
Q9ATM5	Aquaporin PIP2-6	3497,09	-1,12	0
Q9ATM7	Aquaporin PIP2-3	3263,2	-0,94	0
Q9ATM8	Aquaporin PIP2-2	1389,51	-1,45	0
Q9XF58	Aquaporin PIP2-5	3272,13	-1,36	0

Q9XF59	Aquaporin PIP1-2	618,32	-1,12	0,02
<hr/>				
<i>Others (unclassified)</i>				
<hr/>				
P41040	Calmodulin	962,34	-1,72	0
P11143	Heat shock 70 kDa protein	1055,76	0,28	1
P21569	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	10713,38	-0,67	0
Q06509	Caffeic acid 3-O-methyltransferase	1376,92	0,18	1
Q08277	Heat shock protein 82	662,79	0,24	0,96
Q8VXG7	Phenylalanine/tyrosine ammonia-lyase	918,41	-0,51	0
<hr/>				

## Resposta fotossintética do milho ao tratamento com phloretin

*Renato Polimeni Constantin<sup>1</sup>, Rodrigo Polimeni Constantin<sup>2</sup>, Wanderley Dantas dos Santos<sup>1</sup>, Osvaldo Ferrarese-Filho<sup>1</sup> e Rogério Marchiosi<sup>1</sup>.*

<sup>1</sup>Laboratório de Bioquímica de Plantas, Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Oxidações Biológicas e Laboratório de Esteatose Experimental, Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil.

### RESUMO

Neste estudo, nós investigamos os efeitos da phloretin sobre o metabolismo fotossintético de uma planta C<sub>4</sub>, o milho. Para isso, realizamos uma análise combinada de sua ação sobre as trocas gasosas e a fluorescência da clorofila *a*, bem como a quantificação do conteúdo de piruvato e clorofila das folhas. As sementes foram germinadas por 72 h e as plântulas foram transferidas para sistemas de hidroponia, os quais foram cultivadas por 14 dias e, depois, foi adicionado a phloretin na concentração de 500µM nas soluções e o tratamento teve duração de 48h. Nossos resultados com milho confirmaram que, de fato, a phloretin afetou os processos fotossintéticos. A *g<sub>s</sub>* reduzida juntamente com a redução no conteúdo de piruvato, restringiram a entrada de CO<sub>2</sub> nos espaços subestomáticos, o que poderia limitar sua assimilação. Adicionalmente, a redução de  $\Phi_{PSII}$  indicou que o fluxo de elétrons no PSII estava comprometido e o CO<sub>2</sub> não estava sendo consumido de forma eficiente pelas plantas submetidas a phloretin.

### INTRODUÇÃO

As plantas daninhas constituem um dos principais empecilhos à produção agrícola, podendo ocasionar perdas de até 80%. Isso porque elas competem com as culturas por recursos naturais tais como luz, água, nutrientes e espaço (Vargas and Roman, 2006). Adicionalmente, problemas como a redução da qualidade e a maturação desuniforme dos grãos também são consequências da presença de plantas daninhas, que em casos extremos, podem até inviabilizar a colheita. Dentre as plantas daninhas que infestam a cultura da soja destaca-se a corda-de-viola (*Ipomoea* spp.), amendoim-bravo ou leiteiro (*Euphorbia heterophylla*), capim-marmelada (*Brachiaria plantaginea*), grama-seda (*Cynodon dactylon*), caruru (*Amaranthus retroflexus*) e capim-amargoso (*Digitaria insularis*). A presença de corda-de-viola, capim-amargoso, azevém (*Lolium perenne*) e buva (*Conyza* spp.) tem se tornado comum principalmente em lavouras de soja transgênica, nas quais essas espécies são selecionadas devido à tolerância ao glifosato

(Carvalho et al., 2010; Vargas and Roman, 2006). Isso mostra que apesar do sucesso de controle das plantas daninhas obtido com os herbicidas, algumas espécies naturalmente tolerantes desenvolveram resistência à determinados mecanismos de ação.

A seleção de biótipos resistentes apresentado por algumas plantas daninhas é ocasionado pela persistente aplicação ou uso indiscriminado de um dado herbicida sobre uma população (Burnside, 1992). Dessa forma, plantas que expressam uma dada característica que a habilita crescer na presença do herbicida podem tornar-se a população dominante (Powles, 2008). Adicionalmente, a pequena diversidade de herbicidas utilizando um reduzido número de mecanismos de ação está aumentando a ocorrência de resistência aos herbicidas (Lein et al., 2004). É importante ressaltar que a sensibilidade a um dado herbicida varia muito entre as espécies de plantas daninhas, sendo algumas naturalmente tolerantes. Um exemplo é a *Ipomoea* spp., que nunca foi controlada pelo glifosato (Vargas and Roman, 2006).

A seleção de plantas daninhas resistentes a herbicidas vem sendo descrito desde 1957 e, atualmente, estima-se que existam 300 biótipos que apresentam resistência para algum mecanismo de ação. Os herbicidas do grupo das triazinas e inibidores da acetolactato sintase (ALS) são os que apresentam o maior número de casos de resistência, o que está relacionado ao fato de estes herbicidas serem aplicados em grandes áreas e também por serem muito específicos e eficientes (Vargas and Roman, 2006). Por outro lado, herbicidas inibidores da protoporfirinogênio oxidase (PROTOX) são os que apresentam, até o momento, o menor número de espécies resistentes, embora as razões para isso não estejam bem estabelecidas (Vargas and Roman, 2006). O problema do surgimento de espécies resistentes a herbicidas é agravado pelo fato de surgirem biótipos resistentes a mais de um mecanismo de ação, o que tem limitado as formas de controle disponíveis para algumas espécies (CHRISTOFFOLETI et al., 1994). Juntos, esses fatos sugerem que a procura por novas moléculas ativas ou mecanismos de ação constituem assunto de fundamental importância, que pode ser essencial para o controle de plantas daninhas nos sistemas agrícolas e necessário para alcançar maiores rendimentos na produção agrícola.

O caso da resistência do capim-amargoso (*Digitaria insularis*) ao glifosato merece especial atenção. O capim-amargoso é uma espécie nativa de regiões tropicais e subtropicais da América, onde é frequentemente encontrado em pastagens, cafezais, pomares e em áreas rurais como beira de estradas e terrenos baldios (Machado et al., 2008). Especificamente no caso do capim-amargoso, o principal problema tem sido a

seleção de biótipos resistentes ao glifosato, um dos mais importantes herbicidas do sistema de produção de grãos.

Nas últimas décadas, principalmente após o advento do sistema de plantio direto, esta espécie vem apresentando maior relevância dentro da agricultura, sendo este aumento de ocorrência relacionado às suas características de agressividade. Entre elas destaca-se a capacidade de formação de rizomas, que apesar de curtos são bem evidentes, formando notáveis touceiras e a capacidade de disseminação de propágulos (sementes) praticamente durante todo o ano (Kissmann and Groth, 1995). As sementes desta espécie são revestidas por muitos pelos, os quais auxiliam sua dispersão a longas distâncias o que, aliado ao grande percentual germinativo, permite que essa planta se dissemine com grande facilidade (de Mendonça et al., 2014; Kissmann and Groth, 1995; Mondo et al., 2010). É uma espécie de gramínea de ciclo perene com metabolismo fotossintético do tipo C<sub>4</sub> (Kissmann and Groth, 1995), porém apresenta crescimento inicial lento até 45 dias após a emergência (DAE). Dos 45 aos 105 DAE o seu crescimento é acelerado, apresentando aumento exponencial de matéria seca. Na fase de crescimento exponencial, parte do incremento de massa seca das raízes a partir dos 45 DAE se deve à formação dos rizomas (Gemelli et al., 2012). Em comparação com outras 18 espécies de gramíneas, o capim-amargoso apresenta o maior potencial competitivo em relação às espécies cultivadas, especialmente em função do seu rápido crescimento (Carvalho et al., 2010). Quando em competição com a soja e o milho, por exemplo, a interferência do capim-amargoso pode reduzir a produtividade em até 32% e 44%, respectivamente (GAZZIERO et al., 2012; Gemelli et al., 2012).

Plantas que utilizam a via fotossintética C<sub>4</sub> são altamente representadas como as piores plantas daninhas do mundo, com apenas quatro espécies de plantas C<sub>4</sub> sendo agriculturalmente produtivas (milho, sorgo, milheto e cana-de-açúcar). Nestas plantas, o ciclo C<sub>4</sub> funciona como um apêndice do metabolismo C<sub>3</sub>. Dessa forma, as enzimas suplementares envolvidas na fotossíntese C<sub>4</sub> representam um alvo atrativo para o desenvolvimento de herbicidas seletivos para plantas daninhas C<sub>4</sub> (Doyle et al., 2005). Existem três variações do metabolismo C<sub>4</sub>, e as plantas C<sub>4</sub> foram classificadas em três grupos de acordo com a reação de descarboxilação localizada nas células da bainha do feixe vascular. Independentemente do mecanismo de descarboxilação, as enzimas piruvato ortofosfato dicinase (PPDK) e fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) são cruciais para o funcionamento do metabolismo C<sub>4</sub>. Nas plantas contendo enzima NADP-málica, a PPDK catalisa a conversão do piruvato em fosfoenolpiruvato. Após a anidrase

carbônica catalisar a hidratação do CO<sub>2</sub> atmosférico em bicarbonato, a PEPC catalisa a carboxilação do fosfoenolpiruvato para produzir o oxaloacetato. Este é convertido rapidamente em malato pela malato desidrogenase e subseqüentemente transportado para o interior dos cloroplastos das células envoltórias do feixe vascular (Buchanan et al., 2015; Nelson and Cox, 2013; Taiz and Zeiger, 2010). A descarboxilação do malato pela enzima NADP-málica produz CO<sub>2</sub>, que é posteriormente fixado pela Rubisco e incorporado na via C<sub>3</sub>. Desse modo, a interrupção do ciclo do ácido C<sub>4</sub> deverá afetar negativamente a fotossíntese total em plantas C<sub>4</sub>.

A PPDK catalisa um passo limitante da velocidade no ciclo C<sub>4</sub>, fazendo-se um alvo extremamente atrativo para o desenvolvimento de herbicidas seletivos que bloqueiem o crescimento de plantas daninhas C<sub>4</sub>. Além disso, esta enzima não foi, até o momento, descrita em animais, reduzindo a probabilidade de que compostos inibidores da PPDK tenham efeitos toxicológicos adversos ou mesmo impactos ambientais (Doyle et al., 2005). Tentativas anteriores que visaram desenvolver um herbicida seletivo para plantas C<sub>4</sub> envolveram a concepção de análogos estruturais de substratos de enzimas do ciclo C<sub>4</sub> (Jenkins, 1989). O único composto relatado que inibiu especificamente uma enzima do metabolismo C<sub>4</sub> foi o 3,3-dicloro-2-(di-hidroxifosfinoilmetil)-propenoato (DCDP), que atua sobre a PEPC. Infelizmente, este composto não apresentou nenhum efeito sobre o crescimento de plantas C<sub>4</sub>. No entanto, inibir enzimas específicas do metabolismo C<sub>4</sub> continua sendo uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novos herbicidas. Por exemplo, plantas C<sub>4</sub> modificadas para diminuir os níveis de PPDK ou PEPC foram incapazes de sobreviver, a menos que crescidas em condições de alto CO<sub>2</sub> para compensar a inatividade destas enzimas (Maroco et al., 1998). Dessa forma, compostos que inibam especificamente PPDK ou PEPC podem funcionar como um herbicida eficiente e seletivo, impedindo efeitos deletérios de plantas daninhas C<sub>4</sub> em culturas C<sub>3</sub>. Com o objetivo de explorar esse potencial, o presente estudo procurou avaliar os efeitos da phloretin sobre a fotossíntese do milho.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Material vegetal e procedimentos gerais*

Sementes de milho (*Zea mays* L.), cv. IPR-164, foram esterilizadas com hipoclorito de sódio (NaClO) a 2%, lavadas abundantemente com água deionizada e germinadas no escuro a 25° C entre duas folhas de papel Germitest<sup>®</sup> previamente

umedecidos. Plântulas uniformes com 72 h de desenvolvimento foram selecionadas e transferidas para os sistemas de hidroponia contendo 200 mL de solução nutritiva de Dong com um quarto da força iônica. Os sistemas contendo as plantas foram mantidos por 16 dias em sala de crescimento com temperatura de 25° C, fotoperíodo de 12h/12h (claro/escuro) e uma irradiância de 300  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). A phloretin foi dissolvida nas soluções hidrop\u00f4nicas na concentra\u00e7\u00e3o final de 500  $\mu\text{M}$  no 14\u00b0 dia, totalizando 48 h de tratamento.

#### *Crescimento, biomassa fresca e seca*

As pl\u00e2ntulas obtidas ao termino de 72 h foram transferidas para os sistemas de hidroponia. Ao final do 16\u00b0 dia, as plantas foram retiradas dos sistemas e as ra\u00edzes e as partes a\u00e9reas foram submetidas a avalia\u00e7\u00e3o biom\u00e9trica. O tamanho da planta foi determinado da base do caule at\u00e9 a \u00faltima folha e da extremidade da raiz at\u00e9 a base do caule. Al\u00e9m disso, foram determinados os valores das biomassas fresca e seca utilizando uma balan\u00e7a anal\u00edtica. Os resultados foram expressos em cm para o tamanho e em g para as biomassas fresca e seca.

#### *Determina\u00e7\u00e3o do conte\u00fado end\u00f3geno de piruvato*

O conte\u00fado end\u00f3geno de piruvato foi determinado nas folhas de plantas de milho 48 h ap\u00f3s o tratamento com phloretin. Para isso, foi utilizado o m\u00e9todo da enzima lactato desidrogenase (Bernt and Hess, 1965), monitorando-se espectrofotometricamente o desaparecimento do NADH a 340 nm.

#### *An\u00e1lise combinada dos par\u00e2metros de trocas gasosas e fluoresc\u00eancia da clorofila a*

Os par\u00e2metros avaliados de trocas gasosas e fluoresc\u00eancia da clorofila *a* foram obtidos a partir de plantas adultas cultivadas em hidroponia por 16 dias em ambiente com temperatura e umidade controlados, seguindo o mesmo protocolo experimental de cultivo e tratamento descritos no t\u00f3pico anterior. Todas as medidas foram realizadas no 16\u00b0 dia na mesma por\u00e7\u00e3o foliar da 2\u00b0 folha com l\u00edgula expandida bem definida de no m\u00ednimo seis plantas para cada tratamento (0 e 500  $\mu\text{M}$ ).

Estes par\u00e2metros foram analisados por meio da combina\u00e7\u00e3o entre medi\u00e7\u00f5es de trocas gasosas e fluoresc\u00eancia multifase utilizando-se do sistema port\u00e1til de fotoss\u00edntese com fluor\u00f4metro acoplado Li-6800-F2 (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA). As medidas de trocas gasosas foram realizadas entre \u00e0s 7:00 e 12:00 h. A metodologia foi adaptada para

plantas C<sub>4</sub> com base em Galazzi (Galazzi, 2011), de Sousa (de Sousa, 2012), Loriaux et al. (Loriaux et al., 2013), Moualeu-Ngangue (Moualeu-Ngangue et al., 2017), Chen & Stützel (Moualeu-Ngangue et al., 2017), Moriwaki (Moriwaki et al., 2019) e Zhou, Akçay & Helliker (Zhou et al., 2019).

A taxa de assimilação do CO<sub>2</sub> ( $A$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a transpiração ( $E$ ,  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e a concentração intercelular de CO<sub>2</sub> ( $C_i$ ,  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ) foram mensuradas a partir da curva de resposta à luz [2500, 2000, 1750, 1500, 1250, 1000, 750, 500, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25 e 0  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA)]. As condições da câmara foliar foram controladas para manter o CO<sub>2</sub> em concentração próxima à ambiente (400  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ). A partir das curvas de resposta à luz foram calculados o rendimento quântico da fotossíntese ( $\alpha$ ) [ $(\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1})/(\mu\text{mol fóton m}^{-2} \text{ s}^{-1})$ ], assimilação máxima de CO<sub>2</sub> ( $A_{\text{máx}}$ ), o ponto de compensação da luz ( $P_{\text{comp}}$ ), o ponto de saturação da luz ( $P_{\text{sat}}$ ) e a taxa de respiração ( $R_d$ ). Estes parâmetros foram estimados utilizando os modelos matemáticos linear e hiperbólico (Machado et al., 2005; Moriwaki et al., 2019).

As curvas de resposta ao CO<sub>2</sub> ( $A/c_i$ ) para as espécies de plantas C<sub>4</sub> foram realizadas conforme proposto por Zhou et al. (Zhou et al., 2019) e Sharkey et al. (Sharkey et al., 2007), respectivamente. Para determinação dos parâmetros de velocidade máxima de carboxilação da ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) ( $V_{\text{cmáx}}$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), taxa de transporte de elétrons fotossintéticos ( $J$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e velocidade máxima de carboxilação da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEP carboxilase) ( $V_{\text{pmáx}}$ ,  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) foram definidos os pontos de concentração de CO<sub>2</sub> como 400, 200, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1200, 1400, 1600 e 1800  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  sob intensidade luminosa de 1400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Em cada ponto, os dados foram registrados após adaptação por 60 a 120 s.

Juntamente com as medições de trocas gasosas, as medidas de fluorescência da clorofila *a* foram realizadas utilizando a abordagem de flash multifásico descrita por Loriaux et al. (Loriaux et al., 2013) com adaptações. O flash foi ajustado para luz vermelha saturante igual a 8000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , com três fases de 300 ms de comprimento cada e profundidade da rampa de 25%. Após 10 h de adaptação ao escuro foram determinadas a fluorescência inicial ( $F_0$ ), a fluorescência máxima ( $F_m$ ) e o rendimento quântico máximo do fotossistema II (PSII) ( $F_v/F_m$ ), onde  $F_v$  corresponde à diferença entre  $F_m$  e  $F_0$  (Marchiosi et al., 2016). Nas condições adaptadas à luz, após 25 a 30 min de aclimação por planta, foram mensurados em conjunto com as análises de trocas gasosas

os seguintes parâmetros: eficiência quântica fotoquímica efetiva ( $F_v'/F_m'$ ), rendimento quântico efetivo ( $\phi_{PSII}$ ), taxa de transporte de elétrons no PSII (ETR), *quenching* fotoquímico (qP) e *quenching* não-fotoquímico (NPQ) (Galazzi, 2011; Genty et al., 1989). Estes parâmetros foram determinados sob uma DFFFA de  $1400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  em condições de concentração de  $\text{CO}_2$  mantidas na câmara foliar a  $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ ). Todas as avaliações foram realizadas utilizando uma cabeça sensora com câmara foliar de  $2 \text{ cm}^2$ , temperatura de  $27^\circ\text{C}$  (espécies  $\text{C}_4$ ) e déficit de pressão de vapor controlado entre o ar e a folha (DPV) em  $0,2 \text{ KPa}$  com vazão de  $700 \mu\text{mol s}^{-1}$ .

#### *Quantificação de pigmentos fotossintéticos*

A determinação dos teores de clorofilas e carotenoides foi realizada de acordo com Lichtenthaler (Lichtenthaler, 1987). O índice SPAD foi determinado usando um clorofilômetro (SPAD-502, Konica Minolta, Ramsey, EUA).

#### *Análise estatística*

Os dados foram expressos como média dos experimentos independentes  $\pm$  erro padrão da média e as repetições variaram por metodologia, sempre considerando um mínimo de quatro parcelas experimentais para cada condição (controle e tratado). A análise de variância foi realizada para testar a significância das diferenças observadas usando o pacote de software GraphPad Prism<sup>®</sup> (versão 7.0 GraphPad Software Inc., EUA). As diferenças entre os parâmetros foram avaliadas pelo teste de comparação t de student e os valores de  $p \leq 0,05$  considerados estatisticamente significativos.

## **RESULTADOS**

#### *Efeitos da phloretin sobre o crescimento, biomassa fresca e seca de plantas de milho*

A figura 1 mostra os efeitos do tratamento de phloretin sobre o crescimento das raízes e das partes aéreas em plantas de milho, cultivadas em hidroponia por 16 dias e tratadas com phloretin durante 48 h. Quando comparados com o controle, o tratamento ( $500 \mu\text{M}$ ) foi capaz de causar uma redução significativa de 23,50% no crescimento das raízes do milho. Por outro lado, a parte aérea não teve seu tamanho afetado pelo tratamento.

Os efeitos do tratamento com phloretin sobre o conteúdo de biomassa fresca e seca podem ser observados na figura 2. A concentração de  $500 \mu\text{M}$  foi capaz de causar

uma redução significativa no conteúdo de biomassa fresca e seca, diminuindo cerca de 29,11% e 30,71%, respectivamente. Entretanto, a phloretin não causou nenhuma alteração na biomassa (fresca e seca) das partes aéreas do milho.

#### *Efeitos da phloretin sobre o conteúdo endógeno de piruvato em folhas de milho*

A figura 3 mostra o conteúdo endógeno de piruvato em folhas de milho 24 h após o tratamento com phloretin 500  $\mu\text{M}$ . O tratamento foi capaz de reduzir o conteúdo de piruvato endógeno em 36,13%.

#### *Efeitos da phloretin sobre as trocas gasosas de plantas milho*

Os efeitos da phloretin sobre os parâmetros fotossintéticos podem ser observados na figura 4. A exposição de plantas de milho à 500  $\mu\text{M}$  de phloretin durante 48 h reduziu significativamente a taxa fotossintética ( $A$ ), a condutância estomática ( $g_s$ ), a transpiração ( $E$ ) e a concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), no ponto de máxima saturação pela luz (2000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e sob condição de  $\text{CO}_2$  ambiente (400  $\mu\text{mol mol}^{-1}$ ). Nessas condições,  $A$  foi reduzido em 32,65%,  $g_s$  em 39,22%,  $E$  em 36,49% e  $C_i$  em 25,76% em relação ao controle.

A tabela 1 mostra diversos parâmetros fotossintéticos determinados em plantas de milho expostas a phloretin 500  $\mu\text{M}$ , sob condições de  $\text{CO}_2$  ambiente, calculados através de ajustes lineares e não lineares das curvas de resposta à luz. Quando em comparação com o controle, não foram verificadas diferenças significativas em  $R_D$  (respiração no escuro) de plantas tratadas plantas controle. No entanto, podemos observar uma redução significativa na taxa fotossintética máxima ( $P_{N\text{max}}$ ) em 25,99% e uma redução de 27,92% no rendimento quântico da fotossíntese ( $\alpha$ ). Por fim, a tabela nos mostra que houve um aumento significativo de 53,12% no ponto de compensação de luz ( $I_{\text{comp}}$ ) nas plantas tratadas com phloretin.

#### *Efeitos da phloretin sobre os parâmetros de fotossíntese $C_4$*

Outro achado relevante do presente estudo foi a redução de alguns parâmetros da fotossíntese  $C_4$  ( $J$  e  $g_m$ ), calculados a partir das curvas  $A/c_i$ , nas plantas de milho expostas a phloretin. O  $J$  e o  $g_m$  foram reduzidas em 47,7% e 61,01%, respectivamente, após exposição das plantas à 500  $\mu\text{M}$  de phloretin (figura 5). Por outro lado, não foram verificadas alterações significativas na  $V_{c\text{máx}}$  e na  $V_{p\text{máx}}$  no tratamento com a phloretin em relação as plantas controle.

### *Efeitos da phloretin na emissão de fluorescência a com pulso modulado*

Nossos dados revelaram que o tratamento com phloretin não alterou significativamente os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* determinados em plantas de milho adaptadas ao escuro. A fluorescência inicial ( $F_0$ ), fluorescência máxima ( $F_m$ ) e, conseqüentemente, a razão  $F_v/F_m$  não sofreram alterações após o tratamento com phloretin 500  $\mu\text{M}$  (figura 6).

Os parâmetros relacionados à fluorescência da clorofila *a* em plantas adaptadas à luz foram analisados sob condições de  $\text{CO}_2$  ambiente (figura 6). O  $\phi\text{PSII}$  e o ETR foram reduzidos em 31,06% e 31,18%, respectivamente.

Os *quenchings* fotoquímico (qP) e não fotoquímico (NPQ) também foram avaliados (figura 7) e apenas o qP respondeu ao tratamento com phloretin 500  $\mu\text{M}$ , sendo reduzido significativamente em 22,08% quando comparados com o controle. O teor de clorofila verificado através do índice SPAD (figura 7) também não sofreu alterações pelo tratamento com a phloretin.

## **DISCUSSÃO**

De modo geral, nossos dados revelaram que a phloretin reduziu o crescimento das raízes e a fotossíntese de plantas de milho. Curvas de resposta à luz e ao  $\text{CO}_2$  ( $A/c_i$ ), bem como análise da fluorescência da clorofila *a* em plantas adaptadas à luz e ao escuro, sugeriram que a phloretin reduziu a fotossíntese através de uma interferência no transporte de elétrons pelos fotossistemas e devido à uma limitação na abertura estomática. Por conseguinte, essa diminuição da capacidade fotossintética da planta pode ser responsável pela redução do crescimento das raízes do milho.

Curvas de resposta à luz constituem uma valiosa ferramenta para investigar as propriedades fotossintéticas das folhas. Elas descrevem um comportamento hiperbólico da taxa de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ) como uma função do aumento da densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFA) (Lambers and Oliveira, 2019; Lobo et al., 2013). Quando a DFFA é igual a zero, nenhum  $\text{CO}_2$  pode ser assimilado e a taxa de respiração no escuro ( $R_D$ ) pode ser estimada. Sob baixas intensidades luminosas, incrementos da DFFA resultam em aumento linear da  $A$ , uma região da curva na qual a fotossíntese é limitada pelo transporte de elétrons impulsionados pela luz. Nesta região é possível encontrar o  $I_{comp}$ , que corresponde ao ponto no qual a taxa de  $\text{CO}_2$  assimilado pela fotossíntese se iguala à quantidade de  $\text{CO}_2$  liberado pela respiração. Em adição, a

inclinação da reta revela o rendimento quântico da fotossíntese ( $\alpha$ ). Sob altas DFFA, observa-se um platô no qual a fotossíntese é dita saturada pela luz ( $P_{Nmax}$ ) e limitada pela taxa de carboxilação do  $CO_2$  (Hall et al., 1993; Lambers and Oliveira, 2019).

Notavelmente, nossos dados revelaram que a phloretin reduziu o  $\alpha$  e a  $P_{Nmax}$  e aumentou  $I_{comp}$  calculados a partir de curvas de resposta à luz em folhas de plantas de milho. A redução de  $P_{Nmax}$  é um bom indicativo de que a phloretin afeta negativamente a fotossíntese. O  $\alpha$  se relaciona com a inclinação inicial e descreve a eficiência de utilização da luz pela fotossíntese, isto é, o número de moléculas de  $CO_2$  fixadas por  $\mu mol$  de fótons, levando-se em consideração, como por exemplo, os dispêndios com a fotorrespiração e a respiração, estresses que estejam afetando as trocas gasosas, captura, e transporte da energia (Hall et al., 1993; Lobo et al., 2013). Sua redução nas plantas expostas a phloretin aponta para interferências na absorção da energia luminosa ou na eficiência do transporte de elétrons. O ponto de compensação de luz ( $I_{comp}$ ), que é a quantidade de luz mínima necessária para que a planta mantenha seu metabolismo basal aumentou. Devido à baixa assimilação, decorrente de uma eficiência quântica prejudicada, a planta tratada com phloretin necessitaria de uma quantidade maior de luz para assimilar a mesma quantidade de  $CO_2$  e, este fator pode ser um ponto positivo para o controle de plantas daninhas no campo. Nessas condições, as plantas estão diretamente expostas a competição por nutrientes do meio e, principalmente, pela luz. O dano causado pelo tratamento com a phloretin na eficiência da utilização da luz pode proporcionar vantagens competitivas da cultura em relação às plantas daninhas.

Outra informação importante revelada por nosso trabalho foi que a phloretin também reduziu a fotossíntese do milho, ou seja, as trocas gasosas ( $A$ ,  $g_s$ ,  $E$  e  $C_i$ ). A redução de  $A$  em milho tratado com phloretin pode ser devido à uma limitação estomática e/ou interferência nas reações de assimilação de  $CO_2$ . Nos casos de limitação estomática da fotossíntese, a redução de  $g_s$  é geralmente acompanhada por uma diminuição de  $C_i$  (Zhou and Yu, 2006). Em contrapartida, a existência de uma limitação não-estomática para a fotossíntese é caracterizada pela redução de  $g_s$  associada a um aumento de  $C_i$  (Farquhar and Sharkey, 1982). A partir dos resultados aqui obtidos, a  $g_s$  parece limitar parcialmente a  $A$ , pois em condições normais de assimilação de  $CO_2$  a diminuição da  $g_s$  também reduziu o  $C_i$ .

Mudanças na fluorescência de Chl  $a$  refletem mudanças na eficiência fotoquímica e na dissipação de calor. A razão  $F_v/F_m$ , uma medida da integridade estrutural do PSII (Lu et al., 2009), não foi afetada pela phloretin. Sob condições luminosas,  $\Phi_{PSII}$  mede a

proporção de energia absorvida que é utilizada nas reações fotoquímicas (Sánchez-Moreiras et al., 2010). Uma redução no  $\Phi_{PSII}$  está relacionada à uma baixa eficiência do centro de reação PSII e, conseqüentemente, em mudanças na taxa de transporte de elétrons. Isso sugere uma redução na proporção de fótons absorvidos por PSII, que são usados nas reações fotoquímicas (Clarke, 1995). Assim, a análise da emissão de fluorescência de Chl *a* indica a eficiência fotoquímica dos complexos do PSII (Demmig-Adams et al., 1996). Conforme observado neste estudo, os valores de  $\Phi_{PSII}$  foram marcadamente reduzidos. A redução de  $\Phi_{PSII}$  está relacionada à diminuição da *A* e às limitações no metabolismo do carbono (LORETO et al., 2003). Isso ocorre porque a eficiência operacional do PSII ( $\Phi_{PSII}$ ) é diretamente proporcional à eficiência operacional quântica de assimilação de CO<sub>2</sub>, dado que uma proporção constante de equivalentes redutores do fluxo linear de elétrons é usada para assimilação de CO<sub>2</sub> (Baker, 2008; Genty et al., 1989). Adicionalmente,  $\Phi_{PSII}$  é um parâmetro utilizado para calcular a taxa de transporte de elétrons (ETR), e desta forma as reduções observadas nos dois parâmetros são similares. De modo geral, estes dados sugerem que o transporte de elétrons fotossintético foi afetado pela phloretin, diminuindo a proporção da energia luminosa absorvida que é enviada para a fase fotoquímica da fotossíntese.

Os caminhos percorridos pela luz, analisados pela extinção da emissão da fluorescência após a emissão do flash multifásico, mostraram que o *quenching* fotoquímico (*qP*) foi reduzido. O *qP* revela uma menor taxa de reoxidação das *Q<sub>a</sub>* reduzidas pelo flash de luz, ou seja, uma redução da energia direcionada para a fixação de carbono. No cálculo da extinção não-fotoquímica pelo parâmetro NPQ não foram observadas diferenças significantes entre controle e tratamento. O NPQ é um parâmetro que representa o excesso de energia da luz absorvida que é dissipada em calor.

Visando identificar as alterações nas reações de assimilação do carbono que culminaram com a redução da *A* em folhas de plantas de milho expostas à phloretin, nós realizamos curvas de resposta ao CO<sub>2</sub> (*A/ci*). As curvas *A/ci* permitem calcular parâmetros como *J*, *V<sub>cmax</sub>*, *V<sub>pmax</sub>* e *g<sub>m</sub>*, que correspondem ao transporte de elétrons fotossintético, taxa de carboxilação da rubisco, taxa de carboxilação da PEP carboxilase e a condutância mesofílica para o CO<sub>2</sub>, respectivamente. Nossas análises revelaram que a phloretin, na concentração de 500 μM, reduziu consideravelmente os valores de *J* e *g<sub>m</sub>*, corroborando com a hipótese de que a redução na taxa fotossintética é causada, principalmente, por uma interferência no transporte de elétrons na fase luminosa da fotossíntese e por uma limitação estomática na interiorização do CO<sub>2</sub>.

Adicionalmente, nosso estudo revelou uma diminuição no conteúdo de piruvato nas folhas do milho. A via  $C_4$  começa com a conversão de  $CO_2$  em bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) pela anidrase carbônica (CA) nas células mesofílicas, seguida da carboxilação do fosfoenolpiruvato pela ação da PEP carboxilase, convertendo-o em oxaloacetato. Essas duas etapas ocorrem em todas as plantas  $C_4$  e, portanto, são características universalmente convergentes na fotossíntese  $C_4$  (Khoshravesht et al., 2020). O passo anterior a esta etapa, ocorre a formação de fosfoenolpiruvato através da fosforilação do piruvato pela PPK. Então, a redução de piruvato também pode causar uma diminuição no conteúdo de fosfoenolpiruvato, sem o qual o  $CO_2$  não pode ser incorporado e seguir para as demais etapas da via  $C_4$  até que seja assimilado pela rubisco.

O crescimento radicular depende de alguns fatores que estão nas partes das plantas que estão acima do solo, como por exemplo, a fotossíntese, o aproveitamento de luz, hormônios e fatores móveis (van Gelderen et al., 2018). O efeito primário da luz é permitir a fotossíntese, o que leva à produção de açúcares (sacarose) que são transportados pelo floema até as raízes e as permitem crescerem e se desenvolverem. Por conseguinte, uma vez que houve redução na fotossíntese da planta, a produção de açúcares também é reduzida. As raízes, por sua vez, com menor disponibilidade de substrato energético, também podem ter seu crescimento prejudicado. Nesse sentido, a redução fotossintética causada pela phloretin pode ter levado a uma diminuição no crescimento das raízes das plantas.

Os inibidores fotossintéticos controlam muitas plantas daninhas de folha larga e algumas gramíneas. Em geral, esses herbicidas inibem a fotossíntese ligando-se às proteínas D1 do complexo fotossistema II (PSII) nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos. A ligação do herbicida nessa proteína bloqueia o transporte de elétrons e interrompe a fixação de  $CO_2$  e a produção de energia necessária para o crescimento das plantas (“Herbicides That Inhibit Photosynthesis,” 2010). A morte de plantas, no entanto, não ocorre principalmente pela depleção na fotossíntese, mas sim por um efeito indireto em outros processos. Bloquear o transporte de elétrons no PSII promove a formação de moléculas altamente reativas que iniciam reações em cadeia que causam destruição dos lipídios e proteínas das membranas, que resultam em vazamento e permitem que células e organelas celulares sequem e se desintegram rapidamente. Sendo assim, uma molécula que é capaz de inibir o fluxo de elétrons e também impedir a entrada de  $CO_2$  nas células, se mostra como um bom candidato com potencial herbicida.

## CONCLUSÃO

Nossos resultados com milho confirmaram que, de fato, a phloretin afetou os processos fotossintéticos. A  $g_s$  reduzida juntamente com a redução no conteúdo de piruvato, restringiram a entrada de  $\text{CO}_2$  nos espaços subestomáticos, o que poderia limitar sua assimilação. Adicionalmente, a redução de  $\Phi_{\text{PSII}}$  indicou que o fluxo de elétrons no PSII estava comprometido e o  $\text{CO}_2$  não estava sendo consumido de forma eficiente pelas plantas submetidas a phloretin. Como consequência, a produção de açúcares que servem como substrato energético para estruturas não fotossintetizantes das plantas estava reduzida, o que causou redução no crescimento das raízes. Em resumo, nossos dados indicaram que os efeitos da phloretin na fotossíntese do milho ocorreram principalmente devido à redução de  $g_s$ , do conteúdo de piruvato e diminuição da eficiência do transporte de elétrons nas reações fotoquímicas, características que, juntas, fazem com que esta molécula seja um bom candidato com potencial herbicida.

## REFERÊNCIAS

- Baker, N.R., 2008. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 89–113.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759>
- Bernt, E., Hess, B., 1965. Methods of Enzymatic Analysis, Methods of Enzymatic Analysis. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-395630-9.50134-1>
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L., 2015. Biochemistry & Molecular Biology of Plants, Journal of Chemical Information and Modeling.  
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Burnside, O.C., 1992. Rationale for developing herbicide-resistant crops. *Weed Technol.* 6, 621–625.
- Carvalho, L.B., Bianco, S., Guzzo, C.D., 2010. Interference of *Euphorbia heterophylla* in the growth and macronutrient accumulation of soybean. *Planta Daninha* 28, 33–39.
- CHRISTOFFOLETI, P.J., VICTORIA FILHO, R., SILVA, C.B., 1994. Resistência De Planta S Daninhas Aos Herbicidas. *Planta Daninha* 12, 13–20.  
<https://doi.org/10.1590/S0100-83581994000100003>
- Clarke, A.R., 1995. Photosynthesis fifth edition: By D O Hall and K K Rao, pp 211. Cambridge University Press, Cambridge. 1994. £9.95/\$14.95 ISBN 0-521-43622-2. *Biochem. Educ.* 23, 47. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0307-4412\(95\)90203-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0307-4412(95)90203-1)
- de Mendonça, G.S., Martins, C.C., Martins, D., da Costa, N.V., 2014. Ecophysiology of seed germination in *Digitaria insularis* (L.) Fedde). *Rev. Cienc. Agron.* 45, 823–832. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902014000400021>
- de Sousa, C.P., 2012. Ação de herbicida sobre a atividade fotossintética de plantas com metabolismo C3 e C4. Universidade Federal de Pelotas.
- Demmig-Adams, B., Adams III, W.W., Barker, D.H., Logan, B.A., Bowling, D.R., Verhoeven, A.S., 1996. Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of

- absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiol. Plant.* 98, 253–264. <https://doi.org/https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1996.980206.x>
- Doyle, J.R., Burnell, J.N., Haines, D.S., Llewellyn, L.E., Motti, C.A., Tapiolas, D.M., 2005. A rapid screening method to detect specific inhibitors of pyruvate orthophosphate dikinase as leads for C4 plant-selective herbicides. *J. Biomol. Screen.* 10, 67–75. <https://doi.org/10.1177/1087057104269978>
- Farquhar, G.D., Sharkey, T.D., 1982. Stomatal Conductance and Photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33, 317–345. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.33.060182.001533>
- Galazzi, E.B., 2011. Desempenho fotossintético de plantas de *Jatropha curvas* L. cultivadas no Estado do Espírito Santo. Universidade Federal do Espírito Santo.
- GAZZIERO, D.L., ADEGAS, F.S., FORNAROLLI, D., VARGAS, L., KARAM, D., BALBINOT JUNIOR, A.A.V.E., 2012. Um alerta sobre a resistência de plantas daninhas ao glifosato, in: VI Congresso Brasileiro de Soja. p. 3.
- Gemelli, A., Oliveira Junior, R.S. de, Constantin, J., Braz, G.B.P., Jumes, T.M. de C., Oliveira Neto, A.M. de, Dan, H.D.A., Biffe, D.F., 2012. Aspectos da biologia de *Digitaria insularis* resistente ao glyphosate e implicações para o seu controle. *Rev. Bras. Herbic.* 11, 231. <https://doi.org/10.7824/rbh.v11i2.186>
- Genty, B., Briantais, J.M., Baker, N.R., 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 990, 87–92. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(89\)80016-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9)
- Hall, D.O., Scurlock, J.M.O., Bolhar-Nordenkamp, H.R., Leegood, R.C., Long, S.P., 1993. Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual. Springer-Science+Business Media, B. V.
- Herbicides That Inhibit Photosynthesis, 2010. . *Herbic. Plant Physiol.*, Wiley Online Books. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781444327793.ch5>
- Jenkins, C.L., 1989. Effects of the Phosphoenolpyruvate Carboxylase Inhibitor 3,3-Dichloro-2-(Dihydroxyphosphinoylmethyl)propenoate on Photosynthesis: C(4) Selectivity and Studies on C(4) Photosynthesis. *Plant Physiol.* 89, 1231–1237. <https://doi.org/10.1104/pp.89.4.1231>
- Khoshravesh, R., Stata, M., Adachi, S., Sage, T.L., Sage, R.F., 2020. Evolutionary Convergence of C4 Photosynthesis: A Case Study in the Nyctaginaceae . *Front. Plant Sci.* .
- Kissmann, K.G., Groth, D., 1995. Plantas infestantes e nocivas, 3rd ed. BASF, São Paulo.
- Lambers, H., Oliveira, R.S., 2019. Plant physiological ecology, *Plant Physiological Ecology.* <https://doi.org/10.1007/978-3-030-29639-1>
- Lein, W., Börnke, F., Reindl, A., Ehrhardt, T., Stitt, M., Sonnewald, U., 2004. Target-based discovery of novel herbicides. *Curr. Opin. Plant Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.01.001>
- Lichtenthaler, H.K., 1987. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods Enzymol.* 148, 350–382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Lobo, F. de A., de Barros, M.P., Dalmagro, H.J., Dalmolin, Â.C., Pereira, W.E., de Souza, É.C., Vourlitis, G.L., Rodríguez Ortíz, C.E., 2013. Fitting net photosynthetic light-response curves with Microsoft Excel - a critical look at the models. *Photosynthetica* 51, 445–456. <https://doi.org/10.1007/s11099-013-0045-y>
- LORETO, F., CENTRITTO, M., CHARTZOULAKIS, K., 2003. Photosynthetic limitations in olive cultivars with different sensitivity to salt stress. *Plant. Cell*

- Environ. 26, 595–601. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.00994.x>
- Loriaux, S.D., Avenson, T.J., Welles, J.M., Mcdermitt, D.K., Eckles, R.D., Riensche, B., Genty, B., 2013. Closing in on maximum yield of chlorophyll fluorescence using a single multiphase flash of sub-saturating intensity. *Plant, Cell Environ.* 36, 1755–1770. <https://doi.org/10.1111/pce.12115>
- Lu, K.X., Cao, B.H., Feng, X.P., He, Y., Jiang, D.A., 2009. Photosynthetic response of salt-tolerant and sensitive soybean varieties. *Photosynthetica* 47, 381–387. <https://doi.org/10.1007/s11099-009-0059-7>
- Machado, A.F.L.I., Meira, R.M.S., Ferreira, L.R., Ferreira, F.A., Tuffi Santos, L.D., Fialho, C.M.T. V, Machado, M.S. V, 2008. Anatomical Characterization of the Leaf, Stem and Rhizome of *Digitaria insularis* 26, 1–8. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582008000100001>
- Machado, E.C., Schmidt, P.T., Medina, C.L., Ribeiro, E.R.V., 2005. Photosynthetic responses of three citrus species to environmental factors. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 40, 1161–1170. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2005001200002>
- Marchiosi, R., Graciane de Souza Bido, B., Paulo Alfredo Feitoza Böhm, B., Ricardo Soares, A., Hingrid Ariane da Silva, B., Ana Paula Ferro, B., de Lourdes Lucio Ferrarese, M., Osvaldo Ferrarese-Filho, B., 2016. Photosynthetic response of soybean to L-DOPA and aqueous extracts of velvet bean. <https://doi.org/10.1007/s10725-016-0154-2>
- Maroco, J.P., Ku, M.S.B., Lea, P.J., Dever, L. V, Leegood, R.C., Furbank, R.T., Edwards, G.E., 1998. Oxygen requirement and inhibition of C4 photosynthesis. *Plant Physiol.* 116, 823–832.
- Mondo, V.H.V., Carvalho, S.J.P. De, Dias, A.C.R., Marcos Filho, J., 2010. Efeitos da luz e temperatura na germinação de sementes de quatro espécies de plantas daninhas do gênero *Digitaria*. *Rev. Bras. Sementes* 32, 131–137. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222010000100015>
- Moriwaki, T., Falcioni, R., Tanaka, F.A.O., Cardoso, K.A.K., Souza, L.A., Benedito, E., Nanni, M.R., Bonato, C.M., Antunes, W.C., 2019. Nitrogen-improved photosynthesis quantum yield is driven by increased thylakoid density, enhancing green light absorption. *Plant Sci.* 278, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.10.012>
- Moualeu-Ngangué, D.P., Chen, T.W., Stützel, H., 2017. A new method to estimate photosynthetic parameters through net assimilation rate–intercellular space CO<sub>2</sub> concentration (A–C<sub>i</sub>) curve and chlorophyll fluorescence measurements. *New Phytol.* 213, 1543–1554. <https://doi.org/10.1111/nph.14260>
- Nelson, D.L., Cox, M.M., 2013. *Lehninger Principles of Biochemistry* 6th ed., Book. <https://doi.org/10.1016/j.jse.2011.03.016>
- Powles, S.B., 2008. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: Lessons to be learnt, in: *Pest Management Science*. pp. 360–365. <https://doi.org/10.1002/ps.1525>
- Sánchez-Moreiras, A.M., Oliveros-Bastidas, A., Reigosa, M.J., 2010. Reduced photosynthetic activity is directly correlated with 2-(3H)-benzoxazolinone accumulation in lettuce leaves. *J. Chem. Ecol.* 36, 205–209. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9750-1>
- Sharkey, T.D., Bernacchi, C.J., Farquhar, G.D., Singsaas, E.L., 2007. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C<sub>3</sub> leaves 1035–1040. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01710.x>
- Taiz, L., Zeiger, E., 2010. *Plant Physiology*, Fifth Edition. Cell 1, 782.

- van Gelderen, K., Kang, C., Pierik, R., 2018. Light Signaling, Root Development, and Plasticity. *Plant Physiol.* 176, 1049–1060. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01079>
- Vargas, L., Roman, E.S., 2006. Resistência de plantas daninhas a herbicidas: conceitos, origem e evolução. *Passo Fundo Embrapa Trigo (Embrapa Trigo. Doc. Online, 58) 22.* <https://doi.org/10.1592/phco.26.9part2.148S>
- Zhou, H., Akçay, E., Helliker, B.R., 2019. Estimating C4 photosynthesis parameters by fitting intensive A/Ci curves. *Photosynth. Res.* 141, 181–194. <https://doi.org/10.1007/s11120-019-00619-8>
- Zhou, Y.H., Yu, J.Q., 2006. Allelochemicals and photosynthesis, in: *Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications.* pp. 127–139. [https://doi.org/10.1007/1-4020-4280-9\\_6](https://doi.org/10.1007/1-4020-4280-9_6)

Figura 1. Efeitos da concentração de 500  $\mu\text{M}$  de phloretin sobre o crescimento de plantas tratadas por 48 h. As figuras **A** e **B** são referentes ao crescimento raízes e das partes aéreas, respectivamente. Médias ( $n = 6 \pm \text{EPM}$ ) seguidas por asterisco (\*) são estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste de t de student ( $p \leq 0,05$ ).

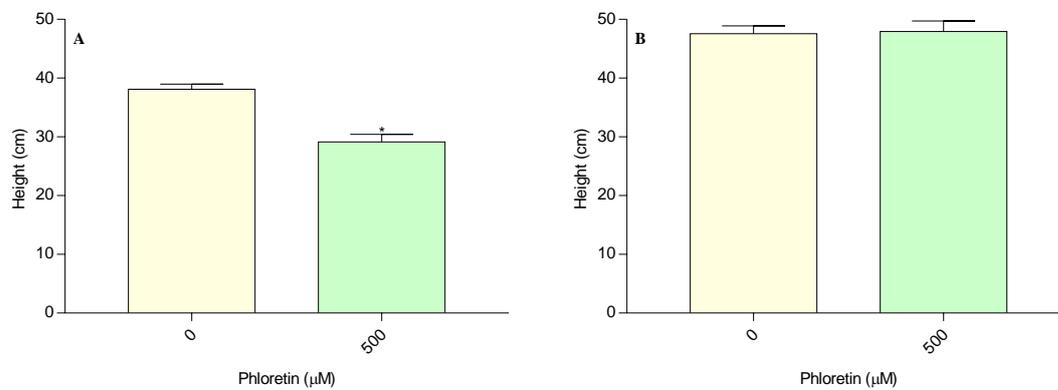


Figura 2. Efeitos da concentração de 500  $\mu\text{M}$  de phloretin sobre a biomassa fresca e biomassa seca em plantas tratadas por 48 h. As figuras **A** e **B** são referentes a biomassa fresca das raízes e das partes aéreas, respectivamente. As figuras **C** e **D** são referentes a biomassa seca das raízes e das partes aéreas, respectivamente. Médias ( $n = 6 \pm \text{EPM}$ ) seguidas por asterisco (\*) são estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste de t de student ( $p \leq 0,05$ ).

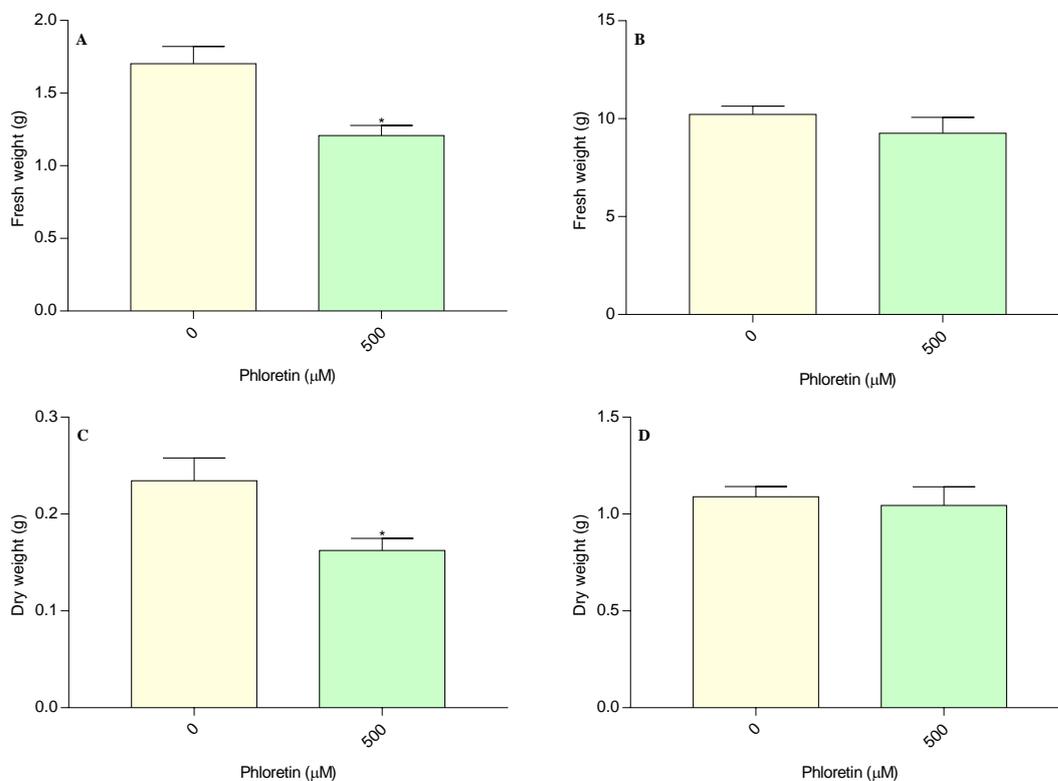


Figura 3. Efeitos da concentração de 500  $\mu\text{M}$  de phloretin sobre o conteúdo de piruvato das folhas de plantas tratadas por 48 h. Médias ( $n = 6 \pm \text{EPM}$ ) seguidas por asterisco (\*) são estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste de t de student ( $p \leq 0,05$ ).

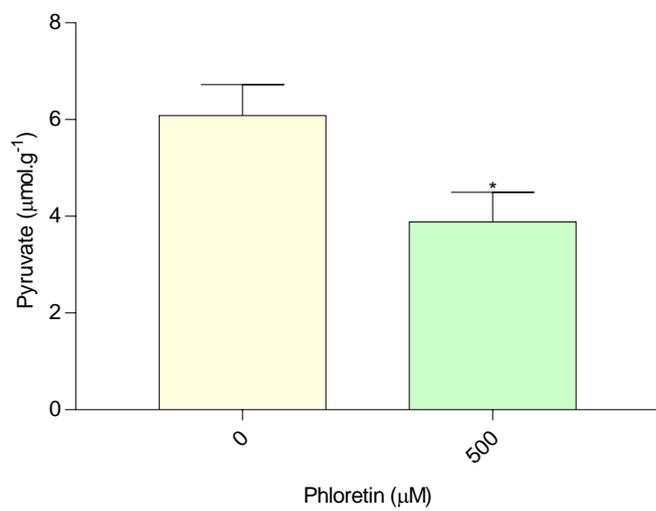


Figura 4. Efeitos da concentração de 500  $\mu\text{M}$  de phloretin sobre a taxa fotossintética (**A**), condutância estomática (**B**), transpiração (**C**) e concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  (**D**). Médias ( $n = 6 \pm \text{EPM}$ ) seguidas por asterisco (\*) são estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste de t de student ( $p \leq 0,05$ ).

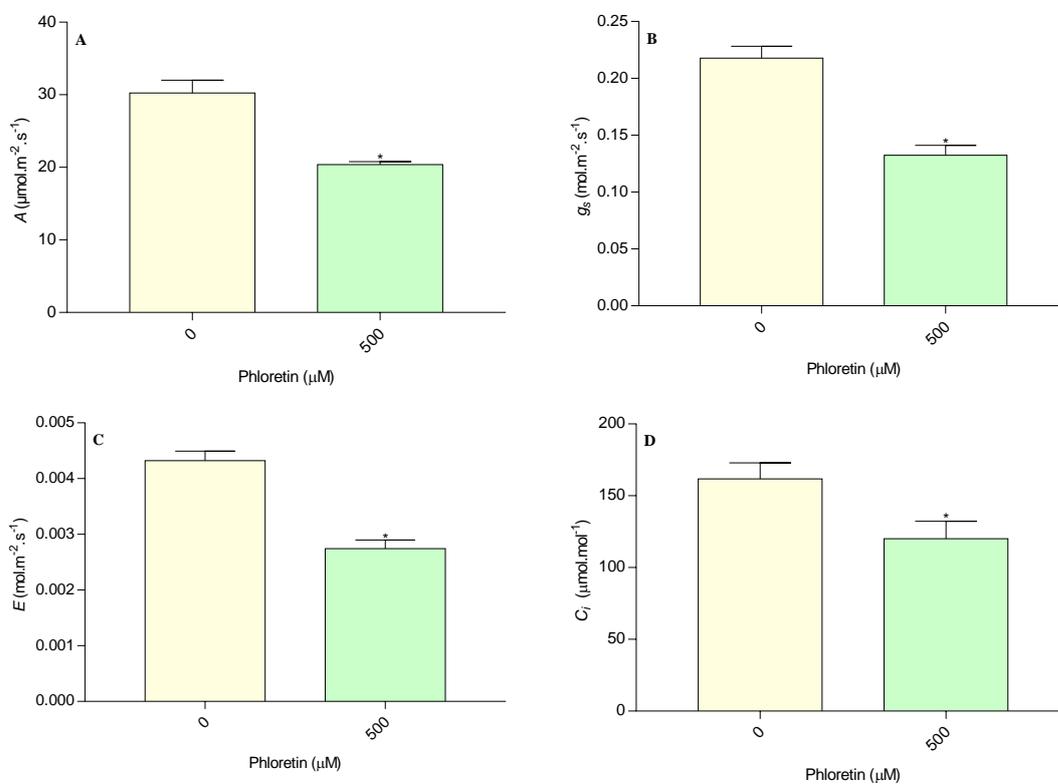


Tabela 1. Taxa de respiração no escuro ( $R_d$ ) ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), ponto de compensação da luz ( $I_{comp}$ ) ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), assimilação máxima de carbono ( $P_{Nmáx}$ ) ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e rendimento quântico da fotossíntese ( $\alpha$ ) [ $(\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1})/(\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1})$ ] na ausência e presença de phloretin 500  $\mu\text{M}$  tratadas durante 48 h. Médias ( $n = 6 \pm \text{EPM}$ ) seguidas por asterisco (\*) são estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste de t de student ( $p \leq 0,05$ ).

[CO <sub>2</sub> ]	Phloretin ( $\mu\text{M}$ )	$R_D$	$I_{comp}$	$P_{Nmax}$	$\alpha$
400	0	2,383 $\pm$ 0,4003	34,05 $\pm$ 3,427	29,23 $\pm$ 1,835	0,06452 $\pm$ 0,001
	500	2,75 $\pm$ 0,1176	52,14 $\pm$ 7,568*	21,63 $\pm$ 1,111*	0,0465 $\pm$ 0,001*

Figura 5. Efeitos da phloretin 500  $\mu\text{M}$  sobre a taxa de transporte de elétrons fotossintéticos ( $J$ ) (**A**), velocidade máxima de carboxilação da Rubisco ( $V_{c\text{máx}}$ ) (**B**), velocidade máxima de carboxilação da PEP carboxilase ( $V_{p\text{máx}}$ ) (**C**) e condutância mesofílica ( $g_m$ ) (**D**) obtidos a partir da curva de A em função de  $C_i$  das folhas de milho tratadas por 48 h. Médias ( $n = 6 \pm \text{EPM}$ ) seguidas por asterisco (\*) são estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste de t de student ( $p \leq 0,05$ ).

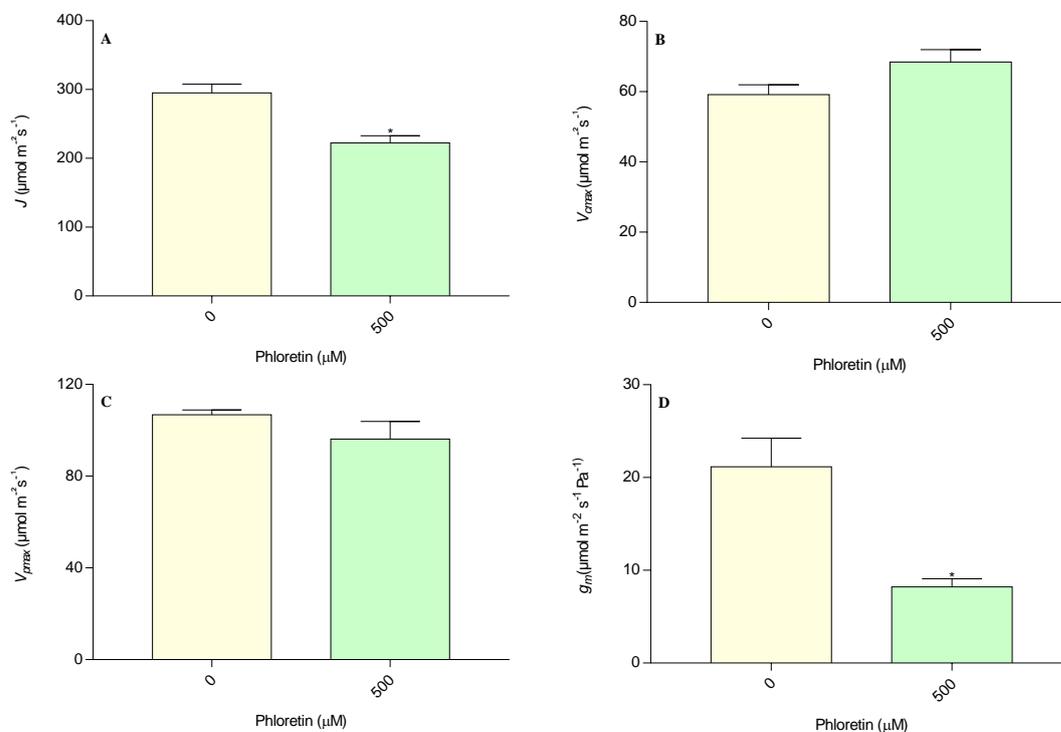


Figura 6. Efeitos da phloretin 500  $\mu\text{M}$  sobre os parâmetros fotossintéticos relacionados a fluorescência da clorofila *a* em plantas adaptadas ao escuro e a luz tratadas durante 48 h. Fluorescência inicial ( $F_0$ ) (A), fluorescência máxima ( $F_m$ ) (B), rendimento quântico máximo do PSII ( $F_v/F_m$ ) (C), eficiência quântica fotoquímica efetiva ( $F_v'/F_m'$ ) (D), rendimento efetivo ( $\phi_{\text{PSII}}$ ) (E) e taxa de transporte de elétrons (ETR) (F). Médias ( $n = 6 \pm \text{EPM}$ ) seguidas por asterisco (\*) são estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste de t de student ( $p \leq 0,05$ ).

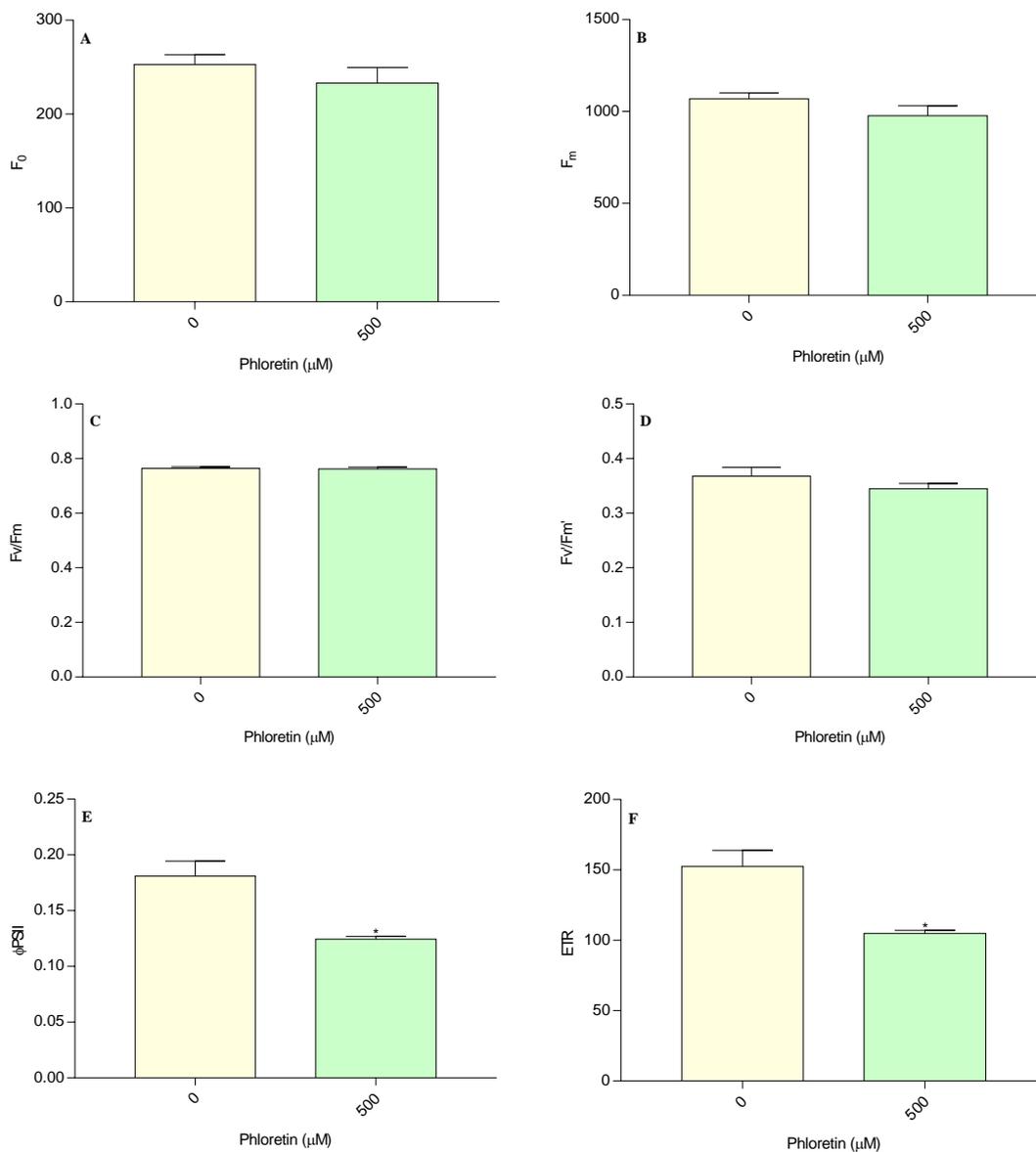


Figura 7. Efeitos da phloretin 500  $\mu\text{M}$ , após 48 h de tratamento, nos quenchings fotoquímicos (qP) (**A**), não fotoquímicos (qN e NPQ) (**B** e **C**) e no teor de clorofila (**D**). Médias ( $n = 6 \pm \text{EPM}$ ) seguidas por asterisco (\*) são estatisticamente diferentes do controle de acordo com o teste de t de student ( $p \leq 0,05$ ).

