

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANA PAULA BOROMELO

PROSPECÇÃO DE INIBIDORES DA ENZIMA O-ACETILSERINA(TIOL) LIASE
(OAS-TL) POR TÉCNICAS *IN SILICO E IN VIVO*

Maringá
2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANA PAULA BOROMELO

PROSPECÇÃO DE INIBIDORES DA ENZIMA O-
ACETILSERINA(TIOL) LIASE (OAS-TL) POR TÉCNICAS *IN SILICO*
E IN VIVO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Área de Concentração – Biologia Celular e Molecular), da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos
Coorientadora: Prof. Dra. Fernanda Freitas de Oliveira

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

B736p

Boromelo, Ana Paula

Prospecção de inibidores da enzima O-acetilserina(tiol) liase (OAS-TL) por técnicas *in silico* e *in vivo* / Ana Paula Boromelo. -- Maringá, PR, 2023.
52 f.: il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos.

Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda Freitas de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular), 2023.

1. Metabolismo do enxofre. 2. Herbicidas. 3. Bioinformática. I. Santos, Wanderley Dantas dos, orient. II. Oliveira, Fernanda Freitas de, 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. 577.6

Márcia Regina Paiva - CRB-9/1267

ANA PAULA BOROMELO

PROSPECÇÃO DE INIBIDORES DA ENZIMA O-ACETILSERINA(TIOL) LIASE
(OAS-TL) POR TÉCNICAS *IN SILICO E IN VIVO*

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

Aprovado em: 20/01/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof Dr. Wanderley Dantas dos Santos
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Josielle Abrahão de Souza
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Paulo Sérgio Alves Bueno
Universidade Estadual de Maringá

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| BIOGRAFIA | V |
| DEDICATÓRIA | VI |
| AGRADECIMENTOS | VII |
| APRESENTAÇÃO | VIII |
| RESUMO GERAL | 8 |
| GENERAL ABSTRACT | 10 |
| RESUMO | 12 |
| ABSTRACT | 13 |
| INTRODUÇÃO | 14 |
| MATERIAIS E MÉTODOS | 18 |
| Ensaio <i>in silico</i> | 18 |
| <i>Seleção de inibidores enzimáticos por varredura virtual e docagem molecular</i> .. | 18 |
| Ensaio <i>in vivo</i> | 19 |
| <i>Germinação e crescimento inicial</i> | 19 |
| <i>Cultivo em substrato – Aplicação de OBT via solo e aplicação foliar</i> | 19 |
| <i>Cultivo em hidroponia – Aplicação de OBT nas raízes</i> | 20 |
| Parâmetros biométricos | 21 |
| <i>Comprimento da raiz e da parte aérea</i> | 21 |
| <i>Massa fresca e massa seca</i> | 21 |
| <i>Área foliar</i> | 21 |
| <i>Análise de contagem de folhas</i> | 21 |
| <i>Análise combinada de parâmetros de trocas gasosas e fluorescência de clorofila</i> .21 | |
| <i>Quantificação de clorofila</i> | 22 |
| <i>Análise estatística</i> | 22 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO | 23 |
| <i>In silico</i> | 23 |
| <i>In vivo</i> | 25 |
| <i>Tratamento com OBT via solo</i> | 25 |
| <i>Tratamento com OBT via foliar</i> | 28 |
| <i>Tratamento com OBT na germinação e crescimento inicial</i> | 31 |
| <i>Tratamento com OBT via raiz-hidroponia</i> | 34 |
| DISCUSSÃO | 38 |
| CONCLUSÃO | 41 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 42 |

BIOGRAFIA

Ana Paula Boromelo, nascida em Marialva, cidade do interior do Paraná, em 10 de janeiro de 1997, filha de José Luiz Boromelo e Janete Aparecida Boromelo. Em 2016 iniciou sua vida acadêmica no curso de Ciências Biológicas, Licenciatura da Universidade Estadual de Maringá. Concluiu a graduação em 2022. Obteve uma segunda o Bacharelado em Ciências Biológicas, tendo ingressado no mestrado em 2021, antes de concluir a segunda habilitação. Realizou o mestrado em aproximadamente 1 ano e 6 meses.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à meus pais, por todo amor, cuidado, paciência e compreensão durante toda a vida e durante esses anos de vida acadêmica. Agradeço pelo incentivo diário para a busca de meus sonhos e por terem me ensinado o valor das coisas e do ser humano todos os dias. Sem vocês, nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, pela presença e cuidado sobre mim em todos os momentos. Obrigada por seus ensinamentos, que apesar de tão antigos, serem tão atuais e presentes. Obrigada por me fazer enxergar o quanto a vida é perfeita, criada por um criador magnífico. À minha família, meus pais Janete e José Luiz e minha irmã Denise, por todo o amor, carinho, cuidado e força, em todos os momentos. Amo vocês.

Ao meu companheiro de vida, Fabricio, por estar comigo todos os dias e em todos os momentos, por incentivar meus sonhos e me trazer segurança.

Ao meu orientador, professor Wanderley, por todo incentivo, apoio e segurança durante essa caminhada. Aprendo muito com você. Um grande ser humano.

À minha coorientadora, professora Fernanda Freitas, por compartilhar a vida acadêmica e pessoal comigo. Minha meta de profissional.

Aos meus amigos do laboratório Bioplan Amanda, Bruna, Breno, Luana, Erika, Isabela e Luiz. Sem a ajuda de vocês, eu não teria conseguido. Obrigada sempre.

Aos professores Paulo Sérgio e Rogério, por todo apoio, conhecimento compartilhado, ensinamentos, compreensão e paciência nesta caminhada. Obrigada mesmo.

À Universidade Estadual de Maringá, que juntamente ao Bioplan, compõem muito mais do que instituições de ensino, e sim, desenvolvem um papel social de ligação entre sociedade-academia e instituições privadas-academia.

À CAPES pelo fomento desta pesquisa.

APRESENTAÇÃO

Em cumprimento às normas fixadas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá (PBC-UEM), a dissertação foi redigida na forma de um artigo a ser submetido à revista *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* e inicia com uma revisão sobre o contexto geral sobre herbicidas e segue com a caracterização da enzima alvo do trabalho, a O-acetilserina(tiol)liase (OAS-TL), juntamente com a justificativa de sua utilização em cada etapa computacional, até a identificação de um possível candidato a herbicida.

RESUMO GERAL

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

Desde os primórdios da agricultura, o homem teve necessidade de lidar com as adversidades dos fatores bióticos e abióticos da natureza. Dentre os fatores bióticos, as plantas daninhas representam um problema para a agricultura uma vez que elas competem por água, nutrientes, luz solar e espaço, afetando o crescimento e desenvolvimento das culturas e levando à redução dos rendimentos e da qualidade da produção. Diversas práticas realizadas de forma mecânica, física, química e biológica vêm sendo estudadas, discutidas e empregadas ao longo dos anos a fim de se obter sucesso no manejo das plantas daninhas. Dentre as práticas, o controle químico é a mais utilizada atualmente, ela tem como vantagem principal a seletividade, sendo vista como uma forma econômica e efetiva para garantir a produção agrícola. No entanto, apesar das suas vantagens, o controle químico apresenta pontos negativos. Seu uso contínuo, e muitas vezes abusivo, leva à seleção de genótipos resistentes de forma muito rápida, dificultando progressivamente o controle das plantas daninhas. Adicionalmente, moléculas pouco biodegradáveis levam ao acúmulo de resíduos tóxicos no meio ambiente e nos alimentos de humanos e animais. A enzima O-acetilserina(tiol) liase (OAS-TL) é responsável por catalisar a síntese de cisteína nas plantas, passo essencial para a assimilação do enxofre. Com a inibição total de sua atividade, a planta não pode sobreviver. Esta enzima não está presente no metabolismo animal, o que a torna um alvo interessante para herbicidas com baixa toxicidade para humanos e animais. Assim, o presente trabalho teve como objetivos: 1) selecionar novas moléculas com potencial herbicida utilizando técnicas de bioinformática; 2) Avaliar os efeitos dos inibidores putativos da enzima O-acetilserina(tiol)liase (OAS-TL), previamente prospectados *in silico*, sobre as plantas de *Ipomoea grandifolia* em relação à germinação, crescimento inicial, comprimento de raiz e parte aérea, área foliar, quantidade de folhas, parâmetros de trocas gasosas e fluorescência de clorofila, quantificação de clorofila, biomassa fresca e seca de plantas submetidas a tratamentos com aplicação do inibidor via substrato, via foliar e via hidroponia. Para as análises *in silico*, foi realizada a validação por *redocking* utilizando os programas AutoDock Vina e Autodock 4 versão 4.2.3, implementado na interface Pyrx-0.9. O *virtual screening* foi conduzido a partir de duas bibliotecas, com produtos comercializáveis da Acros Organics® e Sigma-Aldrich®. A seleção dos melhores ligantes ocorreu utilizando os dois programas, e a compra das moléculas ocorreu diretamente do catálogo da empresa Sigma-Aldrich®. Utilizando a OAS-TL como alvo foram conduzidos

35 experimentos com *I. grandifolia* para verificar os diversos parâmetros analisados. As
36 técnicas *in silico* permitiram a seleção de moléculas candidatos a inibidores da enzima
37 OAS-TL, sendo um deles, a O-benzil-L-tirosina (OBT), utilizado neste trabalho. Em
38 doses menores, observamos um efeito hormese que estimulou o crescimento da planta.
39 Por outro lado, doses mais altas reduziram o comprimento de raiz, parte aérea, biomassa
40 e outros parâmetros em ambas as vias de tratamento: pré- e pós-emergente.

41

42 **Palavras-chave:** Metabolismo do enxofre, herbicidas, bioinformática, *in vivo*, O-
43 acetilserina(tiol)liase.

44

GENERAL ABSTRACT

45

46

47 Since the beginning of agriculture, man has needed to deal with biotic and abiotic factors.
48 Among the biotic factors, weeds represent a problem for agriculture since they compete
49 for water, nutrients, sunlight and space, affecting the growth and development of crops
50 and leading to reduced yields and production quality. Several practices carried out
51 mechanically, physically, chemically and biologically have been attended to, monitored
52 and used over the years in order to obtain success in the management of weeds. Among
53 the practices, chemical control is the most used currently, it has the main advantage of
54 selectivity, being seen as an economical and effective way to guarantee agricultural
55 production. However, despite its advantages, chemical control has negative points. Its
56 continuous use, and often abusive, leads to the selection of resistant genotypes very
57 quickly, making it difficult to coincide with the control of weeds. In addition, they are
58 poorly biodegradable and lead to the accumulation of toxic residues in the environment
59 and in food for humans and animals. The enzyme O-acetylserine(thiol)lyase (OAS-TL)
60 is responsible for catalyzing the synthesis of cysteine in plants, an essential step for the
61 assimilation of sulfur. With the full attraction of its activity, the plant cannot survive. This
62 enzyme is not present in animal metabolism, which makes it an interesting target for
63 herbicides with low toxicity for humans and animals. Thus, the present work had the
64 following objectives: 1) to select new entries with potential herbicide using
65 bioinformatics techniques; 2) Evaluation of the effects of putative inhibitors of the
66 enzyme O-acetylserine(thiol)lyase (OAS-TL), previously prospected *in silico*, on
67 *Ipomoea grandifolia* plants in relation to germination, initial growth, length of root and
68 aerial part, area number of leaves, gas exchange parameters and chlorophyll fluorescence,
69 quantification of chlorophyll, fresh and dry biomass of plants kept under treatment with
70 inhibitor application via substrates, via foliar and via hydroponics. Validation was
71 performed by redocking using the programs AutoDock Vina and Autodock 4 version
72 4.2.3, implemented in the Pyrx-0.9 interface. Virtual screening was controlled from two
73 libraries, with commercial products from Acros Organics® and Sigma-Aldrich®. The
74 selection of the best binders occurred using both programs, and the purchase of the lists
75 occurred directly from the Sigma-Aldrich® company catalog. Using OAS-TL as a target,
76 experiments with *I. grandifolia* were controlled to verify the different parameters
77 analyzed. The *in silico* techniques allowed the selection of compounds with high
78 herbicidal potential, one of them being O-Benzyl-L-Tyrosine, used in this work. At lower

79 doses, we observed a hormesis effect that stimulated plant growth. On the other hand,
80 higher doses reduced root length, shoots, biomass and other parameters in both treatment
81 routes: pre- and post-emergence.

82

83 **Keywords:** Sulfur metabolism, herbicides, bioinformatics, *in vivo*, O-
84 acetylserine(thiol)lyase

85

86 **RESUMO**

87

88 A enzima O-acetilserina(tiol) liase (OAS-TL) é responsável por catalisar a síntese de
89 cisteína nas plantas, passo essencial para a assimilação do enxofre. Com a inibição total
90 de sua atividade, a planta não pode sobreviver. Esta enzima não está presente no
91 metabolismo animal, o que a torna um alvo interessante para a busca por princípios
92 herbicidas de baixa toxicidade para humanos e animais. Dessa forma, os objetivos deste
93 trabalho foram selecionar novas moléculas com potencial herbicida utilizando técnicas de
94 bioinformática e avaliar os efeitos *in vivo* de inibidores da enzima O-acetilserina(tiol)liase
95 (OAS-TL), previamente prospectados *in silico*. Afim de avaliar o potencial da OAS-TL
96 como alvo de ação herbicida, prospectamos ligantes por técnicas de docking molecular e
97 testamos os efeitos dos mesmos *in vivo*, sobre as plantas de *Ipomoea grandifolia* em
98 relação à germinação, crescimento inicial, comprimento de raiz e parte aérea, área foliar,
99 quantidade de folhas, parâmetros de trocas gasosas e fluorescência de clorofila,
100 quantificação de clorofila, biomassa fresca e seca de plantas submetidas a tratamentos
101 com aplicação do inibidor via substrato, via foliar e via hidroponia. A partir dos nossos
102 experimentos, foi possível verificar uma ação mais eficiente em doses maiores. Em doses
103 menores, podemos observar o efeito hormese que estimulou o crescimento. Em doses
104 maiores, obtivemos resultados significativos em relação à redução de comprimento de
105 raiz, parte aérea, biomassa e outros parâmetros com aplicação do inibidor em ambas as
106 vias de tratamento.

107107

108 **Palavras-chave:** Metabolismo do enxofre, herbicidas, bioinformática, *in vivo*, O-
109 acetilserina(tiol)liase.

110110

111 ABSTRACT

112112

113 The enzyme O-acetylserine(thiol) lyase (OAS-TL) is responsible for catalyzing the
114 synthesis of cysteine in plants, an essential step for the assimilation of sulfur. With the
115 complete inhibition of its activity, the plant cannot survive. This enzyme is not present in
116 animal metabolism, which makes it an interesting target for the search for low toxicity
117 herbicidal principles for humans and animals. Thus, the objectives of this work were to
118 select new molecules with herbicidal potential using bioinformatics techniques and to
119 evaluate the *in vivo* effects of O-acetylserine(thiol) lyase (OAS-TL) inhibitors, previously
120 prospected in silico. In order to evaluate the potential of OAS-TL as a target of herbicidal
121 action, we prospected ligands by molecular docking techniques and tested their effects in
122 vivo on *Ipomoea grandifolia* plants in relation to germination, initial growth, root length
123 and part aerial view, leaf area, number of leaves, gas exchange parameters and coloryl
124 fluorescence, quantification of chlorophyll, fresh and dry biomass of plants submitted to
125 treatments with application of the inhibitor via substrate, via foliar and via hydroponics.
126 From our experiments, it was possible to verify a more efficient action at higher doses.
127 At lower doses, we can observe the hormesis effect that stimulated growth. At higher
128 doses, we obtained significant results in relation to the reduction of root length, aerial
129 part, biomass and other parameters with the application of the inhibitor in both treatment
130 routes.

131131

132 **Keywords:** Sulfur metabolism, herbicides, bioinformatics, *in vivo*, O-
133 acetylserine(thiol)lyase.

134134

135 INTRODUÇÃO

136

137 As plantas daninhas constituem um dos principais problemas relacionados à
138 produção agrícola. O custo do controle de ervas daninhas pode variar entre 5% e 20% do
139 custo total considerando todos os insumos agrícolas necessários para a produção de
140 alimentos (Gianessi et.al., 2007). Estudos anteriores já relataram que a falta de controle de
141 plantas daninhas pode reduzir a produtividade da cultura em cerca de 80 a 100% (Merino
142 et.al., 2019; Chaudhari et.al., 2016). Como por exemplo, algumas lavouras demonstraram
143 maior capacidade de suportar a interferência de plantas daninhas, mas observou-se perdas
144 elevadas para soja (70%) (Vitorino et.al., 2017), milho (70%) (Tursun et.al., 2015),
145 gergelim (20%) (Lins et.al., 2019) e algodão (18%) (Tursun et.al., 2015). Isso se deve ao
146 fato destas plantas apresentarem alta capacidade de competir com as culturas de interesse
147 pelos recursos disponíveis do meio ambiente em que estão inseridas como luz, água,
148 nutrientes e espaço (Vargas e Roman, 2006; Gazziero et.al.,1989).

149 O uso de herbicidas pode facilitar o controle de plantas indesejadas, diminuindo os
150 danos causados sobre as plantas de interesse. Desde a descoberta dos primeiros herbicidas,
151 novos sítios de ação foram descobertos continuamente, em média, um a cada 3 anos (Duke,
152 2012) levando ao conhecimento de 26 mecanismos de ação reconhecidos pela *Herbicide*
153 *Resistance Action Committee* (HRAC, 2020).

154 No entanto, o número de herbicidas com novos sítios de ação lançados no mercado
155 nesta década tem caído (Vargas et al., 2006). O grande sucesso no controle de plantas
156 invasoras baseado nas culturas transgênicas resistentes ao glifosato, sobretudo soja, milho
157 e algodão, em meados da década de 1990, levou a uma forte desaceleração da pesquisa por
158 novos herbicidas com redução do número de patentes em 40% na década seguinte. Essa
159 carência de novos herbicidas somada ao uso abusivo dos herbicidas existentes para tentar
160 obter o controle de plantas invasoras têm acelerado o surgimento de daninhas resistentes a
161 herbicidas. Esta lacuna abre espaço para novos arranjos produtivos envolvendo academia e
162 indústria que sejam capazes de desenvolver e lançar novos herbicidas.

163 Além da necessidade de novos herbicidas relacionada ao aumento no número de
164 genótipos de plantas daninhas resistentes, há uma crescente preocupação em torno da
165 poluição causada por estes produtos químicos (Das e Mondal, 2014). Mais recentemente,
166 há uma crescente preocupação com relação à saúde humana, devido ao aumento de doenças
167 como câncer, doenças renais, autismo, mal de Parkinson e Alzheimer, que tem sido

168 relacionadas ao uso excessivo de agroquímicos e seu acúmulo nos reservatórios de água
169 potável (Carneiro et.al., 2015; Dutra e De Souza, 2017).

170 Conceitualmente, todas as interações de herbicidas com uma planta, desde sua
171 aplicação até o efeito final, são denominadas de “modo de ação”. Assim, o modo de ação
172 dos herbicidas envolve absorção pela planta, movimento de translocação, metabolismo do
173 herbicida, e a resposta fisiológica da planta. Já o “sítio de ação” dos herbicidas refere-se ao
174 processo específico que ocorre na planta como, por exemplo, a inibição de uma enzima-
175 chave da fotossíntese que é essencial ao crescimento e desenvolvimento vegetal. Os
176 herbicidas podem ser classificados de acordo com a seletividade (não seletiva, controle de
177 folha larga, controle de folha estreita etc.), o estágio de aplicação (pré-emergente ou pós-
178 emergente), a translocação na planta (contato ou sistêmica), persistência, ou ainda pelo sítio
179 de ação.

180 São conhecidos vários herbicidas comerciais e, de acordo com o *Herbicide*
181 *Resistance Action Committee* (HRAC), os utilizados atualmente podem afetar os processos
182 luminosos, o metabolismo celular ou o crescimento/divisão celular (Gunsolus e Curran,
183 1991). Estes três grupos compreendem aproximadamente 20 sítios de ação, dentre os quais
184 se destacam os inibidores da biossíntese de aminoácidos e lipídios, da síntese de clorofila e
185 carotenoides, dos fotossistemas I e II, do arranjo dos microtúbulos, da síntese de celulose,
186 do transporte de auxinas e os mimetizadores de auxinas (Gunsolus e Curran, 1991).

187 O uso intensivo e indiscriminado dos herbicidas, estimulado na época da chamada
188 revolução verde, aumentou os casos de resistência por diversas plantas (Heap, 2014,
189 Burnside, 1992). Desta forma, plantas que expressam uma dada característica que a habilita
190 crescer na presença do herbicida podem se tornar a população dominante. A sensibilidade
191 a um dado herbicida varia muito entre as espécies de plantas daninhas, sendo algumas delas
192 naturalmente tolerantes (Vargas e Roman, 2006). A ocorrência de resistência múltipla
193 agrava ainda mais o problema já que, neste caso, o metabolismo de xenobióticos está
194 geralmente envolvido, aumentando a capacidade da planta de metabolizar diferentes
195 compostos tóxicos (Vargas e Roman, 2006).

196 A grande maioria dos herbicidas utilizados atualmente são moléculas orgânicas
197 obtidas por rotas sintéticas. Dessa forma, novas estratégias de descobertas de novos
198 herbicidas visam produtos seletivos, eficientes e com menores riscos ambientais, incluindo
199 menor toxicidade aos seres humanos e outros animais. Dentre as estratégias disponíveis
200 para a busca de novos herbicidas está a prospecção de moléculas com atividade biológica.
201 Com recursos da bioinformática é possível encontrar moléculas inibidores para alvos

202 específicos do metabolismo (enzimas/proteínas) que sejam diferentes dos atuais alvos dos
203 herbicidas comerciais.

204 Os estudos *in silico* permitem investigar mecanismos das interações proteína-
205 proteína e proteína-ligante além de permitir simulações que se aproximem da realidade da
206 proteína na planta, servindo como ferramenta de apoio para a investigação teórica da
207 capacidade de inibição que enzimas alvo possam apresentar. Novas ferramentas de
208 bioinformática permitem inclusive simular se o ligante pode perder viabilidade após
209 mutações no alvo (Verli, 2014).

210 O enxofre é um macronutriente vital para plantas e animais. Animais podem
211 incorporar apenas as formas orgânicas do enxofre, presente nos aminoácidos que contêm
212 este elemento como a metionina e a cisteína. Por sua vez, as plantas podem captar e reduzir
213 as formas inorgânicas do enxofre e assimilá-lo em uma variedade de compostos orgânicos
214 (Buchanan, 2015). O enxofre é fundamental para a síntese de proteínas, coenzimas (biotina
215 e coenzima A), grupos prostéticos (como os centros ferro-enxofre), compostos de defesa
216 (glutathiona e glucosinolatos) e vários pigmentos e hormônios (Capaldi et.al., 2015;
217 Gigolashvili e Kopriva, 2014; Kopriva et al., 2012).

218 As plantas são capazes de reduzir sulfato presente no solo em uma via conhecida
219 como via de assimilação do sulfato. A principal via de assimilação ocorre em três passos:
220 ativação do sulfato inorgânico, redução a sulfeto e incorporação do sulfeto no precursor da
221 cisteína (Birke et al., 2012; Buchanan, 2015). No terceiro passo, redução e incorporação do
222 sulfeto a reação é catalisada pela O-acetilserina(tiol)liase (OAS-TL), também conhecida
223 como cisteína sintase (E.C. 2.5.1.47).

224 A síntese de cisteína está relacionada à fase de redução assimilatória do sulfato,
225 marcando a fixação de sulfeto inorgânico em um esqueleto de carbono. A O-acetilserina
226 (tiol)liase (OAS-TL) catalisa a reação do sulfeto inorgânico com a O-acetilserina (OAS).
227 Nas plantas, como nas bactérias, a reação é catalisada por O-acetilserina (tiol) liase (OAS-
228 TL; EC 2.5.1.47; também chamada cisteína sintase) e requer dois substratos: (1) sulfeto
229 livre, fornecido pela via de redução de sulfato, e (2) O-acetilserina (OAS), um derivado
230 da serina que é metabolicamente exclusivo da cisteína síntese. OAS é gerado pela serina
231 acetiltransferase (SAT; EC 2.3.1.30) em uma reação catalisada de serina e acetil coenzima
232 A (Kredich, 1996; Hell et al., 2002; Hell, 2003; Droux, 2004).

233 Recentemente, o complexo cisteína sintase foi sugerido como o centro de um
234 modelo de detecção de metabólito celular baseado na associação e dissociação de SAT e
235 OAS TL (Hell e Hillebrand, 2001; Hell et al., 2002; Droux, 2003). De acordo com análises

236 cinéticas, SAT é mais ou apenas ativa no complexo, enquanto a OAS-TL é basicamente
237 inativa em associação com SAT e só forma cisteína como um dímero livre (Droux et al.,
238 1998). Como a atividade SAT é sempre limitante da taxa em comparação com a atividade
239 OAS-TL (Nakamura e Tamura, 1990; Droux et al., 1998), a quantidade de SAT proteína
240 ligada a OAS-TL no complexo determina a taxa da formação de OAS e, finalmente, da
241 síntese de cisteína.

242 A cisteína é direta ou indiretamente o precursor de todos os compostos orgânicos
243 que contém enxofre em plantas e animais, inclusive do aminoácido metionina (Jurado et
244 al., 2011), ambos sendo aminoácidos essenciais para a síntese de todas as proteínas. A
245 cisteína desempenha um papel importante na manutenção da estrutura tridimensional das
246 proteínas. Grupos tióis das cadeias laterais de resíduos de cisteína distantes entre si na
247 cadeia polipeptídica podem formar ligações dissulfeto que ajudam a estabilizar a estrutura
248 terciária e quaternária de proteínas, sobretudo em proteínas grandes e extracelulares (Ufaz
249 e Galili, 2008).

250 Considerando a relevância da cisteína para o metabolismo primário das plantas e a
251 necessidade de herbicidas com novos mecanismos de ação, neste trabalho utilizou-se um
252 modelo da estrutura tridimensional de OAS-TL obtida *in silico* anteriormente pelo nosso
253 grupo (Foletto-Felipe et al., 2021) para prospectar por técnicas de bioinformática novos
254 compostos orgânicos com potencial para inibir a enzima-alvo. Em seguida, nós testamos a
255 molécula com melhor escore *in vivo* em plantas de *Ipomea grandifolia*.

256256

257 MATERIAIS E MÉTODOS

258 Ensaio *in silico*

259

260 *Varredura virtual pelo método de docking molecular*

261 Para a realização da varredura virtual, utilizou-se a estrutura tridimensional da
262 enzima OAS-TL, modelada anteriormente pelo grupo de pesquisa. A modelagem
263 apresenta sequências de aminoácidos da enzima OAS-TL de milho (*Zea mays* L.) O
264 modelo tridimensional da enzima OAS-TL (ZmCSynt) foi obtido por substituições
265 pontuais na estrutura cristalográfica do molde com relação a sequência de aminoácidos.
266 No sítio ativo da enzima foi modelado o substrato OAS e o cofator piridoxial fosfato
267 (PLP) e a estrutura final consiste em um homodímero (Foletto-Felipe et al., 2021).

268 Foram validados protocolos de docking molecular em dois programas: AutoDock
269 Vina (Trott e Olson, 2010) e Autodock 4 implementados na interface Pyrx-0.9 (Dallakyan
270 e Olson, 2015). Primeiramente, foi realizado o *redocking* molecular com o substrato da
271 enzima OAS-TL, a molécula OAS. O *redocking*, consiste em avaliar a capacidade de
272 interação do substrato endógeno, ou seja, o substrato presente na estrutura tridimensional,
273 de se desconectar da estrutura e ao ser inserido novamente, apresentar a mesma
274 configuração anterior, gerando um escore de referência para ser utilizado na varredura
275 virtual pelo método de docking.

276 Para a varredura virtual, foram construídas duas bibliotecas de moléculas a partir da
277 base de dados ZINC Database (Sterling et al., 2015). A primeira biblioteca era composta
278 por moléculas pequenas comercializáveis, disponíveis no catálogo da empresa Acros e a
279 segunda biblioteca era composta por moléculas pequenas comercializáveis, disponíveis no
280 catálogo da empresa Sigma-Aldrich. Após a construção das bibliotecas, estas foram
281 filtradas pelos critérios ADMETOX (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e
282 toxicidade) através do Programa DataWarrior (Sander, 2015) e pelas Regras de Lipinski
283 (Lipinski, 2016). Após filtradas, as bibliotecas foram submetidas aos programas de
284 docagem utilizando os protocolos validados na etapa de *Redocking*.

285 Após os resultados de escore de cada molécula, emitidos pelos programas de
286 docagem, aquelas que apresentavam escore superior ao valor do escore do substrato OAS,
287 foram analisadas visualmente por meio do programa Pymol e, aqueles que se mostraram
288 promissores foram submetidos a três novas repetições, nos programas AutoDock Vina,
289 AutoDock 4, eliminar resultados falso-positivos. Para expressão do resultado, o escore

290 médio relativo (MRS) das moléculas promissoras, foram calculados utilizando a fórmula
 291 descrita na equação 1.

292 O MRS é um cálculo do valor médio dos escores obtidos nos diferentes programas
 293 de docking molecular utilizados na varredura virtual. Quanto maior seu valor, melhor a
 294 interação da molécula candidata com o sítio de ligação na enzima.

295

$$MRS = \frac{1}{N_p} \left[\left(\frac{S_{p1}}{BS_{p1}} \right) + \left(\frac{S_{p2}}{BS_{p2}} \right) + \dots \right]$$

296

297 MRS = Escore médio relativo

298 N_p= número de programas de docking molecular utilizados nas simulações

299 S_p = Escore de cada ligante no programa

300 B_{S_p} = melhor escore fornecido pelo programa dentre todos os ligantes

301

302 **Ensaio *in vivo***

303

304 ***Germinação e crescimento inicial***

305 Sementes de *Ipomoea grandifolia* foram adicionadas em ácido sulfúrico 95% para
 306 quebra de dormência por 40 minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas e escolhidas
 307 para a semeadura. Foram utilizados Gerbox de acrílico sendo seu interior forrado com papel
 308 de germinação (Germitest). A semeadura consistiu em conter 50 sementes por Gerbox,
 309 sendo fechados com plástico filme. A solução utilizada para manter as sementes hidratadas
 310 foi ajustada para estar em pH 6,0. Foi avaliada a germinação, contado as sementes
 311 diariamente durante 5 dias e no último dia mediu-se em papel milimetrado o crescimento
 312 inicial, além de parâmetros biométricos e de massa seca e massa fresca foram obtidos para
 313 dados posteriores. Para esse experimento, foram utilizadas 5 réplicas de cada tratamento,
 314 ou seja, foram 5 gerbox contendo sementes emergidas apenas com água, 5 gerbox contendo
 315 sementes emergidas em concentração de 0,25 mM de O-Benzil-L-tirosina (OBT) e 5
 316 gerbox contendo sementes emergidas em concentração de 0,5 mM de OBT. O objetivo
 317 desse experimento foi analisar diferenças entre os tratamentos sob os parâmetros: índice de
 318 germinação, comprimento da raiz do crescimento inicial, comprimento do caule do
 319 crescimento inicial e comprimento total do crescimento inicial.

320

321 ***Cultivo em substrato – Aplicação em solo e aplicação foliar***

322 Sementes de *Ipomoea grandifolia* foram adicionadas em ácido sulfúrico 95% para
 323 quebra de dormência por 40 minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas e escolhidas

324 para o plantio. Foram plantadas 6 sementes por vaso de 100 g de substrato de pinus e
325 vermiculita na razão 1:1. Elas foram semeadas a 2,5 cm abaixo da superfície. Os vasos
326 foram umedecidos com água até a capacidade de campo e em seguida, foram
327 acondicionados em sala de cultivo de plantas com temperatura de 30 °C, fotoperíodo 12/12
328 h e DFF de $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, onde permaneceram por 21 dias. Ao longo dos dias foram
329 desbastadas para que restassem apenas 2 plantas por vaso.

330 O delineamento experimental se dispôs da seguinte forma: foram destinadas 5
331 plantas para o grupo controle de solo, o qual recebeu via solo (substrato) água e solução
332 nutritiva de Hoagland a cada 48 horas; 5 plantas para o grupo aplicação em solo 0,25 mM,
333 o qual recebeu solução nutritiva de Hoagland com OBT na concentração de 0,25mM; 5
334 plantas para o grupo aplicação em solo 0,5 mM o qual recebeu solução nutritiva de
335 Hoagland com OBT na concentração de 0,5 mM. Além da aplicação da molécula via solo,
336 também foi realizado aplicação via foliar. Para isso, 5 plantas foram destinadas para o grupo
337 controle foliar o qual recebeu via aplicação foliar apenas com Áureo e água deionizada,
338 contando com uma média de 20 ml por planta, aos 15 dias de cultivo; 5 plantas para o grupo
339 aplicação foliar 0,25 mM, o qual recebeu via foliar aspensão de OBT na concentração de
340 0,25 mM juntamente ao Áureo na concentração de 0,5% e 5 plantas para o grupo aplicação
341 foliar 0,5 mM o qual recebeu via foliar aspensão de OBT na concentração de 0,5 mM
342 juntamente ao Áureo. Todo o experimento foi desenvolvido em pH 6,0.

343 No primeiro dia de plantio, houve rega de 100 mL com apenas água nas plantas
344 controles e da droga nas plantas que receberam aplicação via solo. Ao longo dos dias as
345 regas passaram a ser de 50 ml e foi incrementada a solução nutritiva de Hoagland durante
346 todos os dias de experimento que durou 21 dias. O objetivo desse experimento foi analisar
347 diferenças entre os tratamentos sob os parâmetros: dose da droga desconhecida,
348 comprimento de raiz e de parte aérea, massa fresca e seca da raiz, massa fresca e seca da
349 parte aérea e análise de clorofila (SPAD).

350350

351 ***Cultivo em hidroponia – Aplicação de OBT nas raízes***

352 Sementes de *Ipomoea grandifolia* foram adicionadas em ácido sulfúrico 95% para
353 quebra de dormência por 40 minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas e escolhidas
354 com desenvolvimento e comprimento uniforme de raízes (3 a 5 cm). Em seguida, foi feito
355 a semeadura das sementes em papel de germinação (Germitest) molhado na proporção
356 ideal, recobertas com outra folha de papel, enroladas delicadamente e acondicionadas em
357 tubos apropriados, para preservar a umidade, e climatizados, sendo que o conjunto foi

358 enrolado e levado à germinadora BOD nas condições de 25°C, fotoperíodo 12h/12h
359 (claro/escuro).

360 As plântulas viáveis obtidas após a germinação foram selecionadas, medidas, e
361 acondicionadas em suportes ajustáveis apropriados para o crescimento em hidroponia,
362 contando com um volume final de 100 ml por suporte, utilizando-se solução nutritiva de
363 Hoagland. Utilizou-se 5 repetições para as plantas controle, 5 repetições para as plantas
364 tratadas com uma dose de 0,25 mM do inibidor e 5 repetições para as plantas tratadas com
365 uma dose de 0,5 mM. Todo o experimento foi desenvolvido em pH 6,0. A solução nutritiva,
366 contendo ou não OBT (0,25 mM e 0,5 mM), foi substituída a cada 48 h durante 12 dias. O
367 objetivo desse experimento foi analisar diferenças entre os tratamentos sob os parâmetros:
368 dose da droga desconhecida, comprimento de raiz e de parte aérea, massa fresca e seca da
369 raiz, folhas e de parte aérea, análise de clorofila (SPAD), quantidade de folhas e área foliar.
370370

371 **Parâmetros biométricos**

372 ***Comprimento da raiz e parte aérea***

373 As medidas das raízes e da parte aérea de ambos os experimentos contaram com o
374 auxílio de papel milimetrado e régua padrão 30 cm. Após as medidas, as raízes eram
375 seccionadas da parte aérea e eram destinadas para análise dos próximos parâmetros.

376376

377 ***Massa fresca e massa seca***

378 Foi realizada análise de massa fresca e seca de todos os experimentos deste trabalho,
379 sendo que todas as estruturas analisadas (raiz, parte aérea e folhas) foram devidamente
380 pesadas em balança analítica a fim de medir sua massa fresca e em seguida foram
381 acondicionadas em papel tipo kraft e levadas à estufa de secagem à 70 °C por 72 h ou até
382 obtenção de peso constante. Após esse período, com as amostras secas, foi possível pesar
383 novamente na mesma balança, a massa seca das mesmas.

384384

385 ***Área foliar***

386 A área foliar foi determinada com a utilização do equipamento LiCor3100C que
387 utiliza a área do sombreamento causado pela folha, como referência para o cálculo da área
388 foliar apresentada em cm². A avaliação foi realizada com todas as folhas totalmente
389 desenvolvidas da planta (eófilo e folíolos dos trifólios), as folhas foram excisadas da planta
390 e avaliadas.

391391

392 *Análise de contagem de folhas*

393 As folhas foram seccionadas da parte aérea e contabilizadas manualmente,
394 considerando as folhas totalmente desenvolvidas de cada planta.

395395

396 *Análise combinada dos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência de clorofila*

397 Um analisador de gás por infravermelho (LICOR-6800) foi utilizado para avaliar
398 os parâmetros de trocas gasosas, tais como taxa fotossintética (A), condutância estomática
399 (gs), transpiração (E) e concentração intercelular de CO₂ (Ci). As medições foram
400 realizadas das 7h as 11h30min, a 25 °C e sob uma densidade de fluxo de fótons
401 fotossinteticamente ativos (DFFFA) de 1200 mol m⁻² s⁻¹ (Marchiosi et al., 2016).

402 A fluorescência da clorofila *a* foram estimadas usando o fluorômetro do LICOR-
403 6800 de amplitude modulada. Após 10 horas de adaptação ao escuro, a fluorescência inicial
404 (F₀) e a fluorescência máxima (F_m) foram estimadas na última folha completamente
405 expandida. O rendimento quântico fotossintético máximo do PSII (F_v/F_m) foi calculado e
406 o rendimento quântico do PSII *in vivo* (ΦF) em plantas adaptadas à luz, simultaneamente
407 com as análises de trocas gasosas (Marchiosi et al., 2016).

408 Nas condições adaptadas à luz, após 25 a 30 min de aclimação por planta, foram
409 mensurados em conjunto com as análises de trocas gasosas os seguintes parâmetros:
410 eficiência quântica fotoquímica efetiva (F_v'/F_m'), taxa de transporte de elétrons no PSII
411 (ETR), *quenching* fotoquímico (qP) e *quenching* não-fotoquímico (qN) (Genty et al.
412 1989; Galazzi 2011). Estes parâmetros foram determinados sob uma DFFFA de 1400
413 μmol m⁻² s⁻¹ em duas condições de concentração de CO₂ mantidas na câmara foliar (400
414 e 2000 μmol mol⁻¹). Todas as avaliações foram realizadas utilizando uma cabeça sensora
415 com câmara foliar de 2 cm², temperatura de 27 °C e déficit de pressão de vapor controlado
416 entre o ar e a folha (DPV) em 0,2 KPa com vazão de 700 μmol s⁻¹.

417417

418 *Quantificação de clorofila*

419 O índice SPAD (Soil Plant Analysis Development) foi determinado usando um
420 clorofilômetro (SPAD-502, Konica Minolta, Ramsey, EUA). O índice SPAD foi medido
421 pela transmissão de luz vermelha a 650 nm e a 940 nm, pelo uso do aparelho SPAD-502
422 (Minolta Corporation, Ramsey, USA). Com base nesses dois valores de transmissão foram
423 calculado o índice SPAD (Soil Plant Analysis Development).

424424

425425

426 Análise estatística

427 Para os dados apresentados, foi utilizado análise de variância unidirecional (*One-*
428 *way ANOVA*) e as diferenças significativas foram analisadas no teste de comparação
429 múltipla de Dunnett. Os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente
430 significativos em ambos os testes. As análises foram realizadas utilizando o pacote de
431 software Prisma™.

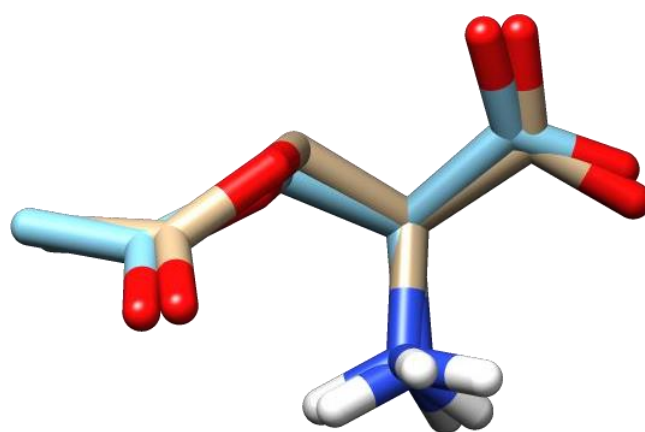
432432

433 **RESULTADOS**

434

435 Para estabelecer o protocolo de simulação de docking ideal e viabilizar o uso do
436 modelo final da OAS-TL de milho (Foletto-Felipe et al.,2021) em estudos de varredura
437 virtual foi realizado o *redocking* (Figura 3) utilizando os programas AutoDock Vina e
438 AutoDock 4, com algoritmo de busca e ranqueamento padrão, grid de 0,375 Å, RMSD
439 menor que 2.0 Å, com centro de busca nos eixos x, y e z de 67, 49, -19 para ambos os
440 programas, e tamanho da caixa em cada eixo de 10 e 30, respectivamente.

441



442

443 **Figura 1.** *Redocking* da O-acetilserina (OAS) pelo programa Autodock Vina na interface gráfica Pyrx. A
444 imagem representa uma sobreposição satisfatória em relação ao ligante e seu sítio ativo. As cores em
445 questão são representadas da seguinte forma: vermelho: oxigênios; branco: hidrogênios; azul claro:
446 carbonos; azul escuro: nitrogênios.

447

448 A biblioteca com as moléculas disponíveis para venda na empresa Acros é
449 constituída ao todo por aproximadamente 17 mil moléculas. Após as filtragens pelos
450 critérios ADMETOX e Regras de Lipinski restaram aproximadamente 5 mil moléculas para
451 serem submetidas a docking molecular, das quais, 1000 apresentaram boas pontuações nos
452 programas testados. As moléculas resultantes da biblioteca da Acros após as filtragens,
453 foram avaliadas de acordo com os escores apresentados nos programas de docking
454 molecular, e as moléculas que apresentaram um escore maior que o escore do substrato,
455 foram selecionadas e suas interações foram analisadas visualmente. Após essa análise
456 visual quatro moléculas foram elencadas como promissoras para os testes *in vivo*, sendo
457 elas: ZINC16892208, ZINC2562555, ZINC159056 e ZINC149993. No entanto, apesar de
458 terem sido bem ranqueadas no docking, uma análise visual, sendo ela visual revelou que
459 mesmo os melhores candidatos faziam poucas interações com o sítio ativo, podendo não

460 estabelecer uma inibição competitiva, como é o interesse por isso, estas moléculas não
461 foram utilizados para seguir os estudos até o momento.

462 A biblioteca de Sigma inicialmente apresentava cerca de 125 mil moléculas. Após
463 ser submetida à filtragem de toxicidade e de coeficiente de partição, foram selecionadas
464 aproximadamente 52 mil moléculas para docagem. Uma primeira varredura foi realizada
465 através do Vina resultando em aproximadamente duas mil moléculas, as quais foram
466 avaliadas cautelosamente com base em suas interações com o sítio ativo. Com isso, 86
467 moléculas foram classificadas como candidatas para à inibição da enzima OAS-TL. Estas
468 moléculas foram submetidas a docagem molecular no programa Autodock 4, resultando em
469 63 moléculas promissoras. Em seguida foram realizadas três repetições no programa
470 Autodock Vina e quatro repetições no programa Autodock 4 demonstrando resultados
471 estáveis nos dois softwares.

472 A Tabela 1 apresenta os ligantes selecionados da biblioteca da Sigma-Aldrich. Os
473 ligantes estão organizados do melhor para o pior escore médio relativo (MRS) obtido e
474 foram os que apresentaram escores acima do substrato OAS (sombreado em amarelo).
475 Em destaque na tabela é mostrado as três moléculas adquiridas (em negrito) para teste *in*
476 *vitro* e *in vivo*.

477 A 10 primeiras moléculas elencadas na tabela receberam um bom ranqueamento,
478 sendo assim, são bons candidatos à inibidores da enzima OAS-TL, sendo também, boas
479 moléculas candidatas com potencial herbicida. Porém por conta do valor dessas
480 moléculas e da disponibilidade para compra, as moléculas compradas para teste *in vivo*
481 estão representadas em negrito e, a escolha destas se baseou na similaridade destas
482 moléculas a um composto já testado anteriormente pelo grupo de pesquisa, e também,
483 pelo preço destas moléculas.

484484

485 **Tabela 1.** Resultados do virtual screening da biblioteca da Sigma-Aldrich em relação ao ligante OAS.
486 Ligantes com seus respectivos códigos retirados do servidor Zinc Database, sigla das moléculas candidatas
487 e valor do Score médio relativo (MRS) de cada molécula. Na tabela à esquerda, consta o código Zinc das
488 moléculas e à direita o seu escore médio relativo (MRS). O MRS está elencado do maior, que representa o
489 melhor valor, para o menor, que representa um valor menos significativo.

| Código Zinc Database | MRS |
|-----------------------------|--------------|
| ZINC133159 | 1,000 |
| ZINC56586 | 0,997 |
| ZINC2512908 | 0,969 |
| ZINC402754 | 0,955 |

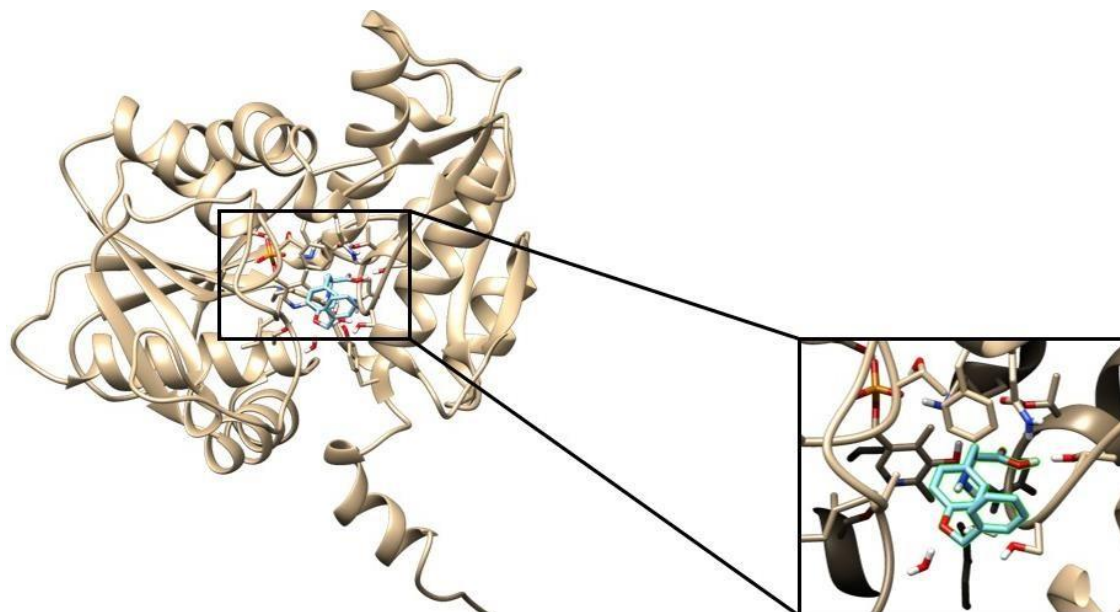
| | |
|-------------------|--------------|
| ZINC403083 | 0,949 |
| ZINC57131 | 0,945 |
| ZINC57156 | 0,941 |
| ZINC393777 | 0,938 |
| ZINC391258 | 0,932 |
| ZINC56406 | 0,932 |
| ZINC422531 | 0,925 |
| ZINC403081 | 0,924 |
| ZINC56393 | 0,924 |
| ZINC57328 | 0,923 |
| ZINC83315 | 0,919 |
| ZINC391257 | 0,912 |
| ZINC895330 | 0,904 |
| ZINC6093700 | 0,903 |
| ZINC1529986 | 0,896 |
| ZINC2244320 | 0,891 |
| ZINC4202402 | 0,887 |
| ZINC4202289 | 0,886 |
| ZINC57132 | 0,886 |
| ZINC968044 | 0,882 |
| ZINC12954078 | 0,879 |
| ZINC56407 | 0,878 |
| ZINC266964 | 0,878 |
| ZINC49538680 | 0,871 |
| ZINC3871381 | 0,870 |
| ZINC8362655 | 0,864 |
| ZINC2556575 | 0,860 |
| ZINC86010 | 0,860 |
| ZINC85742 | 0,857 |
| ZINC391781 | 0,856 |
| ZINC113778 | 0,856 |
| ZINC388689 | 0,853 |
| ZINC4255308 | 0,851 |
| ZINC57329 | 0,850 |
| ZINC403488 | 0,850 |
| ZINC895459 | 0,849 |
| ZINC388371 | 0,842 |
| ZINC83317 | 0,842 |
| ZINC19230004 | 0,832 |
| ZINC113791 | 0,829 |
| ZINC3677329 | 0,828 |
| ZINC156682 | 0,828 |
| ZINC1700281 | 0,827 |
| ZINC1640080 | 0,826 |
| ZINC2047472 | 0,826 |

| | |
|---------------|-------|
| ZINC2385763 | 0,824 |
| ZINC1569733 | 0,820 |
| ZINC4222893 | 0,819 |
| ZINC2560148 | 0,818 |
| ZINC2524882 | 0,816 |
| ZINC1719011 | 0,815 |
| ZINC126560750 | 0,814 |
| ZINC12360599 | 0,813 |
| ZINC2516114 | 0,810 |
| ZINC2169782 | 0,807 |
| ZINC82067976 | 0,805 |
| ZINC2170217 | 0,802 |
| ZINC19506538 | 0,801 |
| ZINC392005 | 0,793 |
| ZINC1531037 | 0,791 |
| ZINC895446 | 0,790 |

490490

491 A molécula O-benzil-L-tirosina (OBT) foi selecionado para compra e para ser
 492 utilizado no decorrer deste trabalho devido à custos e similaridades entre moléculas que já
 493 haviam sido testadas em trabalhos anteriores pelo grupo de pesquisa, e devido também, ao
 494 seu bom ranqueamento pelos programas de docking, apresentar eficientes interações com
 495 o sítio ativo e um MRS superior em relação ao ligante de referência e entre as outras
 496 moléculas. A molécula OBT foi posteriormente encaminhada

497 para os testes *in vivo* e avaliação da taxa de inibição. A molécula apresenta MRS
 498 de 1,00 e logP 0,73. O logP representa o coeficiente de partição e refere-se à solubilidade
 499 da molécula. Sua interação e ancoragem no sítio ativo da enzima, é mostrado na Figura 4.
 500 Além da molécula OBT, adquirida da Sigma-Aldrich (Merk) utilizada neste trabalho, foram
 501 adquiridas da empresa Sigma-Aldrich as moléculas O-benzil-L-serina, que apresenta MRS
 502 de 0,86 e logP -1,29 e S-fenil-L-cisteína, que apresenta MRS de 0,85 e logP -0,55, os quais
 503 foram selecionados para os testes *in vitro* e *in vivo*.



504 **Figura 2.** Representação *in silico* da molécula OBT no sítio catalítico da OAS-TL. Na figura em questão,
505 representa-se em vermelho os oxigênios. Em branco os hidrogênios. Em azul claro os carbonos. Em azul
506 escuro os nitrogênios. A imagem inteira representa o OBT em seu sítio ativo de ligação juntamente a sua
507 cadeia proteica. Já o destaque representa o ligante OBT no seu sítio ativo de uma forma mais detalhada.

508

509 ***Tratamento com OBT via solo:***

510 A Figura 5 apresenta o comprimento de raiz da parte aérea, massa fresca da raiz e
511 da parte aérea, massa seca da raiz e da parte aérea e o índice SPAD. Os tratamentos com
512 OBT reduziram o comprimento de raiz e elevaram o comprimento da parte aérea. Os demais
513 parâmetros não foram significativamente diferentes do controle.

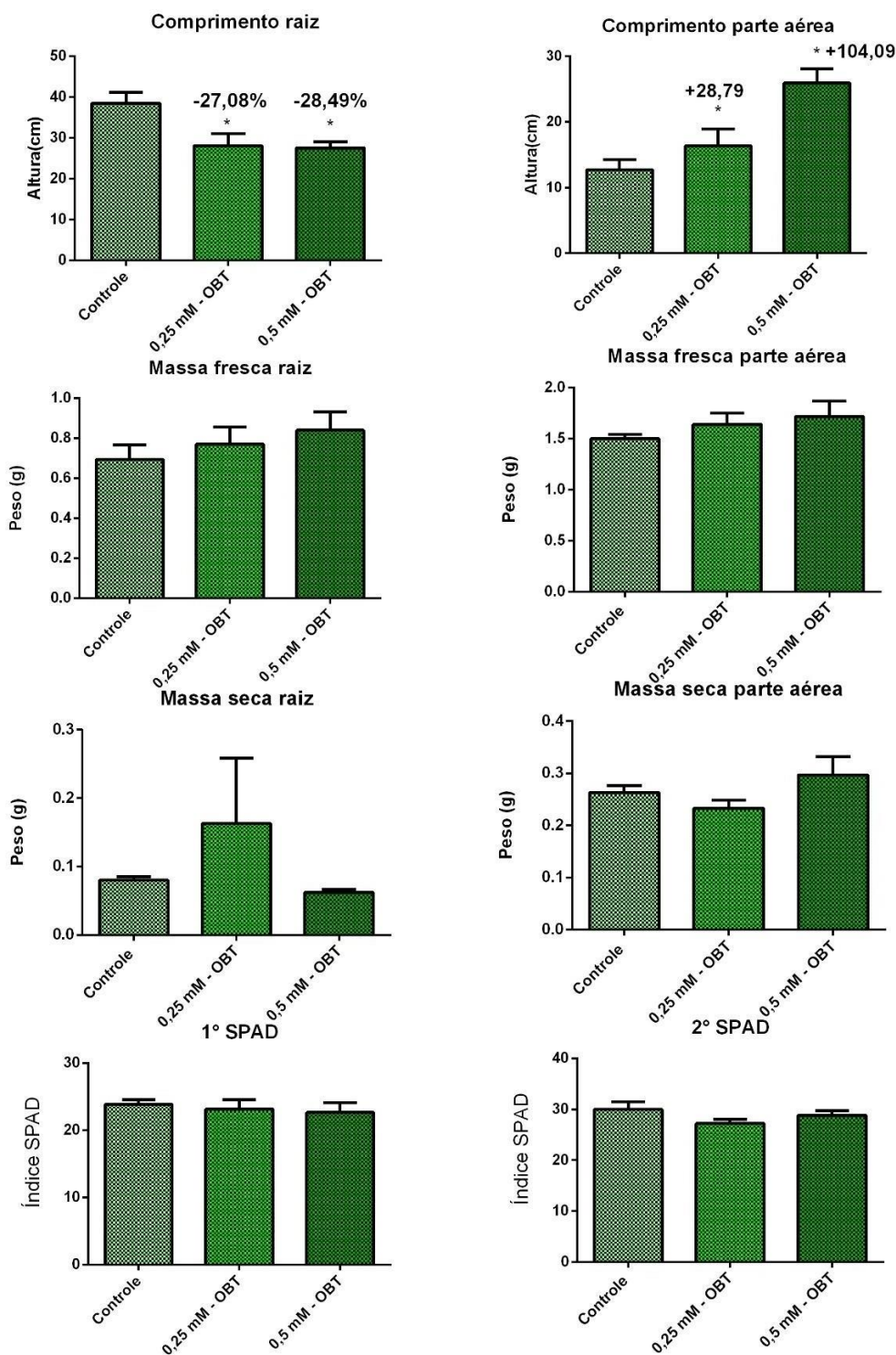


Figura 5. Dados biométricos das plantas de *I. grandifolia* tratadas com (OBT) via solo/substrato em relação aos parâmetros de comprimento de raiz e de parte aérea, massa fresca da raiz e da parte aérea, massa seca da raiz e da parte aérea e 1° e 2° índice SPAD. Considerou-se $P \leq 0,05$ para os resultados que apresentaram diferenças significativas, e os mesmos estão identificados e representados com asterísco (*) na parte superior das barras.



514

515 **Figura 6.** Aspectos do comprimento de raízes e parte aérea. Na prancha da esquerda e da direita são
 516 apresentadas plantas tratadas com OBt no solo. Em cada prancha aparecem três plantas. À esquerda:
 517 controle. No meio: OBt 0,25 mM. à direita: OBt 0,5 mM.

518

519

Nas duas doses em que realizamos os tratamentos com OBt observamos uma
 520 redução significativa no comprimento das raízes em relação ao grupo das plantas controle
 521 (Figuras 5 e 6). As reduções foram de 27,08% no grupo OBt 0,25 mM, com as raízes
 522 atingindo 28,06 cm e de 28,49% no grupo OBt 0,5 mM com as raízes medindo 27,52 cm
 523 em relação ao controle, com 38,48 cm de comprimento de raízes. Esses resultados
 524 corroboram a hipótese de que a molécula foi absorvida pela raiz e inibiu o desenvolvimento
 525 das raízes supostamente pela indisponibilidade de cisteína para a síntese constitutiva de
 526 proteínas.

527

Já em relação à parte aérea, nas duas concentrações, os tratamentos com OBt
 528 induziram um aumento significativo em relação ao controle (Figura 5 e 6). Um aumento de
 529 28,79% foi observado no grupo OBt 0,25 mM com a parte aérea medindo 16,37 cm e
 530 aumento de 104,09% com OBt 0,5 mM, com sua parte aérea atingindo 25,94 cm quando
 531 comparadas ao controle, com parte aérea medindo 12,71 cm. Em face o dado anterior, estes
 532 resultados sugerem um possível efeito compensatório da parte aérea que cresce para obter
 533 energia e compensar o déficit das raízes. Por outro lado, o substancial aumento do
 534 crescimento na parte aérea na menor concentração da molécula também parece refletir um
 535 efeito estimulante imprevisto do OBt. Maiores estudos precisam ser realizados a fim de
 536 esclarecer este efeito.

537

538

539 ***Tratamento com OBT via foliar:***

540 A Figura 7 refere-se aos parâmetros biométricos avaliados após a aplicação de OBT
541 via foliar. Os tratamentos aumentaram a massa fresca da parte aérea no grupo OBT 0,25
542 mM e diminuíram no grupo OBT 0,5 mM. O índice SPAD também foi aumentado no grupo
543 tratado com OBT 0,25 mM e diminuído no grupo tratado com OBT 0,5 mM. Os demais
544 parâmetros não foram significativamente diferentes do controle.

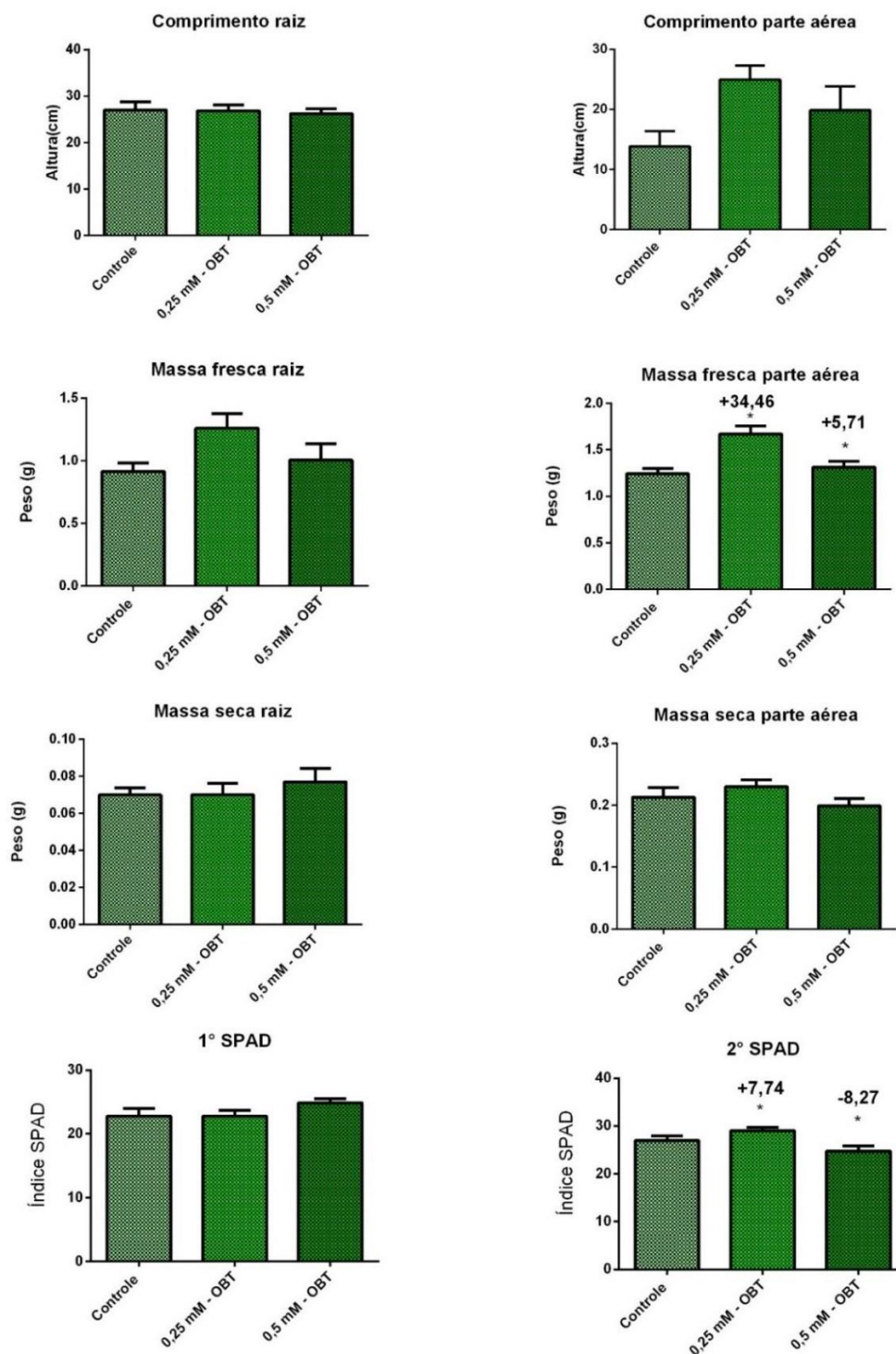


Figura 7. Dados biométricos das plantas de *I. grandifolia* tratadas com (OBt) via foliar em relação aos parâmetros de comprimento de raiz e de parte aérea, massa fresca da raiz e da parte aérea, massa seca da raiz e da parte aérea e 1° e 2° índice SPAD. Considerou-se $p \leq 0,05$ para os resultados que apresentaram diferenças significativas, e os mesmos estão identificados e representados com asterisco (*) na parte superior das barras.



545

546 **Figura 8.** Aspectos de clorose nas folhas que recebem OBt no tratamento via foliar. Acima: Controle.
547 Abaixo: OBt 0,5 mM.

548

549

550 O índice SPAD foi significativamente afetado após o tratamento via foliar das
551 plantas com o OBt nas duas concentrações (Figuras 7 e 8). Na dose de 0,25 mM o SPAD
552 aumentou 7,74% e na dose de 0,5 mM, reduziu 8,27% em relação ao grupo controle (Figura
553 8). Esse resultado é compatível com o investimento na parte aérea observado com relação
554 ao comprimento na menor concentração, mas indica que na maior concentração o OBt já
555 pode estar ultrapassando a capacidade de reação da planta com relação à síntese de clorofila.
556 A redução no conteúdo de clorofila nas maiores concentrações de OBt pode ser observado
na Figura 8.



557

558 **Figura 9.** Aspectos visuais referente à massa fresca da parte aérea aplicação OBt via foliar. À esquerda:
559 Controle. Ao meio: OBt 0,25 Mm. À direita: OBt 0,5 mM.

560

561

562 Já em relação à massa fresca da parte aérea também aumentou com a aplicação
foliar do OBt nas duas concentrações (Figuras 7 e 9), sendo um aumento de 34,46% no

563 grupo OBT 0,25 mM, pesando em média 1,67 g e 5,71% no grupo OBT 0,5 mM, com peso
 564 de 1,313 g em relação ao grupo controle que pesou 1,242 g. Isso pode estar relacionado
 565 com uma espécie de resposta imunológica da planta, tendo em vista uma injúria ocasionada
 566 pelo inibidor.

567 Em relação aos parâmetros de análise de trocas gasosas (Tabela 2), os tratamentos
 568 com as concentrações testadas não apresentaram diferenças significativas em relação ao
 569 grupo controle, apenas uma tendência de possíveis diferenças entre os parâmetros. Embora
 570 o OBT tenha prejudicado o crescimento das plantas, os dados obtidos na análise de trocas
 571 gasosas e fluorescência sugere fortemente que a fotossíntese não é o mecanismo primário
 572 da ação da molécula, indicando que o mecanismo de ação da molécula analisado apresenta
 573 grande tendência de ter como mecanismo de ação enzimas da via do metabolismo do
 574 enxofre.

575

576 **Tabela 2.** Parâmetros da análise de trocas gasosas de plantas de *Ipomoea grandifolia* com 21 dias tratadas
 577 com OBT nas concentrações de 0,25 mM e 0,5 mM. gs: condutância estomática, Ci: concentração de
 578 carbono intercelular, A: assimilação de carbono, E: transpiração, EUA: eficiência o uso da água, Fv/Fm:
 579 eficiência fotoquímica máxima, Fv'/Fm': eficiência máxima efetiva, ΦPSII: rendimento fotoquímico do
 580 fotossistema II, ETR: taxa de transporte de elétrons, qP: quenching fotoquímico, NPQ: quenching não
 581 fotoquímico, qL: quenching não fotoquímico.

| Dose de OBT | gs mol (H ₂ O) m ⁻² s ⁻¹ | C _i μmol (CO ₂) mol ⁻¹ | A μmol (CO ₂) m ⁻² s ⁻¹ | E mol (H ₂ O) m ⁻² s ⁻¹ | EUA μmol (CO ₂) mol ⁻¹ (H ₂ O) |
|-------------|---|--|---|--|--|
| 0 mM | 0,13 ± 0,013 | 283,2 ± 7,27 | 8,27 ± 0,36 | 2,083 ± 0,188 | 4,162 ± 0,266 |
| 0,25 mM | 0,12 ± 0,016 | 287,4 ± 6,36 | 7,146 ± 0,61 | 1,92 ± 0,248 | 3,942 ± 0,238 |
| 0,5 mM | 0,12 ± 0,023 | 287,9 ± 10,22 | 7,34 ± 0,98 | 1,98 ± 0,346 | 3,995 ± 0,411 |

582

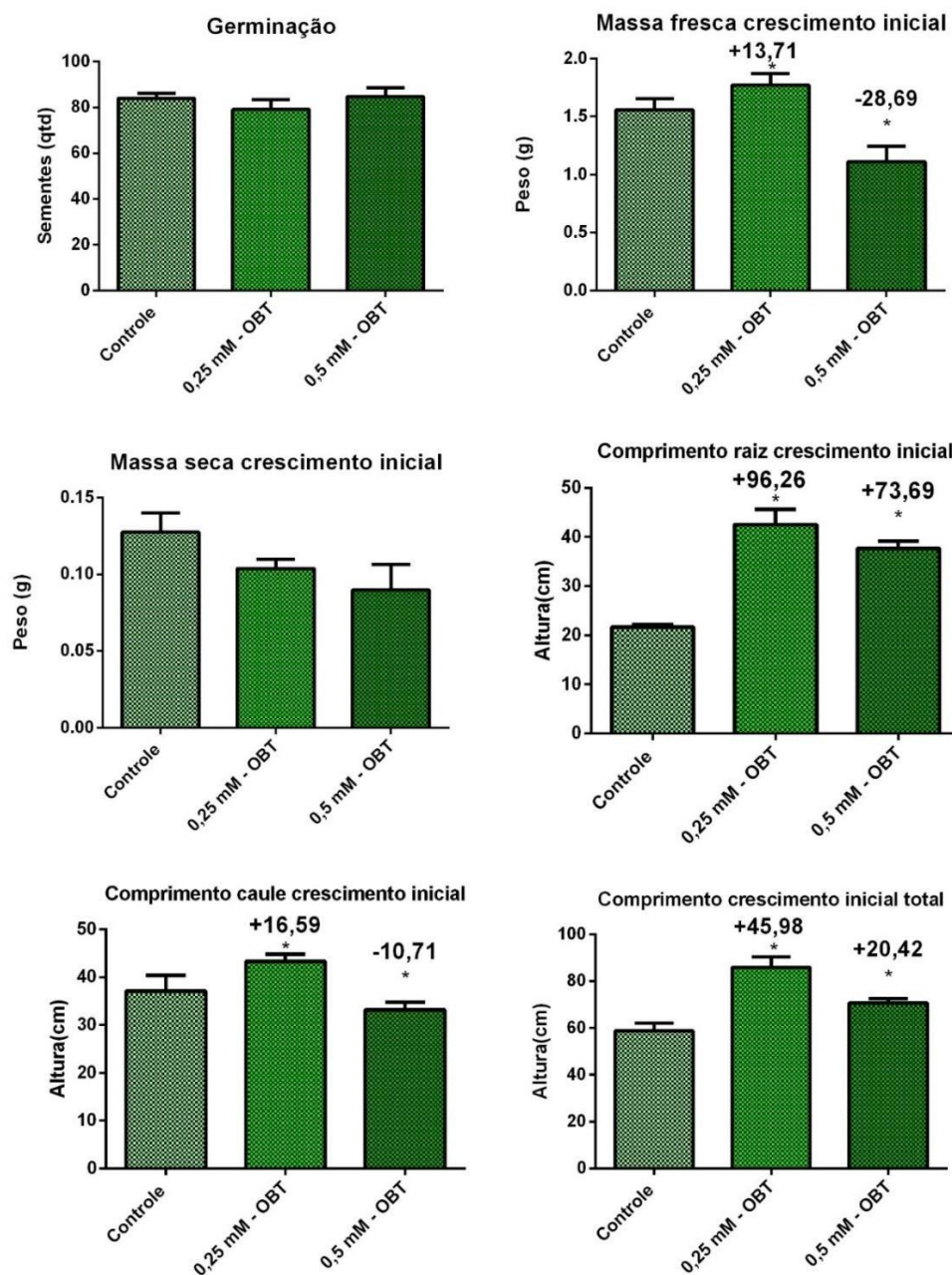
| Dose de OBT | F _v /F _m | F _v '/F _m ' | ΦPSII | ETR μmol (e ⁻) m ⁻² s ⁻¹ | qP | NPQ | qL |
|-------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------|--|--------------|-------------|--------------|
| 0 mM | 0,82 ± 0,007 | 0,44 ± 0,014 | 0,14 ± 0,006 | 48,72 ± 2,178 | 0,32 ± 0,014 | 2,29 ± 0,14 | 0,21 ± 0,013 |
| 0,25 mM | 0,79 ± 0,027 | 0,47 ± 0,013 | 0,12 ± 0,010 | 41,6 ± 3,641 | 0,26 ± 0,025 | 2,08 ± 0,18 | 0,16 ± 0,018 |
| 0,5 mM | 0,80 ± 0,007 | 0,49 ± 0,011 | 0,14 ± 0,015 | 47,92 ± 5,296 | 0,29 ± 0,032 | 1,80 ± 0,15 | 0,17 ± 0,023 |

598

599

600 **Tratamento com OBT na germinação e crescimento inicial:**

601 A Figura 10 refere-se aos dados de germinação, massa fresca e seca do
 602 crescimento inicial, comprimento da raiz e do caule do crescimento inicial e também o
 603 comprimento total do crescimento inicial. A germinação e a massa seca observadas no
 604 crescimento inicial indicam que houve um efeito inibitório da droga, porém, o efeito não
 605 foi estatisticamente significativo.



606
 607 **Figura 3.** Dados biométricos das plântulas de *I. grandifolia* tratadas com (OB) via gerbox/germinação em
 608 relação aos parâmetros de germinação, massa fresca e seca do crescimento inicial, comprimento da raiz, do
 609 caule e comprimento total do crescimento inicial. Considerou-se $p \leq 0,05$ para os resultados que
 610 apresentaram diferenças significativas, e os mesmos estão identificados e representados com asterisco (*)
 611 na parte superior das barras.
 612

613 Observamos um aumento na massa fresca do crescimento inicial nas plantas
 614 tratadas com a concentração de 0,25 mM de 13,71%, pesando em média 1,77 g e uma
 615 redução no crescimento inicial nas plantas tratadas com a concentração de 0,5 mM de
 616 28,69% com peso médio de 1,11 g em relação ao grupo controle, com peso médio de 1,55
 617 g (Figura 10). Foi observado também um aumento do comprimento das raízes no grupo das

618 plantas que receberam OBT na concentração de 0,25 mM de 96,26%, medindo em média
619 42,56 cm e também um aumento nas plantas tratadas com OBT na concentração de 0,5 mM
620 de 73,69%, medindo 37,67 cm em relação ao controle, medindo em média 21,69 cm (Figura
621 10).

622 Já em relação ao comprimento de raiz do crescimento inicial, observou-se aumento
623 nos dois grupos tratados, sendo um aumento de 96,26% no grupo OBT 0,25 mM medindo
624 em média 42,56 cm e no grupo OBT 0,5 mM medindo cerca de 37,67 cm, em relação ao
625 grupo controle, que mediu 21,69. Ao passo que em relação ao comprimento do caule do
626 crescimento inicial, observou-se um aumento no grupo das plantas que receberam OBT na
627 concentração de 0,25 mM de 16,59%, medindo 43,26 cm e uma redução de 10,71% nas
628 plantas tratadas com OBT na concentração de 0,5 mM, medindo 33,13 em relação ao
629 controle, que mediu em média 37,10 cm (Figura 10).

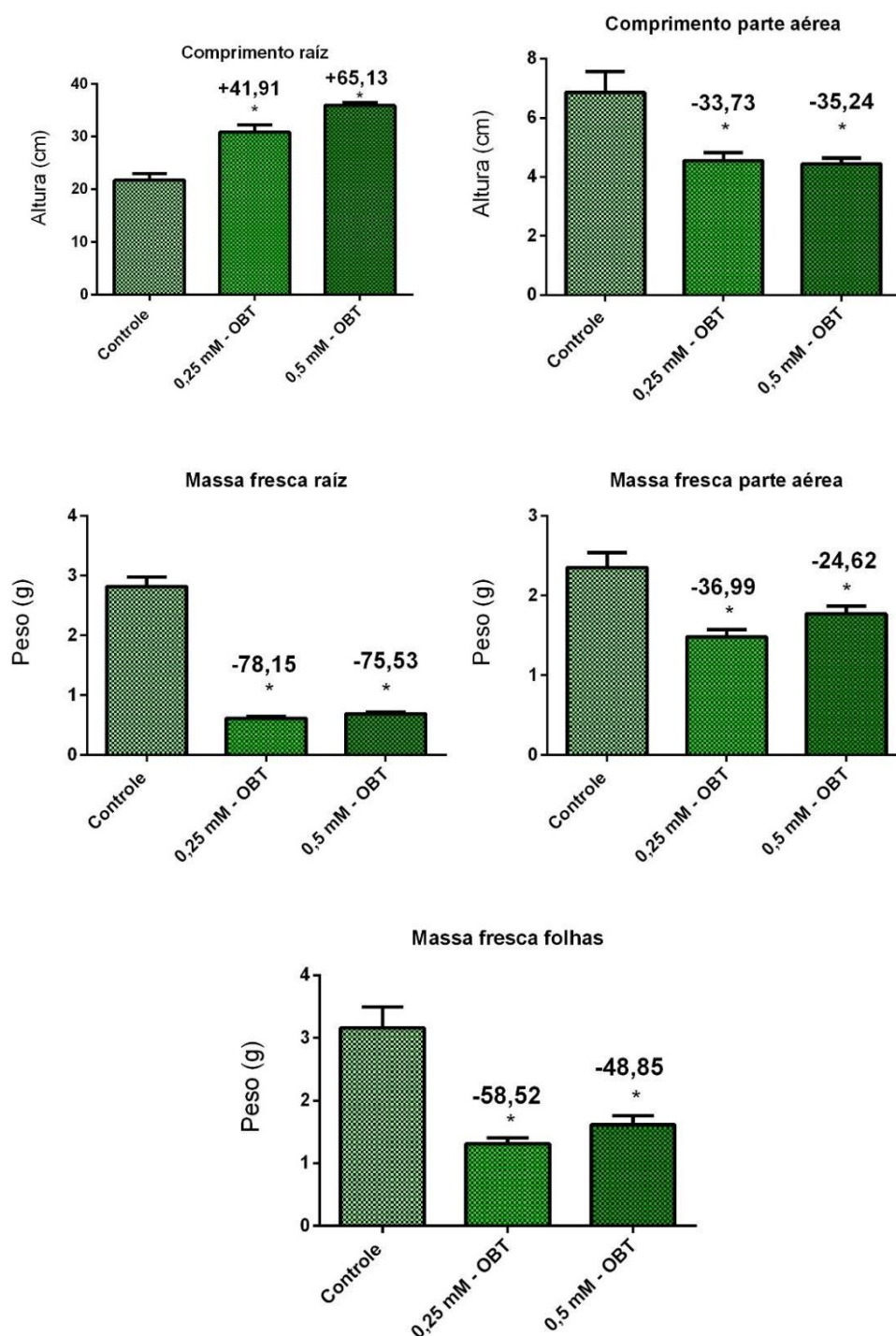
630 Também foi observado um aumento do comprimento total no grupo das plantas que
631 receberam OBT na concentração de 0,25 mM de 45,98% medindo em torno de 85,83 cm e
632 também um aumento nas plantas tratadas com OBT na concentração de 0,5 mM de 20,42%,
633 medindo 70,80 cm em relação ao controle, que mediu em média 58,79 cm (Figura 10).

634

635 ***Tratamento com OBT via raiz- hidroponia:***

636 A Figura 11 refere-se aos dados de comprimento da raiz e da parte aérea e massas
637 frescas da raiz, parte aérea e folhas. Também, alguns de nossos achados estão atrelados a
638 redução dos teores de L-cisteína, produto da OAS-TL, que a partir do seu déficit ocasiona
639 diversos problemas na síntese de vários compostos contendo enxofre.

640



641

642 **Figura 11.** Dados biométricos das plantas de *I. grandifolia* tratadas com (OBT) via hidroponia/raízes em
 643 relação aos parâmetros de comprimento de raiz e de parte aérea, massa fresca da raiz, parte aérea e folhas.
 644 Considerou-se $p \leq 0,05$ para os resultados que apresentaram diferenças significativas, e os mesmos estão
 645 identificados e representados com asterísco (*) na parte superior das barras.



646
 647 **Figura 12.** Aspectos visuais relacionados ao comprimento de raiz e parte aérea (cm): À esquerda: Controle.
 648 Ao meio: OBt 0,25 mM. À direita: OBt 0,5 mM.

649
 650 Houve um aumento significativo do comprimento das raízes com as plantas tratadas
 651 com OBt nas duas concentrações em relação ao grupo das plantas controle, sendo na
 652 concentração de 0,25 mM um aumento de 41,91%, conferindo 30,85 cm e na dose de 0,5
 653 mM aumento de 65,13%, conferindo 35,90 cm (Figuras 11 e 12) em relação ao grupo
 654 controle, medindo 21,74 cm.

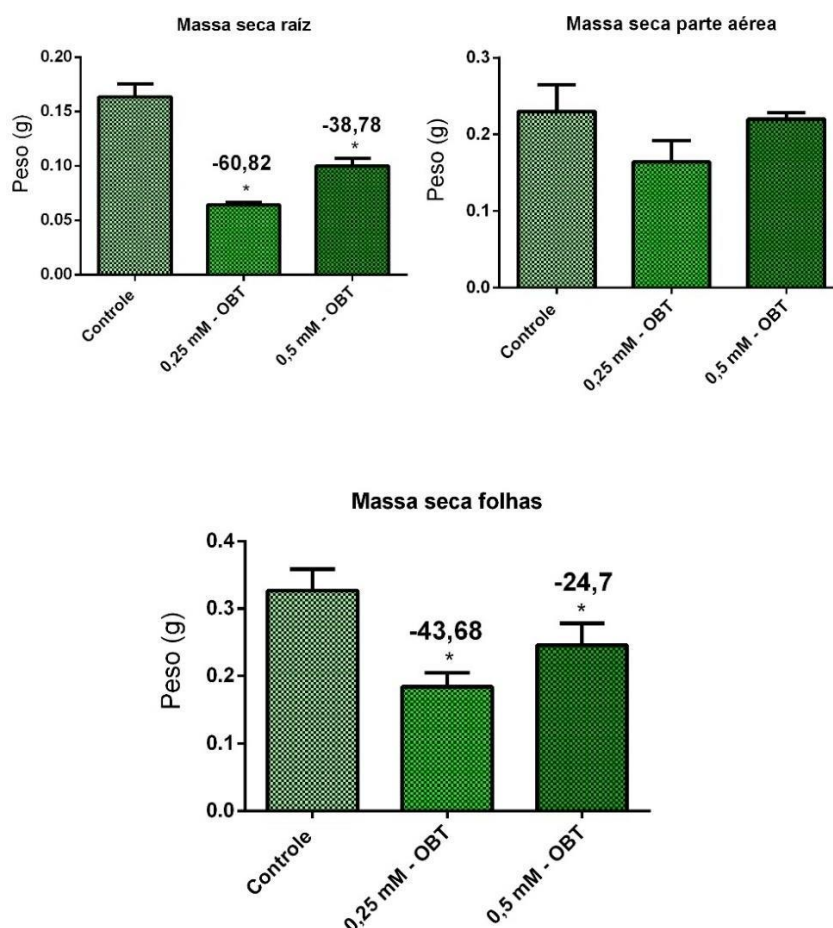
655 Já em relação ao comprimento da parte aérea, houve uma redução significativa das
 656 plantas tratadas com OBt nas duas concentrações em relação ao grupo das plantas controle,
 657 medindo 6,86 cm, sendo uma redução de 33,73% nas plantas tratadas com OBt 0,25 mM,
 658 que mediram 4,54 cm e redução de 35,24% nas plantas tratadas com OBt 0,5 mM que
 659 mediram 4,44 cm (Figuras 11 e 12). Isso também pode complementar o resultado visto
 660 anteriormente, que menciona um aumento do comprimento das raízes, funcionando assim,
 661 como um efeito compensatório do déficit da parte aérea.

662 Observamos também uma redução acentuada da massa fresca da raiz nos grupos
 663 tratados com a concentração de OBt, sendo uma redução de 78,15% nas plantas tratadas
 664 com OBt 0,25 mM, pesando em média 0,616 g e redução de 75,53% nas plantas tratadas
 665 com OBt 0,5 mM, pesando em média 0,690 g em relação ao grupo controle, que pesou
 666 2,821 g (Figuras 11 e 12). Da mesma forma, foi observado uma redução da massa fresca da
 667 parte aérea, também acentuada, nos grupos tratados com a concentração de OBt 0,25 mM
 668 e 0,5 mM em relação as plantas dos grupos controle (Figuras 11 e 12), sendo uma redução
 669 de 36,99% no grupo OBt 0,25 mM pesando em média 1,483 g e 24,62% no grupo OBt
 670 0,5 mM, pesando em média 1,774 g em relação ao grupo controle, que pesou 2,354 g.

671 Podemos observar uma redução acentuada da massa fresca das folhas nos grupos
 672 tratados com a concentração de OBt 0,25 mM e 0,5 mM em relação as plantas dos grupos

673 controle, que pesou 3,162 g sendo uma redução de 58,52% no grupo OBТ 0,25 mM,
674 pesando em média 1,311 g e 48,85% no grupo OBТ 0,5 mM, pesando 1,617g (Figuras 11
675 e 12).

676 A Figura 13 refere-se aos dados de massas secas da raiz, da parte aérea e das
677 folhas. Em relação à massa seca da parte aérea, nota-se uma redução, porém, não foi
678 considerado um dado com diferenças significativas. Estudos mostraram que uma vez que
679 a cisteína é a primeira molécula comprometida em metabolismo vegetal contendo enxofre
680 e nitrogênio, a regulação de sua biossíntese é de suma importância.



681

682 **Figura 4.** Dados biométricos das plantas de *I. grandifolia* tratadas com (OBТ) via hidroponia/raízes em
683 relação aos parâmetros de massa seca da raiz, parte aérea e folhas. Considerou-se $p \leq 0,05$ para os resultados
684 que apresentaram diferenças significativas, e os mesmos estão identificados e representados com asterísco
685 (*) na parte superior das barras.

686

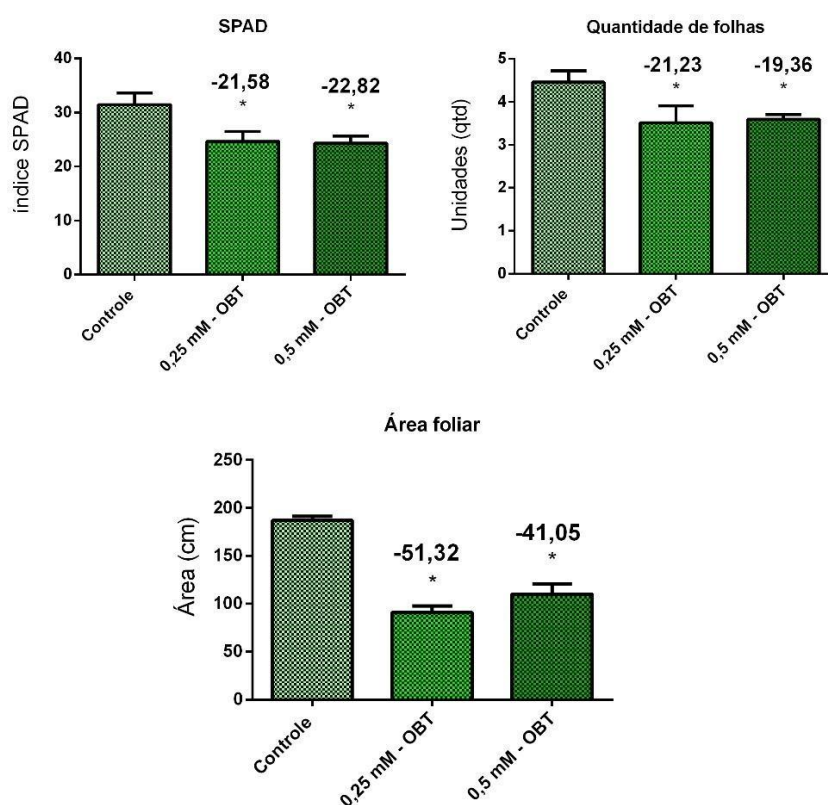
687 Em relação à massa seca da raiz, (Figura 13) podemos observar uma redução nas
688 duas concentrações em relação ao grupo controle, que pesou em média 0,163 g, resultado
689 que condiz com a massa fresca que obtivemos. Sendo assim, a massa seca da raiz foi
690 reduzida em 60,82% no grupo das plantas tratadas com OBТ 0,25 mM, pesando em média

691 0,064 g e 38,78% no grupo das plantas tratadas com OBТ 0,5 mM, pesando em média 0,1
692 g.

693 Podemos também observar uma redução acentuada da massa seca das folhas nos
694 grupos tratados com a concentração de OBТ 0,25 mM, pesando 0,184 g e 0,5 mM, pesando
695 em média 0,246 g em relação as plantas dos grupos controle, que pesou 0,326g sendo uma
696 redução de 58,52% no grupo OBТ 0,25 Mm e 48,85% no grupo OBТ 0,5 mM (Figura 13).

697 A Figura 14 refere-se aos dados de índice SPAD, quantidade de folhas e área foliar.
698 Neste caso, todos os dados apresentados como estatisticamente significativos.

699



700

701 **Figura 14.** Dados biométricos das plantas de *I. grandifolia* tratadas com (OBТ) via hidroponia/raízes em
702 relação aos parâmetros de índice SPAD, quantidade de folhas e área foliar. Considerou-se $P \leq 0,05$ para os
703 resultados que apresentaram diferenças significativas, e os mesmos estão identificados e representados com
704 asterísco (*) na parte superior das barras.

705



706

707 **Figura 15.** Aspectos de clorose nas folhas que recebem OB. À esquerda: Controle. Ao meio: OB 0,25
708 mM. À direita: OB 0,5 mM.

709

710 Em relação ao índice SPAD (Figuras 14 e 15), foi observada uma redução no teor
711 de clorofila nos grupos tratados com OB 0,25 mM e 0,5 mM em relação ao grupo controle,
712 sendo uma redução de 21,58% no grupo OB 0,25 mM e 22,82% no grupo OB 0,5 mM.

713 Já em relação à quantidade de folhas, foi observada uma redução na quantidade de
714 folhas (Figuras 14 e 15) nos grupos tratados com OB 0,25 mM, contando com uma média
715 de 3,51 unidades e 0,5 mM, contando com 3,59 unidades em relação ao grupo controle, que
716 conta com uma média de 4,45 unidades, sendo uma redução de 21,23% no grupo OB 0,25
717 mM e 19,36% no grupo OB 0,5 mM.

718 Já em relação ao último parâmetro discutido, referente à área foliar, foi observada
719 uma redução na área foliar nos grupos tratados com OB 0,25 mM e 0,5 mM em relação
720 ao grupo controle, sendo uma redução de 51,32% no grupo OB 0,25 mM e 41,05% no
721 grupo OB 0,5 mM (Figura 15).

722

723 DISCUSSÃO

724

725 Interferências na assimilação da cisteína pode ter efeitos severos. A carência de
726 cisteína inviabiliza a produção de proteínas e conseqüentemente a formação das estruturas
727 tridimensionais, devido à impossibilidade de formação das ligações dissulfeto entre os
728 grupos tióis dos resíduos de L-cisteína, resultando na diminuição do tamanho das plantas e
729 conseqüentemente interferindo em suas biomassas e outros parâmetros (Long et al., 2015).

730 As plantas podem alterar seu metabolismo para compensar deficiências de enxofre
731 e nitrogênio, entretanto, as limitações para síntese de cisteína também restringem a síntese
732 de proteínas e muitas outras substâncias essenciais para o desenvolvimento (Hese et.al.,
733 2004). O metabolismo tiol representado pela ação das glutatonas é crítico para o
734 crescimento, desenvolvimento e defesa contra uma série de estresses ambientais (Rausch e

735 Wachter 2005). A cisteína é necessária para a produção de todos os metabólitos contendo
736 enxofre como glutatona, biotina, ácido lipoico, coenzima A, metionina, S-
737 adenosilmetionina etc. Na ausência de enxofre o metabolismo vegetal se torna
738 completamente inviável.

739 O complexo da cisteína sintase funciona como um sensor metabólico, um
740 componente do sistema de controle do metabolismo do enxofre primário no nível celular
741 (Hell e Hillebrand, 2001). Esse sistema é capaz de controlar o fluxo de metabólitos à
742 montante da cisteína, e a inibição por retroalimentação da enzima serina acetil transferase
743 (SAT) que é capaz de formar um mecanismo a jusante de controle do produto (Takahashi
744 et.al., 2000). Em ambos os casos de regulação, estão designados a nível celular e podem
745 formar a base da interação fonte-dreno em um conceito de planta inteira do metabolismo
746 do enxofre.

747 A deficiência de sulfato e nitrato, glutatona ou sacarose desencadeia uma
748 regulação positiva ou negativa coordenada dos níveis de transcrição, acúmulo de proteínas
749 e atividade enzimática (Koprivaa et. al, 2015). Estudos mostraram que a resposta à
750 deficiência de sulfato se sobrepõe fortemente ao efeito da interrupção do transportador
751 SULTR1;2 ou ao tratamento com O-acetilserina (Hirai et.al, 2003; Maruyama-Nakashita
752 et. al, 2003).

753 Herbicidas comerciais reduzem significativamente o crescimento de raízes
754 (Vettakkorumakankav et al. 2002; Eslamiamirabadi et al., 2020; Wu et al., 2010; Fiskesjö
755 et al 1981; Ateeq et al., 2002), o que corrobora a hipótese de que a molécula aqui testada
756 está atuando como herbicida. Perim et al (2009), constatou que todos os tratamentos com
757 herbicidas resultam na redução da biomassa seca das plantas daninhas. Para *I. grandifolia*,
758 o herbicida amicarbazone, apresentou uma resposta maior na redução da biomassa seca em
759 21 dias após a aplicação, quando comparado estatisticamente à testemunha. O 2,4-D em
760 baixas concentrações, estimula o crescimento das células vegetais e interage com
761 hormônios endógenos como etileno, ácido giberélico, ácido abscísico e até auxinas (Brady
762 e McCourt, 2003). Cassanego et al. (2010), verificou que o desenvolvimento da folha
763 primária de *Regnellidium diphyllum* Lindman foi afetado pela presença do 2,4-D. Ao final
764 da primeira semana, o crescimento da folha primária foi significativamente reduzido
765 quando comparada com o controle. Foi observado também que em concentrações
766 superiores houve uma diminuição gradativa do número máximo de folhas formadas, de três
767 para uma. Todos os outros tratamentos com o herbicida apresentaram menor número de
768 folhas que a testemunha.

769 A falta de enxofre na planta, seja por carência nutricional ou problemas na
770 assimilação, causa sérios prejuízos como redução da altura e clorose nas folhas,
771 principalmente, as folhas mais novas (Li et al. 2020). O fenótipo da falta de sulfato consiste
772 tipicamente em folhas jovens verde-claras, enquanto as folhas maduras permanecem verde-
773 escuras (Hell, 1997). De forma similar ao que observamos neste estudo, Li et al. (2021)
774 constataram que os teores relativos de clorofila mudaram significativamente entre várias
775 árvores frutíferas. Folhas de pessegueiro começaram a apresentar manchas cloróticas 48 h
776 após o tratamento com glufosinato de amônia, um herbicida que inibe a assimilação de
777 nitrogênio, ao passo que o glifosato que inibe a síntese de aminoácidos aromáticos, causou
778 um amarelamento lento aos 12 dias. Em comparação com os controles, o glifosato reduziu
779 as leituras SPAD de maçã, pêsego e folhas de uva em 80,77%, 16,20% e 11,73%,
780 respectivamente. Com a aplicação dos herbicidas, os valores SPAD diminuíram, sendo que
781 um menor valor de SPAD indica que os herbicidas interferiram com a fotossíntese (Li et.
782 al., 2021).

783 Plantas que são cultivadas com níveis reduzidos de sulfato desenvolvem sintomas
784 de deficiência de enxofre que incluem clorose de folhas jovens, e comprometimento no
785 crescimento e na morfologia da raiz (Hawkesford, 2000; Lopez-Bucio et al., 2003;
786 Nikiforova et.al, 2003). A clorose resultante, pode estar relacionada com o déficit na síntese
787 da coenzima S-adenosil-L-metionina (SAM) (Taiz et al., 2017) que desempenha um papel
788 crítico na biossíntese das clorofilas (Christoffoleti e Nicolai, 2016; Tomaz et al., 2015).

789 A absorção de herbicidas aplicados no solo pode ocorrer no tecido da raiz e da parte
790 aérea, tanto em contato direto com herbicida ou dissolvido na solução do solo ou até
791 presente na fase de vapor. Ao passo que na raiz a absorção é importante na aplicação em
792 pré-emergência. Substâncias dissolvidas na água como por exemplos herbicidas, entram
793 em contato com a superfície da raiz e podem ser absorvidas junto com a água. Também a
794 área da ponta da raiz, incluindo a zona do cabelo da raiz, de algumas espécies de plantas,
795 por ser coberta por uma fina camada de substância lipídica. Essa não é uma barreira
796 significativa à penetração, porque água, minerais e herbicidas podem penetrar através da
797 camada epidérmica. Os herbicidas podem se acumular acima da concentração do meio
798 externo como consequência de sua lipossolubilidade (Duke, 1985). A inibição da cisteína
799 sintase pode causar danos nas plantas devido à falta desses aminoácidos ou atrapalhar o
800 processo de assimilação do enxofre (Kloti et al., 2002). A carência de enxofre em plantas
801 como *Glycine max*, *Manihot esculenta* e *A. thaliana* ocasionam redução no crescimento
802 dessa plantas, além de alteração nos teores de etileno e diminuição de vários metabólitos

803 primários e secundários dependentes da presença de enxofre (Krishnan e Jez, 2018;
804 Wawrzynska et al., 2015).

805 Nossos ensaios mostram que o OBT estimulou o crescimento da parte aérea,
806 sobretudo em baixas concentrações. Estes resultados suscitam a possibilidade de que o OBT
807 funcione como um estimulante do crescimento da parte aérea, embora reduza o crescimento
808 das raízes. Este é um comportamento semelhante ao observado em resposta à auxina que
809 na mesma concentração estimula o crescimento da parte aérea e inibem o crescimento das
810 raízes. Foi possível verificar em nossos ensaios, a possível interferência de efeitos
811 horméticos, sobretudo nas plantas tratadas com a concentração mais baixa de OBT,
812 sugerindo que ocorra uma estimulação de crescimento e desenvolvimento em um
813 comportamento de dose-resposta.

814 Os efeitos horméticos se referem a um comportamento bifásico da curva dose-
815 resposta. Por exemplo, em baixas doses induzem estimulação e altas doses induzem
816 inibição (Vargas-Hernandez et al., 2017; Agathokleous et al., 2019 a, b, c). Os herbicidas
817 podem apresentar esta característica, hora atuando como inibidores e hora como
818 estimulantes em certas vias vegetais (Brito et al. 2018). Calabrese e Baldwin (2003),
819 encontraram mais de 9000 exemplos de hormesis promovidas por pesticidas, medicamentos
820 ou tratamentos de radiação, sendo todos os resultados dependentes da dose utilizada de cada
821 substância.

822 CONCLUSÃO

823

824 Estudos *in silico* permitiram selecionar um conjunto de moléculas com potencial
825 inibitório sobre a OAS-TL, uma enzima-chave na via de assimilação do enxofre. O
826 candidato com melhor score, OBT, foi testado *in vivo* e inibiu significativamente o
827 crescimento de plantas de *Ipomea grandifolia* sem afetar a fotossíntese. Adicionalmente, o
828 OBT também apresentou um efeito estimulante inesperado sobre a parte aérea das plantas.
829 A inibição do metabolismo do enxofre causa danos às plantas e inibidores enzimáticos
830 como o OBT têm potencial para apresentar atividade herbicida. Estudos adicionais são
831 necessários para demonstrar o efeito inibitório do OBT sobre a OAS-TL *in vitro* e
832 desvendar seu mecanismo de inibição por cinética enzimática. Por fim, será necessário
833 demonstrar de forma inequívoca o sítio de ação da droga *in vivo* e a causa do efeito
834 estimulante sobre o crescimento da parte aérea observado neste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agathokleous, E., Kitao, M., & Calabrese, E. J. (2019a). Hormetic dose responses induced by lanthanum in plants. *Environmental Pollution*, 244, 332–341. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.007>
- Agathokleous, E., Kitao, M., & Calabrese, E. J. (2019b). Hormesis: A Compelling Platform for Sophisticated Plant Science. *Trends in Plant Science*, 24(4), 318–327. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.01.004>
- Agathokleous, E., Kitao, M., Harayama, H., & Calabrese, E. J. (2019). Temperature-induced hormesis in plants. *Journal of Forestry Research*, 30(1), 13–20. <https://doi.org/10.1007/s11676-018-0790-7>
- Ateeq, B., Farah, M. A., Ali, M. N., Ahmad, W. (2002). Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 518(2), 135–144. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00075-X](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00075-X)
- Birke, H., Müller, S. J., Rother, M., Zimmer, A. D., Hoernstein, S. N. W., Wesenberg, D., Wirtz, M., Krauss, G. J., Reski, R., & Hell, R. (2012). The relevance of compartmentation for cysteine synthesis in phototrophic organisms. *Protoplasma*, 249(SUPPL.2), 147–155. <https://doi.org/10.1007/s00709-012-0411-9>
- Brady, S. M., & McCourt, P. (2003). Hormone Cross-Talk in Seed Dormancy. *Journal of Plant Growth Regulation*, 22(1), 25–31. <https://doi.org/10.1007/s00344-003-0018-7>
- Brito, I. P. F. S., Tropaldi, L., Carbonari, C. A., & Velini, E. D. (2018). Hormetic effects of glyphosate on plants. *Pest Management Science*, 74(5), 1064–1070. <https://doi.org/10.1002/ps.4523>
- Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2015). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (2nd ed.) John Wiley & Sons.
- Burnside, O. C. (1992). Rationale for developing herbicide-resistant crops. *Weed Technology*, 6(3), 621–625.
- Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. (2003). Hormesis: The Dose-Response Revolution. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 43, 175–197. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140223>
- Capaldi, F. R., Gratão, P. L., Reis, A. R., Lima, L. W., & Azevedo, R. A. (2015). Sulfur Metabolism and Stress Defense Responses in Plants. *Tropical Plant Biology*, 8(3–4), 60–73. <https://doi.org/10.1007/s12042-015-9152-1>
- Carneiro, R. T. A., Taketa, T. B., Gomes Neto, R. J., Oliveira, J. L., Campos, E. V. R., de Moraes, M. A., da Silva, C. M. G., Beppu, M. M., & Fraceto, L. F. (2015). Removal of glyphosate herbicide from water using biopolymer membranes. *Journal of Environmental Management*, 151, 353–360. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.01.005>
- Cassanego, M., Droste, A. B., & Windisch, P. G. (2010). Effects of 2,4-D on the germination of megaspores and initial development of *Regnellidium diphyllum* Lindman (Monilophyta, Marsileaceae). *Braz. J. Biol*, 70(2), 361–366.

Chaudhari, S., Jennings, K. M., Monks, D. W., Jordan, D. L., Gunter, C. C., McGowen, S. J., & Louws, F. J. (2016). Critical Period for Weed Control in Grafted and Nongrafted Fresh Market Tomato. *Weed Science*, 64(3), 523–530. <https://doi.org/10.1614/ws-d-15-00049.1>

Christoffoleti, P.J., Nicolai, M. (2016). *Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas: Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas Daninhas aos Herbicidas (HRAC-BR)* (4th ed.) Piracicaba, Brasil: ESALQ.

Dallakyan, S., & Olson, A. J. (2015). Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Methods in Molecular Biology*, 1263, 243–250. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2269-7_19

Das, S. K, Mondal, T. (2014). Mode of action of herbicides and recent trends in development: A Reappraisal. *International Journal of Agricultural and Soil Science*, 2(3), 27–32.

Duke, S. O. (1985). *Weed physiology: Vol. II*. CRC Press.

Duke, S. O. (2012). Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years? *Pest Management Science*, 68(4), 505–512. <https://doi.org/10.1002/ps.2333>

Dutra, R. M. S., & de Souza, M. M. O. (2017). Impactos negativos do uso de agrotóxicos à saúde humana. *Revista Brasileira de Geografia Médica e Da Saúde-Hygeia*, 13(24), 127–140. <http://www.seer.ufu.br/index.php/hygeia>

Droux, M. (2004). Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey. *Photosynthesis Research* (in press)

Droux, M. (2003). Plant serine acetyltransferase: new insights for regulation of sulphur metabolism in plant cells. *Plant Physiology and Biochemistry* 41, 619–627

Droux, M, Ruffet, M-L, Douce, R & Job, D. (1998). Interactions between serine acetyltransferase and O-acetylserine (thiol) lyase in higher plants. Structural and kinetic properties of the free and bound enzymes. *European Journal of Biochemistry* 255, 235–245;

Eslamiamirabadi, M., Burton, J. D., de los Reyes, F. L., & Ducoste, J. J. (2020). Assessment of alternative herbicides for residential sewer root treatment and their effects on downstream treatment plant nitrification. *Journal of Environmental Management*, 258. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.110058>

Fiskesjo, G., Lassen, C., & Renberg, L. (1981). Chlorinated phenoxyacetic acids and chlorophenols in the modified *Allium* test. *Chem.-Biol. Interactions*, 34, 333–344.

Foletto-Felipe, M.P. (2021). *O*-acetilserina(thiol) liase: estudos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. Tese de Doutorado – Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas- Universidade Estadual de Maringá.

Galazzi, E. B. (2011). Desempenho fotossintético de plantas de *Jatropha curvas* L. cultivadas no Estado do Espírito Santo. Universidade Federal do Espírito Santo.

Genty, B., Britantais J.M., Baker, N.R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, 990(1), 87–92. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(89\)80016-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9).

- Gianessi, L. P., & Reigner, N. P. (2007). The Value of Herbicides in U.S. Crop Production. *Weed Technology*, 21(2), 559–566. <https://doi.org/10.1614/wt-06-130.1>
- Gigolashvili, T., & Kopriva, S. (2014). Transporters in plant sulfur metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 5(SEP). <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00442>
- Gunsolus, J. L., & Curran, W. S. (1991). *Herbicide Mode of Action and Injury Symptoms*.
- Hawkesford, M. J. (2000). Plant responses to sulphur deficiency and the genetic manipulation of sulphate transporters to improve S-utilization efficiency. *Journal of Experimental Botany*, 51(342), 131–138.
- HRAC. (2022). *Herbicide Resistance Action Committee*. Retrieved from: www.hracglobal.com.
- Heap, I. (2014). *The International Survey of Herbicide Resistant Weeds*. Retrieved from: www.weedscience.org.
- Hell, R. (1997). Molecular physiology of plant sulfur metabolism. *Planta*, 202, 138–148. <http://about.jstor.org/terms>
- Hell, R., & Hillebrand, H. (2001). Plant concepts for mineral acquisition and allocation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 161–168.
- Hell, R. & Hillebrand, H. (2001). Plant concepts for mineral acquisition and allocation. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(2), 161–168. doi:10.1016/s0958-1669(00)00193-2
- Hell, R., Jost, R., Berkowitz, O & Wirtz, M. (2002). Molecular and biochemical analysis of the enzymes of cysteine biosynthesis in the plant *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids* 22, 245–257;
- Hell, R. (2003). Metabolic regulation of cysteine synthesis and sulfur assimilation. In: Davidian J-C, De Kok LJ, Stulen I, Hawkesford MJ, Schnug E, Rennenberg H, eds. *Sulfur transport and assimilation in plants: regulation, interaction, signaling*. Leiden: Backhuys Publishers, 21–32;
- Hesse, H., Nikiforova, V., Gakière, B., & Hoefgen, R. (2004). Molecular analysis and control of cysteine biosynthesis: Integration of nitrogen and sulphur metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 55(401), 1283–1292. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh136>
- Hirai, M. Y., Fujiwara, T., Awazuhara, M., Kimura, T., Noji, M., & Saito, K. (2003). Global expression profiling of sulfur-starved *Arabidopsis* by DNA macroarray reveals the role of O-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. *The Plant Journal*, 33, 651–663
- Jurado, A, Fernandes, M., Videira, R., Peixoto, F., & Vicente, J. (2011). Herbicides: the Face and the Reverse of the Coin. An in Vitro Approach to the Toxicity of Herbicides in Non-Target Organisms. In *Herbicides and Environment*. InTech. <https://doi.org/10.5772/12976>
- Kredich, N.M. (1996). Biosynthesis of cysteine. In: Neidhardt FC, Curtiss R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger E, eds. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. Cellular and molecular biology. Washington DC: ASM Press, 514–527

- Kloti, A., Woessner, J., Zayed, A., Gorlach, J., Boyes, D., Davis, K., Hamilton, C., Ascenzi, R., & Hoffman, N. (2001). *Methods for the identification of inhibitor of cysteine synthase expression or activity in plants*.
- Kopriva, S., Mugford, S. G., Baraniecka, P., Lee, B. R., Matthewman, C. A., & Koprivova, A. (2012). Control of sulfur partitioning between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 3, Issue JUL). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00163>
- Krishnan, H. B., & Jez, J. M. (2018). Review: The promise and limits for enhancing sulfur-containing amino acid content of soybean seed. *Plant Science*, 272, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.03.030>
- Lipinski, C. A. (2016). Rule of five in 2015 and beyond: Target and ligand structural limitations, ligand chemistry structure and drug discovery project decisions. *Advanced drug delivery reviews*, 101, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.029>
- Li, Q., Gao, Y., & Yang, A. (2020). Sulfur homeostasis in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms21238926>
- Li, Q., Wei, Z., Gao, D., Si, P., Yu, H., & Liu, J. (2021). Effects of herbicide drift on chlorophyll fluorescence and antioxidant enzyme levels of various types of fruit trees. *Pakistan Journal of Botany*, 53(3), 847–857. [https://doi.org/10.30848/PJB2021-3\(18\)](https://doi.org/10.30848/PJB2021-3(18))
- Lins, H. A., de Freitas Souza, M., de Albuquerque, J. R. T., dos Santos, M. G., Júnior, A. P. B., & Silva, D. V. (2019). Weed interference periods in sesame crop. *Ciencia e Agrotecnologia*, 43. <https://doi.org/10.1590/1413-7054201943000819>
- Long, S.R., Kahn, M., Seefeldt, L., Tsay, Y.-F., Korpiva, S., (2015). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, in: Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. John Wiley & Sons, pp. 711–767.
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., & Herrera-Estrella, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3), 280–287. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00035-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00035-9)
- Marchiosi, R., de Souza Bido, G., Böhm, P. A. F., Soares, A. R., da Silva, H. A., Ferro, A. P., de Lourdes Lucio Ferrarese, M., & Ferrarese-Filho, O. (2016). Photosynthetic response of soybean to L-DOPA and aqueous extracts of velvet bean. *Plant Growth Regulation*, 80(2), 171–182. <https://doi.org/10.1007/s10725-016-0154-2>
- Maruyama-Nakashita, A., Inoue, E., Watanabe-Takahashi, A., Yamaya, T., & Takahashi, H. (2003). Transcriptome profiling of sulfur-responsive genes in *Arabidopsis* reveals global effects of sulfur nutrition on multiple metabolic pathways. *Plant Physiology*, 132(2), 597–605. <https://doi.org/10.1104/pp.102.019802>
- Merino, J., Pedreros, A., Fischer, S., & López, M. D. (2019). Critical period of weed interference on total polyphenol content in quinoa. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 79(3), 405–414. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392019000300405>
- Nakamura, K & Tamura, G. (1990). Isolation of serine acetyltransferase complexed with cysteine synthase from *Allium tuberosum*. *Agricultural and Biological Chemistry* 54, 649–656;
- Nikiforova, V. J., Gakière, B., Kempa, S., Adamik, M., Willmitzer, L., Hesse, H., & Hoefgen, R. (2004). Towards dissecting nutrient metabolism in plants: A systems biology

- case study on sulphur metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 55(404), 1861–1870. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh177>
- Perim, L., Toledo, R. E. B., Negrisoli, E., Corrêa, M. R., Carbonari, C. A., Rossi, C. V. S., & Velini, E. D. (2009). Eficácia do herbicida amicarbazone no controle em pós-emergência de espécies de corda-de-viola (*Ipomoea grandifolia* e *Merremia cissoids*). *Revista Brasileira de Herbicidas*, 8(1), 19–26. www.rbherbicidas.com.br
- Rausch, T., & Wachter, A. (2005). Sulfur metabolism: A versatile platform for launching defence operations. *Trends in Plant Science*, 10(10), 503–509. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.08.006>
- Sander, T., Freyss, J., von Korff, M., & Rufener, C. (2015). DataWarrior: An open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 55(2), 460–473. <https://doi.org/10.1021/ci500588j>
- Smith, F. W., Ealing, P. M., Hawkesford, M. J., & Clarkson, D. T. (1995). Plant members of a family of sulfate transporters reveal functional subtypes (ion transport/sulfate uptake). In *Plant Biology* (Vol. 92).
- Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I. M., Murphy, A. (2017). *Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal* (6th ed.) Porto Alegre, Brasil: Artmed.
- Takahashi, H., Sasakura, N., Noji, M., & Saito, K. (1996). Isolation and characterization of a cDNA encoding a sulfate transporter from *Arabidopsis thaliana*. In *FIBS 17394 FEBS Letters* (Vol. 392).
- Takahashi, H., Watanabe-Takahashi, A., Smith, F. W., Blake-Kalff, M., Hawkesford, M. J., & Saito, K. (2000). The roles of three functional sulphate transporters involved in uptake and translocation of sulphate in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 23(2), 171–182. <http://mbelserver.rutgers.edu/CPGN/>
- Tomaz, M. A., Rodrigues, W. N., Martins, L. D., Brinate, S. V. B., Colodetti, T. V. (2015). *Diagnósticos nutricionais do solo e da planta*, in: Tópicos especiais em produção vegetal, pp. 393–415.
- Trott, O., & Olson, A. J. (2009). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, NA-NA. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Tursun, N., Datta, A., Budak, S., Kantarci, Z., & Knezevic, S. Z. (2016). Row spacing impacts the critical period for weed control in cotton (*Gossypium hirsutum*). *Phytoparasitica*, 44(1), 139–149. <https://doi.org/10.1007/s12600-015-0494-x>
- Tursun, N., Datta, A., Sakinmaz, M. S., Kantarci, Z., Knezevic, S. Z., & Chauhan, B. S. (2016). The critical period for weed control in three corn (*Zea mays* L.) types. *Crop Protection*, 90, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.08.019>
- Ufaz, S., & Galili, G. (2008). Improving the content of essential amino acids in crop plants: Goals and opportunities. In *Plant Physiology* (Vol. 147, Issue 3, pp. 954–961). American Society of Plant Biologists. <https://doi.org/10.1104/pp.108.118091>
- Usui, K. (2001). Metabolism and selectivity of rice herbicides in plants. *Weed Biology and Management*, 1, 137–146.

- Vargas, L., Roman, E. S., & Nascimento Junior, A. (2006). Selectivity and efficacy of herbicides for use on winter cereals. *6th International Triticale Symposium*, 156–157. <http://www.sun.ac.za/genetics>
- Vargas, L., Roman, E. S. (2006). Resistência de plantas daninhas a herbicidas: conceitos, origem e evolução. *Embrapa Trigo-Documentos (INFOTECA-E)*.
- Vargas-Hernandez, M., Macias-Bobadilla, I., Guevara-Gonzalez, R. G., Romero-Gomez, S. de J., Rico-Garcia, E., Ocampo-Velazquez, R. v., Alvarez-Arquieta, L. de L., & Torres-Pacheco, I. (2017). Plant hormesis management with biostimulants of biotic origin in agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01762>
- Verli, H. (2014). *Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular* (1 Ed). Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular
- Vettakkorumakankav, N. N., Deshpande, S., Walsh, T. A., & Hall, J. C. (2002). Physiological Effect of Clopyralid on Corn as Determined by Bioassay and Light-Scattering. *Weed Science*, 50(6), 713–720
- Vitorino, H. dos S., da Silva, A. C., Gonçalves, C. G., & Martins, D. (2017). Interference of a weed community in the soybean crop in functions of sowing spacing. *Revista Ciencia Agronomica*, 48(4), 605–613. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20170070>
- Wawrzynska, A., Moniuszko, G., & Sirko, A. (2015). Links between ethylene and sulfur nutrition — A regulatory interplay or just metabolite association? *Frontiers in Plant Science*, 6(DEC). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01053>
- Wu, G. L., Cui, J., Tao, L., & Yang, H. (2010). Fluroxypyr triggers oxidative damage by producing superoxide and hydrogen peroxide in rice (*Oryza sativa*). *Ecotoxicology*, 19(1), 124–132. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0396-0>
- Yorinori, J. T., Gazziero, D. L. P. (1989). Control of Milk Weed (*Euphorbia heterophylla*) with *Helminthosporium* sp. *Embrapa – Londrina. Delfosse, E.S. (ed.)*. *Institute Sperimentale per la Patologia Vegetale, (MAF)*, 571–576.