

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

MARCELA DE PAIVA FOLETTTO-FELIPE

O-ACETILSERINA(TIOL) LIASE: ESTUDOS IN *SILICO*, *IN VITRO* E *IN VIVO*

MARINGÁ
2021

MARCELA DE PAIVA FOLETTO-FELIPE

O-ACETILSERINA(TIOL) LIASE: ESTUDOS IN *SILICO*, *IN VITRO* E *IN VIVO*

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

Orientador: Prof. Dr. Rogério Marchiosi

Coorientador: Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho

MARINGÁ
2021

MARCELA DE PAIVA FOLETTO-FELIPE

O-ACETILSERINA(TIOL) LIASE: ESTUDOS *IN SILICO*, *IN VITRO* E *IN VIVO*

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

Aprovado em: _____ / _____ /2021

BANCA EXAMINADORA*

Prof. Dr. Rogério Marchiosi
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Edicléia Aparecida Bonini e Silva
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Rodrigo Polimeni Constantin
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos
Universidade Estadual de Maringá

BIOGRAFIA

Marcela de Paiva Foletto Felipe nasceu em 30 de novembro de 1983, em Loanda, Paraná. Possui graduação em Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Maringá (2006). Em 2010, recebeu o título de especialista em Fisiologia Humana: Funcionamento do Organismo Humano no Contexto Interdisciplinar pelo Departamento de Ciências Morfofisiológicas da Universidade Estadual de Maringá. Em seguida, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) também pela Universidade Estadual de Maringá, concluindo-o em 2011. Em 2013, ingressou como docente na Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus* Dois Vizinhos, Paraná. Iniciou o curso de doutorado em março de 2017 pelo mesmo programa de pós-graduação que cursou o mestrado desenvolvendo o projeto intitulado “*O*-acetilserina(tiol) liase como alvo para o desenvolvimento de novos herbicidas”. Ao longo da trajetória acadêmica desenvolveu pesquisa nas áreas de morfologia e fisiologia animal, bioquímica e fisiologia vegetal, bioinformática e proteômica. Além da carreira de docente e pesquisadora, atuou como responsável técnica (CRBio-07 N° 66055/07-D) no Laboratório de Entomologia da Usina de Açúcar Santa Terezinha em Iguatemi, Paraná (2010), com experiência na produção do parasitóide *Cotesia flavipes*.

Dedico este trabalho aos meus pais Rui e Lúcia, por todos os exemplos e orientações, que com muito carinho me ensinaram o caminho da justiça, do respeito e da fé. Ao meu esposo, Raul e às minhas filhas Catarina e Isadora que fazem do meu mundo um lugar melhor e de mim uma pessoa mais corajosa e feliz.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por todos os acontecimentos da minha vida, pela força e proteção ao longo desta jornada, em especial por colocar tantos anjos em meu caminho.

Agradeço aos meus pais, irmão e familiares (cunhados, sobrinhos, sogros, avós, primos, tios de sangue e de coração) que sempre estão presentes na minha vida, me incentivando, me auxiliando e vibrando comigo em todas as minhas empreitadas. Ao meu esposo Raul e minha filha Catarina que ao longo desta exaustiva jornada foram energia, suporte e equilíbrio para que tudo desse certo. Sem vocês nada disso seria possível. E pela minha filha Isadora, que por estar ainda no ventre compartilha das minhas longas horas de trabalho e me acompanha diretamente na finalização deste sonho. A vocês minha eterna gratidão.

Gostaria de agradecer à Universidade Estadual de Maringá (UEM) pela estrutura fornecida para o desenvolvimento da minha pesquisa e formação acadêmica ao longo destes 18 anos. Agradeço à Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) que tornou possível o meu afastamento integral para a realização deste projeto de vida. Agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para execução do trabalho.

Agradeço especialmente, ao meu orientador Prof. Dr. Rogério Marchiosi, pela parceria e antes de tudo pela amizade. Agradeço pelo inestimável e constante apoio, pelo exemplo de pesquisador vocacionado e perfeccionista, pela postura ética, pelo zelo e cuidado com todos que trabalham diretamente com você e pelas inúmeras outras coisas que aprendi com sua exemplar conduta de profissional e ser humano.

Agradeço aos professores do Laboratório de Bioquímica de Plantas (BIOPLAN-UEM). Ao Prof. Dr. Osvaldo Ferrarese Filho agradeço a acolhida no laboratório, pela sensível percepção da ciência, o que o faz não desprezar nenhum iniciante, pelos gratificantes e descontraídos momentos de conversa, pelas palavras de apoio, enfim pelo carinho com que me recebeu e pela atenção que me dispensou. Ao Prof. Dr. Wanderley Dantas dos Santos por ser tão atencioso e nos contagiar com as suas ideias, sejam elas sobre a origem da vida, música e bioquímica pura e aplicada. Agradeço pelas boas conversas e pelos bons ensinamentos.

Agradeço aos professores Dr. Flávio Augusto Vicente Seixas e Dr. Paulo Sérgio Alves Bueno pelos ensinamentos na área de Bioinformática e ao tempo concedido para

auxiliar nos procedimentos *in silico*. Gostaria de agradecer também, a Prof.^a Dr.^a. Emy Luiza Ishii-Iwamoto e aos seus orientados Ana Luiza Wagner Zampieri e Paulo Vinicius Moreira da Costa Menezes pelo auxílio na execução do meu trabalho com as plantas daninhas, pelo precioso tempo que me concederam e pela especial cordialidade com que sempre me trataram.

Ademais, agradeço às professoras Dr.^a. Rosilene Fressatti Cardoso, Dr.^a. Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá e Dr.^a. Jane Martha Graton Mikcha do Departamento de Ciências da Saúde (UEM) e aos seus orientados Jean Eduardo Meneguello e João Vitor de Oliveira da Silva pela disponibilidade em compartilhar os conhecimentos de proteômica e disponibilizar a estrutura física do departamento para as análises de proteômica. Além disso, agradeço pelo carinho com que me receberam e pela atenção que me dispensaram.

Agradeço aos meus amigos e técnicos do Laboratório de Bioquímica de Plantas, Aparecida M. D. Ramos e Antonio Nunis da Silva, por toda a dedicação e esforço durante a execução das várias atividades, além da alegre convivência.

Agradeço aos meus queridos amigos e companheiros de laboratório, em especial, Rita de Cássia, Josielle, Danielly Caroline, Aline, Renata, as Gabrielas e Gabriele, Karla, Larissa, Ana Paula, Lorena, Renato e Luiz Henryque pelas ajudas, sugestões, conselhos concedidos tanto na vida profissional quanto pessoal, além das várias conversas descontraídas, a presença de vocês tornaram minhas madrugadas, meus dias e minhas noites bem mais divertidas. E a todos os demais que me acompanharam ao longo dos três anos de experimentos compartilhando conhecimento, experiências e boas risadas.

As minhas amigas, da terrinha “Natal”, que sempre estiveram presentes na minha vida em todos os momentos, emanando energia positiva, incentivo e muito amor!

Por fim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a finalização deste trabalho, meu muito obrigada!

Sumário

Apresentação.....	1
Resumo Geral.....	2
Capítulo I.....	4
S-Benzil-L-cisteína afeta a atividade da O-acetilserina(tiol) liase e reduz o crescimento de plantas de milho (<i>Zea mays</i> L.) e <i>Ipomoea triloba</i> L. demonstrando potencial ação herbicida	
Resumo.....	6
Introdução.....	7
Materiais e métodos.....	9
Resultados.....	15
Discussão.....	20
Referências.....	23
Figuras.....	28
Materiais Suplementares.....	37
Capítulo II.....	38
S-Benzil-L-cisteína reduz o crescimento e a fotossíntese de plantas de milho inibindo a expressão de proteínas da cadeia de transporte de elétrons fotossintética e do ciclo de Calvin	
Resumo.....	40
Introdução.....	41
Materiais e métodos.....	42
Resultados.....	49
Discussão.....	55
Referências.....	62
Figuras e tabelas.....	67

Apresentação

Esta Tese é composta por dois capítulos. O capítulo I compreende um artigo sobre a modelagem da enzima *O*-acetilserina(tiol) liase e a prospecção *in silico* de possíveis inibidores para esta enzima, bem como os efeitos sentidos pelas plantas de milho e *Ipomoea triloba* pelo(s) o(s) inibidore(s) selecionado(s). Este artigo foi intitulado “**S-Benzil-L-cisteína afeta a atividade da *O*-acetilserina(tiol) liase e reduz o crescimento de plantas de milho (*Zea mays* L.) e *Ipomoea triloba* L. demonstrando potencial ação herbicida**”. O segundo capítulo trata-se de um artigo sobre a atuação do composto selecionado no primeiro trabalho e seus efeitos no crescimento de plantas adultas, na síntese de proteínas, estresse oxidativo e fotossíntese de plantas de milho, intitulado: “**S-Benzil-L-cisteína reduz o crescimento e a fotossíntese de plantas de milho inibindo a expressão de proteínas da cadeia de transporte de elétrons fotossintética e do ciclo de Calvin**”. De acordo com o regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PBC), os artigos foram redigidos seguindo as normas das revistas as quais serão submetidas, conforme descrito abaixo:

Capítulo I – Foletto-Felipe, M.P.; Ferrarese-Filho, O.; Marchiosi, R. *S*-Benzil-L-cisteína afeta a atividade da *O*-acetilserina(tiol) liase e reduz o crescimento de plantas de milho (*Zea mays* L.) e *Ipomoea triloba* L. demonstrando potencial ação herbicida. Será submetido ao Periódico *Plant Physiology and Biochemistry* (Fator de impacto 2019-20: 3.800) (www.journals.elsevier.com/plant-physiology-and-biochemistry).

Capítulo II – Foletto-Felipe, M.P.; Ferrarese-Filho, O.; Marchiosi, R. *S*-Benzil-L-cisteína reduz o crescimento e a fotossíntese de plantas de milho inibindo a expressão de proteínas da cadeia de transporte de elétrons fotossintética e do ciclo de Calvin. Será submetido ao Periódico *New Phytologist* (Fator de impacto 2019: 8.512) (nph.onlinelibrary.wiley.com/journal/14698137).

Resumo Geral

32

33

34 O enxofre é um macronutriente vital para plantas e animais, podendo ser encontrado na
35 natureza em vários estados de oxidação. Os animais e os humanos podem incorporar
36 apenas as formas orgânicas do enxofre presentes em aminoácidos como a L-metionina e
37 L-cisteína. As plantas, por sua vez, podem captar e reduzir as formas inorgânicas do
38 enxofre e assimilá-lo em diversos compostos importantes para a sua sobrevivência, tais
39 como biotina, coenzima A, tiamina pirofosfato, ácido lipoico, centros ferro-enxofre e
40 glucosinolatos. As plantas também são capazes de incorporar o sulfato através de uma via
41 de assimilação catalisada pela enzima *O*-acetilserina(tiol) liase (OAS-TL) (E.C. 2.5.1.47).
42 O produto desta reação, a L-cisteína é um aminoácido particularmente importante para a
43 manutenção das estruturas tridimensionais das proteínas e precursor de diversos
44 compostos orgânicos sulfatados. Neste contexto, a OAS-TL se revela como um alvo
45 metabólico potencial para o desenvolvimento de novos herbicidas, haja vista a
46 importância de sua atividade para a sobrevivência das plantas. Portanto, o objetivo deste
47 trabalho foi o de modelar a estrutura da OAS-TL de milho (*Zea mays* L.) complexada ao
48 ligante *O*-acetilserina (OAS) e o cofator piridoxal 5'-fosfato para ser utilizada como alvo
49 em estudos de *virtual screening*. Em sequência, testar o potencial herbicida em plantas de
50 milho e *Ipomoea triloba* L. Para isso, a sequência de aminoácidos da ZmCSynt foi obtida
51 no *Uniprot* (P80608) e utilizada para busca de moldes estruturais por meio de BlastP
52 contra a base de dados *Protein Data Bank*. Posteriormente, a biblioteca para a *virtual*
53 *screening* foi construída a partir da busca de compostos semelhantes a OAS no banco de
54 dados ZINC 12 e 15. O programa utilizado nas simulações de *docking* foi o *AutoDock*
55 *Wizard* 4.2.3 e o *Vina* implementados na interface gráfica do *PyRx* 0.9. Diferentes
56 orientações dos ligantes foram pesquisadas e classificadas com base em suas pontuações
57 de energia e a boa posição de ligação entre enzima e ligante. Os protocolos foram
58 considerados validados quando a posição do substrato OAS exógeno sobrepôs a posição
59 do substrato OAS modelado com a enzima OAS-TL, o qual apresentou um valor médio
60 para o desvio médio dos átomos (RMSD) menor que 2.0 Å. Após a validação usando a
61 regra de Lipinski e toxicidade (ADMETox), plântulas de milho e *I. triloba* foram
62 cultivadas em solução nutritiva (pH 6,0) com ou sem SBC (125–1000 µM) por períodos
63 de incubação compreendidos entre 24 a 96 h e os efeitos nos parâmetros de crescimento
64 foram estimados. Além destes parâmetros, estudos do teor de L-cisteína e atividade

65 enzimática, foram realizados com intuito de comprovar a ação inibitória do composto.
66 Ademais, experimentos com plantas de milho adultas foram realizados para entender a
67 atuação inibitória da substância selecionada sobre o crescimento, parâmetros
68 fotossintéticos, conteúdo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e os impactos sobre a
69 síntese de proteína destas plantas. Para estas análises, plantas de milho foram cultivadas
70 em vasos contendo substrato e vermiculita suplementados com 1 e 5 mM de SBC por 14
71 dias. Após este período, os órgãos foram excisados e os parâmetros avaliados, as raízes
72 também foram utilizadas para as análises bioquímicas. Com base em todo o protocolo
73 experimental apresentado, iniciamos identificando inibidores da OAS-TL após
74 modelagem e, em seguida, a atividade herbicida da *S*-benzil-L-cisteína (SBC), um dos
75 inibidores selecionados *in silico*, foi avaliada sobre parâmetros de crescimento, teor de L-
76 cisteína e atividade enzimática, com alguns ensaios realizados em plantas de milho e *I.*
77 *triloba* L. e outros apenas em milho. A SBC apresentou menor *score* energético (-7,0 kcal
78 mol⁻¹) que o substrato OAS (-6,6 kcal mol⁻¹), o que indica melhor interação com o sítio
79 ativo da OAS-TL. A SBC reduziu significativamente os parâmetros avaliados em plantas
80 jovens, reduzindo o comprimento de raízes e interferindo nas biomassas, além de
81 demonstrar significativa redução no teor de L-cisteína *in vivo* e *in vitro*. Ademais, reduziu
82 expressivamente o crescimento das plantas de milho adultas, as taxas de assimilação de
83 CO₂ devido às limitações estomática e não estomática, inibiu a expressão de importantes
84 componentes da cadeia de transporte de elétrons fotossintética (fotossistemas I e II,
85 citocromo b6f e ATP sintase) e de enzimas do ciclo de Calvin, e conseqüentemente,
86 reduziu a taxa de fluxo de elétrons, demonstrando um aumento significativo no conteúdo
87 de EROs. Tais resultados sugerem que a via de assimilação do sulfato foi afetada pela
88 exposição à SBC, interferindo desta forma, na síntese de compostos dependentes de
89 enxofre essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência das plantas. Todos os
90 resultados obtidos evidenciam a inibição da OAS-TL quando submetidas à SBC tanto *in*
91 *vivo* como *in vitro*, o que reforça nossa hipótese de que a SBC, substância inibidora
92 selecionada *in silico*, demonstra uma latente ação herbicida.

93

94 **Palavras-chave:** bioinformática, fluorescência da clorofila *a*, fotossíntese, metabolismo
95 do enxofre, novo herbicida, *O*-acetilserina(tiol) liase, *S*-benzil-L-cisteína.

96

97

98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120

CAPÍTULO I

ARTIGO:

***S*-Benzil-L-cisteína afeta a atividade da *O*-acetilserina(tiol) liase e reduz o crescimento de plantas de milho (*Zea mays* L.) e *Ipomoea triloba* L. demonstrando potencial ação herbicida**

Este artigo será submetido ao Periódico *Plant Physiology and Biochemistry*

121 **S-Benzil-L-cisteína afeta a atividade da O-acetilserina(tiol) liase e reduz**
122 **o crescimento de plantas de milho (*Zea mays* L.) e *Ipomoea triloba* L.**
123 **demonstrando potencial ação herbicida**

124

125 Marcela de Paiva Foletto-Felipe¹⁻², Osvaldo Ferrarese-Filho¹, Rogério Marchiosi¹

126

127 ¹*Laboratório de Bioquímica de Plantas, Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de*
128 *Maringá, Maringá, PR, 87020-900, Brasil e* ²*Coordenação de Licenciatura em Ciências*
129 *Biológicas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos, PR, 85660-*
130 *000, Brasil*

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152 *Autor para correspondência:

153 Rogério Marchiosi

154 rmarchiosi@uem.br

155 **RESUMO**

156

157 O enxofre é um macronutriente vital para todos os organismos e pode ser encontrado na
158 natureza em diferentes estados de oxidação. As plantas são capazes de incorporar o
159 enxofre na forma de sulfato à L-cisteína por meio da reação catalisada pela *O*-
160 acetilserina(tiol) liase (OAS-TL). A L-cisteína é um aminoácido importante para a
161 manutenção de estruturas tridimensionais de proteínas e precursora de vários compostos
162 orgânicos sulfatados do metabolismo primário e secundário. Nesse contexto, a OAS-TL
163 é um alvo metabólico em potencial para o desenvolvimento de novos herbicidas, além de
164 não estar presente no metabolismo dos animais, tornando-a mais atrativa para este fim.
165 Utilizando estratégias de *virtual screening* pelo método de *docking*, nós identificamos
166 inibidores da OAS-TL após modelagem por homologia da enzima. Em seguida, a
167 atividade herbicida da *S*-benzil-L-cisteína (SBC), um dos inibidores selecionados, foi
168 avaliada sobre parâmetros de crescimento, teor de L-cisteína e atividade enzimática, com
169 alguns ensaios realizados em plantas de milho e *I. triloba* L. e outros apenas em milho. A
170 SBC apresentou menor *score* energético (-7,0 kcal mol⁻¹) que o substrato *O*-acetilserina
171 (OAS) (-6,6 kcal mol⁻¹), o que indica melhor interação com o sítio ativo da OAS-TL.
172 Além disso, a SBC reduziu significativamente os parâmetros de crescimento em ambas
173 as espécies avaliadas. Tais resultados sugerem que a via de assimilação do sulfato foi
174 afetada pela exposição à SBC, interferindo desta forma, na síntese de compostos
175 dependentes de enxofre essenciais para a sobrevivência das plantas. Além disso, estudos
176 de teor de L-cisteína e atividade enzimática, comprovaram a inibição da OAS-TL quando
177 submetidas à SBC tanto *in vivo* como *in vitro*, o que reforça nossa proposição de que a
178 SBC, substância inibidora selecionada *in silico*, demonstra uma latente ação herbicida.

179

180 *Palavras-chave:* bioinformática, L-cisteína, metabolismo do enxofre, novo herbicida, *O*-
181 acetilserina(tiol) liase, *S*-benzil-L-cisteína.

182

183 1. Introdução

184

185 As plantas daninhas são consideradas um problema desde os primórdios da agricultura.
186 Isso se deve ao fato destas plantas apresentarem alta capacidade competitiva com as
187 culturas de interesse econômico e aptidão para utilizar os recursos disponíveis do meio
188 ambiente (Gazziero et al., 1989). Por estes motivos, existe uma necessidade eminente de
189 manejo das plantas daninhas, a qual é tão antiga quanto a própria agricultura.

190 O primeiro herbicida comercial, o ácido diclorofenoxiacético, foi descoberto em 1947,
191 permitindo um controle mais consistente destas pragas (Jurado et al., 2011). No entanto,
192 nos últimos 30 anos, nenhum novo sítio de ação herbicida foi publicado. Anteriormente
193 a este período de escassez, novos sítios de ação eram descobertos a cada 3 anos (Duke,
194 2011), levando ao conhecimento dos 20 mecanismos de ação reconhecidos pela *Herbicide*
195 *Resistance Action Committee* (HRAC) (Das e Mondal, 2014; Duke, 2011; Epp et al.,
196 2017; Sparks e Lorschach, 2016).

197 Do ponto de vista econômico, a necessidade de pesquisar novos herbicidas está
198 relacionada a pequena quantidade de mecanismos de ação dos herbicidas comerciais
199 usados atualmente e ao aumento expressivo de plantas daninhas resistentes aos atuais
200 herbicidas (Das e Mondal, 2014; Epp et al., 2017; Sparks e Lorschach, 2016; Vargas e
201 Roman, 2006). Do ponto de vista socioambiental, a crescente preocupação gira em torno
202 da poluição causada por estes produtos químicos usados de forma indiscriminada pelos
203 pequenos e grandes agricultores incentivados pela indústria agroquímica (Das e Mondal,
204 2014; Epp et al., 2017), e mais recentemente, uma crescente preocupação com relação à
205 saúde humana, devido ao aumento de doenças como câncer, doenças renais, autismo, mal
206 de Parkinson e Alzheimer, que tem sido relacionadas por pesquisadores e médicos com o
207 uso excessivo de agrotóxicos na agricultura mundial (Camiccia, 2019; Carneiro et al.,
208 2015; Dutra e De Souza, 2017).

209 A via de assimilação do enxofre foi indicada por Hirase e Molin (2003) como um
210 potencial alvo metabólico para desenvolvimento de novos herbicidas e como novos sítios
211 de ação de elementos de segurança (*safeners*). Este interesse se deve à presença de três
212 importantes enzimas da via, que são *O*-acetilserina(tiol) liase (OAS-TL), cistationina γ -
213 sintase (CGS) e cistationina β -liase (CBL), todas localizadas entre a produção de sulfeto
214 (S^{2-}) e sua assimilação na metionina. Além de serem enzimas essenciais à sobrevivência
215 das plantas, não estão presentes no metabolismo dos animais, sendo este um atrativo para
216 o desenvolvimento de novos herbicidas de baixa toxicidade ao homem e ao ambiente.

217 Contudo, as enzimas CGS e CBL são dependentes da disponibilidade de L-cisteína
218 (Hirase e Molin, 2003; Long et al., 2015), reforçando o papel essencial da OAS-TL para
219 o metabolismo do enxofre nas plantas. O enxofre é um macronutriente indispensável para
220 a sobrevivência de todos os organismos vivos, podendo ser encontrado na natureza em
221 vários estados de oxidação (Long et al., 2015; Wawrzynska et al., 2015). Este
222 macronutriente é considerado um elemento muito versátil. Isto se deve ao fato de o
223 enxofre ser multifuncional, ou seja, está presente desde a composição dos aminoácidos
224 L-cisteína e L-metionina à vários compostos do metabolismo secundário, relacionados a
225 defesa, como a glutathione. Ademais, o enxofre é fundamental no transporte de elétrons
226 pelos grupos ferro-enxofre, na composição de coenzimas e grupos-prostéticos e na síntese
227 de vários pigmentos e hormônios (Capaldi et al., 2015; Gigolashvili e Kopriva, 2014;
228 Kopriva et al., 2012; Long et al., 2015)

229 Diferentemente dos animais, as plantas, os fungos e muitas bactérias são capazes de
230 reduzir o sulfato (SO_4^{2-}) inorgânico obtido do solo à L-cisteína por uma via conhecida
231 como via de assimilação do sulfato. Nesta via o SO_4^{2-} é, primeiramente, ativado pela
232 ATP-sulforilase (ATPS) à adenosina-5'-fosfossulfato (APS). A APS está localizada em
233 ponto de ramificação na via de assimilação do sulfato, que pode prosseguir para redução
234 à sulfito (SO_3^{2-}), catalisada pela APS-redutase, ou ser fosforilada à 3'-fosfoadenosina-5'-
235 fosfossulfato (PAPS) pela APS-cinase, sendo esta considerada uma rota alternativa. O
236 SO_3^{2-} é rapidamente reduzido à sulfeto (S^{2-}), devido a sua toxicidade, pela enzima sulfito
237 redutase (SiR). O S^{2-} resultante é incorporado na *O*-acetilserina (OAS), que é formada
238 principalmente nas mitocôndrias a partir da reação catalisada pela serina acetiltransferase
239 (SAT), para produzir L-cisteína por meio da catálise da OAS-TL (Capaldi et al., 2015;
240 Gigolashvili e Kopriva, 2014; Hell e Wirtz, 2012; Jobe et al., 2019; Long et al., 2015).
241 Todo esse caminho percorrido para a incorporação do enxofre só ocorre integralmente
242 nas plantas, dentro dos plastídios, apesar de partes deste metabolismo ocorrer dentro de
243 mitocôndrias e também no citosol das células (Long et al., 2015; Wirtz et al., 2004).

244 A L-cisteína é o produto primário desta via assimilatória, sendo direta ou indiretamente
245 o metabólito precursor para todos os compostos orgânicos que contém enxofre em plantas
246 e animais (Birke et al., 2012; Jurado et al., 2011). Em adição, a L-cisteína é importante
247 para a manutenção da estrutura tridimensional das proteínas, pois as ligações dissulfeto
248 formadas entre os grupos tióis dos seus resíduos podem estabilizar a estrutura terciária e
249 quaternária das mesmas (Long et al., 2015). Além disso, atua como precursora na síntese
250 da L-metionina que, para os humanos, é um aminoácido essencial que deve ser obtido da

251 dieta (Ufaz e Galili, 2008). Mais recentemente, tem sido proposto que a via de síntese de
252 L-cisteína é um ponto de convergência entre três vias do metabolismo primário: vias de
253 assimilação do carbono, do nitrogênio e do enxofre (Jobe et al., 2019).

254 Por estas razões, o objetivo do presente trabalho foi prospectar inibidores da OAS-TL
255 *in silico* utilizando estratégias de *virtual screening* pelo método de *docking*, após
256 modelagem da enzima por homologia. Na sequência, os efeitos da S-benzil-L-cisteína
257 (SBC), um dos candidatos à inibidores selecionados, foram avaliados sobre os parâmetros
258 de crescimento em milho (*Zea mays* L.) e *Ipomoea triloba* L., teor de L-cisteína em
259 extrato bruto de milho e atividade da OAS-TL de *Arabidopsis thaliana* L. com intuito de
260 observar potencial ação herbicida.

261

262 **2. Materiais e métodos**

263

264 Os experimentos *in silico* foram inicialmente desenvolvidos no Laboratório de
265 Bioquímica e Biofísica Computacional do Departamento de Tecnologia da Universidade
266 Estadual de Maringá (UEM), *Campus* Umuarama – PR. As etapas *in silico* de *drug*
267 *repositioning* e *virtual screening*, assim como todos os experimentos *in vivo* e *in vitro*
268 foram desenvolvidos no Laboratório de Bioquímica Vegetal (BIOPLAN) do
269 Departamento de Bioquímica da UEM, *Campus* Maringá – PR.

270

271 **2.1 Procedimentos *in silico***

272

273 **2.1.1 Modelagem molecular por homologia e minimização de energia da enzima OAS-** 274 **TL**

275

276 A sequência de aminoácidos da enzima OAS-TL de milho (*Zea mays* L.) foi obtida a
277 partir do banco de dados do *Uniprot* (Magrane e Consortium, 2011). As estruturas
278 cristalográficas utilizadas como moldes foram selecionados através do servidor BLASTp
279 no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) (Berman et al., 2002).

280 O modelo tridimensional da enzima OAS-TL (ZmCSynt) foi obtido por substituições
281 pontuais na estrutura cristalográfica do molde com relação a sequência de aminoácidos.
282 O programa utilizado foi o *Coot* (Emsley e Cowtan, 2004). O modelo final, por sua vez,
283 foi submetido a ciclos de minimização de energia pelo método do gradiente conjugado
284 através do programa NAMD2 (Phillips et al., 2005) de modo que as interações da proteína

285 com o ligante foram maximizadas. Inicialmente, todo o complexo foi imerso em uma
286 caixa periódica com limites de pelo menos 10 Å da superfície mais externa da molécula
287 e contendo contra íons de sódio suficientes para neutralizar as cargas do sistema. Neste
288 ciclo, todos os átomos foram minimizados por 20.000 passos, exceto o piridoxal fosfato
289 (PLP) e o substrato OAS que se mantiveram fixos no espaço.

290 No ciclo seguinte, todos os átomos foram minimizados por 10.000 passos. E no
291 terceiro ciclo foi realizada a dinâmica molecular das águas por 30.000 passos, onde a
292 proteína, o PLP, a OAS e as águas estruturais foram mantidas fixas no espaço. Por fim,
293 no último ciclo de minimização todos os átomos foram minimizados por 20.000 passos.
294 A estrutura minimizada obtida no quarto ciclo foi utilizada para os estudos de *redocking*
295 e *virtual screening* (Bueno et al., 2019; Bueno et al., 2019; Ferro et al., 2020)

296 A estereoquímica do modelo final foi validada pelo gráfico de Ramachandran, através
297 do programa *Procheck* (Bueno et al., 2019; Laskowski et al., 1996).

298

299 2.1.2 Simulações de *redocking* e *virtual screening*

300

301 Os protocolos de simulações utilizados na *virtual screening* foram validados pelo
302 método de *redocking*. Nesta etapa, foram utilizados dois programas com diferentes
303 algoritmos de busca e de pontuação, o *AutoDock Wizard* 4.2.3 (Morris et al., 2010;
304 Pacheco et al., 2013) e o *Vina* (Pacheco et al., 2013; Trott e Olson, 2010), ambos
305 implementados na interface gráfica *Pyrx* 0.9. Os protocolos foram considerados validados
306 quando a posição do substrato OAS exógeno sobrepôs a posição do substrato OAS
307 modelado com a enzima OAS-TL, o qual apresentou um valor médio para o desvio médio
308 dos átomos (RMSD) menor que 2.0 Å.

309 Para a *virtual screening* foi montada uma biblioteca de ligantes semelhantes aos
310 inibidores da OAS-TL previamente conhecidos e depositados no banco de dados
311 BRENDA *enzymes* (Lee et al., 2017; Schomburg et al., 2013). Para a seleção dos
312 candidatos foi utilizado o coeficiente de similaridade (índice de Tanimoto) maior que
313 70% (Lee et al., 2017; Schomburg et al., 2013) no banco de dados *ZINC* nas versões 12
314 e 15 (Bueno et al., 2019; Irwin et al., 2012). A OAS exógena foi incluída na elaboração
315 da biblioteca, de modo que, ao final da simulação, foram apenas considerados os
316 compostos melhor classificados em relação à OAS exógena. Os compostos selecionados
317 foram baixados em formato *.sdf.

318 Os testes iniciais de *virtual screening* foram realizados no programa *Autodock Wizard*
319 4.2.3 através das diferentes orientações dos ligantes ao sítio ativo da enzima. Estas
320 orientações tridimensionais foram pesquisadas e ranqueadas baseando-se na pontuação
321 do ligante e no melhor posicionamento de interação entre enzima e ligante (*pose*). Em
322 seguida, os compostos selecionados na primeira varredura foram submetidos a três novas
323 repetições no *Autodock Wizard* 4.2.3 e mais quatro repetições no programa *Vina*, com
324 intuito de selecionar ligantes com reprodutibilidade e eliminar resultados falso-positivos.

325 As moléculas selecionadas foram avaliadas pelos critérios abordados nas Regras de
326 Lipinski e critérios *ADMETox* através do *DataWarrior program* (openmolecules.org/)
327 (Bueno et al., 2019; Pacheco et al., 2013) como uma maneira de encontrar candidatos
328 eficazes.

329

330 *2.1.3 Alinhamento das proteínas OAS-TL de milho, Ipomoea triloba L. e Arabidopsis*
331 *thaliana L.*

332

333 O alinhamento foi realizado utilizando o programa *Clustal Omega*
334 (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) (Sievers et al., 2011) e, em seguida, o programa
335 *EsPript* 3.0 (<http://esript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>) foi utilizado para mostrar o
336 alinhamento e a predição das estruturas secundárias no topo das sequências (Feldman-
337 salit et al., 2012; Robert e Gouet, 2014).

338

339 **2.2 Procedimentos in vivo**

340

341 *2.2.1 Alterações no crescimento inicial em plântulas de milho e I. triloba*

342

343 Sementes de milho (*Zea mays* L. cv. IPR-164) e de *Ipomoea triloba* L. foram
344 sanitizadas com hipoclorito de sódio 2% por 5 min, lavadas extensivamente com água
345 deionizada e germinadas no escuro dentro de tubos de PVC preto e tubos de acrílico azul,
346 respectivamente. A germinação ocorreu entre duas folhas de papel filtro (Germitest®)
347 umedecidas com água deionizada. Os tubos foram acondicionados em câmaras de
348 germinação (Tecnal TE 400, São Paulo, Brazil) por 72 h e temperatura em 25°C.

349 Vinte e cinco plântulas de milho e de *I. triloba*, com 3 dias de desenvolvimento e
350 comprimento uniforme de raízes (4 a 6 cm – milho; 2 a 4 cm – *I. triloba*), foram
351 transferidas para suportes de acrílico com altura ajustável (específicos para cada espécie)

352 e, em seguida, para um recipiente de vidro contendo 200 mL (10 × 16 cm) e 150 mL (7 ×
353 11 cm) de solução nutritiva ¼ de força (pH 6,0) (Dong et al., 2006), respectivamente. A
354 solução nutritiva, contendo ou não SBC (125–1000 µM), foi substituída a cada 48 h. Os
355 recipientes contendo as plântulas foram mantidos em câmaras de crescimento à 25°C por
356 24, 48 e 72 h em ambas as espécies de plantas, e adicionalmente no milho por 96 h, com
357 fotoperíodo 12/12 h, e densidade do fluxo de fótons (DFF) de 300 µmol m⁻² s⁻¹. Os
358 comprimentos das raízes foram mensurados antes e após a incubação para posterior
359 estimativa da variação do comprimento. O peso fresco das raízes foi determinado
360 imediatamente após o período de incubação, sendo o peso seco verificado após secagem
361 em estufa à 70°C por 72 h ou até obtenção de peso constante.

362 Experimentos também foram realizados para verificar se a L-cisteína, quando
363 fornecida exogenamente, poderia reverter ou aliviar a inibição de crescimento de raízes
364 induzida pela SBC. Para isso, plântulas de milho e *I. triloba* foram cultivadas por 48 h,
365 como descrito acima, na ausência ou presença de 500 µM e 125 µM de SBC,
366 respectivamente. Neste experimento, o meio nutritivo foi suplementado com L-cisteína
367 0, 0,5, 1 ou 2 mM para a incubação do milho e 0 ou 1 mM para a incubação da *I. triloba*.
368 Ao final do experimento foram determinadas as variações do comprimento das raízes de
369 cada espécie analisada.

370 Os dados foram expressos em centímetros (cm) para a variação nos comprimentos das
371 raízes e em gramas (g) para peso fresco e seco. Cada experimento apresentou de três a
372 nove repetições. O composto selecionado *in silico* (SBC) foi obtido da Sigma-Aldrich
373 (St. Louis, MO, USA), e todos os outros reagentes eram da classe mais pura disponível.

374

375 2.2.2 Quantificação do teor de L-cisteína total em extrato bruto

376

377 A determinação do teor de L-cisteína foi obtida a partir de plântulas cultivadas em
378 hidroponia por 48 h de incubação, seguindo o protocolo experimental de cultivo e
379 tratamento descritos no tópico 2.2.1 dos procedimentos *in vivo*. As plântulas de milho
380 foram incubadas em solução nutritiva (Dong et al., 2006) contendo ou não SBC (0, 500 e
381 750 µM).

382 O teor de L-cisteína total foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência
383 (CLAE) após extração e derivatização com monobromobimane, seguindo um compilado
384 de métodos descritos por Domínguez-Solís et al., 2001; Hell e Wirtz, 2012; Newton et
385 al., 1981 e Rauser et al., 1991 com algumas modificações. Raízes frescas foram

386 homogeneizadas em tampão de extração gelado (2,25 mL g⁻¹ de peso fresco) contendo
387 100 mM de tampão HEPES (pH 7,5) e 2,5 mM de ditioneitol (DTT) utilizando almofariz
388 e pistilo. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 40000 g, por 50 min a 4°C. O
389 sobrenadante (extrato bruto) foi utilizado para as análises e pôde ser armazenado em
390 freezer à -80°C por até uma semana.

391 Os grupos tióis foram reduzidos a 25°C em banho seco por 60 min através da mistura
392 de 130 µL do extrato bruto com 140 µL de tampão TRIS-HCl 134 mM (pH 8,3) e 1 mM
393 de DTT. Em seguida, foi realizada derivatização por 15 min, a 25°C em banho seco,
394 adicionando 30 µL de monobromobimane 3 mM. A reação foi interrompida com adição
395 de 700 µL de ácido acético 5% em temperatura ambiente.

396 Após a reação, as amostras (1 mL) foram filtradas através de uma seringa com filtro
397 específico de 25 µm (Merck-millipore® Co., Darmstadt, Alemanha) e o filtrado foi
398 analisado em cromatógrafo líquido (LC-20 Proeminence HPLC System, Shimadzu®,
399 Japan) equipado com uma bomba de gradiente quaternária LC-20AT, um detector de
400 fluorescência RF-20A, um autoinjeter SIL-20A e um forno de coluna CTO-20A. O
401 aminoácido L-cisteína foi separado usando uma coluna de fase reversa Shimpack® CLC-
402 ODS (M) (250 × 4,6 mm e partículas de 5 µm de diâmetro) equipada com pré-coluna
403 equivalente (10 × 4,6 mm) por meio de gradiente com dois solventes: 100 mM de acetato
404 de potássio pH 5,5 (“A”) e metanol 100% (“B”). O gradiente consistiu no aumento e
405 subsequente diminuição gradual de “B” em relação a “A” como segue: 25:75 em 0 min,
406 100:0 em 30 min e 25:75 em 40 min, com fluxo de 1,0 mL min⁻¹. O detector de
407 fluorescência foi ajustado para excitação de 380 nm e emissão de 480 nm. O tempo de
408 retenção e a concentração da L-cisteína foram determinados utilizando uma curva padrão
409 de L-cisteína 97% (Sigma-Aldrich) com intervalo de concentração de 10 a 100 µM.
410 Foram utilizadas de três a quatro repetições por tratamento e os teores de L-cisteína foram
411 expressos em mg g⁻¹ de peso fresco.

412

413 **2.3 Procedimentos in vitro**

414

415 **2.3.1 Expressão e purificação da proteína AtOAS-TL**

416

417 A sequência de nucleotídeo que codifica a proteína OAS-TL de *A. thaliana* (AtOAS-
418 TL) foi clonada em vetor bacteriano (pET28a) entre os sítios de restrição NdeI e BamHI
419 pelo grupo de pesquisa do *Institute Donald Danforth Plant Science Center*, na cidade de

420 St. Louis, Missouri, Estados Unidos. Este plasmídeo contendo o gene selvagem da
421 AtOAS-TL foi gentilmente cedido pelo pesquisador Joseph M. Jez. A expressão desta
422 proteína foi realizada de acordo com Bonner et al., 2005 com modificações. Após a
423 transformação da construção em *Escherichia coli* da cepa BL21(DE3), as células foram
424 crescidas em meio líquido Luria-Bertani (LB), contendo o antibiótico canamicina
425 ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$), sob agitação, a 37°C até atingir densidade óptica entre 0,6–0,8. Em seguida,
426 a indução foi realizada com 1 mM de β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) durante 20 h a
427 $20\text{--}25^\circ\text{C}$. Então, as células foram separadas por centrifugação (15 min, 5000 g, a 4°C) e
428 ressuspendidas em tampão TRIS-HCl 50 mM (pH 8,0), NaCl 500 mM, β -mercaptoetanol
429 1 mM, Tween 20 a 1% (v/v) e lisozima $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$.

430 Após sonicação e centrifugação, o sobrenadante contendo a proteína AtOAS-TL
431 solúvel foi eluído em uma coluna de cromatografia por afinidade ao níquel
432 (GE Healthcare). Durante a purificação foi utilizado o tampão TRIS-HCl 50 mM (pH 8,0)
433 contendo NaCl 500 mM e β -mercaptoetanol 1 mM. Este mesmo tampão contendo
434 250 mM de imidazol foi usado para eluir a proteína de interesse da coluna. Em seguida,
435 as frações foram observadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e as
436 amostras contendo a maior concentração da enzima dialisadas em tampão HEPES 25 mM
437 (pH 7,5), NaCl 100 mM e ditioneitol (DTT) 1 mM. A dosagem de proteínas foi realizada
438 pelo método de Bradford (1976).

439

440 2.3.2 *Determinação da atividade da AtOAS-TL na presença e ausência do inibidor* 441 *SBC*

442

443 A atividade da AtOAS-TL foi determinada pela quantificação de L-cisteína através
444 do método de ninidrina, conforme descrito por Gaitonde (1967) e Bonner et al., (2005),
445 com modificações. O meio de reação continha tampão HEPES 100 mM (pH 7,0), OAS
446 $0\text{--}10000 \mu\text{M}$, sulfeto de sódio 10 mM (Na_2S), DTT 2,5 mM e $0,075 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ da enzima
447 AtOAS-TL em um volume total final de 100 μL . As reações foram iniciadas pela adição
448 de OAS e incubadas por 8 min a 25°C . As reações foram interrompidas pela adição 20 μL
449 de ácido tricloroacético (TCA) 20%. Após centrifugação (10000 g, 2 min), 100 μL do
450 sobrenadante foi homogeneizado com 100 μL do reagente de ninidrina. Esta mistura foi
451 mantida a 95°C por 5 min e resfriada em gelo por 5 min. Em seguida, foram adicionados
452 200 μL de etanol 100% gelado seguido de leitura a 560 nm. A velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$)
453 e a constante de Michaelis-Menten (K_M) foram determinadas através de um ajuste não

454 linear de mínimos quadrados usando o pacote estatístico *GraphPad Prism*[®] (versão 6.0,
455 GraphPad Software Inc., USA). A inibição da atividade da AtOAS-TL pela SBC (0, 2,5 e
456 5 mM) foi determinada à meia saturação com o substrato OAS (2,5 mM).

457

458 **2.4 Análise estatística**

459

460 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Foram utilizadas 25
461 plântulas para cada parcela experimental (25 plântulas = 1n). Os resultados foram
462 expressos como médias \pm erro padrão da média (EPM) e as repetições variaram por
463 metodologia, sempre considerando um mínimo de três parcelas experimentais para cada
464 condição (controle e tratados).

465 Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico
466 *GraphPad Prism*[®] (Versão 6.0, GraphPad Software Inc., USA). Para os parâmetros de
467 crescimento inicial na presença de L-cisteína foi utilizado análise de variância
468 bidirecional (*Two-way* ANOVA) e o teste de comparação múltipla de Tukey foi
469 selecionado para avaliar as diferenças entre os parâmetros.

470 Para os demais parâmetros, foi utilizado análise de variância unidirecional (*One-way*
471 ANOVA) e as diferenças significativas foram analisadas no teste de comparação múltipla
472 de Dunnett. Os valores de $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos em
473 ambos os testes.

474

475 **3. Resultados**

476

477 *3.1 Modelo tridimensional da enzima OAS-TL*

478

479 A sequência de aminoácidos da enzima OAS-TL de milho (P80608) compreende 325
480 resíduos dando origem a uma massa molecular de 34 kDa de acordo com o *Uniprot*. Uma
481 análise mais aprofundada da sequência de aminoácidos da OAS-TL de milho por
482 BLASTp forneceu dois modelos estruturais. O primeiro deles, a OAS-TL de *A. thaliana*
483 (PDB ID: 1Z7W) compartilha de 82% de identidade, sendo este utilizado como molde
484 para a proteína associada ao seu cofator enzimático, o PLP. Como essa estrutura não
485 fornece as coordenadas espaciais do substrato OAS, modelamos esse ligante utilizando a
486 estrutura da OAS-TL de *Haemophilus influenza* L. (PDB ID: 4ZU6) que compartilha
487 identidade de 54%.

488 A estrutura tridimensional da OAS-TL de milho foi modelada na forma de um
489 homodímero (Fig. 1). Primeiramente, foi gerada a cadeia B pelo programa *UCSF*
490 *Chimera* e incorporada na cadeia A do arquivo molde 1Z7W (dímero). Em seguida, as
491 cadeias A e B do homodímero estruturado e o molde 4ZU6 foram sobrepostos usando o
492 programa *Coot*, sendo as substituições necessárias dos resíduos de aminoácidos
493 processadas de acordo com a sequência de interesse.

494 Além das substituições dos resíduos de aminoácidos, foram incorporadas nas duas
495 cadeias a OAS e mais duas moléculas de água (posições 537 e 556). Em adição, o
496 aminoácido Gln¹⁴⁷ (Q) foi rotacionado para a porção mais favorável das duas cadeias. Por
497 fim, o modelo foi submetido a ciclos de minimização de energia.

498 O modelo final da OAS-TL (Fig. 1) mostrou 90,6% dos resíduos em regiões
499 permitidas no gráfico de Ramachandran (Fig. 2), o que demonstra a excelente qualidade
500 estereoquímica da estrutura modelada.

501

502 3.2 Validação do protocolo de docking e virtual screening

503

504 Para estabelecer o protocolo de simulação de *docking* ideal e viabilizar o uso do
505 modelo final da OAS-TL de milho em estudos de *virtual screening*, foi realizado o
506 *redocking* utilizando os programas *Autodock Wizard* 4.2.3 e *Vina*, os quais forneceram
507 um RMSD de 0,64 Å e *scores* médios de -6,74 Kcal mol⁻¹ e -6,60 Kcal mol⁻¹,
508 respectivamente.

509 A biblioteca de compostos semelhantes aos inibidores da OAS-TL foi elaborada a
510 partir do banco de dados *BRENDA enzyme*. A biblioteca montada continha 683 ligantes
511 com similaridade maior que 70% com os inibidores da OAS-TL depositados no banco de
512 dados. Os 683 ligantes foram testados nos dois programas em quatro repetições cada,
513 resultando em sete candidatos à inibidores. Além das pontuações obtidas, todos os
514 ligantes apresentaram um posicionamento entre enzima e ligante considerados adequados
515 em comparação à OAS endógena (*pose*).

516 Após os testes de validação (regras de Lipinski e ADMETox) dos ligantes, resultaram
517 apenas os compostos *S*-benzil-L-cisteína (SBC) com pontuação igual a -7,0 Kcal mol⁻¹ e
518 coeficiente de partição (XlogP) igual a -0,91 (Fig. 3A) e o 2-amino-3-
519 fenilsulfonilsulfanil-propanóico (AFESULPRO) com pontuação igual -7,55 Kcal mol⁻¹ e
520 XlogP igual a -1,60 (Fig. 3B). Destes, a SBC foi adquirida da Sigma-Aldrich (St. Louis,

521 MO, USA) e testada quanto a sua atividade herbicida sobre plantas de milho e *I. triloba*.
522 O AFESULPRO será testado em experimentos futuros após necessária síntese química.

523

524 3.3 Alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos das proteínas OAS- TL de
525 milho, *I. triloba* e *A. thaliana*

526

527 Realizou-se o alinhamento das sequências de milho, *I. triloba* e *A. thaliana* a fim de
528 verificar os resíduos conservados e os resíduos ativos ligados ao sítio ativo da enzima
529 OAS-TL. O alinhamento das isoformas demonstrou identidade acima de 80% e
530 similaridade acima de 88% entre os resíduos de aminoácidos das três espécies avaliadas.

531 Além do alto índice de resíduos conservados (destacados em vermelho), foi possível
532 observar as regiões ativas para formação do sítio ativo da enzima. A Lys³⁸ (K) formando
533 a base de Schiff com o PLP determina a posição do sítio ativo e os resíduos que interagem
534 com o substrato a Thr⁷⁷, Ser⁷⁸ (TS) e o Gln¹⁵⁰ (Q) destacados em amarelo (Fig. 4).

535

536 3.4 Efeitos da SBC no crescimento inicial em plântulas de milho e *I. triloba*

537

538 A Figura 5 mostra o efeito inibitório da SBC no crescimento de raízes de milho
539 (Fig. 5A, B e C) e de *I. triloba* (Fig. 5D, E e F) (comprimentos e pesos) nos diferentes
540 períodos de incubação (24, 48, 72 e 96 h). Quando comparado às plantas controle, os
541 comprimentos reduziram em 36,4–40,4% nas concentrações de 125 a 750 µM (milho)
542 (Fig. 5A) e em 58,4–76,7 % nas concentrações de 125–1000 µM (*I. triloba*) (Fig. 5D)
543 com apenas 24 h de incubação.

544 Nos períodos de 48 e 72 h, as raízes de milho demonstraram redução nos
545 comprimentos de 44,8–54,3% e acima de 62% nas maiores concentrações de SBC (750 e
546 1000 µM), respectivamente. Além destas, na incubação por 72 h, as concentrações de
547 125 µM e 500 µM de SBC reduziram os comprimentos em 17% e 44,3%, nesta ordem
548 (Fig. 5A). Em raízes de *I. triloba* o efeito inibitório do crescimento foi mais expressivo
549 alcançando um intervalo de redução de 68,9–79,6% em 48 h e de 61–90 % em 72 h nas
550 diferentes concentrações de SBC (125–1000 µM) (Fig. 5D). Além dos três períodos
551 apresentados, o milho foi submetido à incubação por 96 h na presença do composto, os
552 comprimentos apresentaram redução de 20–68,3% com as concentrações de SBC
553 aumentando de 125 a 1000 µM (Fig. 5A).

554 O peso fresco (Fig. 5B) e o peso seco (Fig. 5C) de milho foram influenciados de
555 maneiras diferentes pelo tratamento com SBC nos quatro períodos de incubação. O peso
556 fresco em 24 h, quando comparado ao controle, teve uma redução média de 13% nas
557 concentrações de 125 a 1000 μM e o peso seco apresentou o dobro desta média (26%)
558 entre as concentrações de 250 a 1000 μM . Em 48 h, o peso fresco reduziu 29,5% e 23,7%
559 com 750 e 1000 μM , respectivamente. Neste mesmo período apresentou uma redução do
560 peso seco de 18–35,3% com o aumento progressivo da concentração de SBC (125 a
561 1000 μM).

562 Contrariamente, nos períodos de 72 e 96 h de incubação, o peso fresco foi afetado em
563 todas as concentrações de SBC com uma redução de 22,8–46,8% e 39,7–61,6%,
564 respectivamente. Ao passo que, em 72 h, o peso seco apresentou uma média de redução
565 de 28% entre as três maiores concentrações (500, 750 e 1000 μM), e em 96 h, de 45% em
566 todas as concentrações analisadas.

567 O peso fresco (Fig. 5E) e o peso seco (Fig. 5F) de *I. triloba* em 24 h, apresentaram
568 uma redução média de 14%, sendo significativa no peso fresco nas concentrações de 250
569 a 1000 μM de SBC e no peso seco, a redução foi significativa nas concentrações de 250,
570 750 e 1000 μM do composto. No período de incubação de 48 h para *I. triloba*, o peso
571 fresco reduziu um valor médio de 18% em todas as concentrações de SBC analisadas,
572 enquanto a redução no peso seco foi significativa apenas nas concentrações de 750 e
573 1000 μM em 13,7% e 21,2%, respectivamente. Diferentemente, o período de 96 h de
574 exposição à SBC reduziu em 24,8–36,7% o peso fresco, e em 12,7–29% o peso seco nas
575 cinco concentrações de SBC avaliadas.

576

577 3.5 Efeitos da SBC no crescimento inicial de milho e de *I. triloba* na presença de L- 578 cisteína

579

580 A redução no conteúdo do aminoácido L-cisteína, por ser o produto da enzima OAS-
581 TL na via de assimilação do enxofre, pode representar uma das principais causas da
582 inibição do crescimento em plantas de milho e *I. triloba* expostas ao SBC. Desta forma,
583 para verificar uma possível redução da síntese de L-cisteína induzida pela SBC, nós
584 avaliamos se a suplementação com L-cisteína exógena poderia aliviar ou reverter a
585 inibição do crescimento nas duas espécies de plantas tratadas com SBC. A Figura 7
586 mostra as alterações no comprimento de raízes de plântulas de milho (Fig. 7A) e *I. triloba*
587 (Fig. 7B) cultivadas em solução nutritiva suplementadas com L-cisteína.

588 Observou-se que para este parâmetro, na ausência de L-cisteína, ocorreu redução de
589 27,8% no comprimento de raízes das plântulas de milho tratadas com 500 μM de SBC,
590 quando comparado ao controle. Por outro lado, na presença de qualquer concentração de
591 L-cisteína não foi observada diferenças significativas entre plantas controle e tratadas
592 com SBC (Fig. 7A).

593 O comprimento de raízes em *I. triloba* suplementadas com L-cisteína demonstrou um
594 efeito reversivo maior do que o apresentado no milho. Pode-se observar uma redução
595 significativa de cerca de 69% no comprimento das raízes de plântulas de *I. triloba* na
596 ausência de L-cisteína e redução de 25,6% na presença de 1 mM do aminoácido, quando
597 comparada as plantas tratadas com 125 μM de SBC e o controle.

598

599 3.6 Efeitos da SBC no teor de L-cisteína obtidos a partir do extrato bruto

600

601 Os resultados a respeito do teor de L-cisteína obtidos do extrato bruto de raízes de
602 milho submetidas a 48 h de incubação na presença e ausência do SBC, demonstraram um
603 decréscimo de cerca de 18,5% no teor do aminoácido em extrato de plantas tratadas com
604 750 μM do composto selecionado *in silico*, quando comparadas ao controle (Fig. 8).

605

606 3.7 Inibição da atividade da AtOAS-TL na presença de SBC

607

608 A via de assimilação do enxofre pelas plantas é apta a reduzir o SO_4^{2-} inorgânico
609 obtido do solo à L-cisteína, por meio da catálise final da via através da OAS-TL. A partir
610 dos resultados obtidos nos tópicos 3.5 e 3.6 em que se observou uma redução na síntese
611 de L-cisteína induzida pelo tratamento com SBC *in vivo*, nos motivou a demonstrar o
612 mecanismo da enzima AtOAS-TL por meio da determinação da $V_{\text{máx}}$ e K_M , *in vitro*, assim
613 como o efeito da SBC na enzima.

614 A Figura 9A mostra a curva de saturação para a AtOAS-TL na presença de Na_2S
615 saturante (10 mM) e concentrações crescentes de OAS. A $V_{\text{máx}}$ e a K_M obtidas foram,
616 respectivamente, 43,41 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} \text{prot}$ e 2649 μM . Sob meia saturação com OAS,
617 foram observadas reduções de 42,6% e 53% na atividade quando na presença de 2,5 e
618 5 mM de SBC, respectivamente (Fig. 9B).

619

620

621

622 4. Discussão

623

624 Em nosso estudo, a estrutura da OAS-TL de milho modelada apresentou qualidade
625 estereoquímica que permitiu selecionar de forma eficaz dois compostos que apresentaram
626 *score* energético menor que o do substrato e posicionamento no sítio ativo semelhante ao
627 mesmo, sugerindo que estas substâncias são potenciais inibidores desta enzima (Fig. 3A
628 e B).

629 A SBC (Fig. 3A), um dos compostos selecionados, foi testada *in vivo* com intuito de
630 verificar uma possível inibição da OAS-TL. No presente trabalho, os resultados de
631 crescimento em plantas jovens de milho e de *I. triloba* demonstraram que a exposição à
632 SBC em diferentes concentrações foi responsável pela diminuição dos parâmetros
633 biométricos observados nas duas espécies (Fig. 5A a F), com maior redução no
634 comprimento de raízes de plântulas de *I. triloba* (Fig. 5D). O visível efeito redutor no
635 comprimento de raízes, peso fresco e seco deste órgão em ambas as espécies permite
636 inferir que a via de assimilação do enxofre foi afetada (Fig. 6A e B).

637 Além da clara interferência negativa da SBC observada nos parâmetros de
638 crescimento discutidos acima, sintomas relacionados à deficiência de enxofre foram
639 observados, principalmente, no ápice foliar de milho (Fig. 6A). A ocorrência de clorose
640 (amarelamento) da porção apical das folhas sugerem fortemente a falta do
641 macronutriente. A clorose das folhas provavelmente está relacionada com o
642 comprometimento na síntese da coenzima *S*-adenosil-L-metionina (SAM) (Staelin,
643 2015; Taiz et al., 2017), que atua em uma das etapas da biossíntese das clorofilas a/b
644 (Christoffoleti e Nicolai, 2016; Tomaz et al., 2015).

645 Estes resultados estão atrelados a redução dos teores de L-cisteína, produto da OAS-
646 TL, ocasionando problemas na síntese de vários compostos contendo enxofre, além de
647 inviabilizar a formação das estruturas tridimensionais das proteínas devido à não
648 formação das ligações dissulfeto entre os grupos tíóis dos resíduos de L-cisteína,
649 resultando na diminuição do tamanho dos órgãos e conseqüentemente interferindo em
650 suas biomassas (Fig. 5A e F) (Long et al., 2015). Nas análises de quantificação do teor de
651 L-cisteína a partir do extrato bruto de raízes de milho incubadas na ausência e presença
652 de SBC, observamos que na maior dose testada (750 μ M) ocorreu uma diminuição
653 significativa de 18,5% no teor do aminoácido (Fig. 8), o que nos permite sugerir que a
654 SBC pode atuar como inibidora da OAS-TL e reduzir a biossíntese de L-cisteína *in vivo*,

655 comprometendo a síntese de moléculas dependentes de enxofre (Long et al., 2015; Taiz
656 et al., 2017).

657 Nossos resultados corroboram com alguns artigos de revisão, os quais pontuam que a
658 carência de enxofre em plantas como *Glycine max*, *Manihot esculenta* e *A. thaliana*
659 ocasionam redução no crescimento, além de alteração nos teores de etileno e diminuição
660 de vários metabólitos primários e secundários subjugados a presença de enxofre
661 (Krishnan and Jez, 2018; Wawrzynska et al., 2015). Ademais, estudos genéticos
662 apresentaram uma outra perspectiva entre a redução do crescimento e interferência
663 negativa na nodulação de *G. max* com a via de assimilação do enxofre, através da
664 superexpressão da OAS-TL (Krishnan e Jez, 2018).

665 Com propósito de confirmar o comprometimento na síntese de L-cisteína causada pela
666 inibição da OAS-TL, verificamos o comprimento das raízes de milho e *I. triloba*
667 incubadas com 500 μ M e 125 μ M de SBC, respectivamente, e suplementadas em solução
668 nutritiva com L-cisteína, produto da via de assimilação do sulfato. Nossos dados
669 revelaram que a L-cisteína fornecida no meio foi capaz de reverter, ainda que
670 parcialmente, o efeito inibitório da SBC sobre os parâmetros de crescimento
671 (Fig. 7A e B), reafirmando que a integridade das etapas da via de assimilação do sulfato,
672 em particular da enzima OAS-TL que catalisa a síntese da L-cisteína, é indispensável para
673 o desenvolvimento das plantas (Long et al., 2015; Taiz et al., 2017).

674 No entanto, apesar das duas espécies de plantas apresentarem redução nos parâmetros
675 de crescimento quando submetidas ao tratamento com SBC em diferentes concentrações,
676 pode-se observar que as plântulas de milho pareceram mais tolerantes à SBC que a
677 plântulas de *I. triloba*, quando comparamos os resultados de crescimento (Fig. 5A e D).
678 Além disso, a *I. triloba* respondeu de forma mais eficiente que o milho ao experimento
679 de reversão proposto pela suplementação de L-cisteína no meio (Fig. 7A e B). Os dados
680 mostram que na *I. triloba* a redução do comprimento das raízes tratadas com 125 μ M de
681 SBC foi significativamente menor nas plantas que receberam 1 mM de L-cisteína em
682 solução nutritiva em comparação às que não foram suplementadas (Fig. 7B).

683 Para tentar compreender os diferentes efeitos sentidos entre as espécies
684 experimentais, realizamos o alinhamento da sequência de aminoácidos de três isoformas
685 da OAS-TL. A isoforma de *A. thaliana*, a qual foi utilizada como molde da OAS-TL para
686 modelagem da OAS-TL de milho e no ensaio enzimático, isoformas de *I. triloba* e milho,
687 utilizadas nos ensaios *in vivo*, com o intento de verificar possíveis alterações nos resíduos
688 de aminoácidos que explicassem tais resultados. Porém, observamos alta identidade e

689 similaridade entre as sequências analisadas, inclusive os resíduos de aminoácidos
690 relacionados ao sítio ativo e à interação com o substrato OAS são altamente conservados
691 nas três espécies (Fig. 4).

692 Desta forma, os diferentes graus de tolerância observados nos ensaios *in vivo* não
693 podem ser explicados pela estrutura primária da enzima OAS-TL. Contudo, podemos
694 sugerir que o grau dos efeitos sentidos pelas plantas de milho e *I. triloba* pode estar
695 relacionado a classificação em que se enquadram, monocotiledôneas e dicotiledôneas,
696 nesta ordem. Isto porque, estas classes apresentam estruturas fisiológicas diferentes, tais
697 como raízes (fasciculada ou pivotante), estrutura caulinar (colmo ou tronco), organização
698 dos feixes vasculares (irregulares ou em círculo), desenvolvimento da bainha (paralela ou
699 reticulada) (Taiz et al., 2017), todas estruturas indispensáveis para o bom funcionamento
700 dos diferentes metabolismos das plantas, tais como absorção de nutrientes, equilíbrio
701 hídrico, fotossíntese, transpiração, respiração, dentre outros.

702 Por consequência das diferenças fisiológicas entre o milho e a *I. triloba*, a absorção
703 da SBC, bem como os efeitos sentidos pela sua presença nos parâmetros estudados podem
704 responder de forma mais marcante nas plantas dicotiledôneas, como a *I. triloba*
705 observadas neste trabalho. Porém, estudos adicionais com outras espécies de
706 monocotiledôneas e dicotiledôneas precisam ser realizados para confirmar esta
707 proposição.

708 Por fim, ensaio enzimático foi realizado para observar a atividade da enzima na
709 presença do substrato (Fig. 9A) e comprovar o efeito inibitório da SBC, selecionado *in*
710 *silico*, na atividade da enzima OAS-TL (Fig. 9B). Este resultado agrega maior
711 confiabilidade aos resultados obtidos nos procedimentos *in vivo*, confirmando a potencial
712 ação herbicida que o composto apresenta.

713 Em conclusão, os experimentos de modelagem e *virtual screening* possibilitaram
714 identificar dois compostos candidatos a inibidores da enzima OAS-TL de milho. Um
715 destes inibidores candidatos, a SBC, parece interagir mais fortemente com o sítio ativo
716 do que o próprio substrato OAS, já que apresentou menor *score* energético (-7,0
717 kcal mol⁻¹) do que a OAS (-6,6 kcal mol⁻¹). A SBC reduziu significativamente o
718 crescimento inicial de plântulas de milho e *I. triloba* e o teor de L-cisteína das raízes,
719 sugerindo sua atividade inibitória sobre a OAS-TL *in vivo*. E confirmando a ação
720 inibitória do composto, o ensaio enzimático demonstrou este efeito *in vitro*.

721
722

723 5. AGRADECIMENTOS

724

725 Aos professores Dr. Rogério Marchiosi (orientador), Dr. Osvaldo Ferrarese-Filho
726 (coorientador) e Flávio Augusto Vicente Seixas pesquisadores do Conselho Nacional de
727 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Os autores agradecem à Aparecida
728 M. D. Ramos e Antonio Nunis da Silva pela assistência técnica.

729

730 6. REFERÊNCIAS

731

732 Berman, H.M., Battistuz, T., Bhat, T.N., Bluhm, W.F., Bourne, P.E., Burkhardt, K., Feng,
733 Z., Gilliland, G.L., Iype, L., Jain, S., Fagan, P., Marvin, J., Padilla, D., Ravichandran,
734 V., Schneider, B., Thanki, N., Weissig, H., Westbrook, J.D., Zardecki, C., 2002. The
735 protein data bank. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 58, 899–907.
736 <https://doi.org/10.1107/S0907444902003451>

737 Birke, H., Müller, S.J., Rother, M., Zimmer, A.D., Hoernstein, S.N.W., Wesenberg, D.,
738 Wirtz, M., Krauss, G.J., Reski, R., Hell, R., 2012. The relevance of
739 compartmentation for cysteine synthesis in phototrophic organisms. *Protoplasma.*
740 <https://doi.org/10.1007/s00709-012-0411-9>

741 Bonner, E.R., Cahoon, R.E., Knapke, S.M., Jez, J.M., 2005. Molecular Basis of Cysteine
742 Biosynthesis in Plants. *J. Biol. Chem.* 280, 38803–38813.
743 <https://doi.org/10.1074/jbc.m505313200>

744 Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
745 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*
746 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

747 Bueno, P.S., Rodrigues-Vendramini, F.A., Toplak, M., Macheroux, P., Kioshima, É.S.,
748 Seixas, F.A., 2019. New inhibitors of chorismate synthase present antifungal
749 activity against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Future Microbiol.* 14, 969–980.
750 <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0052>

751 Bueno, P.S.A., Carina Biavatti, D., Sandro Gularte Chiarello, A., Aureliana Fassina, V.,
752 Aparecida Fernandez, M., Augusto Vicente Seixas, F., 2019. The structure of viral
753 cathepsin from *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus as a target against
754 grasserie: docking and molecular dynamics simulations. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 0,
755 1–9. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1521344>

756 Camiccia, M., 2019. Perfil do aleitamento materno e contaminação por glifosato em
757 lactantes do município de Francisco Beltrão - PR. Universidade Estadual do Oeste
758 do Paraná.

759 Capaldi, F.R., Gratão, P.L., Reis, A.R., Lima, L.W., Azevedo, R.A., 2015. Sulfur
760 Metabolism and Stress Defense Responses in Plants 60–73.
761 <https://doi.org/10.1007/s12042-015-9152-1>

762 Carneiro, F.F., Augusto, L.G. da S., Rigotto, R.M., Friedrich, K., Búrigo, A.C., 2015.
763 Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. EPSJV,
764 Expressão Popular, Rio de Janeiro, São Paulo.

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

768 Das, S.K., Mondal, T., 2014. Mode of action of herbicides and recent trends in
769 development : A Reappraisal. *Int. Invent. J. Agric. Soil Sci.* 2, 27–32.

770 Domínguez-Solís, J.R., Gutiérrez-Alcalá, G., Romero, L.C., Gotor, C., 2001. The
771 Cytosolic O-Acetylserine(thiol)lyase Gene is Regulated by Heavy Metals and Can
772 Function in Cadmium Tolerance. *J. Biol. Chem.* 276, 9297–9302.
773 <https://doi.org/10.1074/jbc.M009574200>

774 Dong, J., Wu, F., Zhang, G., 2006. Influence of cadmium on antioxidant capacity and
775 four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*).
776 *Chemosphere* 64, 1659–1666. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.01.030>

777 Duke, S.O., 2011. Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years?
778 *Pest Manag. Sci.* 68, 505–512. <https://doi.org/10.1002/ps.2333>

779 Dutra, R.M.S., De Souza, M.M. de O., 2017. IMPACTOS NEGATIVOS DO USO DE
780 AGROTÓXICOS À SAÚDE HUMANA. *Rev. Bras. Geogr. Médica e da Saúde* 13,
781 127–140.

782 Emsley, P., Cowtan, K., 2004. Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta*
783 *Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 60, 2126–2132.
784 <https://doi.org/10.1107/S0907444904019158>

785 Epp, J.B., Schmitzer, P.R., Crouse, G.D., 2017. Fifty years of herbicide research :
786 comparing the discovery of trifluralin and halauxifen-methyl.
787 <https://doi.org/10.1002/ps.4657>

788 Feldman-salit, A., Wirtz, M., Lenherr, E.D., Throm, C., Hothorn, M., Scheffzek, K.,
789 2012. Article Allosterically Gated Enzyme Dynamics in the Cysteine Synthase

790 Complex Regulate Cysteine Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Structure* 292–
791 302. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.11.019>

792 Ferro, A.P., Parizotto, A.V., Augusto, F., Seixas, V., 2020. Naringin inhibits the *Zea mays*
793 coniferyl aldehyde dehydrogenase: an in silico and in vitro approach 0.
794 <https://doi.org/10.1007/s13562-020-00561-0>

795 Gaitonde, M.K., 1967. A spectrophotometric method for the direct determination of
796 cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. *Biochem. J.* 104,
797 627–33.

798 Gazziero, D.L.P., Guimarães, S.C., Pereira, F. de A.R., 1989. *Plantas Daninhas: cuidado*
799 *com a disseminação*. Londrina.

800 Gigolashvili, T., Kopriva, S., 2014. Transporters in plant sulfur metabolism. *Front. Plant*
801 *Sci.* 5, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00442>

802 Hell, R., Wirtz, M., 2012. Molecular Biology, Biochemistry and Cellular Physiology of
803 Cysteine Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Arab. B.* 9, e0154.
804 <https://doi.org/10.1199/tab.0154>

805 Hirase, K., Molin, W.T., 2003. Sulfur assimilation in plants and weed control: Potential
806 targets for novel herbicides and action sites of certain safeners. *Weed Biol. Manag.*
807 3, 147–157. <https://doi.org/10.1046/j.1445-6664.2003.00098.x>

808 Irwin, J.J., Sterling, T., Mysinger, M.M., Bolstad, E.S., Coleman, R.G., 2012. Zinc
809 *Chem. Inf. Model.* 52, 1757–1768.

810 Jobe, T.O., Zenzen, I., Karvansara, P.R., Kopriva, S., 2019. Integration of sulfate
811 assimilation with carbon and nitrogen metabolism in transition from C₃ to C₄
812 photosynthesis 70, 4211–4221. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz250>

813 Jurado, A.S., Fernandes, M.A.S., Videira, R.A., Peixoto, F.P., Vicente, J.A.F., 2011.
814 *Herbicides: The Face and the Reverse of the Coin. An in vitro Approach to the*
815 *Toxicity of Herbicides in Non-Target Organisms*, in: Kortekamp, A. (Ed.),
816 *Herbicides and Environment*. InTech, Rijeka, Croatia, pp. 3–44.
817 https://doi.org/10.3719/weed.1971.12_1

818 Kopriva, S., Mugford, S.G., Baraniecka, P., Lee, B., Matthewman, C.A., Koprivova, A.,
819 2012. Control of sulfur partitioning between primary and secondary metabolism in
820 *Arabidopsis* 3, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00163>

821 Krishnan, H.B., Jez, J.M., 2018. Review: The promise and limits for enhancing sulfur-
822 containing amino acid content of soybean seed. *Plant Sci.* 272, 14–21.
823 <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.03.030>

824 Laskowski, R.A., Rullmann, J.A.C., MacArthur, M.W., Kaptein, R., Thornton, J.M.,
825 1996. AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein
826 structures solved by NMR* 8, 477–486.

827 Lee, Y.H., Choi, H., Park, S., Lee, B., Yi, G.S., 2017. Drug repositioning for enzyme
828 modulator based on human metabolite-likeness. *BMC Bioinformatics* 18.
829 <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1637-5>

830 Long, S.R., Kahn, M., Seefeldt, L., Tsay, Y.-F., Korpiva, S., 2015. *Biochemistry &*
831 *MOlecular Biology of Plants*, in: Buchanan, Bob. B Grisseem, Wilhelm Jones,
832 Russell L. Chichester, pp. 711–767.

833 Magrane, M., Consortium, U.P., 2011. UniProt Knowledgebase: A hub of integrated
834 protein data. *Database* 2011, 1–13. <https://doi.org/10.1093/database/bar009>

835 Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M.F., Belew, R.K., Goodsell, D.S.,
836 Olson, A.J., 2010. Reference-36 docking simulation.pdf. *J. ...* 30, 2785–2791.
837 <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.AutoDock4

838 Newton, G.L., Dorian, R., Fahey, R.C., 1981. Analysis of biological thiols: Derivatization
839 with monobromobimane and separation by reverse-phase high-performance liquid
840 chromatography. *Anal. Biochem.* 114, 383–387. [https://doi.org/10.1016/0003-](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90498-X)
841 [2697\(81\)90498-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90498-X)

842 Pacheco Homem, D., Flores, R., Tosqui, P., De Castro Rozada, T., Abicht Basso, E.,
843 Gasparotto Junior, A., Augusto Vicente Seixas, F., 2013. Homology modeling of
844 dihydrofolate reductase from *T. gondii* bonded to antagonists: Molecular docking
845 and molecular dynamics simulations. *Mol. Biosyst.* 9, 1308–1315.
846 <https://doi.org/10.1039/c3mb25530a>

847 Phillips, J.C., Braun, R., Wang, W., Gumbart, J., Tajkhorshid, E., Villa, E., Chipot, C.,
848 Skeel, R.D., Kalé, L., Schulten, K., 2005. Scalable molecular dynamics with
849 NAMD. *J. Comput. Chem.* 26, 1781–1802. <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>

850 Rauser, W.E., Schupp, R., Rennenberg, H., 1991. Cysteine, γ -Glutamylcysteine, and
851 Glutathione Levels in Maize Seedlings. *Plant Physiol.* 97, 128–138.
852 <https://doi.org/10.1104/pp.97.1.128>

853 Robert, X., Gouet, P., 2014. Deciphering key features in protein structures with the new
854 ENDscript server. *Nucleic Acids Res.* 42, 320–324.
855 <https://doi.org/10.1093/nar/gku316>

856 Schomburg, I., Chang, A., Placzek, S., Söhngen, C., Rother, M., Lang, M., Munaretto,
857 C., Ulas, S., Stelzer, M., Grote, A., Scheer, M., Schomburg, D., 2013. BRENDA in

858 2013: Integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease
859 classification: New options and contents in BRENDA. *Nucleic Acids Res.* 41, 764–
860 772. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1049>

861 Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R.,
862 Thompson, J.D., Higgins, D.G., McWilliam, H., Remmert, M., So, J., 2011. Fast ,
863 scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using
864 Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>

865 Sparks, T.C., Lorschach, B.A., 2016. Perspectives on the agrochemical industry and
866 agrochemical discovery. <https://doi.org/10.1002/ps.4457>

867 Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I.M., Murphy, A. 2017. *Fisiologia e Desenvolvimento*
868 *Vegetal*. 6. ed. Artmed. Porto Alegre.

869 Tomaz, Marcelo Antonio Rodrigues, W.N., Martins, L.D., Brinate, S.V.B., Colodetti,
870 tafarel V., 2015. Diagnósticos nutricionais do solo e da planta, in: *Tópicos Especiais*
871 *Em Produção Vegetal V.* pp. 393–415.

872 Trott, O., Olson, A., 2010. Autodock vina: improving the speed and accuracy of docking.
873 *J. Comput. Chem.* 31, 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>. AutoDock

874 Ufaz, S., Galili, G., 2008. Improving the Content of Essential Amino Acids in Crop
875 Plants : Goals and Opportunities 1 147, 954–961.
876 <https://doi.org/10.1104/pp.108.118091>

877 Vargas, L., Roman, E.S., 2006. Resistência de plantas daninhas a herbicidas: conceitos,
878 origem e evolução. *Passo Fundo Embrapa Trigo (Embrapa Trigo. Doc. Online, 58)*
879 22. <https://doi.org/10.1592/phco.26.9part2.148S>

880 Wawrzynska, A., Moniuszko, G., Sirko, A., 2015. Links Between Ethylene and Sulfur
881 Nutrition — A Regulatory Interplay or Just Metabolite Association ?
882 <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01053>

883 Wirtz, M., Droux, M., Hell, R., 2004. O-acetylserine (thiol) lyase: An enigmatic enzyme
884 of plant cysteine biosynthesis revisited in *Arabidopsis thaliana*, in: *Journal of*
885 *Experimental Botany.* <https://doi.org/10.1093/jxb/erh201>

886



887

888 **Figura 1.** Estrutura tridimensional da *O*-acetilserina(tiol) liase (OAS-TL) de milho
889 (homodímero) modelada com o substrato *O*-acetilserina (OAS) e o cofator piridoxal-
890 fosfato (PLP).

891

892

893

894

895

896

897

898

899

900

901

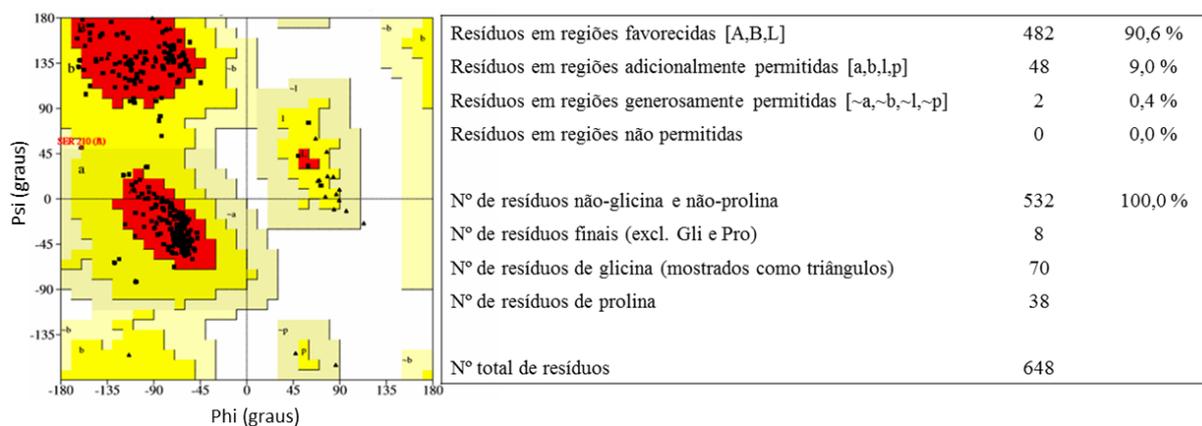
902

903

904

905

906



907

908 **Figura 2.** Gráfico de Ramachandran da *O*-acetilserina(tiol) liase (OAS-TL) que
 909 demonstra as conformações mais estáveis dos ângulos diédricos ψ (*psi*) versus ϕ (*phi*) e
 910 dados obtidos com base na análise de 118 estruturas com resolução de pelo menos 2.0 Å
 911 e fator R menor que 20% (*Procheck*).

912

913

914

915

916

917

918

919

920

921

922

923

924

925

926

927

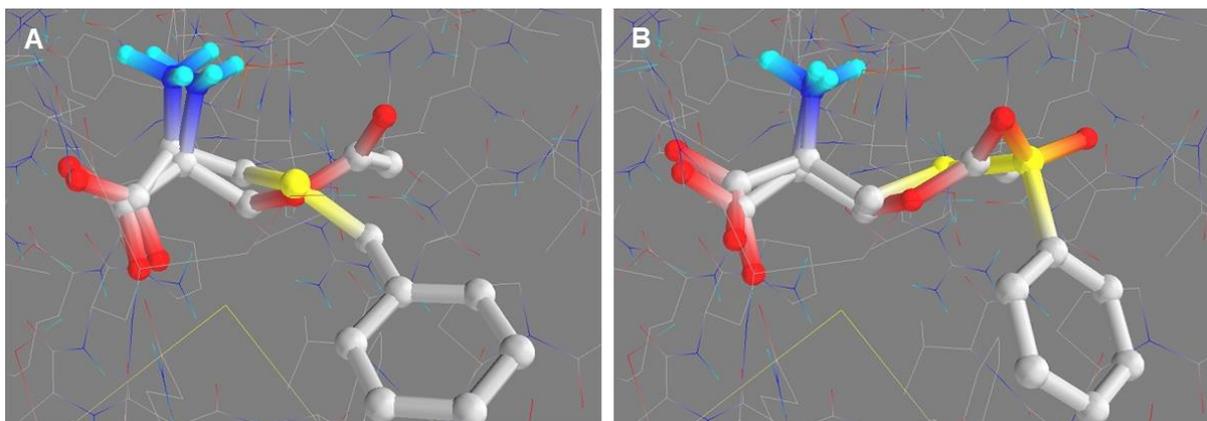
928

929

930

931

932



933

934 **Figura 3.** Compostos selecionados *in silico* através da *drug repositioning* e *virtual*
935 *screening* considerados com melhor classificação em relação ao substrato *O*-acetilserina
936 exógeno (OAS) (-6,6 kcal mol⁻¹). O composto S-benzil-L-cisteína (SBC) (-7,0 kcal mol⁻¹
937 e XlogP igual a -0,91) (**A**) foi testado nos experimentos *in vivo* do presente trabalho. E o
938 composto 2-amino-3-fenilsulfonilsulfanyl-propanóico (AFESULPRO) (-7,55 kcal mol⁻¹
939 e XlogP igual a -1,60) (**B**) será testado em experimentos futuros após necessária síntese.

940

941

942

943

944

945

946

947

948

949

950

951

952

953

954

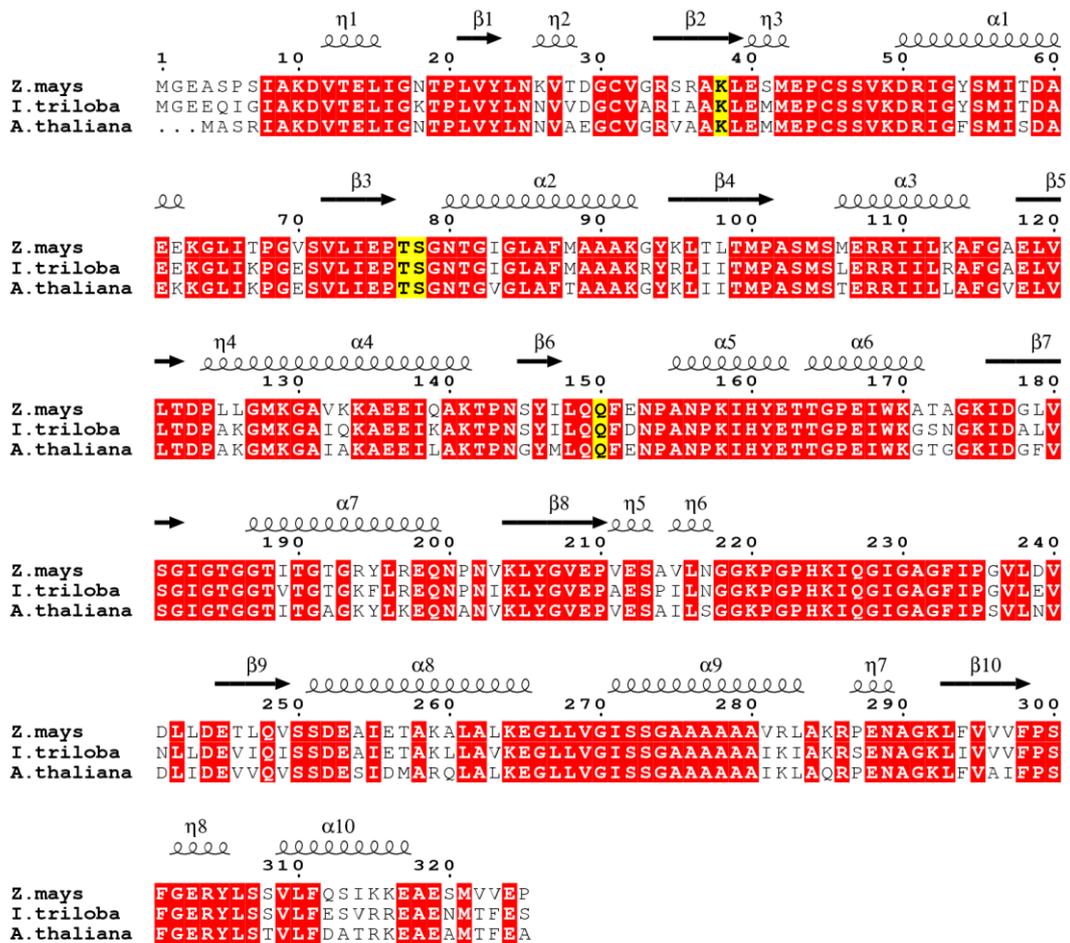
955

956

957

958

959



960

961 **Figura 4.** Alinhamento das sequências de aminoácidos da *O*-acetilserina(tiol) liase (OAS-
 962 TL) de milho, *Ipomoea triloba* e *Arabidopsis thaliana*. Os resíduos altamente
 963 conservados estão identificados em vermelho e os resíduos ativos para a ligação do
 964 substrato *O*-acetilserina (OAS) e a formação do sítio ativo estão marcados em amarelo. O
 965 alinhamento e a predição das estruturas secundárias no topo das sequências foram
 966 realizadas no programa *EsPript* 3.0, utilizando o modelo da estrutura cristalina da
 967 proteína OAS-TL de *A. thaliana* (PDB 4AEC) (α = hélices α indicadas como espirais; β
 968 = folhas β indicadas como setas; η = hélices do tipo 3¹⁰ indicadas como espirais).

969

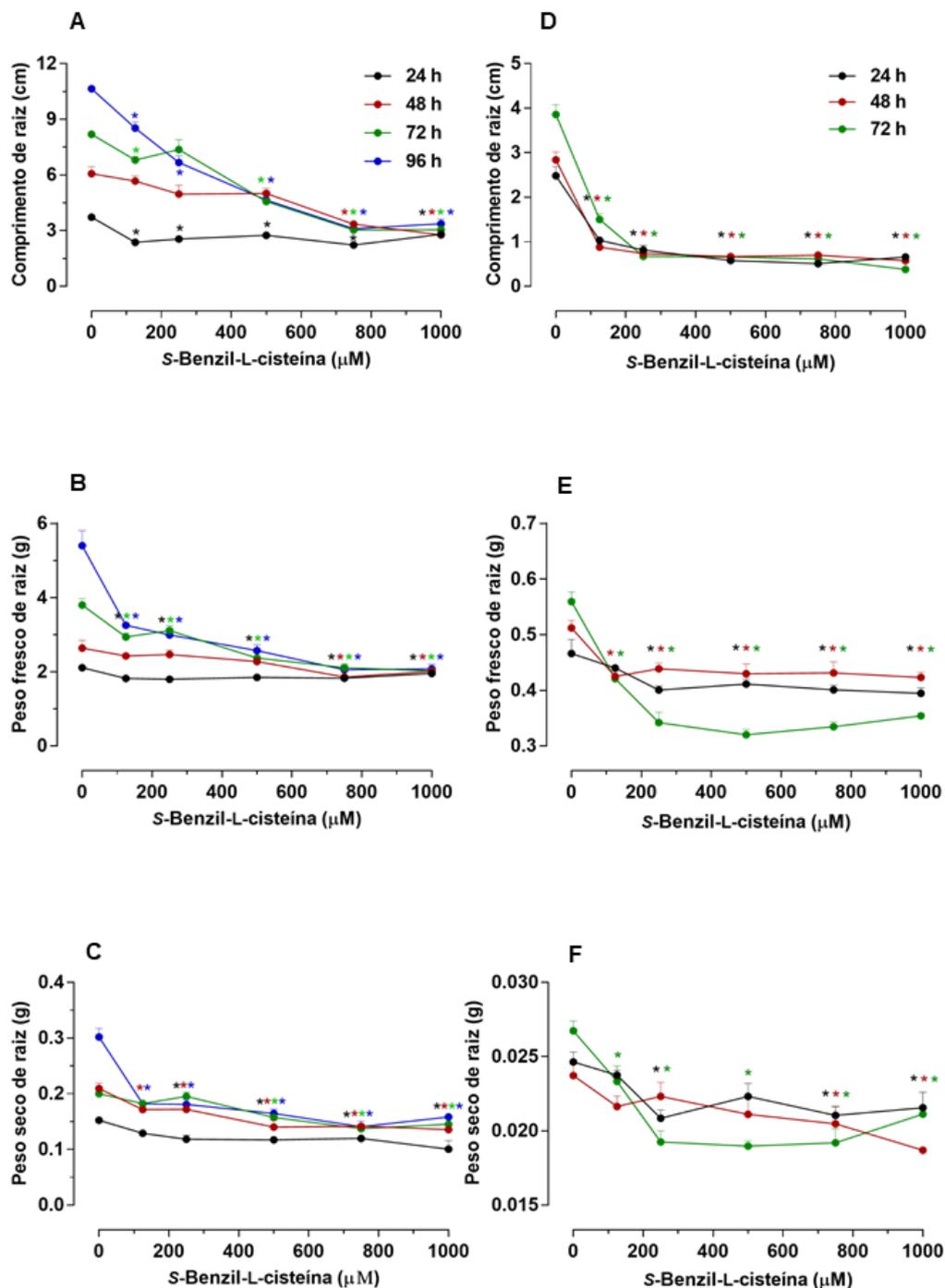
970

971

972

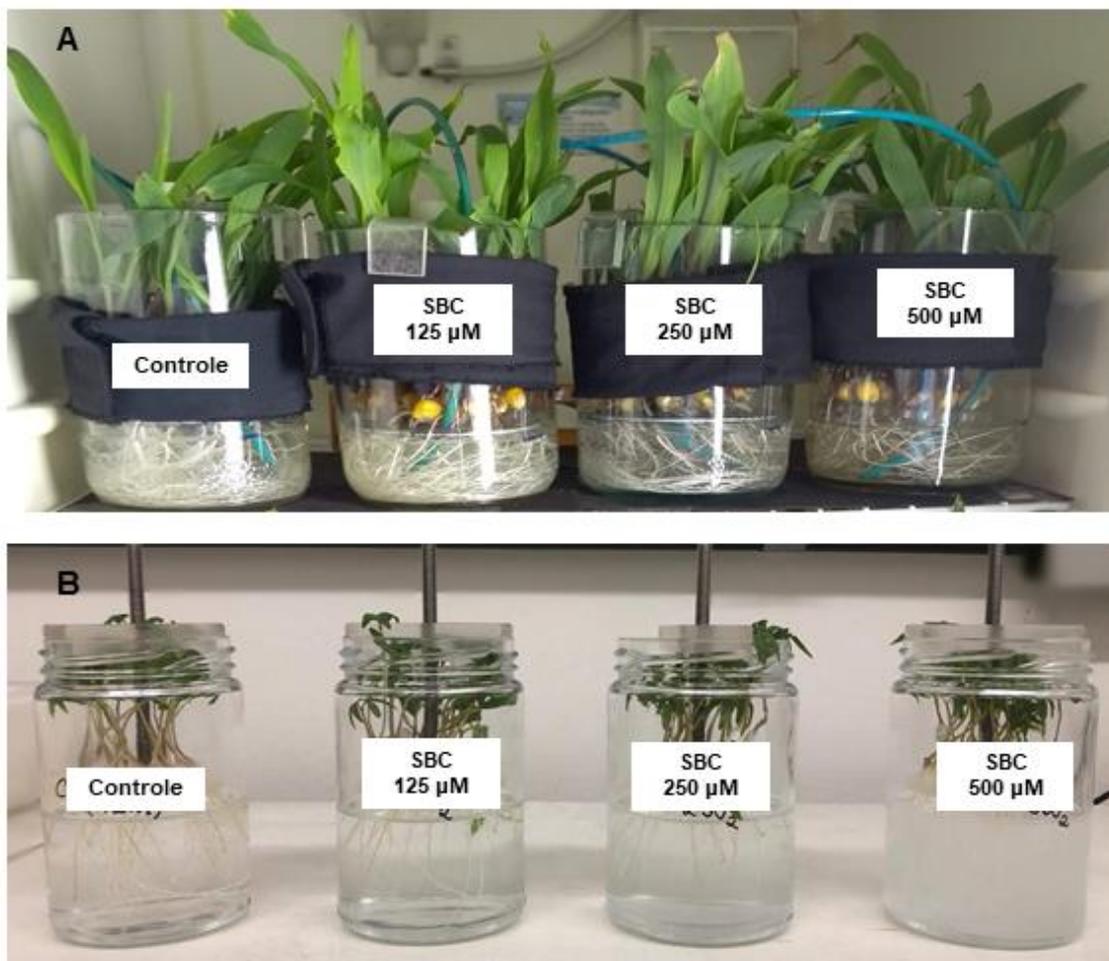
973

974



975

976 **Figura 5.** Efeitos da S-benzil-L-cisteína (SBC) (0, 125, 250, 500, 750 e 1000 μM) no
 977 comprimento (A e D), peso fresco (B e E) e peso seco (C e F) de raízes principais de
 978 milho (A, B e C) e *Ipomoea triloba* (D, E e F), ambos incubadas por 24, 48 e 72 h, sendo
 979 o milho incubado também por 96 h. As médias ± EPM (n = 3 a 9) marcadas com * diferem
 980 do controle de acordo com o teste de Dunnett (*One-way ANOVA*) com nível de
 981 significância de $P \leq 0,05$. As cores dos asteriscos (*) correspondem aos respectivos
 982 períodos de incubação.



983

984 **Figura 6.** Desenvolvimento das plântulas de milho (A) por 96 h de incubação e *Ipomoea*
985 *triloba* (B) por 72 h de incubação (períodos máximos de incubação) na presença ou não
986 de *S*-benzil-L-cisteína (SBC) (125–500 µM) diluídos em solução nutritiva (pH 6,0),
987 substituídas a cada 48 h.

988

989

990

991

992

993

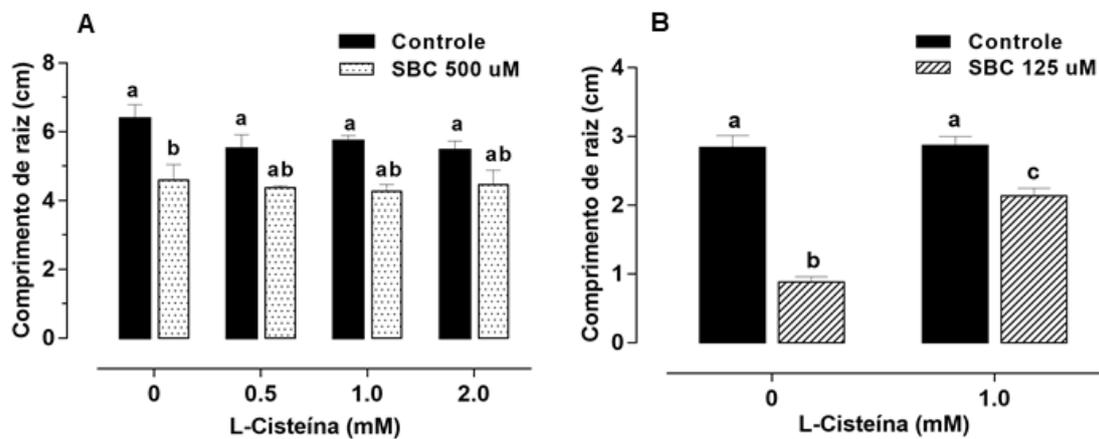
994

995

996

997

998



999

1000 **Figura 7.** Alterações no comprimento de raízes principais de milho (A) e *Ipomoea triloba*
 1001 (B) submetidos à 48 h de incubação com 500 μ M e 125 μ M de *S*-benzil-L-cisteína (SBC),
 1002 respectivamente. A incubação do milho ocorreu na presença ou não de L-cisteína em três
 1003 concentrações diferentes (0,5, 1 ou 2 mM) e a da *I. triloba* apenas na ausência e presença
 1004 de L-cisteína 1 mM. As médias \pm EPM (n = 3 a 4) marcadas com letras (a, b, c) diferem
 1005 entre si de acordo com o teste de Tukey (*Two-way ANOVA*) com nível de significância
 1006 de $P \leq 0,05$.

1007

1008

1009

1010

1011

1012

1013

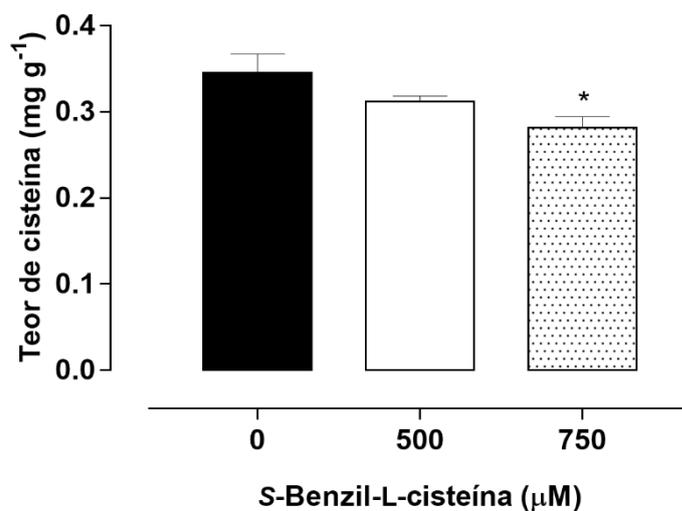
1014

1015

1016

1017

1018



1019

1020 **Figura 8.** Efeitos da *S*-benzil-L-cisteína (SBC) (0, 500 e 750 µM) no teor de L-cisteína
 1021 (mg g⁻¹) do extrato bruto obtido a partir da extração de raízes de milho incubadas por
 1022 48 h. As médias ± EPM (n = 3 a 4) marcadas com * diferem do controle de acordo com
 1023 o teste de Dunnett (*One-way* ANOVA) com nível de significância de $P \leq 0,05$.

1024

1025

1026

1027

1028

1029

1030

1031

1032

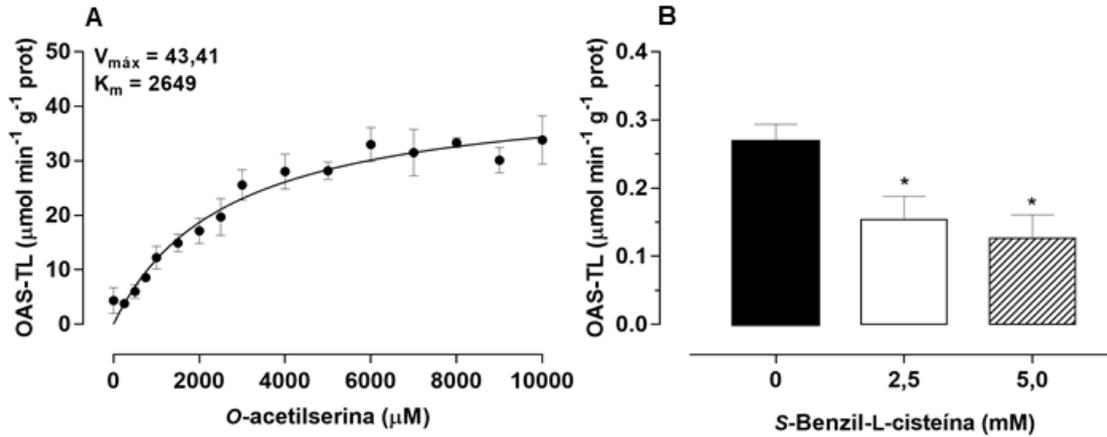
1033

1034

1035

1036

1037



1038

1039 **Figura 9.** Atividade da *O*-acetilserina(tiol) liase de *Arabidopsis thaliana* (AtOAS-TL)
 1040 expressa em *Escherichia coli* da cepa BL21(DE3) e purificada através de coluna de
 1041 cromatografia por afinidade ao níquel (GE Healthcare). Curva de saturação para a
 1042 AtOAS-TL realizada com o substrato *O*-acetilserina (OAS) sob concentrações saturantes
 1043 de sulfeto de sódio (Na_2S) (**A**). Inibição da atividade da AtOAS-TL pela S-benzil-L-
 1044 cisteína (SBC) realizada à meia saturação com o substrato OAS (**B**). As médias \pm EPM
 1045 ($n = 3$ em 3 replicatas independentes) marcadas com * diferem do controle de acordo
 1046 com o teste de Dunnett (*One-way* ANOVA) com nível de significância de $P \leq 0,05$.

1047

1048

1049

1050

1051

1052

1053

1054

1055

1056

1057

1058

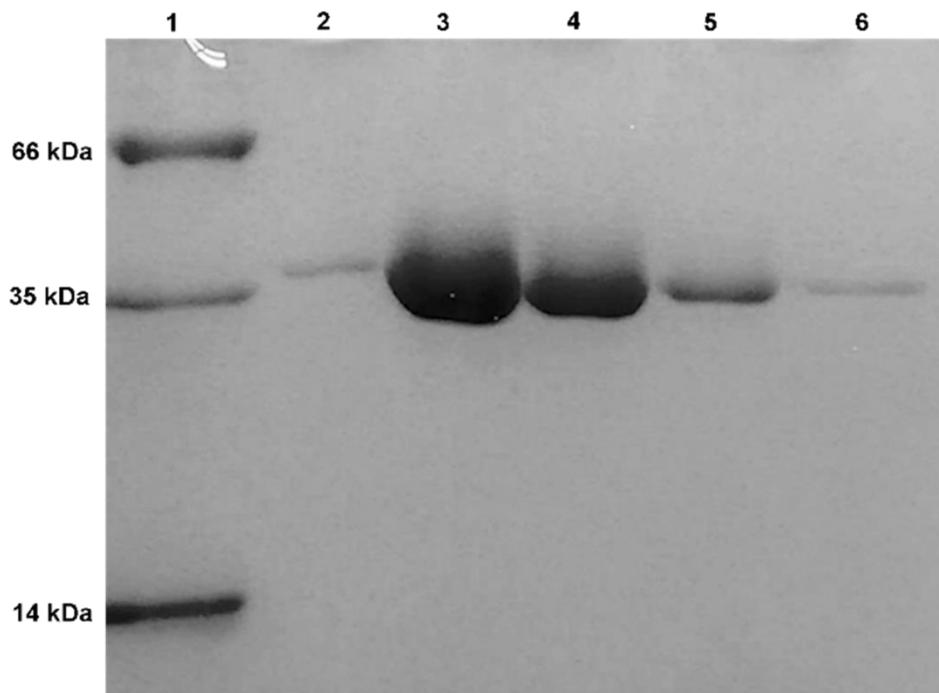
1059

1060

1061

1062

1063



1064

1065 **Figura S1.** Análise da proteína *O*-acetilserina(tiol) liase de *Arabidopsis thaliana*
1066 (AtOAS-TL) em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% purificada por cromatografia
1067 de afinidade ao níquel. Coluna 1, marcador de peso molecular de 66, 37 e 14 kDa. Colunas
1068 2 a 6, eluição da coluna de cromatografia por afinidade utilizando o tampão TRIS-HCl
1069 50 mM (pH 8,0), NaCl 500 mM, β -mercaptoetanol 1 mM e imidazol 250 mM. A proteína
1070 AtOAS-TL, contendo a cauda de poli-histidina, possui uma massa molecular aparente de
1071 37 kDa. As frações 3 e 4 foram submetidas a diálise e, em seguida, utilizadas para os
1072 ensaios de cinética enzimática.

1073

CAPÍTULO II

ARTIGO:

***S*-Benzil-L-cisteína reduz o crescimento e a fotossíntese de plantas de milho
inibindo a expressão de proteínas da cadeia de transporte de elétrons fotossintética
e do ciclo de Calvin**

Este artigo será submetido ao Periódico New Phytologist

1 **S-Benzil-L-cisteína reduz o crescimento e a fotossíntese de plantas de milho inibindo a**
2 **expressão de proteínas da cadeia de transporte de elétrons fotossintética e do ciclo de**
3 **Calvin**

4

5 Marcela de Paiva Foletto-Felipe¹⁻², Osvaldo Ferrarese-Filho¹, Rogério Marchiosi^{1*}

6

7 ¹Laboratório de Bioquímica de Plantas, Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual
8 de Maringá, Maringá, PR, 87020-900, Brasil e ²Coordenação de Licenciatura em Ciências
9 Biológicas, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos, PR, 85660-
10 000, Brasil

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32 *Autor para correspondência:

33 *Rogério Marchiosi*

34 rmarchiosi@uem.br

35 **Resumo**

36

37 • Os efeitos da *S*-benzil-L-cisteína (SBC), uma substância inibidora da via de assimilação do
38 enxofre, sobre o crescimento e a fotossíntese de plantas de milho foram investigados.

39 • Plantas de milho foram cultivadas em vasos contendo substrato vermiculita suplementado com
40 1 e 5 mM de SBC por 14 dias. Os impactos da SBC sobre a fotossíntese foram monitorados
41 através da realização de curvas de resposta à luz e ao CO₂ (A/C_i), bem como pela determinação
42 da fluorescência da clorofila *a*. Uma análise do proteoma das folhas foi realizada para avaliar
43 os efeitos da SBC sobre a síntese de componentes proteicos fotossintéticos. O conteúdo total
44 de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas folhas também foi monitorado.

45 • A SBC reduziu drasticamente o crescimento das plantas de milho. As análises de trocas gasosas
46 revelaram que as plantas de milho apresentaram reduzida taxa de assimilação de CO₂ devido às
47 limitações estomática e não estomática. Em adição, a SBC inibiu a expressão de importantes
48 componentes da cadeia de transporte de elétrons fotossintética (fotossistemas I e II, citocromo
49 b6f e ATP sintase) e de enzimas do ciclo de Calvin, alguns dos quais possuem enxofre em seus
50 grupos prostéticos. Como consequência da reduzida taxa de fluxo de elétrons, o conteúdo de
51 EROs foi significativamente aumentado nas folhas.

52 • Em conjunto, nossos dados mostraram que a SBC pode impactar a fotossíntese de plantas de
53 milho através da indisponibilidade de L-cisteína e/ou enxofre assimilado para a síntese de
54 proteínas e grupos prostéticos envolvidos no transporte de elétrons e na assimilação do CO₂
55 fotossintéticas.

56

57 **Palavras-chave:** Fluorescência da clorofila *a*, metabolismo do enxofre, *O*-acetilserina(tiol)
58 liase, *S*-benzil-L-cisteína, trocas gasosas.

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68 **Introdução**

69

70 O enxofre é um macronutriente essencial para as plantas (Gigolashvili & Kopriva, 2014). Ele é
71 um importante componente dos aminoácidos L-cisteína e L-metionina e de outros compostos
72 sulfatados, dentre os quais destacam-se coenzimas, grupos prostéticos, centros ferro-enxofre,
73 *S*-adenosilmetionina, glutatona, sulfolipídeos, glucosinolates dentre outros (Kopriva *et al.*,
74 2012, 2019; Koprivova & Kopriva, 2014). Devido a esta ampla distribuição bioquímica, a
75 deficiência de enxofre impacta negativamente o crescimento, o desenvolvimento, a resistência
76 a doenças e a qualidade nutricional das culturas (Kopriva *et al.*, 2019). As plantas podem captar
77 sulfato (SO_4^{2-}) do solo em um sistema de cotransporte com prótons (H^+) (Gigolashvili &
78 Kopriva, 2014) e, em seguida, incorporá-lo em L-cisteína através da via de assimilação redutiva
79 do enxofre (Jez *et al.*, 2016). A L-cisteína é o produto primário desta via assimilatória, sendo
80 direta ou indiretamente o metabólito precursor para uma vasta gama de compostos orgânicos
81 sulfatados nas plantas (Takahashi *et al.*, 2011; Pivato *et al.*, 2014; Jobe *et al.*, 2019). Em adição,
82 ela também é importante para a manutenção da estrutura tridimensional das proteínas devido à
83 possibilidade de formação de ligações dissulfeto.

84 Embora as raízes possam assimilar o SO_4^{2-} , a maior parte deste nutriente é translocado para
85 as folhas. Nas células fotossintéticas ou radiculares, a assimilação do SO_4^{2-} ocorre no interior
86 dos plastídeos. Na via de assimilação redutiva do enxofre, a incorporação do SO_4^{2-} em L-
87 cisteína envolve etapas de ativação, redução e incorporação. Primeiramente, o SO_4^{2-} é ativado
88 a adenosina 5'-fosfosulfato (APS), com gasto de ATP, em uma reação catalisada pela ATP
89 sulfurilase (Takahashi *et al.*, 2011; Kopriva *et al.*, 2019). Em seguida, a APS redutase reduz o
90 sulfato ativado em sulfito (SO_3^{2-}) usando a glutatona reduzida como doadora de elétrons.
91 Então, a sulfito redutase transfere seis elétrons da ferredoxina reduzida para o SO_3^{2-} ,
92 convertendo-o em sulfeto (S^{2-}) (Koprivova & Kopriva, 2016). Finalmente, a L-cisteína é
93 formada na reação da *O*-acetilserina(tiol) liase (OAS-TL) através da condensação do S^{2-} com a
94 *O*-acetilserina (OAS), esta última produzida pela combinação entre acetil-CoA e L-serina na
95 reação da serina acetiltransferase (Takahashi *et al.*, 2011). Em uma via secundária, o APS pode
96 ser fosforilado em 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (PAPS), que subsequentemente atua como
97 um doador de grupos sulfato para peptídeos, hormônios e metabólitos especializados
98 (Takahashi *et al.*, 2011; Koprivova & Kopriva, 2016; Kopriva *et al.*, 2019).

99 Nas plantas, a síntese de L-cisteína representa um ponto de convergência entre os
100 metabolismos de carbono, nitrogênio e enxofre. Resumidamente, as reações de assimilação
101 fotossintética do carbono fornecem o esqueleto carbônico, enquanto as reações de assimilação

102 do nitrogênio incorporam este elemento no aminoácido L-serina. Por sua vez, a via de
103 assimilação do enxofre se encarrega de reduzir o SO_4^{2-} a S^{2-} e incorporá-lo na OAS que será
104 usada na síntese de L-cisteína (Jobe *et al.*, 2019). Embora seja evidente a imbrincada relação
105 entre estas três vias assimilativas, pouco ainda é conhecido sobre os mecanismos regulatórios
106 que as integram. Não obstante, sabe-se que o metabolismo do enxofre pode afetar a capacidade
107 fotossintética das folhas, uma vez que este elemento está envolvido no transporte de elétrons
108 fotossintético (como elemento constituinte de centros ferro-enxofre, citocromo b6f, e
109 ferredoxina, por exemplo) e no metabolismo redox (glutationa) (Chan *et al.*, 2013). Além disso,
110 foi recentemente demonstrado que a fotorrespiração pode estimular a assimilação do enxofre
111 através da produção de L-serina, a qual pode ser usada para a síntese de L-cisteína *de novo*
112 (Abadie & Tcherkez, 2019). Em adição, a conversão de L-glicina em L-serina na fotorrespiração
113 envolve o metabolismo do metil-tetrahidrofolato necessário para a síntese de L-metionina *de*
114 *novo* (Abadie & Tcherkez, 2019), enquanto a formação de glicina parece importante para a
115 síntese de glutaciona (Noctor *et al.*, 1996).

116 Devido a sua importância capital no metabolismo vegetal, as enzimas da via de assimilação
117 de enxofre têm sido sugeridas como possíveis alvos para o desenvolvimento de novos
118 herbicidas (Hirase & Molin, 2003). Assim, com o objetivo de desenvolver um herbicida com
119 novo sítio de ação, nós identificamos, recentemente, a S-benzil-L-cisteína (SBC) como um
120 inibidor da OAS-TL capaz de reduzir dramaticamente o crescimento de plântulas de milho e
121 *Ipomoea tribola* devido a redução da síntese de L-cisteína *in vivo* (Foletto-Felipe *et al.*, 2021).
122 Dessa forma, no presente estudo nós investigamos os impactos da SBC sobre o crescimento e
123 fotossíntese de plantas de milho através da realização de curvas de resposta à luz e ao CO_2
124 (A/C_i), bem como através da determinação da fluorescência da clorofila a. Para investigar as
125 respostas das plantas de milho expostas à SBC em nível de proteoma, nós realizamos uma
126 análise proteômica quantitativa comparativa. O conteúdo total de espécies reativas de oxigênio
127 (EROs) nas folhas também foi monitorado.

128

129 **Materiais e Métodos**

130

131 Procedimentos de semeadura e crescimento das plantas

132

133 Sementes de milho (*Zea mays* L. cv. IPR-164) foram sanitizadas com hipoclorito de sódio 2%
134 por 5 min, lavadas extensivamente com água deionizada e semeadas diretamente em vaso de

135 plástico preto (5,0 × 5,8 × 4,2 cm) preenchido com 100 g de substrato de pinus e vermiculita na
136 razão 1:1. Cada vaso recebeu uma semente, a qual foi semeada 2,5 cm abaixo da superfície. Os
137 vasos foram umedecidos até a capacidade de campo pela adição de 130 mL de água e, em
138 seguida, foram acondicionados em sala de cultivo de plantas com temperatura de 25 °C,
139 fotoperíodo 12/12 h e DFF de 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, onde permaneceram por 14 dias. Até a
140 emergência das primeiras folhas, os vasos foram regados, a cada 48 h, com 50 mL de água ou
141 solução aquosa de SBC 1 ou 5 mM (pH 6,0). Após a emergência das primeiras folhas, os vasos
142 foram regados, a cada 48 h, com 50 mL de solução nutritiva de Hoagland (pH 6,0) (Hoagland
143 & Arnon, 1938) contendo ou não SBC 1 ou 5 mM, até o final do experimento.

144 No 14º dia de cultivo, as plantas foram removidas dos vasos para determinação do
145 comprimento e peso fresco da raiz principal, colmo e 2ª folha com lígula expandida bem
146 definida. O peso fresco também foi mensurado para as raízes adventícias e o diâmetro do colmo
147 foi verificado utilizando um paquímetro aço inox Universal digital 150 mm. O peso seco dos
148 materiais biológicos coletados não foi mensurado, pois alguns órgãos (folhas e raízes principais
149 e adventícias) foram estocados em nitrogênio líquido para futuras análises de proteômica.

150 Os dados foram expressos em centímetros (cm) para comprimento de raiz, folha e colmo, e
151 em milímetros (mm) para o diâmetro do colmo. Os resultados de peso fresco foram expressos
152 em gramas (g). Cada análise foi realizada com no mínimo três plantas por tratamento. A SBC
153 foi obtida da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), e todos os outros reagentes eram da classe
154 mais pura disponível.

155

156 Análise combinada dos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*

157

158 Os parâmetros avaliados de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foram obtidos a partir
159 de plantas adultas cultivadas em substrato e vermiculita por 14 dias em ambiente com
160 temperatura e umidade controlados, seguindo o mesmo protocolo experimental de cultivo e
161 tratamento descritos no tópico anterior. Todas as medidas foram realizadas no 14º dia na mesma
162 porção foliar da 2ª folha com lígula expandida bem definida de no mínimo três plantas para
163 cada tratamento (0, 1 e 5 mM de SBC).

164 Estes parâmetros foram analisados por meio da combinação entre medições de trocas
165 gasosas e fluorescência multifase através do sistema portátil de fotossíntese com fluorômetro
166 acoplado Li-6800-F2 (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA). As medidas de trocas gasosas ocorreram
167 entre às 7:00 e 15:00 h, porém os dados só foram considerados quando as variáveis analisadas
168 dentro do mesmo grupo experimental apresentaram invariabilidade. A metodologia foi

169 adaptada para plantas C₄ com base em Galazzi (2011), de Sousa (2012), Loriaux *et al.* (2013),
170 Moualeu-Ngangue, Chen & Stützel (2017), Moriwaki *et al.* (2019) e Zhou, Akçay & Helliker
171 (2019).

172 As taxas de assimilação do CO₂ (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a transpiração (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), a
173 condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a concentração intercelular de CO₂ (c_i , $\mu\text{mol mol}^{-1}$)
174 foram mensuradas a partir da curva de resposta à luz [2000, 1900, 1800, 1700, 1600, 1500,
175 1400, 1200, 1000, 800, 600, 400, 200, 175, 150, 125, 100, 75, 50, 25 e 0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de
176 densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA)]. As condições da câmara
177 foliar foram controladas para manter o CO₂ em concentração próxima à ambiente
178 (400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) e em concentração saturante (2000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$).

179 A partir da curva de resposta de A à DFFFA foi possível calcular o rendimento quântico da
180 fotossíntese (α) [$(\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1})/(\mu\text{mol fóton m}^{-2} \text{ s}^{-1})$], assimilação máxima de CO₂ ($A_{\text{máx}}$),
181 o ponto de compensação da luz (P_{comp}), o ponto de saturação da luz (P_{sat}) e a taxa de respiração
182 (R_d). Estes parâmetros foram estimados utilizando os modelos matemáticos linear e hiperbólico
183 (Machado *et al.*, 2005; Moriwaki *et al.*, 2019).

184 A curva A/c_i foi fundamentada no modelo proposto por Zhou *et al.* (2019), o qual foi
185 adaptado para plantas C₄ a partir do modelo utilizado em plantas C₃ (Sharkey *et al.*, 2007). Para
186 determinação dos parâmetros de velocidade máxima de carboxilação da ribulose 1,5-bisfosfato
187 carboxilase/oxigenase (Rubisco) ($V_{\text{cmáx}}$, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), taxa de transporte de elétrons
188 fotossintéticos (J , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e velocidade máxima de carboxilação da fosfoenolpiruvato
189 carboxilase (PEP carboxilase) ($V_{\text{pmáx}}$, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foram definidos os pontos de concentração
190 de CO₂ como 400, 200, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 400, 400,
191 500, 600, 700, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 e 2000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ sob intensidade luminosa
192 de 1400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Em cada ponto, os dados foram registrados quando a concentração
193 intercelular de CO₂ se equilibrava entre 60 a 120 s.

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

201 Nas condições adaptadas à luz, após 25 a 30 min de aclimação por planta, foram
202 mensurados em conjunto com as análises de trocas gasosas os seguintes parâmetros: eficiência

203 quântica fotoquímica efetiva (F_v'/F_m'), rendimento quântico efetivo (ϕ_{PSII}), taxa de transporte
204 de elétrons no PSII (ETR), *quenching* fotoquímico (qP) e *quenching* não-fotoquímico (NPQ)
205 (Genty *et al.*, 1989; Galazzi, 2011). Estes parâmetros foram determinados sob DFFFA de 1400
206 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em duas condições de concentração de CO_2 mantidas na câmara foliar (400 e 2000
207 $\mu\text{mol mol}^{-1}$).

208 Todas as avaliações foram realizadas utilizando uma cabeça sensora com câmara foliar de
209 2 cm^2 , temperatura em 27°C e o déficit de pressão de vapor controlado entre o ar e a folha
210 (DPV) em 0,2 KPa com vazão de $700 \mu\text{mol s}^{-1}$. As folhas menores, principalmente as tratadas
211 com 5 mM de SBC, que não apresentaram largura suficiente para completar a câmara foliar,
212 tiveram suas áreas calculadas pelo programa *ImageJ*. Além da fluorescência adaptada ao escuro
213 e ao claro, foi estimado o conteúdo de clorofila por meio do índice SPAD (SPAD-502, Konica
214 Minolta, Ramsey, USA).

215

216 Análise da emissão da fluorescência rápida ou polifásica (OJIP)

217

218 A emissão da fluorescência da clorofila *a* foi medida durante a fase de desenvolvimento do
219 milho (14º dia) utilizando um sistema portátil de fotossíntese com fluorômetro acoplado Li-
220 6800-F2 (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA) buscando obter informações sobre os parâmetros
221 estruturais e funcionais em relação ao desempenho e atividade da maquinaria fotossintética.

222 As leituras foram realizadas após adaptação das plantas ao escuro por 10 h. A emissão da
223 fluorescência transiente da clorofila *a* foi induzida em uma área de 2 cm^2 da 2ª folha com lígula
224 expandida bem definida pela exposição da amostra a um pico de luz vermelha de 8000
225 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e duração de 1000 ms. Em uma escala de tempo logarítmica, a fluorescência
226 transiente da clorofila *a* pôde ser observada desde a fluorescência inicial (F_o), considerada a
227 intensidade de fluorescência em que todos os centros de reação do PSII estão oxidados (abertos)
228 e corresponde ao nível de fluorescência no tempo (t_{F_o}) de 50 μs segundo; e a fluorescência
229 máxima (F_m) obtida quando todos os centros de reação do PSII encontram-se reduzidos
230 (fechados) e o tempo máximo (t_{F_m}) corresponde ao pico em 650 nm devido à mais alta
231 intensidade luminosa da luz vermelha actínica. O aumento da fluorescência é usualmente exibido
232 em mais dois passos seguintes entre F_o ($t_{F_o} = 50 \mu\text{s}$) e F_m (t_{F_m}), que são denominados de
233 fluorescência no ponto J e no ponto I, no tempos de 2 ms (t_{F_J}) e 30 ms (t_{F_I}), respectivamente
234 (Strasser *et al.*, 2000; Schansker *et al.*, 2006).

235 Os diferentes níveis de fluorescência (F_o , F_J , F_I e F_m) foram mensurados nas mesmas plantas
236 avaliadas para os parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, tanto controles,

237 como tratadas (1 e 5 mM de SBC). Cada análise foi realizada com no mínimo sete plantas por
238 tratamento.

239

240 Determinação do conteúdo total de espécies reativas de oxigênio (EROs)

241

242 O conteúdo total de EROs foi quantificado usando diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
243 (Jambunathan, 2010).

244

245 Extração de proteínas solúveis totais para estudo de proteoma

246

247 No presente estudo, o tratamento com 5 mM de SBC foi o que mais evidentemente alterou o
248 crescimento, a produção de EROs e a fotossíntese de plantas de milho, sendo, portanto, o
249 tratamento selecionado para a realização do estudo do proteoma de folhas de milho. Para isso,
250 folhas (1 g) foram homogeneizadas em 4 mL de meio de extração gelado contendo tampão Tris-
251 HCl 20 mM (pH 8,3), KCl 1,5 mM, DTT 10 mM, PMSF 1 mM e dodecil sulfato de sódio 0,1%.
252 Em seguida, a amostra foi sonicada por 10 s a uma amplitude de 40%. Este procedimento foi
253 repetido por mais nove vezes, estabelecendo-se um intervalo de repouso de 1 min em banho de
254 gelo entre as sonicações. Então, a amostra foi transferida para eppendorf e centrifugada
255 (18000 g, 10 min, 4 °C) e o sobrenadante reservado em um tubo falcon gelado. A amostra foi
256 fracionada em cinco alíquotas de 300 µL e, a cada uma das frações, foi adicionado 1,2 mL de
257 acetona pura gelada, permitindo-se que a precipitação das proteínas procedesse *overnight*. No
258 dia seguinte, as alíquotas foram centrifugadas (18000 g, 10 min, a 4 °C) e os sobrenadantes
259 descartados. Os pellets foram gentilmente ressuspensos em 150 µL de bicarbonato de amônio
260 50 mM contendo ureia 8 M. As alíquotas foram combinadas e a quantificação das proteínas
261 realizada através do método de Bradford (1976). Então, a amostra foi finalmente diluída com
262 bicarbonato de amônio 50 mM para uma concentração final de proteína de 1 µg µL⁻¹ e uma
263 concentração final de ureia de 1,6 M.

264

265 Preparação de amostra para aquisição NanoUPLC-MS^E

266

267 Uma alíquota de 50 µL da amostra de proteínas a 1 µg µL⁻¹ foi mantida em banho seco a 60 °C
268 por 30 min e, então, adicionados 2,5 µL de DTT 100 mM. Em seguida, a amostra foi resfriada
269 a temperatura ambiente antes da adição de 2,5 µL de iodoacetamida 300 mM. Após 30 min no

270 escuro e à temperatura ambiente, foram adicionados 10 μL de tripsina 0,05 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ (razão
271 1:100), com leve homogeneização. As amostras foram digeridas a 37 °C em banho seco por 16–
272 20 h. A reação foi interrompida pela adição de 10 μL de ácido trifluoroacético 5%. Após
273 incubação por 1 h, as amostras foram centrifugadas a 30000 g, por 15 min a 4 °C. O
274 sobrenadante foi transferido para um eppendorf e reservado em banho de gelo até o momento
275 da análise por NanoUPLC-MS^E (Murad & Rech, 2012; Silva *et al.*, 2017).

276

277 Aquisição NanoUPLC-MS^E

278

279 A separação dos peptídeos trípticos em cromatografia líquida (LC) nanoescala foi realizada
280 usando um sistema nanoACQUITYTM (Waters Corporation, EUA) equipado com uma coluna
281 de fase reversa C18 1,7 $\mu\text{m} \times 100 \mu\text{m} \times 100 \text{mm}$ e uma pré coluna Symmetry C18 5 $\mu\text{m} \times 5$
282 $\text{mm} \times 300 \mu\text{m}$ (Waters). As amostras de proteínas digeridas foram transferidas para a pré-coluna
283 usando uma solução aquosa de ácido fórmico 0,1% sob um fluxo de 6 $\mu\text{L min}^{-1}$ durante 2 min.
284 Então, os peptídeos foram separados usando um gradiente de 0–40% da fase B (acetonitrila)
285 em relação a fase A (ácido fórmico 0,1%) por 103 min sob um fluxo de 6 $\mu\text{L min}^{-1}$, seguido por
286 um enxague de 10 min com 85% da fase B. A coluna foi reequilibrada com as condições iniciais
287 durante 20 min. A temperatura da coluna foi mantida a 35 °C durante a corrida. O carregamento
288 da coluna com a amostra foi de 2 a 4 μg de proteína. Todas as análises foram realizadas usando
289 nano-ionização *eletrospray* no modo positivo e uma fonte de ionização *NanoLockSpray*
290 (Waters, EUA). A calibração inicial do espectrômetro de massas foi realizada com uma solução
291 de leucina encefalina 200 fmol μL^{-1} fornecida pela fonte de ionização *NanoLockSpray*,
292 enquanto a calibração final foi realizada com formiato de sódio 100 fmol μL^{-1} fornecido através
293 do sistema da fluídica. O *spray* de referência foi amostrado a cada 30 s durante as corridas. Os
294 dados de tempo exato de retenção de massa nanoLC-MS^E foram coletados em um modo
295 alternado de aquisição de baixa energia e elevada energia. O tempo de aquisição de espectros
296 contínuos em cada modo foi de 1,5 s com um atraso *interscan* de 0,1 s. No modo MS de baixa
297 energia, os dados foram coletados com energia de colisão constante de 3 eV. No modo MS de
298 energia elevada, a energia de colisão foi aumentada de 12 para 45 eV durante cada espectro de
299 1,5 s. A radiofrequência aplicada ao analisador de massa quadrupolo foi ajustado de modo que
300 os íons de 50 a 2000 m/z fossem transmitidos de forma eficiente, o que garantiu que quaisquer
301 íons menores que 50 m/z observados nos dados de LC-MS fossem apenas derivados de
302 dissociações na *TRAP T-wave collision cell* (Murad & Rech, 2012; Silva *et al.*, 2017).

303

304 Processamento de dados e identificação de proteínas

305

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

317 Os critérios de identificação de proteínas também incluíram a detecção de pelo menos dois
318 íons de fragmento por peptídeo, cinco fragmentos por proteína e a determinação de pelo menos
319 um peptídeo por proteína. A identificação da proteína foi permitida com uma FDR de 4% em
320 pelo menos três réplicas de injeções técnicas. Foi especificada como modificação fixa a
321 carbamidometilação de Cys e como modificação variável a oxidação de Met. As proteínas
322 coletadas foram organizadas pelo algoritmo da ferramenta PLGS *Expression*^E em uma lista
323 estatisticamente significativa que correspondeu a taxas de regulação mais altas ou mais baixas
324 entre os diferentes grupos. Para quantificação das proteínas, o *software* PLGS v3.0.3 foi usado
325 com o algoritmo *Identity*^E usando a metodologia Hi3. Os valores quantitativos foram calculados
326 em média em todas as amostras, e os desvios padrão em $P \leq 0,05$ foram determinados usando
327 o *software* *Expression*^E. Apenas proteínas com uma razão de \log_2 de expressão diferencial entre
328 as duas condições maior ou igual a 1,2 foram consideradas (Murad & Rech, 2012; Silva *et al.*,
329 2017).

330

331 Análise de anotação funcional das proteínas

332

333 Anotação funcional das proteínas e identificação das vias metabólicas foi realizada usando
334 Kobas 3.0 (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/kobas3/?t=1>) (Xie *et al.*, 2011).

335

336

337 Análises estatísticas

338

339 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Os experimentos com plantas
340 adultas, cada parcela foi representada por um vaso contendo uma planta (1 planta = 1 n). Os
341 resultados foram expressos como médias \pm erro padrão da média (EPM) e as repetições
342 variaram por metodologia, sempre considerando um mínimo de três parcelas experimentais
343 para cada condição (controle e tratado).

344 O pacote estatístico *SigmaPlot*[®] (Versão 12.0, Systat Software Inc., USA) foi usado para
345 ajustar alguns parâmetros obtidos a partir da curva de resposta de A à DFFFA usando modelos
346 linear ou hiperbólico. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote
347 *GraphPad Prism*[®] (Versão 6.0, GraphPad Software Inc., USA). Para os parâmetros de
348 crescimento inicial na presença de L-cisteína e para os parâmetros obtidos após ajustes no
349 *SigmaPlot*[®] dos dados da curva de A em relação à DFFFA foi utilizado análise de variância
350 bidirecional (*Two-way* ANOVA) e o teste de comparação múltipla de Tukey foi selecionado
351 para avaliar as diferenças entre os parâmetros.

352 Para os demais parâmetros, foi utilizado análise de variância unidirecional (*One-way*
353 ANOVA) e as diferenças significativas foram analisadas no teste de comparação múltipla de
354 Dunnett. Os valores de $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos em ambos
355 os testes.

356

357 **Resultados**

358

359 Efeitos da SBC sobre o crescimento de plantas de milho

360

361 De modo geral, a exposição a SBC alterou significativamente o crescimento das plantas de
362 milho, sendo verificadas reduções em todos os parâmetros avaliados (Fig. 1). A raiz foi o órgão
363 mais afetado (Fig. 1F, I e K). Os comprimentos das raízes das plantas tratadas com 1 e 5 mM
364 de SBC foram 75,8% e 81,1% menores, respectivamente, do que o de plantas controle (Fig. 1I).
365 Os pesos frescos das raízes principais foram reduzidos em 50% no tratamento com 1 mM e em
366 95,8% no tratamento com 5 mM (Fig. K). Os pesos frescos das raízes adventícias não foram
367 alterados pelos tratamentos, embora tenha sido verificada uma redução de 80% neste parâmetro
368 após exposição das plantas a 5 mM de SBC (Fig. K).

369 Os comprimentos das folhas não foram afetados pelo tratamento com 1 mM de SBC, mas
370 foram reduzidos em 55,3% no tratamento com 5 mM de SBC, quando comparado com o
371 controle (Fig. 1D e I). Além disso, reduções de 16,6% e 62% foram verificadas nos
372 comprimentos dos colmos de plantas expostas à 1 e 5 mM de SBC, respectivamente (Fig. 1E e
373 I). Também foram notadas reduções de 27,6% e 89% nos pesos frescos de folhas, e de 30,5% e
374 86,5% nos pesos frescos de colmos, em plantas tratadas com 1 e 5 mM de SBC, respectivamente
375 (Fig. 1E e I). Os diâmetros dos colmos foram reduzidos em 26,7% e 63,8% nos tratamentos
376 com 1 e 5 mM de SBC, respectivamente (Fig. 1J). É importante mencionar que as plantas de
377 milho tratadas com 5 mM de SBC não apresentaram crescimento e/ou desenvolvimento
378 significativo a partir do 6º dia de cultivo (Fig. 1A, B e C).

379 Nós também verificamos importantes alterações qualitativas nas plantas expostas a SBC.
380 Particularmente, as folhas das plantas tratadas com SBC foram evidentemente mais estreitas do
381 que as plantas controle, além de apresentarem necrose em sua porção apical, sendo esta mais
382 pronunciada no tratamento com 5 mM de SBC (Fig. 1D e G). Clorose próxima à bainha e
383 clorose internerval de folhas jovens foram também notadas em ambos os tratamentos, sendo,
384 contudo, mais evidentes com 5 mM de SBC (Fig. 1G e H). Também foi possível observar uma
385 coloração púrpura mais intensa nos colmos de plantas tratadas com SBC do que em plantas
386 controle (Fig. 1E).

387

388 Efeitos da SBC sobre as trocas gasosas de milho analisadas sob diferentes concentrações de
389 CO₂

390

391 A exposição de plantas de milho à 5 mM de SBC reduziu drasticamente a *A*, na região da curva
392 de resposta à luz limitada pelo CO₂, sob condição de CO₂ ambiente (400 μmol mol⁻¹) e sob
393 condição de CO₂ saturante (2000 μmol mol⁻¹) (Fig. 2A e B). Entretanto, na presença de 400
394 μmol mol⁻¹ de CO₂, uma redução mais discreta da *A* foi também evidente no tratamento com 1
395 mM de SBC (Fig. 2A), embora esta concentração de SBC não tenha alterado a *A* sob condições
396 saturantes de CO₂ (Fig. 2B).

397 Os valores médios de *E* e *g_s*, obtidos sob condições de CO₂ ambiente ou saturante,
398 demonstraram que estes parâmetros estão intimamente relacionados (Fig. 3A–D).
399 Notavelmente, *E* e *g_s* foram mais significativamente reduzidos sob condição de CO₂ ambiente
400 do que sob condição de CO₂ saturante. Quando sob condição de CO₂ ambiente, ambos os
401 parâmetros, *E* e *g_s*, sofreram reduções médias de 30% e 80% nos tratamentos com 1 e 5 mM de
402 SBC, respectivamente (Fig. 3A e C). No entanto, quando sob condição saturante de CO₂, os

403 mesmos parâmetros foram reduzidos significativamente apenas no tratamento com 5 mM de
404 SBC (Fig. 3B e D), apresentando uma redução média de 50%. Nossos dados também revelaram
405 que o tratamento das plantas com 5 mM de SBC reduziu em 23% a c_i sob condição de CO₂
406 ambiente (Fig. 3E), mas aumentou em 21,7% a c_i sob condição de CO₂ saturante (Fig. 3F). A
407 exposição das plantas de milho à 1 mM de SBC não alterou significativamente a c_i ,
408 independentemente da concentração de CO₂ fixada na câmara de análise.

409 A Tabela 1 mostra diversos parâmetros fotossintéticos determinados em plantas de milho
410 expostas a SBC, sob condições de CO₂ ambiente e saturante, calculados através de ajustes
411 lineares (Fig. 2C e D) e não lineares (Fig. 2A e B) das curvas de resposta à luz. Quando em
412 comparação com o controle, não foram verificadas diferenças significativas no P_{comp} de plantas
413 tratadas com SBC em ambas as condições de CO₂ utilizadas. No entanto, reduções médias de
414 80% foram observadas no P_{sat} de plantas expostas à 5 mM de SBC sob condições de CO₂
415 ambiente e saturante. Resultados similares foram notados para $A_{máx}$ e α . O tratamento das plantas
416 de milho com 5 mM de SBC reduziu em 86,5% e 78,8% a $A_{máx}$ sob condições de CO₂ ambiente
417 e saturante, respectivamente, quando comparado com o controle. Em adição, o α , parâmetro
418 que determina a eficiência quântica da fotossíntese, foi reduzido em 67,8% e 49% sob condições
419 de CO₂ ambiente e saturante, respectivamente, após exposição das plantas à 5 mM de SBC.
420 $A_{máx}$ e α não foram significativamente afetados no tratamento com 1 mM. Além disso, sob
421 condição de CO₂ ambiente, nós verificamos aumentos de 17% e 58% no Rd de plantas de milho
422 tratadas com 1 e 5 mM de SBC, respectivamente. Não foram notadas alterações significativas
423 no Rd das plantas de milho sob condição de CO₂ saturante, independente da concentração de
424 SBC utilizada.

425

426 Efeitos da SBC sobre o teor de espécies reativas de oxigênio

427

428 Plantas de milho expostas à 5 mM de SBC apresentaram conteúdo de EROs 235% maior do
429 que plantas controle (Fig. S2). Embora o conteúdo de EROs total tenha sido aproximadamente
430 50% maior nas folhas de plantas tratadas com 1 mM de SBC, esta alteração não foi significativa.

431

432 Efeitos da SBC sobre os parâmetros de fotossíntese C₄

433

434 Outro achado relevante do presente estudo foi a redução dos parâmetros de fotossíntese C₄
435 ($V_{cmáx}$, $V_{pmáx}$ e J), calculados a partir das curvas A/c_i , nas plantas de milho expostas ao SBC. A
436 $V_{cmáx}$ e a $V_{pmáx}$ foram reduzidas em 47,7% e 64,3%, respectivamente, após exposição das

437 plantas à 5 mM de SBC (Fig. 4A). Em adição, plantas tratadas com 5 mM de SBC apresentaram
438 J 53,8% menor do que plantas controle (Fig. 4B). Não foram verificadas alterações
439 significativas na $V_{cmáx}$, na $V_{pmáx}$ e no J quando as plantas foram tratadas com 1 mM de SBC.

440

441 Efeitos da SBC na emissão de fluorescência a com pulso modulado e na fluorescência
442 transiente (OJIP) de milho

443

444 Nossos dados revelaram que a SBC reduziu significativamente os parâmetros de fluorescência
445 da clorofila a determinados em plantas de milho adaptadas ao escuro. A fluorescência inicial
446 (F_0) e a fluorescência máxima (F_m) foram reduzidas em 13,7% e 22%, respectivamente, nas
447 plantas tratadas com 5 mM de SBC (Fig. 5A). Conseqüentemente, uma estreita redução de 2,5%
448 na razão F_v/F_m também foi verificada após exposição das plantas a 5 mM de SBC, quando
449 comparado com o controle (Fig. 5B).

450 Os parâmetros relacionados à fluorescência a em plantas adaptada à luz foram analisados
451 sob condições de CO_2 ambiente e saturante (Fig. 6). Para todos os parâmetros avaliados, exceto
452 F_v'/F_m' sob condição de CO_2 ambiente, reduções foram verificadas apenas no tratamento com
453 5 mM de SBC. O $\phi PSII$ e o ETR foram reduzidos em aproximadamente 70% em ambas as
454 condições de CO_2 utilizadas (Fig. 6A e E). A razão F_v'/F_m' foi menos alterada, apresentando
455 reduções de 24% e 31,7% sob 400 e 2000 $\mu mol mol^{-1}$ de CO_2 , respectivamente (Fig. 6B). Além
456 disso, sob condição de CO_2 ambiente, foi também observado um decréscimo de 8,3% na
457 concentração de 1 mM de SBC (Fig. 6B).

458 Os *quenchings* fotoquímico (qP) e não fotoquímico (NPQ), por sua vez, responderam ao
459 tratamento com 5 mM de SBC de forma antagônica, sendo o qP reduzido em 70% em ambas
460 as condições de CO_2 utilizadas (Fig. 6C) e o NPQ aumentado em aproximadamente 1000% sob
461 CO_2 ambiente, apesar de não demonstrar alterações significativas sob CO_2 saturante (Fig. 6D).
462 O teor de clorofila verificado através do índice SPAD foi reduzido em 46,7% no tratamento
463 com 5 mM de SBC, mas não foi significativamente alterado com 1 mM (Fig. 6F).

464 A Fig. S1 mostra as curvas de emissão de fluorescência transiente ou polifásica (OJIP) da
465 clorofila a de plantas de milho controle e tratadas com SBC (1 e 5 mM) após 10 h de adaptação
466 ao escuro. Os pontos O, J, I e P representam os níveis de fluorescência F_0 , F_J , F_I e F_m , nos
467 tempos de 50 μs , 2 ms, 30 ms e o t_{F_m} em 200 ms, respectivamente. Apesar de ser possível
468 observar uma redução a partir do ponto I em 5 mM do SBC, a mesma só foi significativa no
469 ponto P, em que foi constatado uma diminuição de cerca de 12% na F_m .

470

471 Impactos da SBC no proteoma de folhas de milho e análise de enriquecimento

472

473 Neste estudo, nós realizamos uma análise proteômica livre de marcação (LC/MS^E) para
474 identificar as alterações no proteoma de folhas de plantas de milho expostas à 5 mM de SBC.
475 Um total de 110 proteínas não redundantes foram identificadas, 74 das quais expressas em
476 ambos os tratamentos, controle e SBC (Fig. 7 e Tabela 2). Cinquenta e cinco (55) proteínas
477 foram diferencialmente expressas entre folhas de plantas controle e tratadas com 5 mM de SBC,
478 sendo 28 *downreguladas* e 27 *upreguladas* (Fig. 7B e Tabela 2).

479 Para obter informações sobre os processos biológicos afetados pelo tratamento das plantas
480 de milho com SBC, nós examinamos as proteínas diferencialmente usando Kobas 3.0 (*KEGG*
481 *Orthology Based Annotation System*). Os resultados revelaram que as proteínas *upreguladas*
482 pela SBC foram relacionadas principalmente com as funções moleculares ligação de DNA (10
483 proteínas), atividade de heterodimerização de proteínas (8 proteínas), ligação de clorofila
484 (5 proteínas) e ligação de íon metálico (4 proteínas) (Fig. 7 C). Além disso, essas proteínas
485 foram encontradas por constituírem principalmente os processos biológicos montagem de
486 nucleossomo (8 proteínas), resposta ao estímulo de luz (4 proteínas), fotossíntese (3 proteínas)
487 e coleta de luz no fotossistema I (3 proteínas) (Fig. 7D). Em adição, as proteínas *upreguladas*
488 foram principalmente classificadas nos componentes celulares núcleo (11 proteínas),
489 nucleossomo (11 proteínas), cloroplasto (4 proteínas), envelope do cloroplasto (4 proteínas) e
490 componente integral de membrana (4 proteínas) (Fig. 7E).

491 Por sua vez, as proteínas *downreguladas* foram principalmente classificadas nas funções
492 moleculares ligação de íon metálico (7 proteínas), atividade de transferência de elétrons
493 (5 proteínas), ligação de ATP (4 proteínas), ligação de magnésio (3 proteínas) e centros ferro-
494 enxofre (2 proteínas) (Fig. 7C). Estas proteínas também foram associadas aos processos
495 biológicos de fotossíntese (8 proteínas), resposta ao estímulo de luz (3 proteínas), processo
496 metabólico de piruvato (3 proteínas) e ciclo redutor de pentose-fosfato (3 proteínas) (Fig. 7D).
497 Além disso, os componentes celulares cloroplasto (13 proteínas), membrana do tilacoide (6
498 proteínas), citoplasma (6 proteínas) e componente integral de membrana (3 proteínas) foram os
499 principalmente enriquecidos para as proteínas *downreguladas* (Fig. 7E).

500

501 Identificação das proteínas envolvidas em termos de vias metabólicas

502

503 A tabela 2 classifica as proteínas diferencialmente reguladas entre folhas de plantas controle e
504 tratadas com SBC em termos de vias metabólicas. É possível verificar que as proteínas

505 upreguladas foram associadas com 8 vias metabólicas a saber: glicólise e gliconeogênese,
506 metabolismo do piruvato, fosforilação oxidativa, fotossíntese, fixação do carbono em
507 organismos fotossintéticos, metabolismo do nitrogênio, tradução proteica e proteínas de
508 associação ao cromossomo. Em glicólise e gliconeogênese três proteínas foram *upreguladas*
509 pela SBC (P08735, Q09054 e Q43247), correspondendo a gliceraldeídos desidrogenases
510 citosólicas. Em metabolismo de piruvato as proteínas *upreguladas* foram malato desidrogenase
511 NADP-dependente cloroplastídica (P15719) e a fosfoenolpiruvato carboxilase (P51059). O
512 tratamento com SBC também induziu a expressão da subunidade beta da ATP sintase
513 mitocondrial (P19023) na via fosforilação oxidativa. Na via fotossíntese, a SBC induziu a
514 expressão das proteínas CP47 (P05641) e PsbN (P68854) do centro de reação do PSII e de mais
515 três proteínas de ligação às clorofilas a-b (P06671, P12329 e P27497). Seis proteínas foram
516 *upreguladas* na via de fixação do carbono em organismos fotossintéticos, gliceraldeído
517 desidrogenase (P08735, Q09054 e Q43247), malato desidrogenase NADP-dependente
518 cloroplastídica (P15719) e fosfoenolpiruvato carboxilase (P04711 e P51059). O tratamento das
519 plantas de milho com SBC também induziu a expressão foliar de glutamina sintetase (P25462)
520 e ferredoxina nitrito redutase cloroplastídica, ambas enzimas da via metabolismo de nitrogênio.
521 Na via de tradução de proteínas apenas uma proteína foi induzida, a proteína ribossomal
522 ubiquitina-40S S27a (P27923). Porém, oito proteínas de associação ao cromossomo foram
523 *upreguladas* pela SBC, sendo elas as histonas H2B.1 (P30755), H2B.2 (P30756), H2B.3
524 (Q43261), H2B.4 (P49120), H2B.5 (P54348), H3.2 (P69246), H4 (P62787) e H4.3 (Q41811).
525 Em adição, duas proteínas de reparo e recombinação do DNA foram *upreguladas*, as proteínas
526 *14-3-3-like protein GF14-6* (P49106) e *14-3-3-like protein GF14-12* (Q01526). Finalmente,
527 uma proteína com função desconhecida denominada *unknown protein from spot 32 of 2D-PAGE*
528 *of etiolated coleoptile (fragmente)* (P80623) também foi induzida nas folhas das plantas tratadas
529 com SBC.

530 As proteínas reprimidas nas folhas de plantas tratadas com SBC foram associadas com 16
531 vias metabólicas, sendo elas glicólise e gliconeogênese, ciclo do ácido cítrico, metabolismo de
532 amido e sacarose, metabolismo do piruvato, metabolismo do glioxilato e dicarboxilatos,
533 fosforilação oxidativa, fotossíntese, fixação do carbono em organismos fotossintéticos,
534 metabolismo do enxofre, metabolismo de purinas, metabolismo de pirimidinas, metabolismo
535 de cisteína e metionina, tradução de proteínas, degradação do RNA, via de sinalização MAPK
536 e chaperonas e catálise de dobramento (Tabela 2). A enolase (P30792) foi a única proteína
537 reprimida na glicólise e gliconeogênese. A malato desidrogenase citosólica (Q08062), que atua
538 nas vias ciclo do ácido cítrico, metabolismo de piruvato e metabolismo do glioxilato e

539 dicarboxilato, bem como a beta-amilase (P55005) do metabolismo de amido e sacarose também
540 foram *downreguladas*. A SBC reprimiu ainda a enzima málica NADP-dependente
541 cloroplastídica do metabolismo do piruvato e as subunidades menor (P05348) e maior (P00874)
542 da ribulose bifosfato carboxilase (Rubisco) do metabolismo do glioxilato e dicarboxilato.

543 É importante destacar que a fotossíntese foi a via metabólica com o maior número de
544 proteínas reprimidas pela SBC. As principais enzimas reprimidas nesta via foram a subunidade
545 beta da ATP sintase cloroplastídica (P00827), citocromo b6 (P05642), citocromo f (P46617),
546 ferredoxina (P27787, O80429 e P27789), proteínas intensificadoras da evolução do oxigênio
547 (Q41048 e Q41806), clorofila a apoproteínas A1 e A2 (P04966 e P04967) e subunidade VI
548 (O65101) do centro de reação do PSI, centro ferro enxofre do PSI (P11601), proteína H do
549 centro de reação do PSII e Rubisco ativase (Q9ZT00) (Fig. 8). A SBC também reduziu a
550 expressão das enzimas cloroplastídica gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (P09315), enzima
551 málica NADP-dependente (P16243), piruvato fosfato dicinase (P11155), transcetolase
552 (Q7SIC9) e subunidades menor (P05348) e maior (P00874) da Rubisco. Pertencentes a mesma
553 via metabólica, mas localizadas no citosol, a piruvato fosfato dicinase 2 (Q42368) e malato
554 desidrogenase (Q08062) foram também *downreguladas* pela SBC.

555 Nos metabolismos de enxofre e de cisteína e metionina as enzimas reprimidas pela SBC
556 foram cisteína sintase (P80608) e isoflavona redutase homóloga IRL (P52580). Os
557 metabolismos de purina e pirimidina também foram impactados pelo SBC, com redução das
558 enzimas adenilato cinase cloroplastídica (P43188) e nucleosídeo difosfato cinase (P93805).
559 Finalmente, a proteína P1 acídica ribossomal 60S e a tiorredoxina tipo M cloroplastídica
560 pertencentes as vias de tradução de proteínas e chaperonas e catálise de dobramento,
561 respectivamente, também foram reduzidas pela SBC.

562

563 **Discussão**

564

565 De modo geral, nossos dados revelaram que a SBC reduziu drasticamente o crescimento e a
566 fotossíntese de plantas de milho. Curvas de resposta à luz e ao CO₂ (A/c_i), bem como análise da
567 fluorescência da clorofila *a* em plantas adaptadas à luz e ao escuro, sugeriram interferências da
568 SBC sobre o transporte de elétrons fotossintético e nas reações de assimilação do carbono.
569 Como demonstrado através de análise proteômica quantitativa (LC/MS^E), a SBC reduziu a
570 expressão de proteínas constituintes do PSII, PSI, citocromo b6f, ferredoxina e ATP sintase
571 plastidial, proteínas cruciais para o adequado transporte de elétrons fotossintético. Além disso,
572 a expressão de enzimas pertencentes as etapas de carboxilação, redução e regeneração do ciclo

573 de Calvin, e também do metabolismo fotossintético C₄, foi reduzida pela SBC, corroborando
574 os dados obtidos através das análises de trocas gasosas, como descrito a seguir.

575 Como descrito anteriormente, a SBC reduziu significativamente o crescimento de plantas
576 de milho. Neste estudo, nós sugerimos que o efeito primário responsável pela redução do
577 crescimento seja a inibição da OAS-TL, com conseqüente comprometimento da via de
578 assimilação do enxofre e redução na síntese de L-cisteína *de novo*. De fato, nós demonstramos
579 em trabalho anterior que a SBC pode inibir moderadamente a atividade da OAS-TL de
580 *Arabidopsis thaliana in vitro*, enzima que compartilha alta similaridade com suas homólogas
581 em milho e *Ipomea triloba* (Foletto-Felipe, 2021a). Além disso, o efeito inibitório sobre o
582 crescimento de plantas de *I. triloba* foi amenizado quando as plantas foram cultivadas em meio
583 suplementado com L-cisteína, comprovando a ação da SBC sobre a OAS-TL *in vivo* (Foletto-
584 Felipe, 2021a).

585 No presente estudo, nós notamos que a SBC induziu o aparecimento de sintomas
586 característicos da deficiência de enxofre tais como o desenvolvimento de clorose internerval e
587 na bainha das folhas, folhas pequenas e estreitas e caules mais finos e com crescimento
588 longitudinal inibido (Fig. 1) (Haneklaus *et al.*, 2008). A clorose das folhas provavelmente está
589 relacionada com interferências na síntese da coenzima S-adenosil-L-metionina (SAM), que atua
590 em uma das etapas da biossíntese das clorofilas *a* e *b* (Niyogi *et al.*, 2015). Interessantemente,
591 as plantas de milho também apresentaram acúmulo de antocianina nos caules, o que é
592 característico da deficiência de fósforo (Vasconcelos & Raghothama, 2003; Leon-Cisneros *et*
593 *al.*, 2019). Isso sugere que a ação primária da SBC sobre a via de assimilação do enxofre pode
594 ter impactado negativamente outros processos metabólicos envolvidos com a captação de
595 nutrientes. De fato, tem sido mostrado recentemente que os metabolismos de carbono,
596 nitrogênio e enxofre estão intimamente imbricados (Jobe *et al.*, 2019).

597 Neste contexto, a análise do proteoma de folhas revelou que a expressão da cisteína sintase
598 foi inibida pela SBC, enquanto a de glutamina sintetase 2 cloroplastídica foi estimulada
599 (Tabela 2). A cisteína sintase compõe um complexo hetero-oligomérico formado pelas enzimas
600 serina acetiltransferase (SAT) e OAS-TL (Takahashi *et al.*, 2011). A maior expressão de
601 glutamina sintetase 2 cloroplastídica pode estar associada com o acúmulo de *O*-acetilserina
602 (OAS), o substrato da OAS-TL. Em concordância com este achado, plantas de colza com quinze
603 dias de idade e submetidas à deficiência de enxofre, seguida pela restauração do suprimento de
604 enxofre e adicional suplementação de OAS, apresentaram estímulo da atividade de glutamina
605 sintetase nas folhas (Kaur *et al.*, 2011).

606 Curvas de resposta à luz constituem uma valiosa ferramenta para investigar as propriedades
607 fotossintéticas das folhas. Elas descrevem um comportamento hiperbólico da taxa de
608 assimilação líquida de CO₂ (A) como uma função do aumento da densidade de fluxo de fótons
609 fotossinteticamente ativos (DFFA) (Lobo *et al.*, 2013; Lambers & Oliveira, 2019). Quando a
610 DFFA é igual a zero, nenhum CO₂ pode ser assimilado e a taxa de respiração no escuro (Rd)
611 pode ser estimada. Sob baixas intensidades luminosas, incrementos da DFFA resultam em
612 aumento linear da A , uma região da curva na qual a fotossíntese é limitada pelo transporte de
613 elétrons impulsionados pela luz. Nesta região é possível encontrar o P_{comp} , que corresponde ao
614 ponto no qual a taxa de CO₂ assimilado pela fotossíntese se iguala à quantidade de CO₂ liberado
615 pela respiração. Em adição, a inclinação da reta revela o rendimento quântico da fotossíntese
616 (α). Sob altas DFFA, observa-se um platô no qual a fotossíntese é dita saturada pela luz ($A_{máx}$)
617 e limitada pela taxa de carboxilação do CO₂ (Hall *et al.*, 1993; Lambers & Oliveira, 2019).

618 Notavelmente, nossos dados revelaram que a SBC reduziu drasticamente o α , a $A_{máx}$ e o P_{sat}
619 calculados a partir de curvas de resposta à luz em folhas de plantas de milho. O α descreve a
620 eficiência de utilização da luz pela fotossíntese, isto é, o número de moles de CO₂ fixados por
621 quanta de luz absorvido pela folha (Hall *et al.*, 1993). Sua redução nas plantas expostas a SBC
622 aponta para interferências na absorção da energia luminosa ou na eficiência do transporte de
623 elétrons. De fato, a SBC reduziu o teor de clorofila nas folhas e estimulou a síntese de proteínas
624 de ligação às clorofilas a - b (complexo coletor de luz, CCL) (Tabela 2), provavelmente como
625 um mecanismo compensatório. O CCL funciona como um receptor de luz que captura e fornece
626 energia de excitação aos fotossistemas com os quais está intimamente associado. Em
627 concordância com estes achado, a expressão de CCLII em *Dunaliella tertiolecta* foi aumentada
628 por 3-(3,4-diclorofenil)-1-1-dimetilureia (DCMU), um inibidor do fluxo de elétrons da PQA
629 para PQB no fotossistema II (PSII) (Escoubas *et al.*, 1995; Teramoto *et al.*, 2002). Como
630 discutido posteriormente neste trabalho, a SBC também afetou o transporte de elétrons em nível
631 de PSII.

632 Uma limitação estomática para a fotossíntese deve ser a causa para a significativa queda da
633 $A_{máx}$ nas plantas de milho expostas à 1 e 5 mM de SBC sob condição de CO₂ ambiente (Fig. 2A
634 e C). Essa hipótese é corroborada pela acentuada redução da g_s , em associação com a queda da
635 c_i (apenas no tratamento com 5 mM de SBC), nestas plantas (Fig. 3C e E). Resultados similares
636 foram encontrado por Marchiosi *et al.* (2016) em plantas de soja expostas ao L-DOPA.
637 Entretanto, é importante destacar que a c_i não foi reduzida na mesma magnitude que a g_s , de
638 modo que alguma limitação não estomática para a fotossíntese pode ser esperada. Para
639 comprovar esta hipótese, nós realizamos curvas de resposta à luz em plantas tratadas com 1 e

640 5 mM de SBC sob condições saturantes de CO₂. Sob esta condição, a disponibilidade adicional
641 de CO₂ foi suficiente para elevar a $A_{m\acute{a}x}$ de plantas tratadas com 1 mM de SBC ao nível do
642 controle (Fig. 3B). Entretanto, no tratamento com 5 mM, uma limitação não estomática para a
643 fotossíntese foi evidenciada pelo aumento da c_i (Fig. 3F). Em termos bioquímicos, isso pode
644 ser interpretado como uma ineficiência das reações de assimilação do carbono em consumir o
645 CO₂ disponível, culminando em seu acúmulo. Esta análise nos permite concluir que a inibição
646 da fotossíntese induzida pela SBC em plantas de milho está atrelada a ambas limitações
647 estomática e não estomática (como depressão na atividade do PSII, inibição do transporte de
648 elétrons e fotofosforilação) (Everard *et al.*, 1994; Zhou & Yu, 2006).

649 Outra evidência de que o SBC afetou a fotossíntese do milho foi a redução de 50% no J , ou
650 seja, na taxa transporte de elétrons oriundos da fotólise da água, o que pode ter impactado
651 negativamente a produção de ATP e NADPH necessários para assimilação do CO₂. Em adição,
652 nós também notamos redução média de 70% na ETR, Φ PSII e qP e de 30% na F_v'/F_m' de
653 plantas tratadas com 5 mM de SBC. De modo geral, estes dados sugerem que o transporte de
654 elétrons fotossintético foi afetado pela SBC, diminuindo a proporção da energia luminosa
655 absorvida que é enviada para a fase fotoquímica da fotossíntese. Em contrapartida, o NPQ, que
656 representa o *quenching* não fotoquímico, foi notavelmente maior nas plantas tratadas com SBC,
657 demonstrando que a energia absorvida pelos PSII e não utilizada na fotoquímica está sendo
658 dissipada amplamente na forma de calor (Baker, 2008).

659 O F_v/F_m é uma medida da integridade estrutural do PSII (Lu, Cao, Feng, He & Jiang 2009).
660 Em resumo, uma queda em seus valores pode indicar um dano nas membranas dos tilacoides,
661 particularmente daquele associado aos fotossistemas ou inibição da transferência de excitação
662 de energia das antenas para os centros de reação (Krause & Weis 1984). Nossos resultados
663 demonstraram que as plantas de milho tratadas com SBC 5 mM apresentaram apenas uma
664 ligeira redução (2,5%) no F_v/F_m , confirmando a integridade estrutural dos PSII, já que os
665 valores de F_v/F_m ficaram dentro dos limites (0,75–0,85) reportados para plantas não
666 estressadas (Araus & Hogan 1994).

667 Em adição, a SBC 5 mM reduziu significativamente a fluorescência transiente da clorofila
668 a no ponto P. A fluorescência neste ponto significa um acúmulo da forma reduzida do acceptor
669 de elétrons quinona A (PQ_A) e, assim, o progressivo fechamento dos centros de reação (Strasser
670 *et al.*, 2000) como resultado da baixa atividade de reoxidação de PQ_A⁻. Dessa forma, nossos
671 dados sugerem um possível comprometimento no transporte de elétrons fotossintético em nível
672 de citocromo b_6/f . Em adição, o acúmulo de PQ_A reduzida pode ter sido responsável pelo
673 incremento de EROs nas folhas das plantas tratadas com SBC. Corroborando esta hipótese,

674 elevada produção de ânion superóxido (O_2^-) foi detectada em tilacoides de ervilha quando na
675 presença de dinitrofenil-éter de 2-iodo-4-nitrotimol (DNP-INT), um inibidor da oxidação de
676 PQH_2 pelo complexo do citocromo b_6f (Y & Grace, 1999; Mubarakshina & Ivanov, 2010).

677 Notavelmente, nós verificamos uma redução na expressão de importantes proteínas
678 constituintes do PSII, complexo do citocromo b_6f , PSI e ATP sintase após exposição das plantas
679 à SBC (Fig. 8). Para facilitar o entendimento de como a SBC afetou o transporte de elétrons
680 fotossintético faremos uma detalhada descrição de cada complexo proteico apontando as
681 principais subunidades reprimidas. O PSII é um grande complexo proteico que atua como uma
682 plastoquinona oxidoreductase (Gao *et al.*, 2018). Ele usa energia luminosa para abstrair elétrons
683 da H_2O , gerando O_2 e um gradiente de prótons através da membrana do tilacoide que será
684 posteriormente utilizado para a síntese de ATP. Nas plantas superiores ele existe como um
685 dímero, cada um dos quais possui mais de 20 proteínas, pigmentos antena e lipídeos (Niyogi *et*
686 *al.*, 2015). As proteínas D1 e D2 formam o núcleo do complexo, ligando os grupos prostéticos
687 P680, feofitina e plastoquinonas (PQ_A e PQ_B). As proteínas CP43 e CP47 são dois complexos
688 antenas que compõem o centro de reação fotoquímica (Gao *et al.*, 2018). Elas ligam clorofila *a*
689 e carotenoides centrais. Sob luz, elétrons são transferidos do P680 para feofitina e,
690 posteriormente, para as PQ_A e PQ_B , formando PQH_2 que possui mobilidade na membrana. O
691 $P680^+$ deficiente em elétrons é restaurado (reduzido) por um resíduo de tirosina da proteína D1.
692 Subsequentemente, a proteína D1 é reduzida pelo complexo de evolução do oxigênio anexo ao
693 PSII, formando H_2O , $2H^+$ e $\frac{1}{2}O_2$ (Vinyard *et al.*, 2019). Interessantemente, a SBC reduziu a
694 expressão dos componentes D1, D2, CP43, CP47, PsbN, PsbH e PsbQ no PSII de plantas de
695 milho, impactando severamente o transporte de elétrons em nível de PSII. Embora ainda
696 obscuro, PsbN pode ter um papel na biogênese dos PSI e PSII. Em adição, PsbQ é um
697 componente do complexo de evolução do oxigênio envolvido na otimização da evolução do
698 oxigênio (Gao *et al.*, 2018).

699 O citocromo b_6f é um complexo proteico da membrana dos tilacoides que transfere os
700 elétrons do PQH_2 , proveniente do PSII, para a plastocianina (PC), bombeando prótons para o
701 lúmen do tilacoide e contribuindo para a formação do gradiente eletroquímico de prótons
702 necessário à síntese de ATP (Malone *et al.*, 2019). Ele é formado, basicamente, por um
703 citocromo *b* (PetB), que possui dois hemes denominados b_H e b_L , um citocromo *f* (PetA) e uma
704 proteína ferro-enxofre de Rieske (Niyogi *et al.*, 2015). É importante destacar que citocromos
705 do tipo *c* possuem o grupo heme ligado à proteína através de resíduos de L-cisteína. No presente
706 estudo, nós verificamos uma redução da expressão dos citocromos b_6 e *f* após exposição ao

707 SBC. Dessa forma, a redução da síntese de L-cisteína pela SBC parece ter prejudicado a síntese
708 dos componentes deste importante complexo.

709 O PSI das plantas superiores contém cerca de 19 proteínas, está localizado na membrana
710 dos tilacoides e atua como uma plastocianina-ferredoxina oxidoreductase dependente de luz
711 (Jensen *et al.*, 2007). As proteínas PsaA e PsaB são seus principais componentes, formando um
712 heterodímero central que liga os principais transportadores de elétrons: P700, clorofila A₀,
713 Filoquinona (A₁) e o centro 4Fe-4S (F_X). PsaC é a apoproteína para a ligação de dois centros
714 4Fe-4S adicionais, F_A e F_B, sendo essencial para a atividade fotoquímica do PSI. A PC traz
715 elétrons provenientes do complexo citocromo b₆f, os quais são sequencialmente transferidos
716 para P700⁺, clorofila A₀, clorofila A₁, centros 4Fe-4S F_X, F_A e F_B, a partir do qual os elétrons
717 são transferidos para a proteína solúvel ferredoxina (Fd) no lado estromal da membrana
718 tilacoide (Jensen *et al.*, 2007; Caffarri *et al.*, 2014; Mazor *et al.*, 2015; Niyogi *et al.*, 2015). A
719 Fd reduzida atua como doador de elétrons para redução de NADP⁺, assimilação do nitrogênio
720 e redução da ligação dissulfeto da proteína regulatória tiorredoxina. Como demonstrado neste
721 estudo, a SBC reduziu a expressão das subunidades PsaA, PsaB e PsaC no PSI de plantas de
722 milho, bem como da Fd. Notavelmente, algumas dessas subunidades possuem centros 4Fe-4S,
723 demonstrando de modo contundente que a ação da SBC sobre a via de assimilação de enxofre
724 prejudicou significativamente a formação de constituintes do PSI e impactou o transporte de
725 elétrons fotossintético e síntese de NADPH.

726 O gradiente de H⁺ gerado através da membrana dos tilacoides pelo fluxo de elétrons
727 fotossintético pode ser utilizado para a síntese de ATP pelo complexo ATP sintase. Este
728 complexo enzimático é formado pelas subunidades CF_o e CF₁ (Hahn *et al.*, 2018). CF_o
729 localiza-se na membrana tilacoide e é constituído pelas subunidades a, b, b' e c, esta última
730 fornecendo um caminho transmembrana para os prótons voltarem ao estroma. CF₁ localiza-se
731 do lado estromal da membrana tilacoide, sendo constituído pelas subunidades γ , ϵ , δ , α e β (em
732 uma estequiometria de γ , ϵ , δ , α_3 e β_3), na qual a subunidade β possui a atividade de síntese de
733 ATP. Todas as ATP sintases rotativas são totalmente reversíveis. Para evitar a hidrólise de ATP,
734 a CF₁CF_o ATP sintase tem uma inserção de aproximadamente 40 aminoácidos na subunidade
735 γ que atua como interruptor no escuro por meio de uma ligação dissulfeto, atenuando a atividade
736 de ATPase (Hahn *et al.*, 2018). Essas ligações dissulfeto são mantidas reduzidas sob luz pela
737 ação das tiorredoxinas e tiorredoxina redutase NADP-dependente (Carrillo *et al.*, 2016).
738 Intrigantemente, a SBC reduziu a expressão de uma tiorredoxina cloroplastídica nas folhas das
739 plantas de milho. Além disso, a subunidade β de CF₁ também foi reprimida pelo SBC, o que
740 pode ter sido uma resposta para diminuir a atividade ATPase quando da escassez do regulador

741 tioredoxina. Em resumo, a análise do proteoma de folhas de milho mostrou que a SBC inibiu
742 a expressão de importantes componentes do PSII, citocromo b6f e PSI, justificando a redução
743 de $A_{máx}$, J e ETR observada nas análises de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a . Além
744 disso, a possível redução da síntese de NADPH e ATP na fase fotoquímica da fotossíntese pode
745 ser a causa da limitação não estomática para $A_{máx}$ evidente sob condições saturantes de CO_2 .

746 Visando identificar as alterações nas reações de assimilação do carbono que culminaram
747 com a redução da $A_{máx}$ em folhas de plantas de milho expostas à SBC, nós realizamos curvas
748 de resposta ao CO_2 (A/c_i). Curvas A/c_i permitem calcular parâmetros como $V_{cmáx}$, $V_{pmáx}$ e J , que
749 correspondem as taxas de carboxilação da Rubisco, da PEP carboxilase e de transporte de
750 elétrons fotossintético, respectivamente (Sharkey *et al.*, 2007). Nossas análises revelaram que
751 a SBC, na concentração de 5 mM, reduziu drasticamente $V_{cmáx}$, $V_{pmáx}$ e J , demonstrando que
752 as etapas iniciais da assimilação do CO_2 foram comprometidas. Nas células mesofílicas de
753 plantas C4 como o milho, o CO_2 é inicialmente hidratado a HCO_3^- pela anidrase carbônica que,
754 em seguida, é fixado em oxaloacetato pela PEP carboxilase (Zhou *et al.*, 2019). Então, a NADP-
755 malato desidrogenase converte o oxaloacetato em malato, que é posteriormente transportado
756 para as células envoltórias do feixe vascular e descarboxilado pela enzima málica NADP-
757 dependente para produzir CO_2 e piruvato. Por sua vez, o CO_2 liberado pode ser fixado pela
758 Rubisco e demais reações do ciclo de Calvin, enquanto o piruvato é regenerado em PEP na
759 célula da bainha pela piruvato ortofosfato dicinase (PPDK) numa reação que envolve o gasto
760 de ATP. Corroborando os resultados obtidos nas curvas A/c_i , a análise do proteoma de folhas
761 das plantas expostas à SBC mostrou uma redução da expressão de Rubisco (subunidades
762 grandes e pequenas), PPDK e enzima málica NADP-dependente. Em adição, as enzimas
763 gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e transcetolase, que participam, respectivamente das
764 etapas de redução e regeneração do ciclo de Calvin, também foram reprimidas pela SBC. Por
765 outro lado, a expressão da PEP carboxilase foi estimulada. Em conjunto, nossos dados sugerem
766 que a etapa de assimilação do CO_2 nas plantas de milho expostas à SBC foi negativamente
767 impactada pela redução da expressão de enzimas exclusivas do metabolismo C4 e também do
768 ciclo de Calvin.

769 Em conclusão, nossos dados permitem afirmar que a SBC reduziu drasticamente a
770 fotossíntese de plantas de milho através de limitações estomática e não estomática, como
771 evidenciado pelas análises de trocas gasosas e fluorescência da clorofila a . De fato, uma análise
772 proteômica quantitativa das folhas mostrou que a SBC reprimiu a expressão de componentes
773 chaves dos PSII, PSI, complexo citocromo b6f e ATP sintase, bem como de enzimas do
774 metabolismo C4 e do ciclo de Calvin. Além disso, é possível afirmar que as alterações

775 observadas em nível fotossintético foram causadas devido a indisponibilidade de L-cisteína e
776 enxofre assimilado para a síntese de tais proteínas e seus cofatores, já que a SBC é uma
777 substância inibidora da OAS-TL.

778

779 **Agradecimentos**

780

781 O professor Rogério Marchiosi é pesquisador do Conselho Nacional de Desenvolvimento
782 Científico e Tecnológico (CNPq). Os autores agradecem à Aparecida M. D. Ramos pela
783 assistência técnica.

784

785 **Referências**

786

787 **Abadie C, Tcherkez G. 2019.** Plant sulphur metabolism is stimulated by photorespiration.
788 *Communications Biology* **2**: 1–7.

789 **Baker NR. 2008.** Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annual*
790 *Review of Plant Biology* **59**: 89–113.

791 **Bradford MM. 1976.** Rapid and sensitive method for the quantification of microgram
792 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**:
793 248–254.

794 **Buchanan, Bob B.; Gruissem, Wilhelm; Jones RL. 2015.** *Biochemistry and molecular*
795 *biology of plants*.

796 **Caffarri S, Tibiletti T, Jennings RC, Santabarbara S. 2014.** A comparison between plant
797 photosystem I and photosystem II architecture and functioning. *Current Protein and Peptide*
798 *Science* **15**: 296–331.

799 **Carrillo LR, Froehlich JE, Cruz JA, Savage LJ, Kramer DM. 2016.** Multi-level regulation
800 of the chloroplast ATP synthase : the chloroplast NADPH thioredoxin reductase C (NTRC) is
801 required for redox modulation specifically under low irradiance. : 654–663.

802 **Chan KX, Wirtz M, Phua SY, Estavillo GM, Pogson BJ. 2013.** Balancing metabolites in
803 drought: The sulfur assimilation conundrum. *Trends in Plant Science* **18**: 18–29.

804 **Escoubas JM, Lomas M, LaRoche J, Falkowski PG. 1995.** Light intensity regulation of cab
805 gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. *Proceedings of the*
806 *National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 10237–10241.

807 **Everard JD, Cucci R, Kann SC, Flore JA, Loescher WH. 1994.** Gas exchange and carbon

808 partitioning in the leaves of celery (*Apium graveolens* L.) at various levels of root zone salinity.
809 *Plant Physiology* **106**: 281–292.

810 **Galazzi EB. 2011.** Desempenho fotossintético de plantas de *Jatropha curvas* L. cultivadas no
811 Estado do Espírito Santo.

812 **Gao J, Wang H, Yuan Q, Feng Y. 2018.** Structure and function of the photosystem
813 supercomplexes. *Frontiers in Plant Science* **9**: 1–7.

814 **Genty B, Briantais JM, Baker NR. 1989.** The relationship between the quantum yield of
815 photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et*
816 *Biophysica Acta - General Subjects* **990**: 87–92.

817 **Gigolashvili T, Kopriva S. 2014.** Transporters in plant sulfur metabolism. *Frontiers in Plant*
818 *Science* **5**: 1–16.

819 **Hahn A, Vonck J, Mills DJ, Meier T, Kühlbrandt W. 2018.** Structure, mechanism, and
820 regulation of the chloroplast ATP synthase. *Science* **360**.

821 **Hall DO, Scurlock JMO, Bolhar-Nordenkampf HR, Leegood RC, Long SP. 1993.**
822 *Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual.*
823 Springer-Science+Business Media, B. V.

824 **Haneklaus S, Bloem E, Schnug E. 2008.** History of Sulfur Deficiency in Crops Sulfur—
825 Yellow Poison or Jilted Plant Nutrient? *Sulfur: A Missing Link between Soils, Crops, and*
826 *Nutrition. Agronomy Monograph 50 agronomymo*: 45–58.

827 **Hirase K, Molin WT. 2003.** Sulfur assimilation in plants and weed control: Potential targets
828 for novel herbicides and action sites of certain safeners. *Weed Biology and Management* **3**: 147–
829 157.

830 **Jambunathan N. 2010.** Determination and detection of reactive oxygen species (ROS), lipid
831 peroxidation, and electrolyte leakage in plants. In: Sunkar R, ed. *Plant stress tolerance: Methods*
832 *in molecular biology.* Springer, 291–297.

833 **Jensen PE, Bassi R, Boekema EJ, Dekker JP, Jansson S, Leister D, Robinson C, Scheller**
834 **HV. 2007.** Structure, function and regulation of plant photosystem I. *Biochimica et Biophysica*
835 *Acta - Bioenergetics* **1767**: 335–352.

836 **Jez JM, Ravilious GE, Herrmann J. 2016.** Structural biology and regulation of the plant
837 sulfation pathway. *Chemico-Biological Interactions* **259**: 31–38.

838 **Jobe TO, Zenzen I, Karvansara PR, Kopriva S. 2019.** Integration of sulfate assimilation with
839 carbon and nitrogen metabolism in transition from C 3 to C 4 photosynthesis. **70**: 4211–4221.

840 **Kaur G, Chandna R, Pandey R, Abrol YP, Iqbal M, Ahmad A. 2011.** Sulfur starvation and
841 restoration affect nitrate uptake and assimilation in rapeseed. *Protoplasma* **248**: 299–311.

842 **Kopriva S, Malagoli M, Takahashi H. 2019.** Sulfur nutrition: Impacts on plant development,
843 metabolism, and stress responses. *Journal of Experimental Botany* **70**: 4069–4073.

844 **Kopriva S, Mugford SG, Baraniecka P, Lee B, Matthewman CA, Koprivova A. 2012.**
845 Control of sulfur partitioning between primary and secondary metabolism in Arabidopsis. **3**: 1–
846 9.

847 **Koprivova A, Kopriva S. 2014.** Molecular mechanisms of regulation of sulfate assimilation:
848 first steps on a long road. *Frontiers in Plant Science* **5**: 1–11.

849 **Koprivova A, Kopriva S. 2016.** Sulfation pathways in plants. *Chemico-Biological Interactions*
850 **259**: 23–30.

851 **Lambers H, Oliveira RS. 2019.** *Plant physiological ecology*.

852 **Leon-Cisneros S, Quirola-Garcés A, Alvarez-Santana J, Barriga-Medina N, Ramirez-**
853 **Villacís D, Caviedes M, Ramirez-Cárdenas L, Leon-Reyes A. 2019.** Evaluation of
854 anthocyanin production in white and purple maize (*Zea mays* L.) using methyl jasmonate,
855 phosphorus deficiency and high concentration of sucrose. *Cereal Research Communications*
856 **47**: 604–614.

857 **Lobo F de A, de Barros MP, Dalmagro HJ, Dalmolin ÂC, Pereira WE, de Souza ÉC,**
858 **Vourlitis GL, Rodríguez Ortíz CE. 2013.** Fitting net photosynthetic light-response curves
859 with Microsoft Excel - a critical look at the models. *Photosynthetica* **51**: 445–456.

860 **Loriaux SD, Avenson TJ, Welles JM, Mcdermitt DK, Eckles RD, Riensche B, Genty B.**
861 **2013.** Closing in on maximum yield of chlorophyll fluorescence using a single multiphase flash
862 of sub-saturating intensity. *Plant, Cell and Environment* **36**: 1755–1770.

863 **Machado EC, Schmidt PT, Medina CL, Ribeiro ERV. 2005.** Photosynthetic responses of
864 three citrus species to environmental factors. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* **40**: 1161–1170.

865 **Malone LA, Qian P, Mayneord GE, Hitchcock A, Farmer DA, Thompson RF, Swainsbury**
866 **DJK, Ranson NA, Hunter CN, Johnson MP. 2019.** Cryo-EM structure of the spinach
867 cytochrome b₆ f complex at 3.6 Å resolution. *Nature* **575**: 535–539.

868 **Marchiosi R, Graciene de Souza Bido B, Paulo Alfredo Feitoza Böhm B, Ricardo Soares**
869 **A, Hingrid Ariane da Silva B, Ana Paula Ferro B, de Lourdes Lucio Ferrarese M, Osvaldo**
870 **Ferrarese-Filho B. 2016.** Photosynthetic response of soybean to L-DOPA and aqueous extracts
871 of velvet bean.

872 **Mazor Y, Borovikova A, Nelson N. 2015.** The structure of plant photosystem I super-complex
873 at 2.8 Å resolution. *eLife* **4**: 1–18.

874 **Moriwaki T, Falcioni R, Tanaka FAO, Cardoso KAK, Souza LA, Benedito E, Nanni MR,**
875 **Bonato CM, Antunes WC. 2019.** Nitrogen-improved photosynthesis quantum yield is driven

876 by increased thylakoid density, enhancing green light absorption. *Plant Science* **278**: 1–11.

877 **Moualeu-Ngangué DP, Chen TW, Stützel H. 2017.** A new method to estimate photosynthetic
878 parameters through net assimilation rate–intercellular space CO₂ concentration (A–C_i) curve
879 and chlorophyll fluorescence measurements. *New Phytologist* **213**: 1543–1554.

880 **Mubarakshina MM, Ivanov BN. 2010.** The production and scavenging of reactive oxygen
881 species in the plastoquinone pool of chloroplast thylakoid membranes. *Physiologia Plantarum*
882 **140**: 103–110.

883 **Murad AM, Rech EL. 2012.** NanoUPLC-MSE proteomic data assessment of soybean seeds
884 using the Uniprot database. *BMC Biotechnology* **12**: 1.

885 **Niyogi KK, Wolosiuk RA, Malkin R. 2015.** Photosynthesis. In: B. BB, Grissem W, Jones
886 RL, eds. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Wiley-Blackwell, 508–566.

887 **Noctor G, Strohm M, Jouanin L, Kunert KJ, Foyer CH, Rennenberg H. 1996.** Synthesis
888 of glutathione in leaves of transgenic poplar overexpressing γ -glutamylcysteine synthetase.
889 *Plant Physiology* **112**: 1071–1078.

890 **Pivato M, Fabrega-Prats M, Masi A. 2014.** Low-molecular-weight thiols in plants:
891 Functional and analytical implications. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **560**: 83–99.

892 **Schansker G, Tóth SZ, Strasser RJ. 2006.** Dark recovery of the Chl a fluorescence transient
893 (OJIP) after light adaptation: The qT-component of non-photochemical quenching is related to
894 an activated photosystem I acceptor side. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1757**:
895 787–797.

896 **Sharkey TD, Bernacchi CJ, Farquhar GD, Singaas EL. 2007.** Fitting photosynthetic carbon
897 dioxide response curves for C₃ leaves. : 1035–1040.

898 **Silva WM, Folador EL, Soares SC, Souza GHMF, Santos A V., Sousa CS, Figueiredo H,**
899 **Miyoshi A, Le Loir Y, Silva A, et al. 2017.** Label-free quantitative proteomics of
900 *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates reveals differences between Biovars ovis and
901 equi strains. *BMC Genomics* **18**: 1–14.

902 **de Sousa CP. 2012.** Ação de herbicida sobre a atividade fotossintética de plantas com
903 metabolismo C₃ e C₄.

904 **Strasser RJ, Srivastava A, Tsimilli-Michael M. 2000.** The fluorescence transient as a tool to
905 characterize and screen photosynthetic samples. *Probing Photosynthesis: Mechanism,*
906 *Regulation & Adaptation*: 443–480.

907 **Takahashi H, Kopriva S, Giordano M, Saito K, Hell R. 2011.** Sulfur Assimilation in
908 Photosynthetic Organisms: Molecular Functions and Regulations of Transporters and
909 Assimilatory Enzymes. *Annual Review of Plant Biology* **62**: 157–184.

910 **Teramoto H, Nakamori A, Minagawa J, Ono TA. 2002.** Light-intensity-dependent
911 expression of Lhc gene family encoding light-harvesting chlorophyll-a/b proteins of
912 photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* **130**: 325–333.

913 **Vasconcelos MJ V., Raghothama KG. 2003.** Analise de expressão do gene A1 induzido por
914 estresse de fósforo em genótipos de milho eficiente e ineficiência ao uso de fósforo. *Artigo em*
915 *anais de congresso (ALICE)*.

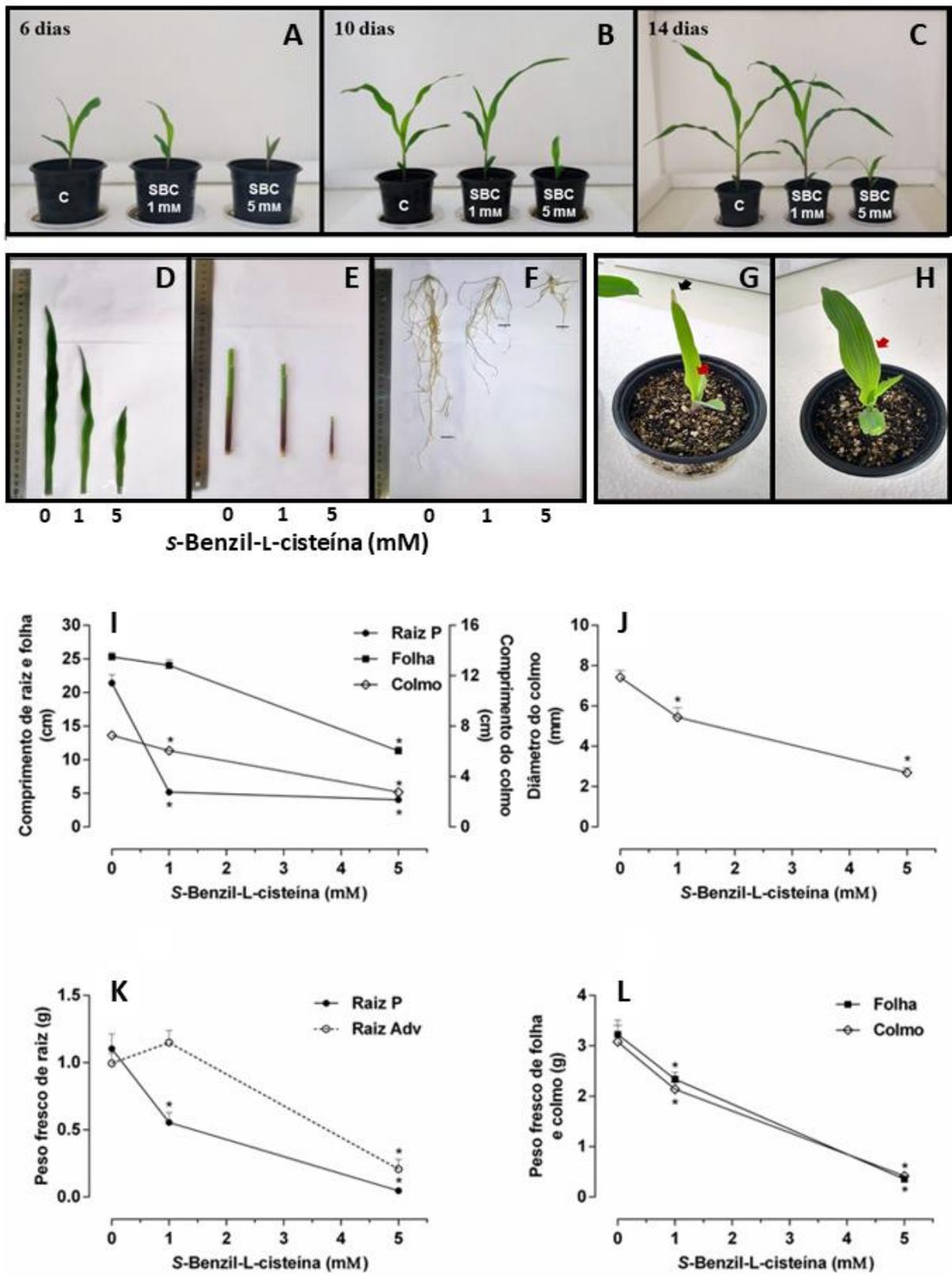
916 **Vinyard DJ, Badshah SL, Riggio MR, Kaur D, Fanguy AR, Gunner MR. 2019.**
917 Photosystem II oxygen-evolving complex photoassembly displays an inverse H/D solvent
918 isotope effect under chloride-limiting conditions. *Proceedings of the National Academy of*
919 *Sciences of the United States of America* **116**: 18917–18922.

920 **Y REC, Grace SC. 1999.** Voltammetric detection of superoxide production by photosystem
921 II. *FEBS Letters* **457**: 348–352.

922 **Zhou H, Akçay E, Helliker BR. 2019.** Estimating C4 photosynthesis parameters by fitting
923 intensive A/Ci curves. *Photosynthesis Research* **141**: 181–194.

924 **Zhou YH, Yu JQ. 2006.** Allelochemicals and photosynthesis. In: *Allelopathy: A Physiological*
925 *Process with Ecological Implications*. 127–139.

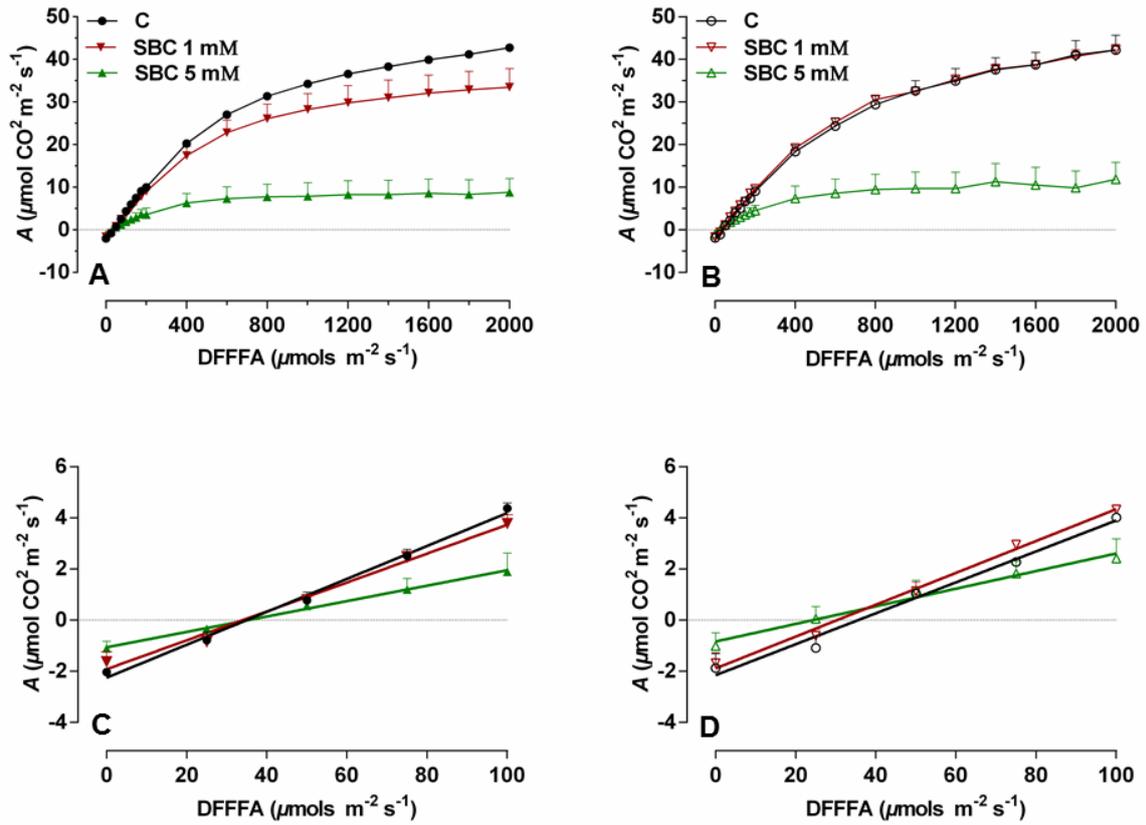
926



927

928 **Figura 1.** Efeitos da *S*-benzil-L-cisteína (SBC) sobre o crescimento de plantas de milho. As
 929 plantas foram regadas a cada 48 h com 50 mL de solução (pH 6,0) contendo ou não SBC 1–
 930 5 mM. Plantas de milho controle (C) e tratadas com *S*-benzil-L-cisteína (SBC) aos 6 (A), 10 (B)
 931 e 14 dias (C) de tratamento. Folhas (D), colmos (E) e raízes principais e adventícias (F) de

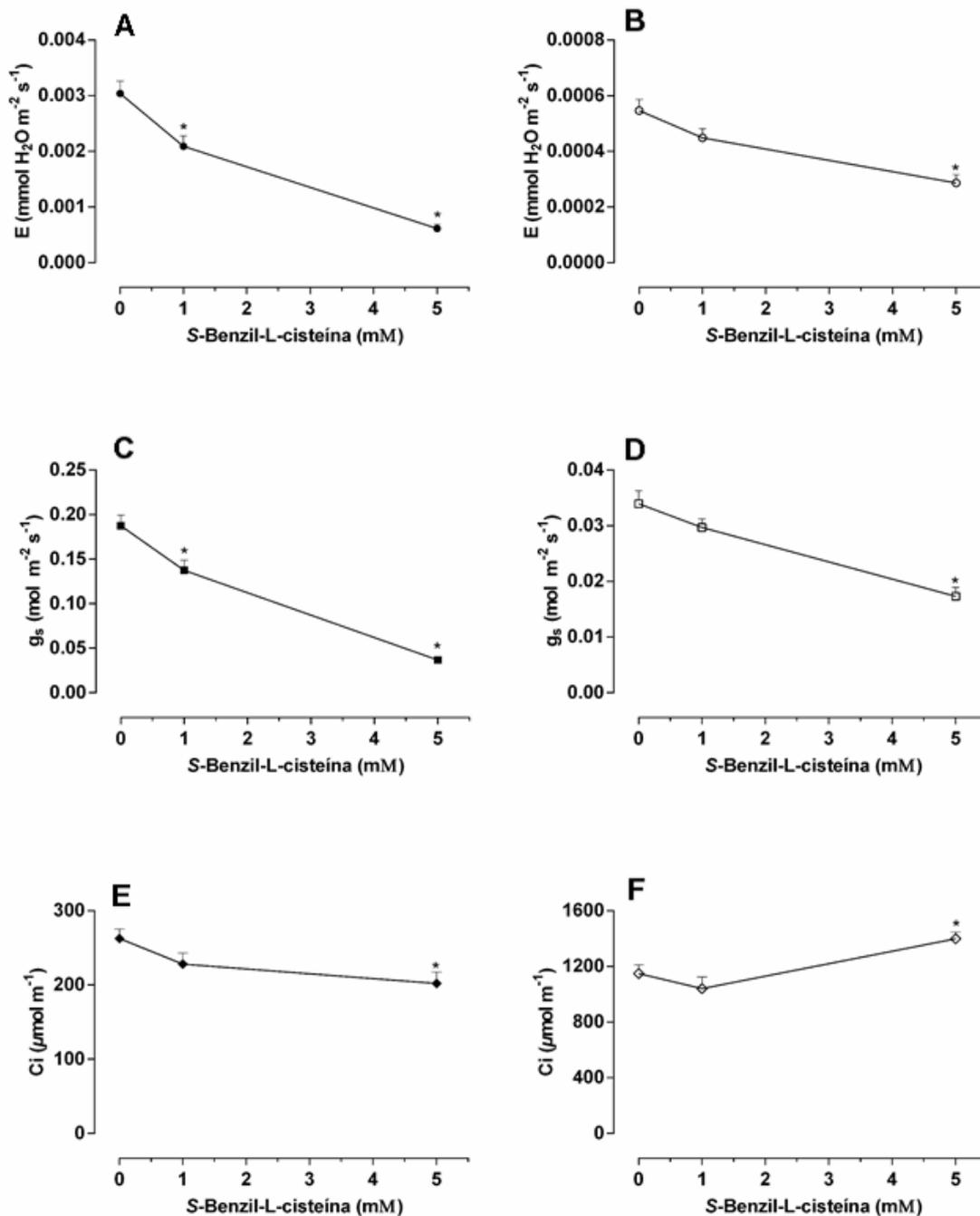
932 milho após 14 dias de tratamento com 1 ou 5 mM de SBC. A sequência dos tratamentos
933 realizados da esquerda para a direita nas figuras corresponde ao controle, 1 e 5 mM de SBC.
934 Em **F** as barras pretas representam os comprimentos das raízes principais. Necrose da porção
935 apical (G, seta preta), clorose próximo à bainha e clorose internerval (G e H, setas vermelhas)
936 em folhas de plantas de milho tratadas com 5 mM de SBC (os sintomas foram evidentes a partir
937 do 8º dia de tratamento). Alterações no comprimento de raízes principais (Raiz P), folhas e
938 colmos (**I**), diâmetro dos colmos (**J**), peso fresco de raízes principais (Raiz P) e adventícias
939 (Raiz Adv) (**K**) e de folhas e colmos (**L**) de milho após 14 dias de cultivo. Valores médios ±
940 EPM (n = 3 a 10) marcados com asterisco (*) diferem do controle de acordo com o teste de
941 comparação múltipla de Dunnett (*One-way ANOVA*) com nível de significância 5% ($P \leq 0,05$).
942



943

944 **Figura 2.** Resposta da assimilação de CO₂ ($A, \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) à densidade de fluxo de fótons
 945 fotossinteticamente ativos (DFFFA) em concentração ambiente (400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$) (A) e 2000
 946 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (B) de CO₂ na câmara foliar. As figuras C e D mostram A em função de DFFFA
 947 em baixa irradiância, nas condições de 400 e 2000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO₂ na câmara foliar,
 948 respectivamente.

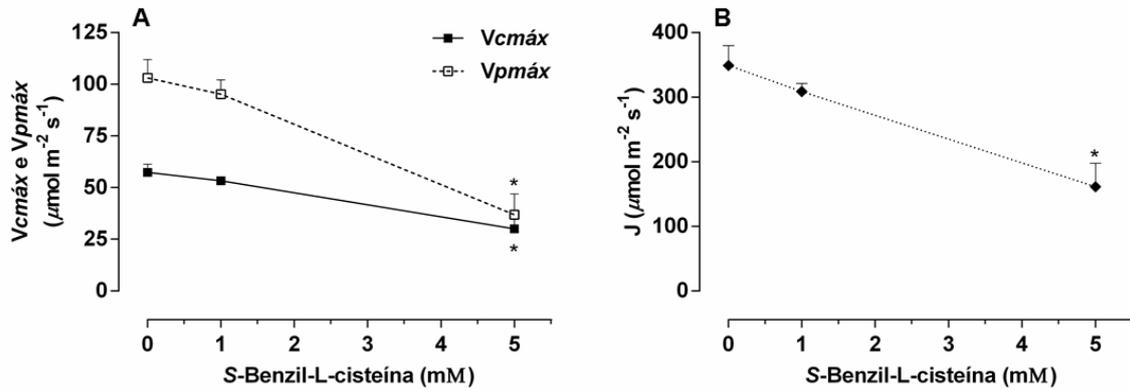
949



950

951 **Figura 3.** Efeitos *S*-benzil-L-cisteína (SBC) na transpiração (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (A e B), na
 952 condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (C e D) e na concentração intercelular de CO_2 (c_i , μmol
 953 mol^{-1}) (E e F) de folhas de milho mantidas em concentrações de CO_2 na câmara foliar em 400
 954 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (A, C e E) e em 2000 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ (B, D e F) após 14 dias de cultivo. Valores médios
 955 \pm EPM ($n = 51$ a 72) marcadas com asterisco (*) diferem do controle de acordo com o teste de
 956 comparação múltipla de Dunnett (*One-way ANOVA*) com nível de significância de 5% ($P \leq$
 957 0,05).

958



959

960 **Figura 4.** Efeitos da *S*-benzil-L-cisteína (SBC) na velocidade máxima de carboxilação da
 961 Rubisco ($V_{cmáx}$, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (A), velocidade máxima de carboxilação da PEP carboxilase
 962 ($V_{pmáx}$, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (A) e taxa de transporte de elétrons fotossintéticos (J , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (B)
 963 obtidos a partir da curva de A em função de c_i ($\mu\text{mol mol}^{-1}$) nas folhas de milho cultivadas por
 964 14 dias. Valores médios \pm EPM ($n = 3$) marcadas com asterisco (*) diferem do controle de
 965 acordo com o teste de comparação múltipla de Dunnett (*One-way* ANOVA) com nível de
 966 significância de 5% ($P \leq 0,05$).

967

968

969

970

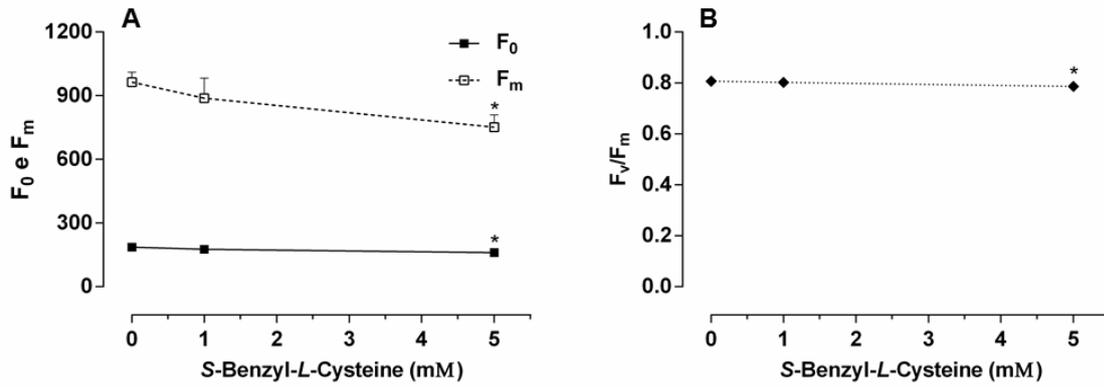
971

972

973

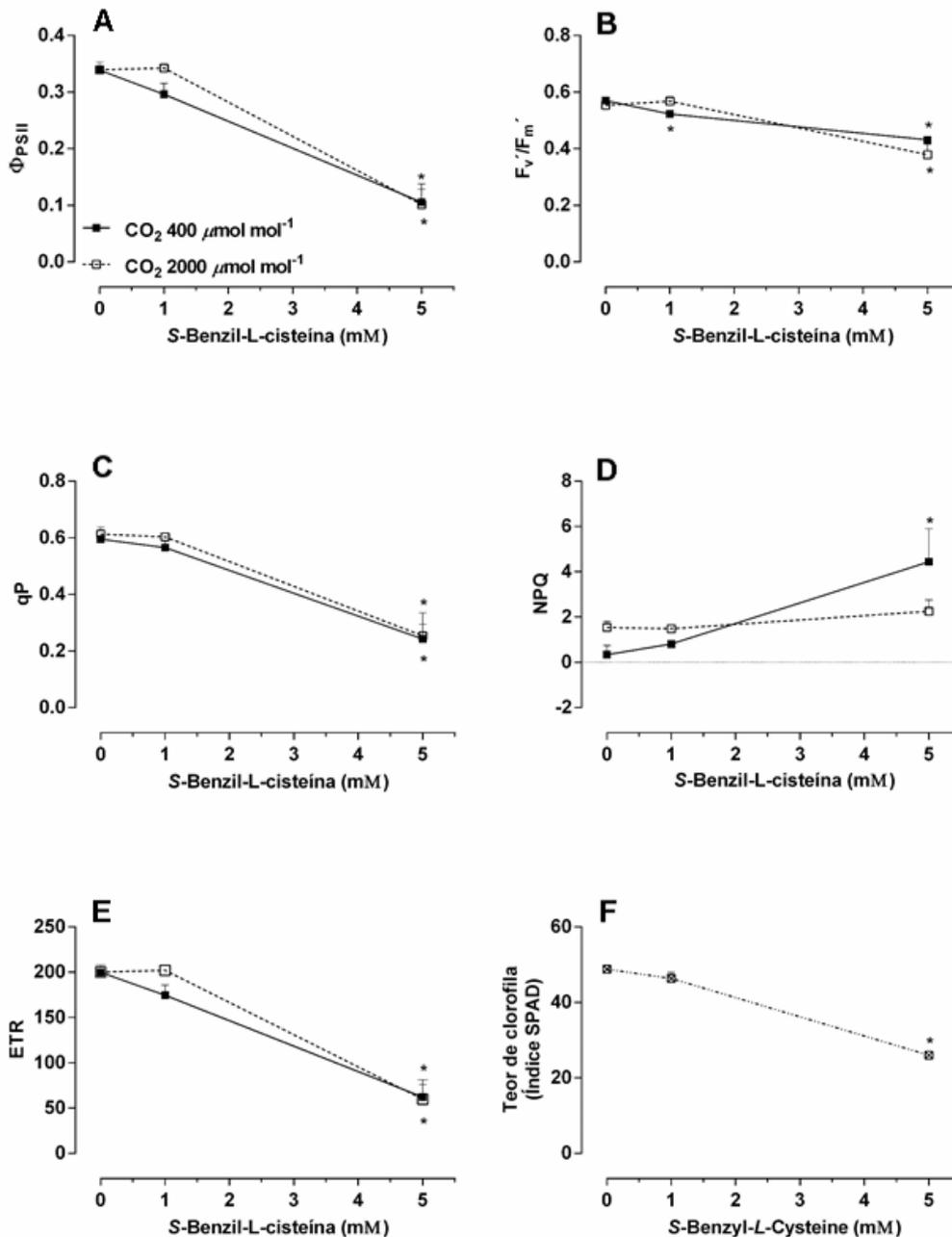
974

975



976

977 **Figura 5.** Efeitos da S-benzil-L-cisteína (SBC) na fluorescência inicial (F_0) (A), fluorescência
 978 máxima (F_m) (A) e no rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m) (B) verificados após 10 h
 979 de adaptação ao escuro das plantas de milho cultivadas por 14 dias. Valores médios \pm EPM
 980 ($n = 3$ a 4) marcadas com asterisco (*) diferem do controle de acordo com o teste de
 981 comparação múltipla de Dunnett (*One-way ANOVA*) com nível de significância de 5% ($P \leq$
 982 0,05).



983

984 **Figura 6.** Efeitos da *S*-benzil-L-cisteína (SBC), após 14 dias de cultivo, no rendimento efetivo
 985 (Φ_{PSII}) (A), na eficiência quântica fotoquímica efetiva (F_v'/F_m') (B), nos *quenchantes*
 986 fotoquímicos (qP) (C) e não fotoquímico (NPQ) (D), na taxa de transporte de elétrons (ETR)
 987 (E) e no teor de clorofila (F) de folhas de milho em concentrações de CO₂ de 400 e 2000 μmol
 988 mol⁻¹ mantidas na câmara foliar. Valores médios ± EPM (n = 3 a 4) marcadas com asterisco (*)
 989 diferem do controle de acordo com o teste de comparação múltipla de Dunnett (*One-way*
 990 ANOVA) com nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$).

991 **Tabela 1.** Taxa de respiração (Rd) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), ponto de compensação da luz (P_{comp}) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), ponto de saturação da luz (P_{sat}) (μmol
 992 $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), assimilação máxima de carbono ($A_{m\acute{a}x}$) ($\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e rendimento quântico da fotossíntese (α) [$(\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1})/(\mu\text{mol f\acute{o}tons}$
 993 $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1})$] de milho em diferentes concentrações de CO_2 mantidas na câmara foliar ($400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ e $2000 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de CO_2) e na ausência e
 994 presença de SBC (1 e 5 mM) cultivas por 14 dias. Valores médios \pm EPM ($n = 3$) seguidas pelas letras a, b,c, d diferem entre si de acordo com o
 995 teste de Tukey (*Two-way* ANOVA) com nível de significância de 5% ($P \leq 0,05$).

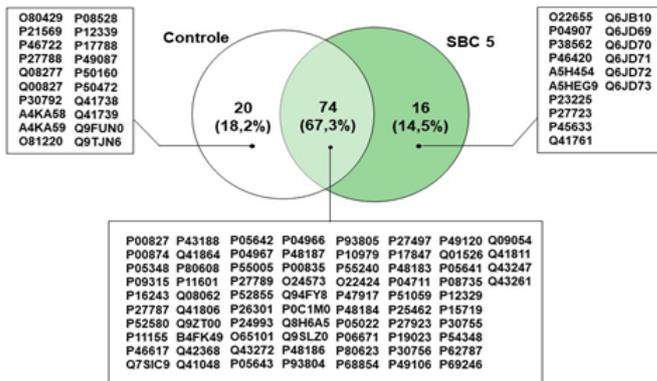
[CO ₂] câmara foliar	SBC (mm)	Rd	P _{comp}	P _{sat}	A _{máx}	α
400	0,0	-2,32 \pm 0,15 a	38,15 \pm 2,68 a	1429,26 \pm 114,00 a	55,77 \pm 2,06 a	0,061 \pm 0,000 a
	1,0	-1,93 \pm 0,20 ab	34,29 \pm 1,85 a	1230,30 \pm 103,96 a	45,87 \pm 4,08 a	0,06 \pm 0,000 a
	5,0	-0,97 \pm 0,29 b	39,22 \pm 3,27 a	254,41 \pm 7,48 bd	7,52 \pm 1,78 b	0,020 \pm 0,010 b
2000	0,0	-2,10 \pm 0,40 a	34,92 \pm 4,62 a	2152,78 \pm 90,37 c	61,35 \pm 4,93 a	0,059 \pm 0,004 a
	1,0	-1,70 \pm 0,38 a	28,62 \pm 5,43 a	1984,96 \pm 290,69 c	59,44 \pm 3,09 a	0,059 \pm 0,003 a
	5,0	-0,80 \pm 0,51 a	21,97 \pm 13,76 a	428,59 \pm 242,53 d	13,00 \pm 5,30 b	0,030 \pm 0,001 b

996

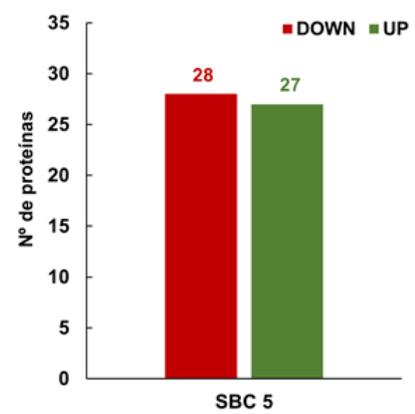
997

998

A



B



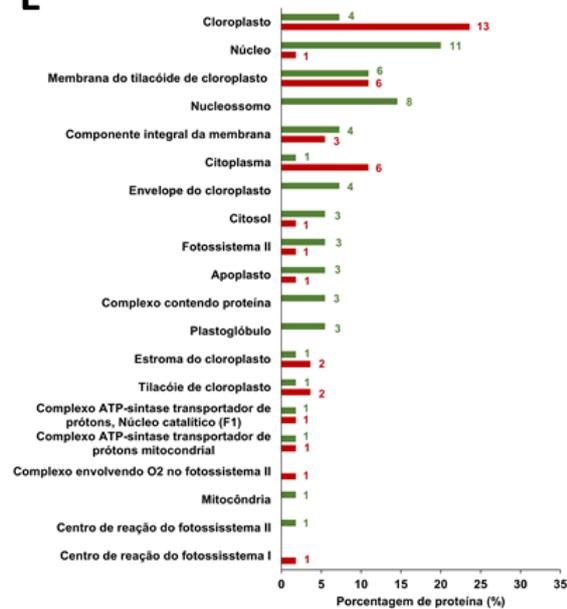
C



D



E



1000 **Figura 7.** Resumo das alterações no proteoma de folhas de plantas de milho tratadas com SBC.
1001 Distribuição das proteínas identificadas no proteoma de folhas de plantas de milho controle e
1002 tratadas com SBC representadas pelo diagrama de Venn (A). Análise de Kobas (*KEGG*
1003 *Orthology Based Annotation System*) das proteínas significativamente alteradas (B–D).
1004 Número de proteínas significativamente alteradas (B). Função molecular (C), processos
1005 biológicos (D) e componente celular (E) das proteínas alteradas. As vias de enriquecimento
1006 foram ranqueadas pelo seu nível de significância e comparadas com a referência, sendo plotados
1007 apenas as 20 primeiras. O número ao lado das barras denota o número de proteínas encontradas
1008 em cada via.

1009

1010

1011

1012

1013

1014

1015

1016

1017

1018

1019

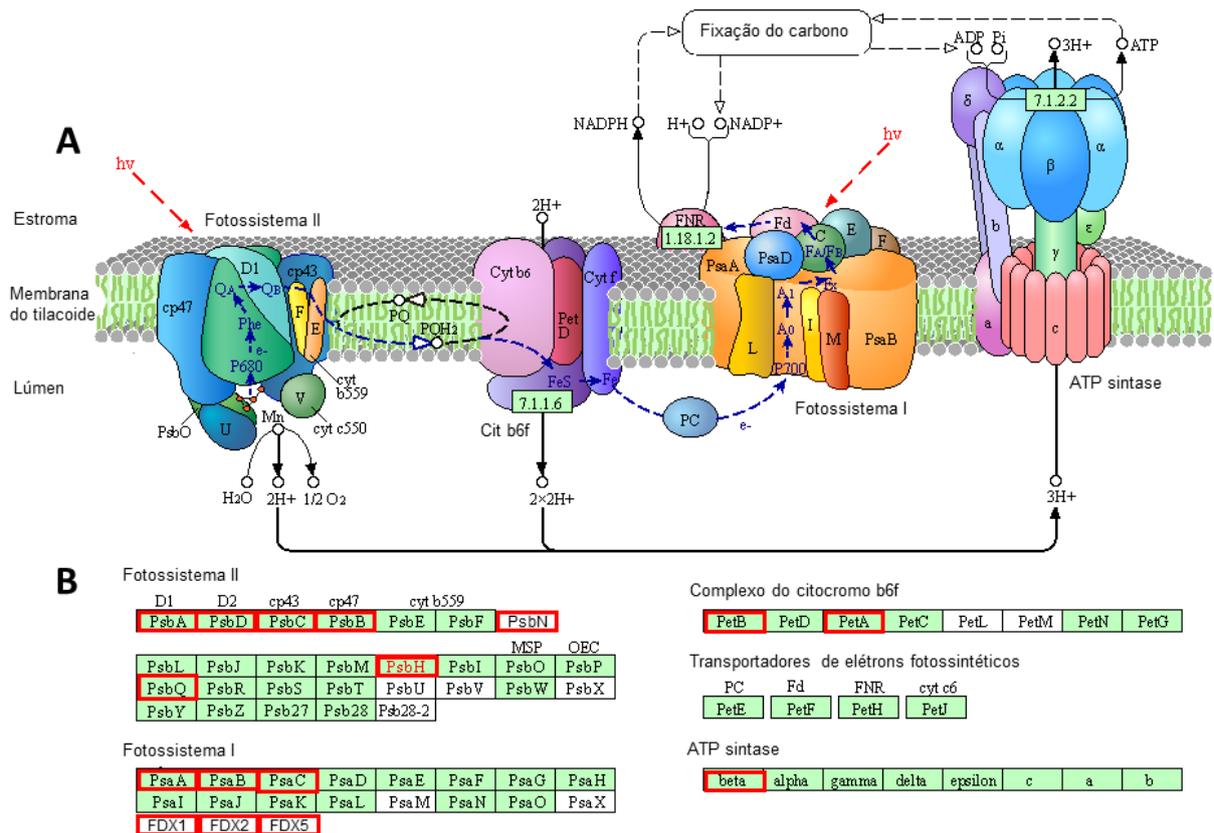
1020

1021

1022

1023

1024



1025

1026 **Figura 8.** Efeitos da *S*-benzil-L-cisteína (SBC) sobre a cadeia de transporte de elétrons
 1027 fotossintética de plantas de milho. Imagem ilustrativa da cadeia de transporte de elétrons
 1028 fotossintética (A). São mostradas as subunidades constituintes dos fotossistemas I (PSI) e II
 1029 (PSII), do complexo citocromo b6f e da ATP sintase. O caminho dos elétrons da H₂O até o
 1030 NADP⁺ é mostrado pelas setas azuis. As setas pretas mostram como o gradiente eletroquímico
 1031 de prótons gerado pelo PSII e complexo citocromo b6f é usado para a síntese de ATP. Relação
 1032 das subunidades que compõe cada complexo proteico (B). As subunidades destacadas em
 1033 vermelho tiveram expressão reprimida em plantas de milho tratadas com SBC.

1034

1035

1036

1037

1038

Table 2. Differentially regulated proteins between leaves of maize plants treated with 1 mM and 5 mM of *S*-benzyl-L-cysteine (SBC) and controls.

Accession	Description	Score	SBC5:Control Log(e) Ratio	p_value
<u>Metabolism (KEGG BRITE 09100)</u>				
Carbohydrate metabolism				
<i>Glycolysis and Gluconeogenesis</i>				
(14)_P30792	2_3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	668.67	-	-
(3)_P26301	Enolase 1	875.37	-0.22	0.01
(11)_P08735	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1_ cytosolic	2738.41	0.47	1.00
(9)_Q09054	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2_ cytosolic	3241.56	0.44	1.00
(7)_Q43247	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3_ cytosolic	1704.73	0.32	1.00
(16)_P93805	Phosphoglucomutase_ cytoplasmic 2	3906.90	-	-
<i>Citrate cycle (TCA cycle)</i>				
(8)_Q08062	Malate dehydrogenase_ cytoplasmic	6538.75	-0.33	0.00
<i>Pentose phosphate pathway</i>				
(16)_P93805	Phosphoglucomutase_ cytoplasmic 2	3906.90	-	-
<i>Galactose metabolism</i>				
(16)_P93805	Phosphoglucomutase_ cytoplasmic 2	3906.90	-	-
<i>Starch and sucrose metabolism</i>				
P55005	Beta-amylase	1097.81	-0.54	0.00
(16)_P93805	Phosphoglucomutase_ cytoplasmic 2	3906.90	-	-
<i>Amino sugar and nucleotide sugar metabolism</i>				
(16)_P93805	Phosphoglucomutase_ cytoplasmic 2	3906.90	-	-
<i>Pyruvate metabolism</i>				
(4)_P15719	Malate dehydrogenase [NADP]_ chloroplastic	3084.07	0.24	1.00
(8)_Q08062	Malate dehydrogenase_ cytoplasmic	6538.75	-0.33	0.00
(13)_P16243	NADP-dependent malic enzyme_ chloroplastic	15393.59	-0.52	0.00
(6)_P51059	Phosphoenolpyruvate carboxylase 2	745.43	0.31	1.00
<i>Glyoxylate and dicarboxylate metabolism</i>				
(8)_Q08062	Malate dehydrogenase_ cytoplasmic	6538.75	-0.33	0.00
(1)_P00874	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	20016.61	-0.17	0.00

(5)_P05348	Ribulose biphosphate carboxylase small chain_ chloroplastic	19639.66	-0.24	0.00
------------	--	----------	-------	------

Energy metabolism

Oxidative phosphorylation

(2)_P00827	ATP synthase subunit beta_ chloroplastic	29278.25	-0.15	0.00
P19023	ATP synthase subunit beta_ mitochondrial	2119.24	0.53	1.00

Photosynthesis

(2)_P00827	ATP synthase subunit beta_ chloroplastic	29278.25	-0.15	0.00
P05642	Cytochrome b6	16293.27	-0.33	0.00
P46617	Cytochrome f	6574.78	-0.47	0.00
P27787	Ferredoxin-1_ chloroplastic	44707.90	-2.94	0.00
O80429	Ferredoxin-2_ chloroplastic	17938.15		
P27789	Ferredoxin-5_ chloroplastic	2230.78	-2.01	0.01
Q41048	Oxygen-evolving enhancer protein 3-1_ chloroplastic	15458.88	-0.29	0.00
Q41806	Oxygen-evolving enhancer protein 3-2_ chloroplastic	14172.39	-0.29	0.00
P04966	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1	1092.35	-	-
P04967	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2	2209.89	-0.37	0.00
O65101	Photosystem I reaction center subunit VI_ chloroplastic	4067.15	-0.21	0.03
P11601	Photosystem I iron-sulfur center	22228.70	-0.77	0.00
P05641	Photosystem II CP47 reaction center protein	2446.15	0.12	1.00
P48183	Photosystem II protein D1	3196.25	0.15	0.98
P48184	Photosystem II protein D2	4509.92	-	-
P48187	Photosystem II CP43 reaction center protein	2197.67	-	-
P68854	Photosystem II protein N (Protein PsbN)	1667.08	1.26	0.97
P24993	Photosystem II reaction center protein H	9323.04	-0.34	0.03
Q9ZT00	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase_ chloroplastic	11180.08	-0.40	0.00

Photosynthesis - antenna proteins

P06671	Chlorophyll a-b binding protein_ chloroplastic	49973.17	0.10	0.95
P12329	Chlorophyll a-b binding protein 1_ chloroplastic	46713.32	0.32	1.00
P27497	Chlorophyll a-b binding protein M9_ chloroplastic	52218.57	0.13	0.98

Carbon fixation in photosynthetic organisms

P09315	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A_ chloroplastic	27509.85	-1.03	0.00
(11)_P08735	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1_ cytosolic	2738.41	0.47	1.00
(9)_Q09054	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 2_ cytosolic	3241.56	0.44	1.00
(7)_Q43247	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3_ cytosolic	1704.73	0.32	1.00
(4)_P15719	Malate dehydrogenase [NADP]_ chloroplastic	3084.07	0.24	1.00
(8)_Q08062	Malate dehydrogenase_ cytoplasmic	6538.75	-0.33	0.00

(13)_P16243	NADP-dependent malic enzyme_ chloroplastic	15393.59	-0.52	0.00
P04711	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1	13039.00	0.17	1.00
(6)_P51059	Phosphoenolpyruvate carboxylase 2	745.43	0.31	1.00
P11155	Pyruvate_ phosphate dikinase 1_ chloroplastic	10211.43	-0.18	0.00
Q42368	Pyruvate_ phosphate dikinase 2	3450.24	-0.11	0.00
(1)_P00874	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	20016.61	-0.17	0.00
(5)_P05348	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain_ chloroplastic	19639.66	-0.24	0.00
Q7SIC9	Transketolase_ chloroplastic	7635.26	-0.27	0.00

Nitrogen metabolism

P17847	Ferredoxin--nitrite reductase_ chloroplastic (Fragment)	553.15	0.25	0.98
P25462	Glutamine synthetase_ chloroplastic	729.49	0.66	1.00

Sulfur metabolism

(12)_P80608	Cysteine synthase	1672.95	-0.48	0.00
P52580	Isoflavone reductase homolog IRL	1103.52	-3.71	0.00

Nucleotide metabolism

Purine metabolism

P43188	Adenylate kinase_ chloroplastic	5772.44	-0.31	0.00
(10)_B4FK49	Nucleoside diphosphate kinase 1	1951.52	-0.46	0.00
(16)_P93805	Phosphoglucomutase_ cytoplasmic 2	3906.90	-	-

Pyrimidine metabolism

(10)_B4FK49	Nucleoside diphosphate kinase 1	1951.52	-0.46	0.00
-------------	---------------------------------	---------	-------	------

Amino acid metabolism

Glycine, serine and threonine metabolism

(14)_P30792	2_3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	668.67	-	-
-------------	---	--------	---	---

Cysteine and methionine metabolism

(12)_P80608	Cysteine synthase	1672.95	-0.48	0.00
(8)_Q08062	Malate dehydrogenase_ cytoplasmic	6538.75	-0.33	0.00
P47917	O-methyltransferase ZRP4	1170.29	-	-

Genetic Information Processing (KEEG BRITE 09120)

Translation

Ribosome

O24573	60S acidic ribosomal protein P0	868.14	-	-
P52855	60S acidic ribosomal protein P1	1669.99	-0.44	0.01
P27923	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	1173.97	0.37	1.00

Folding, sorting and degradation*RNA degradation*

(3)_P26301	Enolase 1	875.37	-0.22	0.01
------------	-----------	--------	-------	------

Environmental Information Processing (KEGG BRITE 09130)**Signal transduction***MAPK signaling**pathway - plant*

(10)_B4FK49	Nucleoside diphosphate kinase 1	1951.52	-0.46	0.00
-------------	---------------------------------	---------	-------	------

Brite Hierarchies (KEGG BRITE 09180)**Protein families: genetic information processing***Chaperones and folding catalysts*

Q41864	Thioredoxin M-type_ chloroplastic	2307.74	-0.46	0.00
--------	-----------------------------------	---------	-------	------

Chromosome and associated proteins

P30755	Histone H2B.1	1641.23	0.76	1.00
--------	---------------	---------	------	------

P30756	Histone H2B.2	1843.74	0.80	1.00
--------	---------------	---------	------	------

Q43261	Histone H2B.3	1567.27	0.74	1.00
--------	---------------	---------	------	------

P49120	Histone H2B.4	1630.54	0.78	1.00
--------	---------------	---------	------	------

P54348	Histone H2B.5	1643.68	0.78	1.00
--------	---------------	---------	------	------

P69246	Histone H3.2	1145.81	0.81	1.00
--------	--------------	---------	------	------

P62787	Histone H4	6604.70	1.07	1.00
--------	------------	---------	------	------

Q41811	Histone H4.3	6613.06	1.07	1.00
--------	--------------	---------	------	------

DNA repair and recombination proteins

P49106	14-3-3-like protein GF14-6	2135.60	0.62	1.00
--------	----------------------------	---------	------	------

Q01526	14-3-3-like protein GF14-12	1764.02	0.45	1.00
--------	-----------------------------	---------	------	------

Unknown function

P80623	Unknown protein from spot 32 of 2D-PAGE of etiolated coleoptile (Fragment)	3313.40	0.97	0.97
--------	--	---------	------	------

All post information processing in Kobas 3.0 and expression in PLGS / Waters.