



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRUNO DE CAMPOS LEME

**TRIAGEM VIRTUAL, AVALIAÇÃO *IN SILICO* E *IN VIVO* DE
DERIVADOS DE UREIA, TIOUREIA E GUANIDINA COMO
POTENCIAIS CITOCININAS**

Londrina
2022

BRUNO DE CAMPOS LEME

**TRIAGEM VIRTUAL, AVALIAÇÃO *IN SILICO* E *IN VIVO* DE
DERIVADOS DE UREIA, TIUREIA E GUANIDINA COMO
POTENCIAIS CITOCININAS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química

Orientadora: Profa. Dra. Marcelle de Lima Ferreira Bispo

Coorientadora: Profa. Dra. Carla Cristina Perez

Londrina
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Leme, Bruno de Campos.

TRIAGEM VIRTUAL, AVALIAÇÃO IN SILICO E IN VIVO DE DERIVADOS DE UREIA, TIUREIA E GUANIDINA COMO POTENCIAIS CITOCININAS / Bruno de Campos Leme. - Londrina, 2022.

98 f. : il.

Orientador: Marcelle de Lima Ferreira Bispo .

Coorientador: Carla Cristina Perez.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2022.

Inclui bibliografia.

1. hormônios vegetais - Tese. 2. docagem molecular - Tese. 3. cinetina - Tese. 4. citocininas - Tese. I. de Lima Ferreira Bispo , Marcelle. II. Cristina Perez, Carla. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU 54

BRUNO DE CAMPOS LEME

**TRIAGEM VIRTUAL, AVALIAÇÃO *IN SILICO* E *IN VIVO* DE
DERIVADOS DE UREIA, TIOUREIA E GUANIDINA COMO
POTENCIAIS CITOCININAS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Marcelle de Lima
Ferreira Bispo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Magaly Girão Albuquerque
Universidade Federal do Rio de Janeiro -
UFRJ

Prof. Dr. Alexandre Orsato
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 23 de fevereiro de 2022.

AGRADECIMENTOS

Às professoras Marcelle e Carla por me receberem com muito entusiasmo no grupo de pesquisa LaSMMed. Em especial à minha orientadora, profa. Marcelle, que, sempre muito atenciosa e disponível, contribuiu de forma decisiva para o desenvolvimento deste trabalho de pesquisa e também para minha formação acadêmica e profissional.

À empresa Inquima, representada pelo Sr. Santiago, que me propiciou a oportunidade de cursar o mestrado, mesmo durante os períodos de expediente dos quais precisei me ausentar, e também pelos materiais disponibilizados.

À minha esposa Thaís por me apoiar neste projeto e em tantos outros ao longo da nossa caminhada de vida juntos.

Aos meus pais, Sonia e Oscar, pelo apoio incondicional e por sempre batalharem por uma educação de qualidade para mim e meu irmão Felipe.

Aos colegas do LaSMMed pelas contribuições durante todo o desenvolvimento do meu projeto.

Aos colegas da Inquima pelo apoio, principalmente ao João pelo enorme suporte prestado na realização dos ensaios agronômicos.

Aos membros da banca de qualificação, professores Camilo e Nilton, e aos membros da banca de defesa, professores Magaly e Alexandre, pelas valiosas contribuições oferecidas.

“Nenhuma atividade no bem é insignificante... As mais altas árvores são oriundas de minúsculas sementes.”

Chico Xavier

RESUMO

CAMPOS LEME, Bruno de. **Triagem Virtual, avaliação *in silico* e *in vivo* de derivados de ureia, tiourea e guanidina como potenciais citocininas**. 2021. 98 f. Qualificação de Mestrado (Mestrado em Química). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021

Os hormônios vegetais são substâncias com diversas funções fisiológicas no metabolismo das plantas. As citocininas são uma das classes de fito-hormônios conhecidas, sendo a cinetina a principal representante desta classe, atuando na ativação da divisão celular *in vitro* (citocineses) e em vários momentos do desenvolvimento vegetal, principalmente, em conjunto com a auxina. As citocininas são classificadas em naturais (derivados de adenina) e sintéticas (derivados de ureia). Esses últimos são o tema principal deste trabalho. Diferentes alvos biológicos podem ser estudados para a ação das citocininas, sendo que a enzima do milho responsável pela inativação molecular dos hormônios endógenos (*Zea mays* cytokinin oxidase/desidrogenase, ZmCKO1) e o receptor de *Arabidopsis thaliana*, o AHK4 são alvos moleculares conhecidos e com estruturas disponíveis no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB). Conjuntos de benzoilureias (BU), benzoiltioureas (BTU) e benzoilguanidinas (BNG), previamente sintetizadas pelo LaSMMed, foram avaliadas primeiramente através de docagem molecular sobre a ZmCKO1 no processo conhecido como triagem virtual (VS). Dez substâncias foram selecionadas, seguindo para a avaliação das propriedades físico-químicas *in silico* e *pesticide-likeness*. Dois compostos foram selecionados com base na avaliação *in silico*: BTU54 e BNG33b, seguindo para uma avaliação de afinidade molecular com receptor AHK4 via docagem molecular e experimentos agrônômicos *in vivo* com plantas de milho. Observou-se uma alta afinidade com os alvos moleculares nas poses previstas para BTU54 e BNG33b e modos de ligação semelhantes à cinetina e aos derivados de ureia tidiazuron (TDZ) e forclorofenuron (CPPU) sobre os alvos ZmCKO1 e AHK4, destacando-se interações com resíduos de aminoácidos-chave para o processo de reconhecimento molecular. Os ensaios agrônômicos executados consistiram em germinação e desenvolvimento inicial de plantas de milho sob condições controladas, aplicando-se tratamentos com a cinetina, ácido indol-butírico (IBA, uma auxina), BTU54 e BNG33b em diferentes combinações. Após o período de desenvolvimento, as plantas foram avaliadas quanto ao comprimento dos sistemas radicular e aéreo, massa de raízes e da parte aérea, e espessura de colmo. Os resultados obtidos foram planejados e avaliados comparando-se, via teste t de Student, as médias dos parâmetros para cada tratamento. Os dados agrônômicos coletados indicaram, de modo geral, que a BTU54 apresentou performance igual à cinetina, enquanto a BNG33b mostrou-se levemente inferior. Estes resultados corroboram o observado nas simulações computacionais, indicando que tais substâncias podem ser consideradas promissoras para o desenvolvimento de formulações agroquímicas focadas em estimulação de crescimento vegetal.

Palavras-chave: hormônios vegetais; docagem molecular; cinetina; ZmCKO1; AHK4.

ABSTRACT

CAMPOS LEME, Bruno de. **Virtual Screening, *in silico* and *in vivo* evaluation of urea, thiourea and guanidine derivatives as potential cytokinins.** 2021. 98 p. Qualification (Master in Chemistry) – State University of Londrina, Londrina, 2021.

Plant hormones are biochemical molecules with several physiological functions over vegetal metabolism. Cytokinins are a group of those plant hormones, with the kinetin (KIN) as the main representant, acting on cellular division stimulation *in vitro* (cytokinesis) and over many specific periods of the plant development in association with auxins. Two structure types of cytokinins are known: adenine (the natural ones) and urea (synthetic) derivatives. These urea cytokinins are the central subject of this research work. Different biological targets for cytokinin action were studied over the years, including the inactivation enzyme from *Zea mays* plant (*Zea Mays* Cytokinin oxidase/dehydrogenase, ZmCKO1) and the bioreceptor from *Arabidopsis thaliana*, AHK4, which present available molecular structures on the PDB database. Previously synthesized groups of benzoylureas (BU), benzoylthioureas (BTU), and benzoylguanidines (BNG) were evaluated initially by molecular docking over ZmCKO1, applying the virtual screening (VS) technique. Ten substances were selected on VS, followed by an *in silico* prediction of physical-chemical properties and pesticide-likeness assessment, selecting two molecules mainly based on water solubility profile: BTU54 and BNG33b. Then, molecular docking was performed over AHK with the selected ones, observing similar interactions between ligand and AHK4 active sites compared to kinetin and urea derivatives TDZ and CPPU. BTU54 and BNG33b were tested in agronomical experiments comparing with kinetin, specifically, germination and initial development phase of *Zea mays* over-controlled conditions, associated (or not) with an auxin, the indol butyric acid (IBA). After the germination and development period, some aspects of the plants were evaluated: roots and aerial length, mass of roots and aerial system, and culm thickness. Results were evaluated, and means of the treatments compared applying significance test with $p < 0,05$ (t-test of Student), data obtained pointed out, in a general way, that BTU54 performed as kinetin, while BNG33b presented inferior results of plant development. These results corroborated the data obtained in molecular docking analysis previously performed, pointing out that those substances are promising to be applied in agrochemical formulations focused on vegetal growth stimulation.

Key-words: plant hormones; molecular docking; kinetin; ZmCKO1; AHK4.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estruturas moleculares dos principais hormônios vegetais	22
Figura 2.	Estruturas químicas das citocininas de ocorrência natural derivadas de adenina (destacada em azul, com a numeração do núcleo purínico em vermelho), a) citocininas isoprenóides e b) citocininas aromáticas	24
Figura 3.	Estruturas químicas genéricas de citocininas conjugadas. Porção adenina destacada em azul.....	25
Figura 4.	Estruturas químicas de: a) ureia e seus derivados (representação genérica); b) citocininas do tipo ureia. A porção ureia destacada em verde	26
Figura 5.	Estruturas químicas de algumas citocininas do tipo derivados de ureia. A porção ureia destacada em verde.....	26
Figura 6.	O transporte das citocininas dentro do vegetal. Em azul o transporte via floema, das folhas para as raízes, e em violeta o transporte via xilema, das raízes para a parte aérea do vegetal	29
Figura 7.	Estrutura do domínio do CRE1 (receptor de citocinina 1, em <i>Arabidopsis thaliana</i>).....	30
Figura 8.	Estrutura molecular do FAD	31
Figura 9.	Estrutura da enzima ZmCKO1 (em verde o domínio de ligação do cofator e em azul o do substrato) co-cristalizada com o inibidor CPPU (em bastões violeta), e uma aproximação destacando o inibidor e parte da estrutura do cofator FAD (em bastões amarelos) (RCSB PDB: 2QKN).....	32
Figura 10.	Túnel que leva ao sítio ativo da enzima ZmCKO1. Em violeta está representada a molécula do inibidor (CPPU). Em amarelo está o FAD e em azul a His105	33
Figura 11.	Ligações de hidrogênio (linhas pretas, distâncias de 2,800 e 3,234 Å) formadas entre o Asp169 (bolas e bastões) e os dois grupos amino da porção ureia da CPPU (bastões).....	34
Figura 12.	Inibição da atividade da CKO pela CPPU em diferentes concentrações. Sem CPPU em verde, 1,5 µM em preto e 3,0 µM	

	em azul. A intersecção no eixo das ordenadas indica inibição competitiva	36
Figura 13.	Representação da estrutura tridimensional do receptor AHK4. Duas moléculas de N-isopentenil adenina (em amarelo) estão ligadas nos sítios ativos do receptor.	38
Figura 14.	Interações moleculares realizadas pela iP (em bolas e bastões amarelos) com sítio de ligação do AHK4 (resíduos de aminoácidos em azul)	39
Figura 15.	Interações moleculares realizadas pelo tidiazuron com sítio de ligação do AHK4.....	40
Figura 16.	Estrutura cristalográfica tridimensional da ZmCKO1 ligada a CPPU (PDB: 2QKN).....	48
Figura 17.	a) Representação dos resíduos de aminoácidos (em bastões azuis) do sítio ativo da ZmCKO1, e da porção flavina do cofator FAD (em bastões amarelos). b) representação tridimensional do sítio ativo preenchido pela superfície molecular do ligante CPPU	49
Figura 18.	Sobreposição de poses do ligante CPPU no sítio ativo da enzima ZmCKO1 de menor RMSD utilizando função de pontuação ASP	51
Figura 19.	Equilíbrio químico entre três tautômeros (formas a, b e c) de uma BNG genérica.....	53
Figura 20.	Estruturas moleculares dos 10 compostos selecionados na triagem virtual com os respectivos valores de Fitness apresentado abaixo de cada molécula)	56
Figura 21.	Representação bidimensional das interações realizadas pela CPPU com o sítio catalítico da enzima ZmCKO1.....	57
Figura 22.	Representação das principais interações da CPPU com os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico da ZmCKO1	58
Figura 23.	Representação das interações dos ligantes selecionados através da triagem virtual com os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico da ZmCKO1. a) BNG20c; b) BNG19a; c) BNG11c; d) BNG7a; e) BNG13c; f) BNG3b; g) BNG33b; h) BNG32b	59
Figura 24.	Representação das interações da BNG6a com os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico da ZmCKO1.....	61

Figura 25.	a) Representação das interações da BTU54 com os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico da ZmCKO1. b) Sobreposição das poses da BTU54 e da CPPU (obtida do complexo co-cristalizado).....	62
Figura 26.	Estrutura cristalográfica tridimensional do AHK4 ligado a cinetina (PDB: 3T4S).....	66
Figura 27.	a) Resíduos de aminoácidos do sítio de ligação do receptor AHK4. b) representação tridimensional do sítio de ligação preenchido pela superfície molecular do ligante cinetina.....	67
Figura 28.	Sobreposição de poses do ligante cinetina no sítio de ligação do receptor AHK4 de menor RMSD utilizando as funções de pontuação CHEMPLP, ASP, ChemScore e GoldScore	68
Figura 29.	Representação bidimensional das interações realizadas pela cinetina (a) e TDZ (b) com o sítio de ligação do receptor AHK4. Representação 3D das principais interações da cinetina (c) e TDZ (d) com os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação do AHK4.....	70
Figura 30.	Representação bidimensional das interações realizadas pela BNG33b (a) e BTU54 (b) com o sítio de ligação do receptor AHK4 obtidas por docagem molecular. Representação tridimensional das principais interações da BNG33b (c) e BTU54 (d) com os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação do AHK4.	71
Figura 31.	Representação bidimensional (a) e tridimensional (b) das principais interações realizadas pela BNG33a com o sítio de ligação do receptor AHK4 obtidas por docagem molecular.....	72
Figura 32.	Comprimento médio das plantas após 10 dias de desenvolvimento em câmara de crescimento vegetal.....	75
Figura 33.	Média das massas secas obtidas do sistema radicular e parte aérea das plantas após 10 dias de desenvolvimento em câmara de crescimento vegetal	76
Figura 34.	Comprimento médio das plantas após 10 dias de desenvolvimento em câmara de crescimento vegetal.....	78
Figura 35.	Média das massas secas obtidas do sistema radicular e parte aérea das plantas após 10 dias de desenvolvimento em câmara de crescimento vegetal	78

Figura 36. Comprimento médio das plantas após 28 dias de desenvolvimento em casa de vegetação	80
Figura 37. Valores médios de espessura do colmo após 28 dias de desenvolvimento em casa de vegetação	81
Figura 38. Valores médios de massa seca das plantas após 28 dias de desenvolvimento em casa de vegetação	82
Figura 39. a) Bandeja contendo substrato e as sementes de milho no momento da semeadura; b) e c) Câmara Climática utilizada nos experimentos; d) Diferentes etapas do desenvolvimento vegetal durante o tempo de incubação	86
Figura 40. Exemplo de planta ao final do período de desenvolvimento em câmara climática, removida e lavada, para a determinação de comprimento radicular e de parte aérea.....	87
Figura 41. Desenvolvimento de plântula de milho da germinação aos estágios vegetativos iniciais	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Especificidade de diferentes substratos com CKO nativa e recombinante (BILYEU et al., 2001).....	36
Tabela 2.	Estruturas e valores de k_i para inibidores da CKO	37
Tabela 3.	Resultados obtidos no redocking, utilizando o ligante CPPU na enzima ZmCKO1 com o programa GOLD.....	50
Tabela 4.	Características estruturais gerais dos compostos utilizados para o VS, os grupos R1 e R2 apresentam-se em diferentes posições (orto, meta e para).....	52
Tabela 5.	Resultados da triagem virtual, apenas a pose de maior fitness foi selecionada para cada ligante e seus tautômeros	53
Tabela 6.	Dez maiores resultados de fitness obtidos considerando apenas o tautômero de maior fitness.	55
Tabela 7.	Regras propostas para “pesticide-likeness” e regra dos 5 de Lipinski (TICE, 2001).....	63
Tabela 8.	Parâmetros físico-químicos preditos na plataforma SwissADME e VCC (indicado com *) para as 10 substâncias selecionadas na triagem virtual, CPPU e cinetina.....	64
Tabela 9.	Parâmetros de ecotoxicidade preditos pela plataforma ADMETSar para as substâncias selecionadas na VS e análise <i>in silico</i>	65
Tabela 10.	Resultados obtidos no redocking, utilizando o ligante cinetina no receptor AHK4 com o programa GOLD.....	68
Tabela 11.	Resultados de docagem molecular com os dois ligantes selecionados na triagem virtual, a cinetina e o TDZ.....	69
Tabela 12.	Resultados de plântulas normais germinadas por dia e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) calculado	73
Tabela 13.	Média dos resultados obtidos no primeiro ensaio sob diferentes tratamentos (IBA: 1,23 $\mu\text{mol/L}$; cinetina, BTU54 e BNG33b: 2,09 $\mu\text{mol/L}$)	75
Tabela 14.	Média dos resultados obtidos no segundo ensaio sob diferentes tratamentos	77
Tabela 15.	Média dos resultados obtidos no estudo em casa de vegetação	79

Tabela A 1. Resultados de todas as observações realizadas nas plantas de milho após 10 dias de desenvolvimento em câmara climática – 1º experimento	95
Tabela A 2. Resultados de todas as observações realizadas nas plantas de milho após 10 dias de desenvolvimento em câmara climática – 2º experimento	96
Tabela A 3. Resultados de todas as observações realizadas nas plantas de milho após 28 dias de desenvolvimento em casa de vegetação.....	96

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Representação da rota biossintética da <i>E</i> -zeatina	27
Esquema 2. Exemplo de inativação de citocininas. Em verde é destacado o ponto de inativação reversível do hormônio e em laranja as conjugações irreversíveis.....	28
Esquema 3. Reação química de oxirredução de uma citocinina tipo adenina catalisada pela enzima CKO	32
Esquema 4. Mecanismo de reação da CKO exemplificado com a isopentenila adenina (iP) como substrato (adaptado de MALITO et al., 2004)	35
Esquema 5. Fluxograma geral para o processo de desenho de fármacos (ou ingredientes ativos em geral) assistido por computador (CADD).....	43
Esquema 6. Planejamento estrutural para a seleção de substâncias-líderes com potencial atividade citocinínica.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,3-MDPUN	<i>N,N'</i> -bis-(2,3-metilenodioxifenil)ureia
3,4-MDPU	<i>N,N'</i> -bis-(3,4-metilenodioxifenil)ureia
Å	Ångström
AIA-3	Ácido Indol-3-acético
ABA	Ácido Abscísico
ADP	Difosfato de adenosina
AHK	<i>Arabidopsis</i> Histidina-Quinase
ALH	Aceptor de ligação de hidrogênio
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
ATP	Trifosfato de adenosina
BA	<i>N</i> 6-benziladenina
BNG	Benzoilguanidina
BTU	Benzoiltioureia
BU	Benzoilureia
CADD	<i>“computer-aided drug design”</i>
CHASE	<i>“cyclases/histidine kinases-associated sensing extracellular”</i>
CIN	Cinetina
CKO	Citocinina Oxidase
CKX	Citocinina Desidrogenase
CPPU	Forclorofenuron
DCPIP	2,6-diclorofenol indofenol
DHZ	diidrozeatina
DIMBOA	2,4-dihidroxi-7-metoxil-1,4-benzoxazinona
DMSO	Dimetilsulfóxido
DLH	Doador de ligação de hidrogênio
DPU	Difenilureia
EZ	<i>E</i> -Zeatina
E-ZR	Ribosídeo de <i>E</i> -Zeatina
FAD	Dinucleotídeo de flavina e adenina
FADH ₂	Dinucleotídeo de flavina e adenina reduzido
F-PU	<i>N</i> -(2-cloro-4-piridil- <i>N</i> -5-fluorfenilureia

GA	Ácido Giberélico
Gli	Glicina
Glic	Glicose
Glu	Glutamato
His	Histidina
IBA	Ácido indol-butírico
iP	Isopentenil Adenina
iPR	Ribosídeo de Isopentenil Adenina
iPRDP	Trifosfato de ribosídeo de isopenteniladenina
ipRTP	Difosfato de ribosídeo de isopenteniladenina
IPT	Enzima isopentenil transferase
IVG	Índice de Velocidade de Germinação
k_i	Constante de Inibição
k_{cat}	Constante catalítica
kDa	quilo Dalton
k_M	Constante de Michaelis-Menten
LBDD	<i>“Ligand-based drug design”</i>
Leu	Leucina
LOG	gene “Lonely Guy”
LR	Ligação rotacionável
Me-iP	Metoxi Isopentenil Adenina
<i>mT</i>	<i>meta</i> -Topolina
<i>oT</i>	<i>orto</i> -Topolina
PAS	“Per-Arnt-Sim”
PDB	Protein Data Bank
PBU	<i>N</i> -fenil- <i>N'</i> -(benzotiazol-6-il)ureia
PMS	metasulfato de fenazina
Pro	Prolina
QSAR	<i>“Quantitative structure–activity relationship”</i>
RE	Retículo Endoplasmático
RMSD	<i>“Root-Mean-Square Deviation”</i>
SBDD	<i>“Structure-based drug design”</i>
Ser	Serina
TDZ	Tidiazuron

Trp	Triptofano
Val	Valina
VS	<i>“Virtual Screening”</i>
Xil	Xilose
Z-ZR	Ribosídeo de Z-Zeatina
ZmCKO1	<i>Zea mays</i> citocinina oxidase 1
ZZ	Z-Zeatina

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	22
1.1.	OS HORMÔNIOS VEGETAIS	22
1.2.	CITOCININAS	23
1.2.1.	A química das Citocininas	23
1.2.2.	O metabolismo das Citocininas	27
1.3.	ALVOS MOLECULARES DAS CITOCININAS	30
1.3.1.	Enzima Citocinina Oxidase/Desidrogenase (CKO e CKX)	31
1.3.2.	<i>Arabidopsis thaliana</i> Histidina Quinase 4 (AHK4)	37
1.4.	EFEITOS AGRONÔMICOS DAS CITOCININAS	40
1.5.	MODELAGEM MOLECULAR	42
1.5.1.	Docagem Molecular e Triagem Virtual	44
1.6.	PLANEJAMENTO ESTRUTURAL	46
2.	OBJETIVOS	47
2.1.	OBJETIVOS GERAIS	47
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.1.	VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE DOCAGEM MOLECULAR	48
3.2.	TRIAGEM VIRTUAL	51
3.3.	DOCAGEM MOLECULAR NA ENZIMA ZMCKO1	56
3.4.	PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS <i>IN SILICO</i> DOS CANDIDATOS SELECIONADOS	62
3.5.	DOCAGEM MOLECULAR NO RECEPTOR AHK4	66
3.6.	ENSAIOS AGRONÔMICOS EM PLANTAS DE MILHO	73
3.6.1.	Velocidade de Germinação	73
3.6.2.	Estudos em Câmara de Crescimento de Plantas	74
3.6.3.	Estudo em Casa de Vegetação	79
4.	CONCLUSÕES	83
5.	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	84

5.1.	PROCEDIMENTOS PARA A TRIAGEM VIRTUAL E DOCAGEM MOLECULAR.....	84
5.2.	PROCEDIMENTOS PARA OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS <i>IN SILICO</i>	85
5.3.	PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA ENSAIOS AGRONÔMICOS.....	85
5.4.	PROCEDIMENTOS PARA ENSAIOS AGRONÔMICOS EM CÂMARA DE CRESCIMENTO DE PLANTAS	86
5.5.	PROCEDIMENTOS PARA ENSAIOS AGRONÔMICOS EM CASA DE VEGETAÇÃO	88
5.6.	DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO.....	88
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
7.	APÊNDICES.....	95

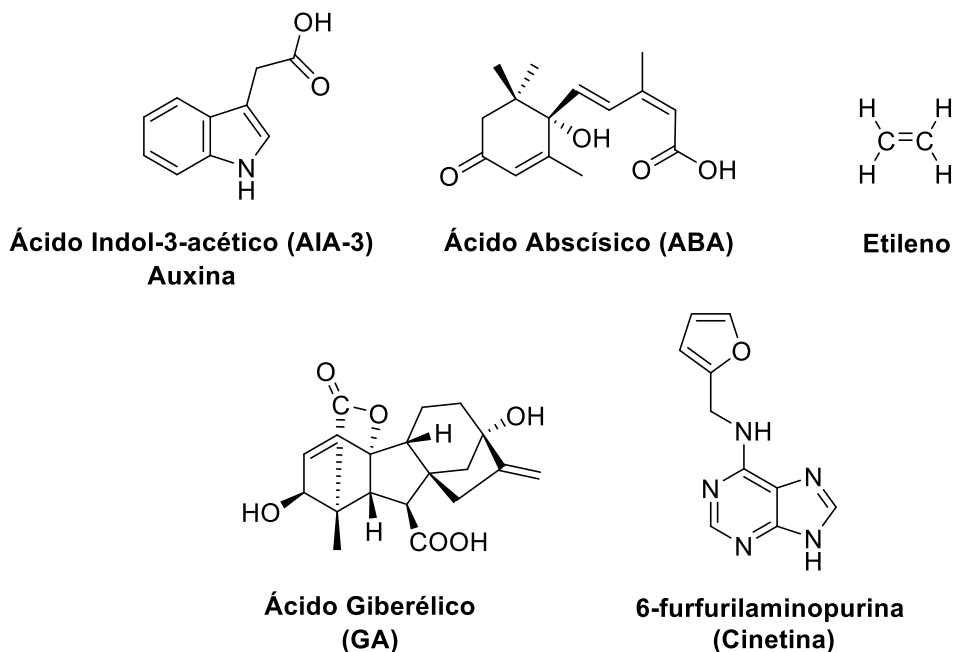
1. INTRODUÇÃO

1.1. OS HORMÔNIOS VEGETAIS

Os hormônios vegetais são substâncias com diversas funções fisiológicas nas plantas, tendo ação efetiva, mesmo em baixíssimas concentrações, regulando aspectos de morfologia, fisiologia e desenvolvimento dos vegetais (KUCERA; COHN; LEUBNER-METZGER, 2005).

Os hormônios vegetais clássicos (Figura 1), que foram os cinco primeiros identificados a partir da década de 1940, atuam em conjunto ou isoladamente, influenciando numerosos aspectos do desenvolvimento da planta e sua fisiologia, como a germinação de sementes, estiolamento, diferenciação de cloroplastos, dominância apical, interação com patógenos, desenvolvimento de folhas, flores e frutos e senescência de folhas (HABERER; KIEBER, 2002). As citocininas pertencem a esse grupo de hormônios vegetais clássicos, sendo a cinetina a primeira substância desta classe identificada por F. Skoog e colaboradores em 1955, juntamente com a auxina (ácido indol-3-acético), giberelina (ácido giberélico), ácido abscísico e etileno (Figura 1).

Figura 1. Estruturas moleculares dos principais hormônios vegetais



(Fonte: próprio autor)

A cinetina recebeu esta denominação em função de sua habilidade em ativar a divisão de células vegetais *in vitro* (citocineses) (LOMIN et al., 2012). Posteriormente a sua descoberta, outras substâncias com estruturas e atividades similares foram identificadas e classificadas como citocininas. Em função dos diversos impactos positivos que essas substâncias exercem sobre o desenvolvimento vegetal, as citocininas passaram a ser muito estudadas visando aplicação potencial como reguladores de crescimento vegetal. No entanto, esses fito-hormônios ainda não possuem uma posição relevante entre as formulações agroquímicas comercializadas, muito em função da complexidade de interpretação de seus efeitos. Os produtos comumente utilizados na agricultura para regulação de crescimento vegetal são formulações que contém misturas de diversas classes de fito-hormônios (auxinas, giberelinas, citocininas e ácido abscísico) e substâncias que regulam a biossíntese e metabolismo dos hormônios (KOPRNA et al., 2016). Em função do seu alto potencial de induzir efeitos agrônômicos desejados e a necessidade de maior compreensão sobre a interação entre o hormônio e o metabolismo vegetal, as citocininas são o tema central do presente trabalho de pesquisa.

1.2. CITOCININAS

Uma breve descrição sobre a química, bioquímica e metabolismo das citocininas será apresentada a seguir, passando por aspectos estruturais das moléculas citadas na literatura, biossíntese, transporte e regulação dos níveis hormonais dentro do vegetal.

1.2.1. A química das Citocininas

Estruturalmente, as citocininas podem ser classificadas em derivados de adenina, ocorrendo naturalmente nos vegetais, e em derivados de ureia, de origens sintéticas (também citadas como substâncias tipo-citocinina, do inglês "*cytokinin-like*").

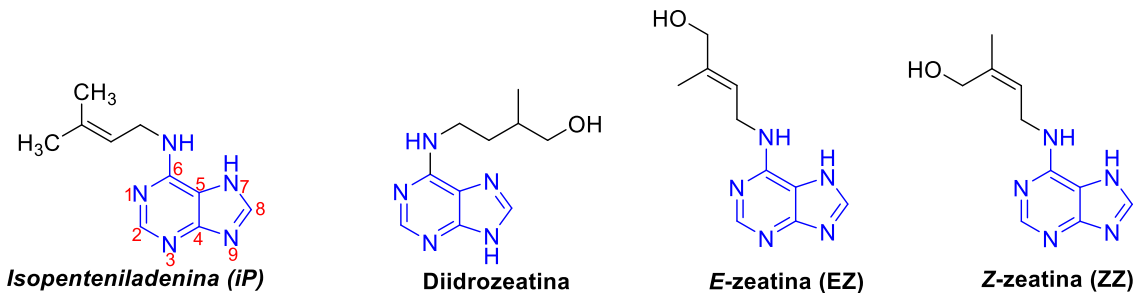
1.2.1.1. Derivados de adenina

Nas plantas, as citocininas de ocorrência natural são derivadas de adenina (Figura 2). De acordo com a estrutura da cadeia lateral, são classificadas como

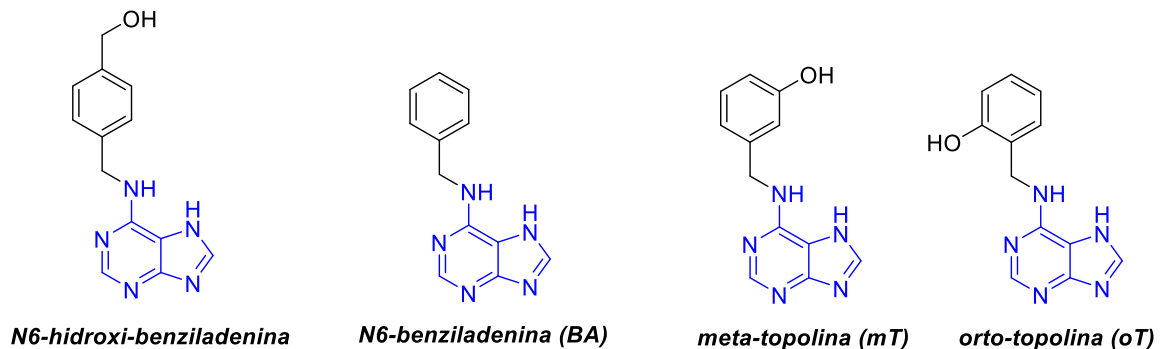
citocininas isoprenóides ou aromáticas. As isoprenóides possuem uma cadeia lateral isopentenila, por exemplo, a isopentenil adenina (iP) e a zeatina, podendo apresentar-se como *Z* ou *E*-zeatina (ZZ e EZ, respectivamente) (Figura 2a). As citocininas aromáticas possuem um grupo benzila ou hidroxibenzila na posição N6, como a cinetina (Figura 1), N6-benziladenina (BA) e a topolina (Figura 2b). Essa última classe apresenta representantes endógenos de alta atividade, tais como: *orto*-topolina (*oT*), *meta*-topolina (*mT*) (Figura 2b) e derivados metoxílicos da BA (FENG et al., 2017).

Figura 2. Estruturas químicas das citocininas de ocorrência natural derivadas de adenina (destacada em azul, com a numeração do núcleo purínico em vermelho), a) citocininas isoprenóides e b) citocininas aromáticas

a)



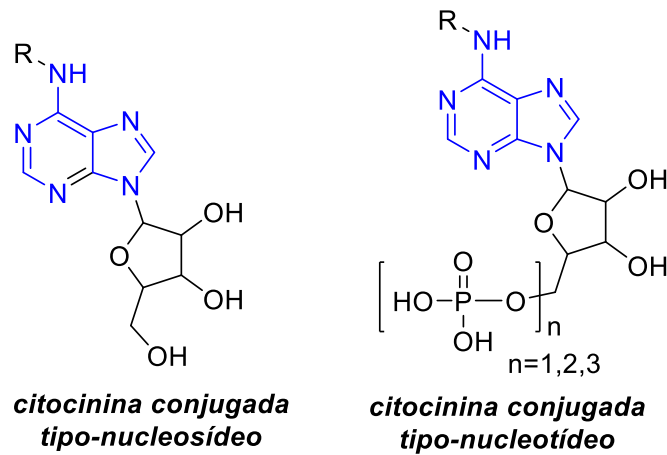
b)



(Fonte: próprio autor)

As citocininas são geralmente encontradas nas plantas como bases livres, consideradas como as formas ativas (Figura 2), ou em conjugação com moléculas de nucleosídeos e nucleotídeos, neste caso são referidas como formas inativas (Figura 3) (FENG et al., 2017).

Figura 3. Estruturas químicas genéricas de citocininas conjugadas. Porção adenina destacada em azul



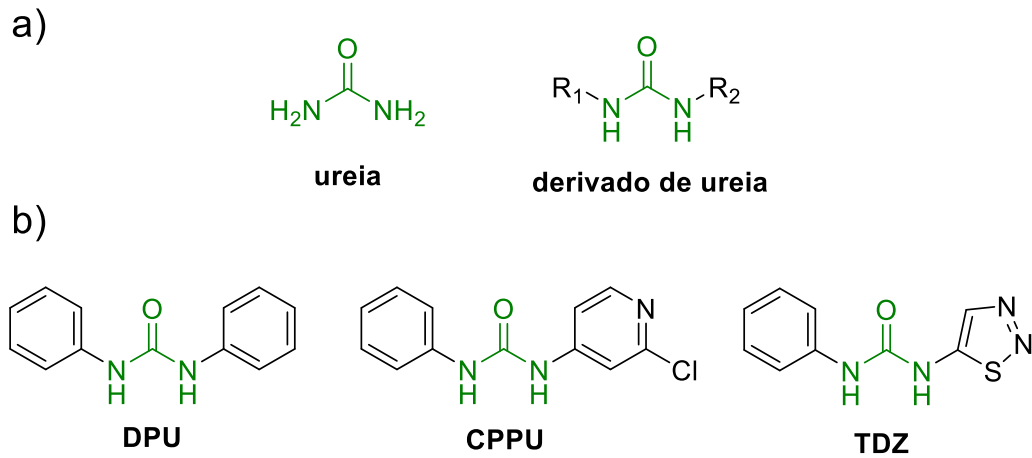
(Fonte: próprio autor)

A zeatina (Figura 2a) é a citocinina livre de ocorrência natural mais abundante, porém a diidrozeatina (DHZ) (Figura 2a) e a isopentenil adenina (iP) (Figura 2a) são igualmente encontradas nos vegetais superiores e nas bactérias. Os locais de síntese de citocininas são os meristemas das raízes, embrião de sementes em desenvolvimento, folhas e frutos jovens (HABERER; KIEBER, 2002).

1.2.1.2. Derivados de ureia

Derivados sintéticos de ureia (Figura 4) foram identificados com atividades biológicas semelhantes às citocininas naturais, sendo portanto classificados como substâncias “tipo-citocinina” (em inglês “cytokinin like”) (RICCI; BERTOLETTI, 2009). Alguns representantes dessa classe são: 1,3-difenilureia (DPU), *N*-fenil-*N'*-(2-cloro-4-piridil)ureia (forclorofenuron, CPPU) e *N*-fenil-*N'*-(1,2,3-tiadiazol-5-il)ureia (tidiazuron, TDZ) (Figura 4b), que são extensivamente utilizados em estudos de morfogêneses *in vitro*, dado que possuem atividade como citocinina geralmente até maior que compostos do tipo adenina (RICCI; BERTOLETTI, 2009).

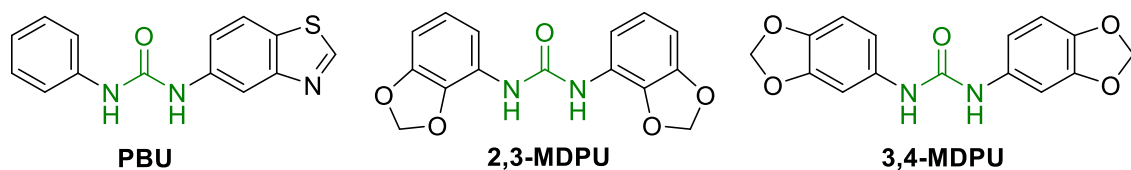
Figura 4. Estruturas químicas de: a) ureia e seus derivados (representação genérica); b) citocininas do tipo ureia. A porção ureia destacada em verde



(Fonte: próprio autor)

Ricci et al (2009) e Koprna et al. (2016) apresentam uma revisão bibliográfica extensa citando diversas substâncias que foram sintetizadas e avaliadas *in vitro* em cultura de tecidos, visando verificar as suas influências sobre a divisão celular de caules de tabaco, o retardamento da senescência em rabanete, a germinação de sementes de alface e o desenvolvimento de brotos laterais em ervilha. Por exemplo, a *N*-fenil-*N'*-(benzotiazol-6-il)ureia (PBU) (Figura 5) demonstrou maior atividade que o TDZ no teste de determinação da concentração de clorofila e no teste de regeneração de cotilédone de tomate. A *N,N'*-bis-(2,3-metilenodioxifenil)ureia (2,3-MDPU) e a *N,N'*-bis-(3,4-metilenodioxifenil)ureia (3,4-MDPU) (Figura 5) incrementaram a porcentagem de enraizamento de maçã por microcortes quando suplementadas sozinhas, ou a porcentagem de enraizamento de maçã por cortes na haste quando suplementadas simultaneamente com auxina exérgônica (RICCI; BERTOLETTI, 2009).

Figura 5. Estruturas químicas de algumas citocininas do tipo derivados de ureia. A porção ureia destacada em verde

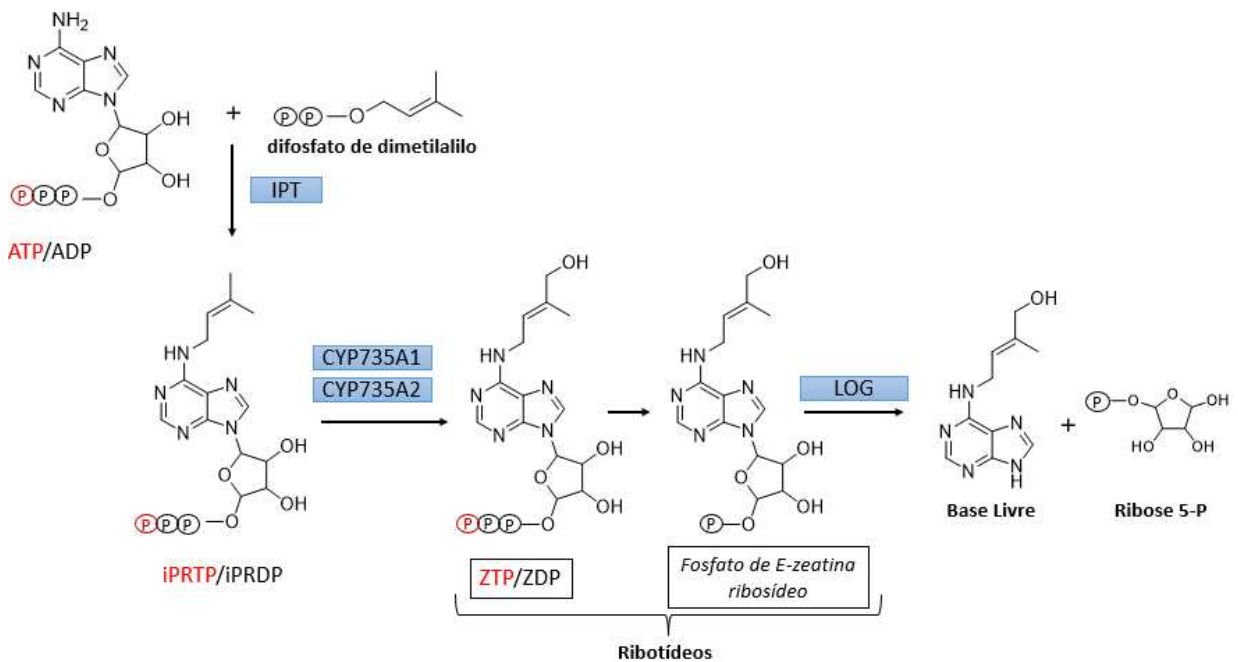


(Fonte: próprio autor)

1.2.2. O metabolismo das Citocininas

A biossíntese das citocininas se inicia com a adição de um grupo prenila derivado do difosfato de dimetilalilo, proveniente da via do Mevalonato, ao nitrogênio N6 do trifosfato de adenosina ou difosfato de adenosina (ATP/ADP). Esta reação bioquímica é catalisada por uma enzima isopentenil transferase (IPT) que é codificada por uma família de multigenes, por exemplo a sequência de *AtIPT1 a AtIPT9* em plantas de *Arabidopsis thaliana* (ARGUESO; FERREIRA; KIEBER, 2009). O ribotídeo de isopentenila resultante (iPRTP ou iPRDP) pode ser então convertido à citocinina do tipo *E*-zeatina via hidroxilação da cadeia lateral isoprenóide em um processo realizado pelas enzimas do citocromo P450 (CYP735A1 e CYP735A2). O hormônio ativo é obtido pela liberação da base livre pela ação da enzima 5-monofosfato fosfohidrolase, da família LOG (Esquema 1) (LOMIN et al., 2012).

Esquema 1. Representação da rota biossintética da *E*-zeatina

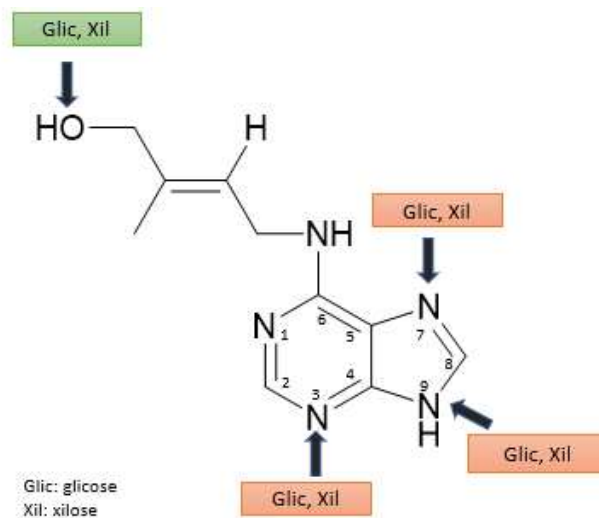


(fonte: adaptado de LOMIN et al., 2012)

Os níveis de citocininas ativas podem ser modulados via conjugação a um açúcar, comumente a glicose, como representado no Esquema 2, que exemplifica os possíveis pontos de conjugação da *E*-zeatina. As conjugações que ocorrem nos átomos de oxigênio da cadeia lateral (destacado em verde) resultam na inativação

reversível do hormônio, enquanto as conjugações que ocorrem nos átomos de nitrogênio da adenina (posições em laranja) são irreversíveis. Outro mecanismo de modulação dos níveis de citocininas nas plantas é o da quebra irreversível catalisado por enzimas conhecidas como citocininas oxidases ou oxi-redutases (CKO e CKX, respectivamente) (apresentado em detalhes na seção 1.3.1) (ARGUESO; FERREIRA; KIEBER, 2009).

Esquema 2. Exemplo de inativação de citocininas. Em verde é destacado o ponto de inativação reversível do hormônio e em laranja as conjugações irreversíveis

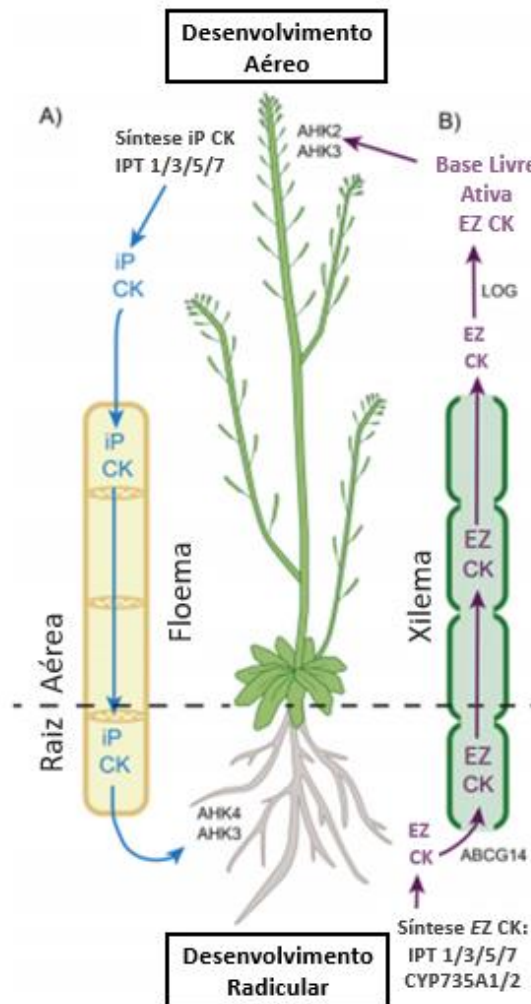


(fonte: adaptado de ARGUESO; FERREIRA; KIEBER, 2009)

As citocininas são sintetizadas em vários tipos de células nas raízes e parte aérea, ocorrendo transporte local e de longa distância dentro da planta, via xilema das raízes para os galhos (primariamente como *E*-zeatina-ribotídeos) e via floema no sentido inverso (principalmente como citocininas tipo iP). (O'BRIEN; BENKOVÁ, 2013).

Um esquema ilustrativo do transporte de citocinina é apresentado na Figura 6, na qual observa-se em A) a isopentenil-adenina (iP) sintetizada na parte aérea (folhas, galhos, caule) pela IPT1/3/5/7 e transportada para o sistema radicular via floema. Nas raízes, a iP é reconhecida pelos receptores AHK3 e AHK4 (*Arabidopsis* Histidina-Quinase), promovendo o desenvolvimento radicular. Em B) A *E*-zeatina (EZ) é secretada no xilema e transportada para a parte aérea do vegetal. A EZ é então convertida em base livre ativa pelas enzimas LOG nas folhas. Na parte aérea, os receptores AHK2 e AHK3 reconhecem a EZ, que regula o desenvolvimento dos galhos.

Figura 6. O transporte das citocininas dentro do vegetal. Em azul o transporte via floema, das folhas para as raízes, e em violeta o transporte via xilema, das raízes para a parte aérea do vegetal

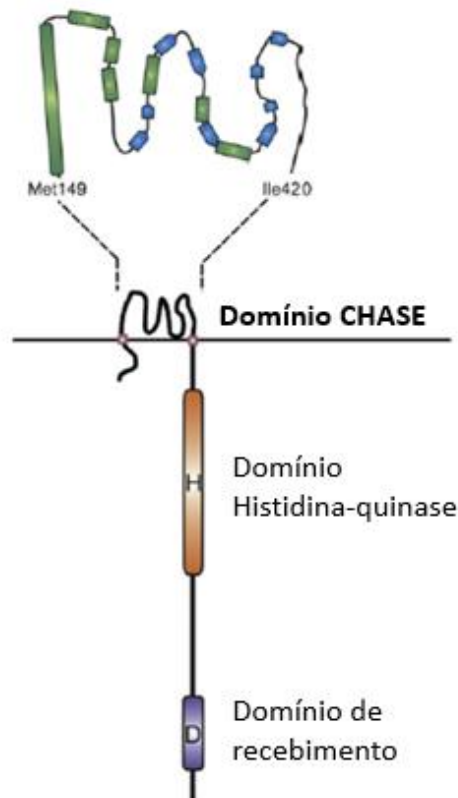


(fonte: adaptado de WHEELDON; BENNETT, 2021)

O caminho da percepção e transdução de sinais induzidos pelas citocininas envolve uma fosforilação Histidina-Aspartato, similar ao encontrado nos sistemas de sinalização de dois componentes em bactérias, que são as rotas principais pelas quais esses organismos respondem aos estímulos do ambiente (INOUE et al., 2001). Os dois componentes-chave nesses sistemas bacterianos de sinalização são: um receptor quinase localizado na membrana que percebe o estímulo do ambiente e um regulador responsivo que propaga o sinal. A transdução do sinal ocorre via fosfotransferência entre um resíduo histidina do receptor quinase e um resíduo aspartato no domínio receptor do regulador de resposta (Figura 7) (KIEBER; SCHALLER, 2018).

Os receptores de citocinina HK (histidina-quinase) possuem um domínio de ligação de citocinina extracitosólico denominado CHASE (*cyclases/histidine kinases-associated sensing extracelular*), ao menos dois domínios transmembrana, uma região citosólica contendo um domínio histidina-quinase, um domínio de recebimento canônico e um domínio de recebimento que, provavelmente, não atua na fosfotransferência. A localização do domínio CHASE na membrana do retículo endoplasmático (RE), sugere que o local de ligação da citocinina em plantas é o lúmen do RE (INOUE et al., 2001).

Figura 7. Estrutura do domínio do CRE1 (receptor de citocinina 1, em *Arabidopsis thaliana*)



(fonte: adaptado de HEYL et al., 2007)

1.3. ALVOS MOLECULARES DAS CITOCININAS

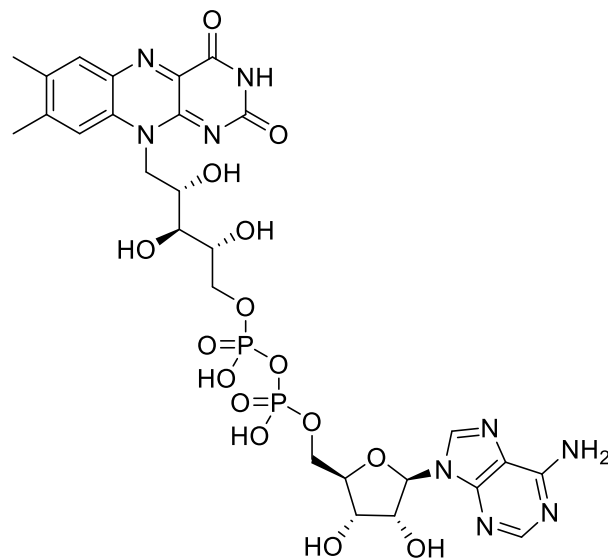
Embora as citocininas tenham seus efeitos comprovados como hormônio vegetal, por muito tempo os mecanismos moleculares através dos quais esses hormônios regulam a fisiologia vegetal foram desconhecidos. Apenas a partir dos anos 2000, observou-se uma evolução nesse entendimento, com a descoberta dos receptores desses hormônios vegetais. Além disso, outros possíveis alvos

moleculares das citocininas foram relatados, como por exemplo as enzimas de degradação (citocinina oxidase/desidrogenase), responsáveis por regular os níveis hormonais nos diferentes tecidos vegetais e proteínas citosólicas responsáveis pelo transporte no apoplasto. A seguir, serão apresentados dois possíveis alvos moleculares presentes nos vegetais para a ação das citocininas.

1.3.1. Enzima Citocinina Oxidase/Desidrogenase (CKO e CKX)

A degradação irreversível das citocininas é mediada por enzimas conhecidas como citocininas oxidases/desidrogenases (CKO/CKX), pertencentes ao grupo das flavoproteínas oxidoredutases. Essa classe de enzimas é caracterizada por conter uma ligação, covalente ou não, com o cofator dinucleotídeo de flavina e adenina, FAD (Figura 8) (POPELKA et al., 2016).

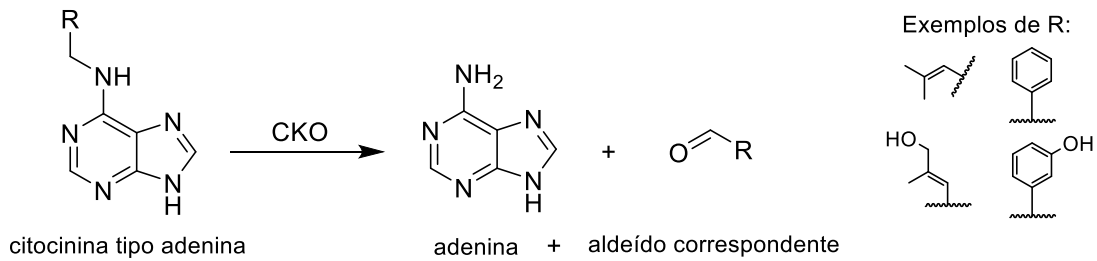
Figura 8. Estrutura molecular do FAD



(Fonte: próprio autor)

A CKO cliva a cadeia lateral de isoprenóide (ou aromática) da iP, ZZ, EZ e seus ribosídeos (iPR, ZZ-R e EZ-R) levando à adenina/adenosina e ao aldeído correspondente (Esquema 3) (MOTYKA et al., 1996).

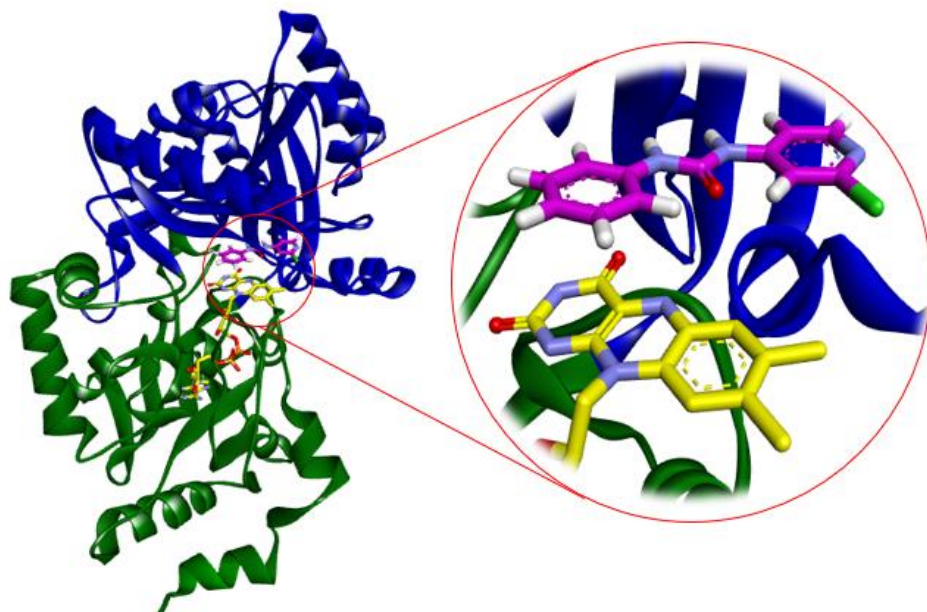
Esquema 3. Reação química de oxirredução de uma citocinina tipo adenina catalisada pela enzima CKO



(Fonte: próprio autor)

A enzima presente na espécie de milho denominada *Zea mays* citocinina oxidase 1 (ZmCKO1) é uma flavoproteína encontrada no apoplasto (ZALABÁK et al., 2016), monomérica e glicosilada com massa molecular de 63 kDa. A estrutura cristalina da ZmCKO1 (RCSB PDB: 2QKN, resolução 2,15 Å) (Figura 9) mostra que a enzima é composta por dois domínios: a região de ligação do cofator (resíduos 40–244 e 492–534) e o domínio de ligação do substrato (resíduos 245–491). Os substratos, assim como os inibidores, não induzem a alterações conformacionais durante a ligação ao sítio ativo (MALITO et al., 2004).

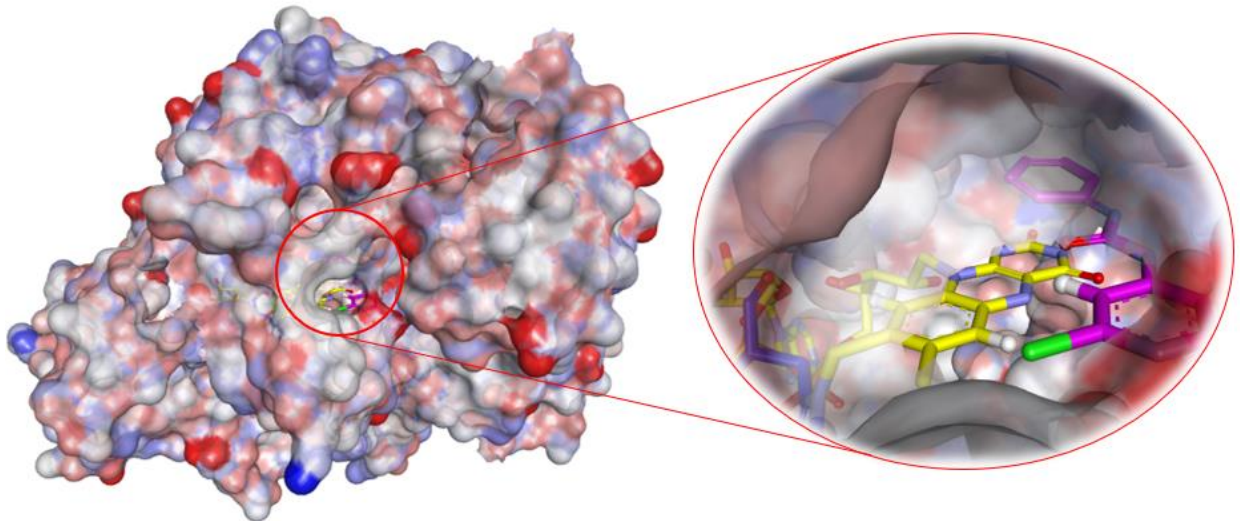
Figura 9. Estrutura da enzima ZmCKO1 (em verde o domínio de ligação do cofator e em azul o do substrato) co-cristalizada com o inibidor CPPU (em bastões violeta), e uma aproximação destacando o inibidor e parte da estrutura do cofator FAD (em bastões amarelos) (RCSB PDB: 2QKN)



(fonte: próprio autor)

Existe uma passagem em formato de túnel pela superfície da proteína que leva ao sítio ativo, a qual consiste de uma cavidade interna situada acima do anel isoaloxazínico do cofator FAD, ligado covalentemente a His105 (Figura 10) (POPELKA et al., 2016). Kopečný e colaboradores mostraram que o Asp169 está envolvido na atividade catalítica da enzima e identificaram o Glu381 como um resíduo-chave para a especificidade enzimática, que restringe a ligação de substratos e da quinona como acceptor de elétrons (KOPEČNÝ et al., 2016).

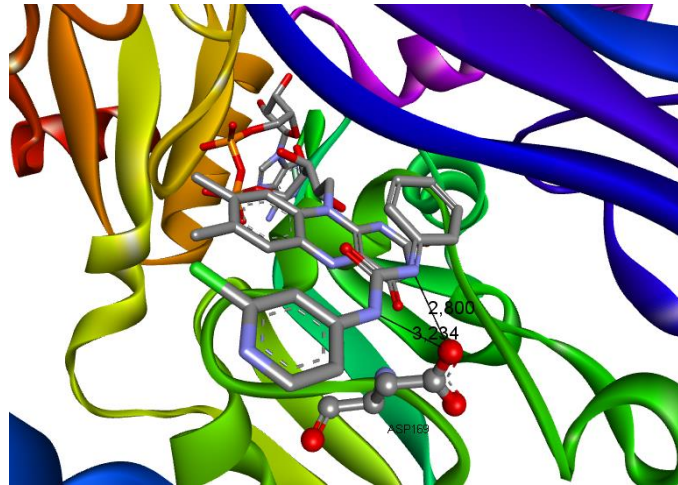
Figura 10. Túnel que leva ao sítio ativo da enzima ZmCKO1. Em violeta está representada a molécula do inibidor (CPPU). Em amarelo está o FAD e em azul a His105



(fonte: próprio autor)

Os ligantes da ZmCKO1 se ligam através de um modelo “*plug-into-socket*” e o Asp169 estabelece ligação de hidrogênio com o grupo amino do substrato (POPELKA et al., 2016) (Figura 11).

Figura 11. Ligações de hidrogênio (linhas pretas, distâncias de 2,800 e 3,234 Å) formadas entre o Asp169 (bolas e bastões) e os dois grupos amino da porção ureia da CPPU (bastões)



(Fonte: próprio autor)

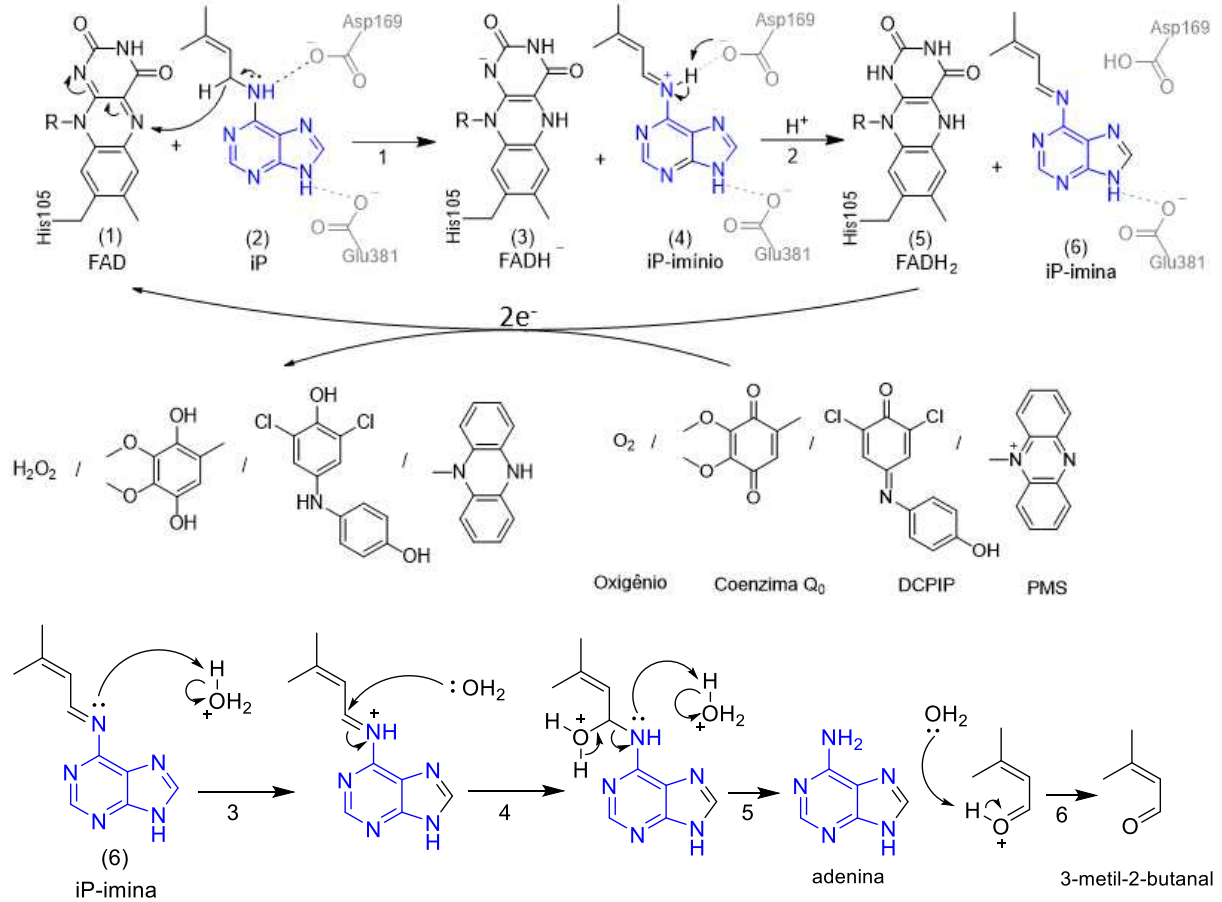
De um modo geral, durante a reação enzimática, a citocinina do tipo adenina (2), substrato natural das CKO, é oxidada a uma imina intermediária (3) e hidrolisada em sequência (etapa 3) (Esquema 4). O FADH₂ reduzido é então reoxidado ou por oxigênio molecular (modo de oxidase) ou por compostos do tipo quinona (modo de desidrogenase), sendo esta a etapa limitante da velocidade da reação catalítica (POPELKA et al., 2016).

No modo de oxidase, a CKO catalisa a produção de uma molécula de H₂O₂ para cada substrato de citocinina, já no modo de desidrogenase a enzima se comporta como uma quinona redutase. Enquanto o 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP), o metassulfato de fenazina (PMS), a 2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona (coenzima Q0) e compostos correlatos são conhecidos por funcionarem como eficientes aceptores de elétrons exógenos, outras substâncias como a 2,4-dihidroxi-7-metoxil-1,4-benzoxazinona (DIMBOA), o 5-metoxi-2-itosofenol (coniferron) e radicais livres originários de suas oxidações atuam como aceptores naturais de elétrons no floema do milho (POPELKA et al., 2016).

No Esquema 4, a iP (2) é oxidada à uma imina intermediária (6) na etapa 2. O Asp169 (numeração da ZmCKO1) polariza a amina secundária do substrato facilitando a transferência de dois elétrons e um próton do substrato para o cofator FAD (1), enquanto o Glu381 forma uma ligação de hidrogênio com um dos NH da adenina. A imina resultante (6) é hidrolisada ao aldeído correspondente e adenina (etapas 3, 4, 5 e 6). O FAD (1) reduzido a FADH₂ (5) é então reoxidado pelo oxigênio

com liberação de H_2O_2 (modo de oxidase) ou por algum outro acceptor de elétrons como a Coenzima Q_0 , DCPIP e PMS (modo desidrogenase) (BILYEU et al., 2001)

Esquema 4. Mecanismo de reação da CKO exemplificado com a isopentenila adenina (iP) como substrato (adaptado de MALITO et al., 2004)



(fonte: adaptado de MALITO et al., 2004)

Devido ao seu importante papel para regulação do crescimento vegetal, alguns estudos na literatura relatam estudos cinéticos com essa enzima. A Tabela 1 lista os valores de k_m de algumas citocininas para CKO nativas e recombinantes, sendo que essa medida está relacionada com a afinidade do substrato pela enzima, quanto menor o valor de k_m , maior é a afinidade. Os valores de k_{cat} são apresentados apenas para a enzima recombinante e são baseados em dados de taxa precisos e no coeficiente de extinção molar da enzima. O k_{cat} fornece o número de moléculas de substrato convertidas em produto por uma molécula de enzima por unidade de tempo, considerando que a enzima está totalmente saturada com substrato. Com base nessas duas constantes calcula-se a razão k_{cat}/k_m , que é uma medida da eficiência catalítica. Os valores de k_m para a CKO recombinante e nativa são muito similares,

sendo a *E*-zeatina, a isopenteniladenina e a isopenteniladenosina bons substratos para ambas as enzimas (BILYEU et al., 2001).

Tabela 1. Especificidade de diferentes substratos com CKO nativa e recombinante (BILYEU et al., 2001)

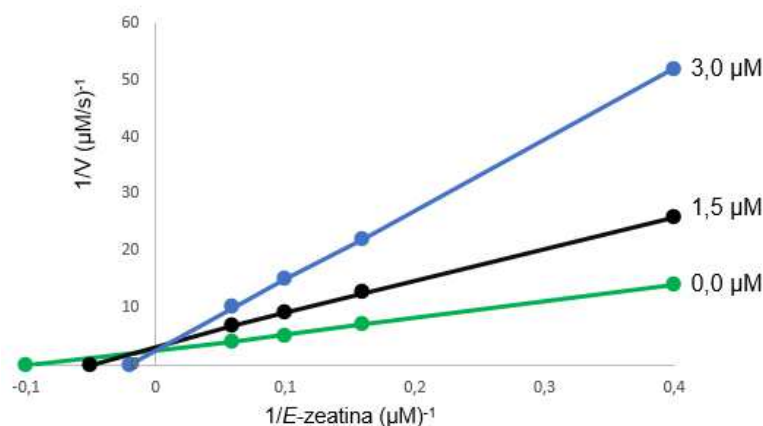
Substrato	Nativa (k_m)		Recombinante	
		k_m	k_{cat}	k_{cat}/k_m
		μM	s^{-1}	$\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
Isopenteniladenina	2,8	1,5	67,0	44,60
<i>E</i>-zeatina	11,0	14,0	126,0	9,00
Isopenteniladenosina	15,0	11,0	48,0	4,40
Z-zeatina	n.d. ^a	46,0	17,0	0,37
<i>E</i>-zeatina ribosídeo	n.d.	54,0	18,0	0,34

^a n.d., atividade não determinada

(fonte: BILYEU et al., 2001)

As citocininas derivadas de ureia são capazes de inibir as CKO. A CPPU e o tidiazuron inibiram de maneira competitiva a CKO de calos de soja em estudos de morfogênese. Na Figura 12, observa-se a curva de Lineweaver-Burk para a zeatina como substrato e a CPPU como inibidor. O resultado indica que a inibição é competitiva em relação ao substrato (BILYEU et al., 2001).

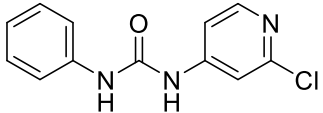
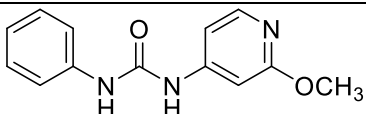
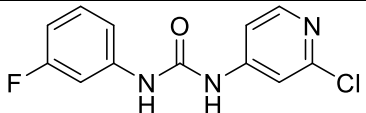
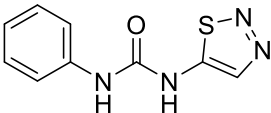
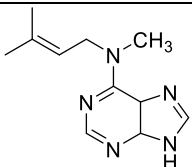
Figura 12. Inibição da atividade da CKO pela CPPU em diferentes concentrações. Sem CPPU em verde, 1,5 μM em preto e 3,0 μM em azul. A intersecção no eixo das ordenadas indica inibição competitiva



(fonte: adaptado de BILYEU et al., 2001)

Outros inibidores testados também apontaram para o mesmo tipo de inibição. As estruturas e os valores de k_i estão listados na Tabela 2. A F-PU apresentou o menor k_i (0,1 μM). Observou-se boa correlação entre a alta atividade biológica destes derivados de ureia *in vivo* e o baixo valor de k_i para inibição da oxidase *in vitro*. (BILYEU et al., 2001)

Tabela 2. Estruturas e valores de k_i para inibidores da CKO

Substância	Estrutura	k_i
CPPU		3,0
Metoxi-PU		3,0
F-PU		0,1
Tidiazuron		8,0
Me-iP		12,0

(fonte: adaptado de BILYEU et al., 2001)

1.3.2. *Arabidopsis thaliana* Histidina Quinase 4 (AHK4)

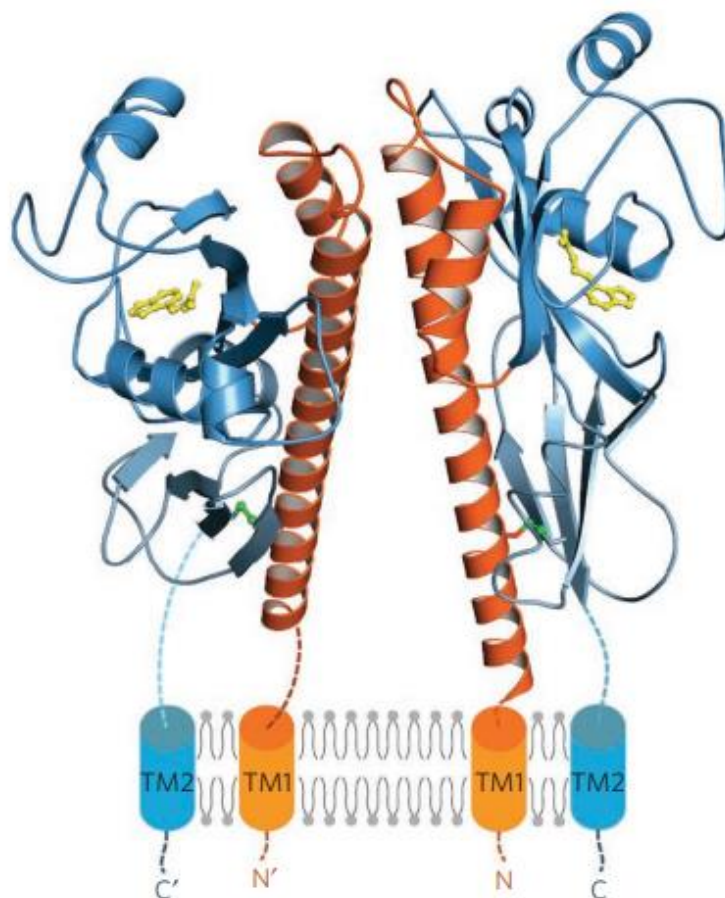
Um conjunto de receptores eucarióticos histidina quinases atuam como receptores de membranas em plantas. O membro dessa família de receptores mais profundamente estudado é o *Arabidopsis* histidina quinase 4 (AHK4), que contém um módulo citoplasmático de histidina quinase e um domínio sensorial de aproximadamente 270 resíduos, que formam o sítio de ligação das citocininas (HEYL et al., 2007).

O AHK4 pode se ligar tanto com citocininas naturais como com as sintéticas derivadas de ureia, com afinidade nanomolar. Esse receptor também consegue

diferenciar entre diferentes tipos de conjugados de citocininas, os quais ocorrem naturalmente em função de modificações enzimáticas que efetivamente bloqueiam a ação das citocininas *in vivo* (BAJGUZ; PIOTROWSKA, 2009).

A cadeia *N*-terminal do receptor AHK4 dobra em uma longa haste em hélice seguida por dois domínios do tipo PAS (“*Per-Arnt-Sim*”), que são ligados por um conector helicoidal. O domínio PAS é conhecido por atuar na percepção e interação em proteínas de transdução de sinais, detectando um grande número de estímulos químicos e físicos (MÖGLICH; AYERS; MOFFAT, 2009). A última folha β do domínio PAS membrana-proximal é covalentemente ligada ao *N*-terminal da haste em hélice por pontes de dissulfeto, que mantém as hélices laterais na membrana em proximidade (Figura 13) (HOTHORN; DABI; CHORY, 2011).

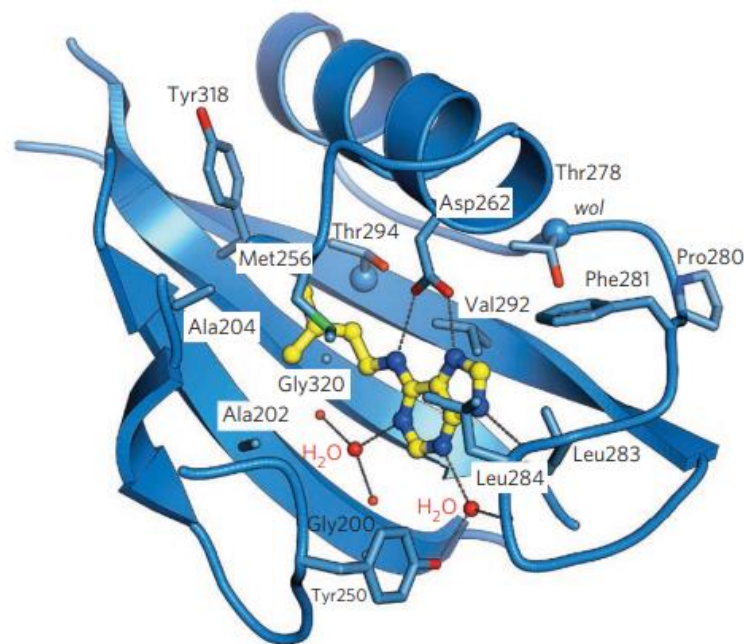
Figura 13. Representação da estrutura tridimensional do receptor AHK4. Duas moléculas de *N*-isopentenil adenina (em amarelo) estão ligadas nos sítios ativos do receptor.



(fonte: HOTHORN; DABI; CHORY, 2011)

Em complexo com a iP, o bolsão de ligação do AHK4 é ocupado pela porção adenina do hormônio e sua cauda de isopentenila, que são encontradas inseridas profundamente na cavidade (Figura 14). A metade inferior do sítio de ligação é formada pela folha β central do domínio PAS e é revestido por pequenos resíduos hidrofóbicos (HOTHORN; DABI; CHORY, 2011).

Figura 14. Interações moleculares realizadas pela iP (em bolas e bastões amarelos) com sítio de ligação do AHK4 (resíduos de aminoácidos em azul)

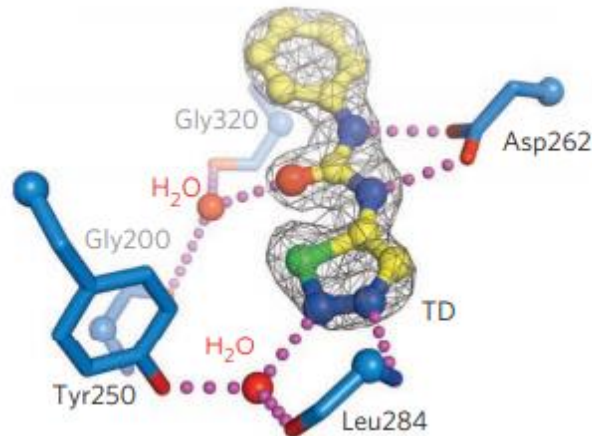


(fonte: HOTHORN; DABI; CHORY, 2011)

Duas folhas β formam a metade superior do bolsão e contribuem com contatos hidrofóbicos adicionais. Ligações de Hidrogênio são estabelecidas entre o Asp262 e o anel de adenina, sendo que essas interações podem ser consideradas críticas para o funcionamento do receptor (HOTHORN; DABI; CHORY, 2011).

A estrutura do AHK4 em complexo com o tidiazuron, mostra que o mesmo sítio de ligação é ocupado (Figura 15). O anel fenila do ligante se acomoda no bolsão, e o grupo tidiazol mimetiza o anel de adenina. A fração ureia do tidiazuron e o grupo tidiazol estabelecem interações polares com Asp262 e Leu284, respectivamente, que são muito similares às observadas nos complexos com as citocininas do tipo adenina (HOTHORN; DABI; CHORY, 2011).

Figura 15. Interações moleculares realizadas pelo tidiazuron com sítio de ligação do AHK4



(fonte: HOTHORN; DABI; CHORY, 2011)

O estudo da ação de substâncias com potencial ação citocinínica sobre diferentes alvos moleculares, por exemplo as enzimas CKO e receptores AHK aqui apresentados, contribui para uma maior probabilidade de se observar a ação desses compostos na prática, influenciando etapas do desenvolvimento vegetal. Brunoni e colaboradores (2021) apresentam a abordagem de dupla função para moléculas derivadas de ureia, como inibidores da ZmCKO1 e ligantes do receptor AHK4, obtendo resultados *in vitro*, *in vivo* e por simulações computacionais que apontam fortemente para a habilidade destes derivados de ureia atuarem como “adjuvantes” capazes incrementar a ação das citocininas naturais (BRUNONI et al., 2021).

1.4. EFEITOS AGRONÔMICOS DAS CITOCININAS

Observa-se um progresso substancial a respeito da elucidação do mecanismo molecular de ação das citocininas a partir dos anos 2000. O sequenciamento do genoma da planta modelo *Arabidopsis thaliana* colaborou de forma decisiva para a obtenção de respostas ligadas ao tema. A descoberta dos receptores, componentes chave na transdução e recepção de sinais hormonais, foi de significância particular (LOMIN et al., 2012).

O aumento nos níveis de citocinina, em resposta à redução da expressão do gene CKO/CKX tem sido relacionada com o aumento na produtividade de grãos em variedades de arroz (ASHIKARI et al., 2005), e a destruição dos genes CKO/CKX em

Arabidopsis thaliana leva ao aumento na produtividade de sementes (BARTRINA et al., 2011).

As citocininas também regulam a arquitetura das raízes, atuando para inibir a formação de radículas laterais e alongamento da raiz primária, podem também modular a função do sistema radicular através da regulação da expressão de proteínas de captação e transporte de nutrientes. Finalmente, a citocinina age em conjunto com a auxina (por exemplo o IBA) para regular o desenvolvimento vascular, sendo que a citocinina promove o desenvolvimento do floema enquanto a auxina regula o desenvolvimento do xilema, através de um sistema de interação mutuamente inibitório (ARGUESO; FERREIRA; KIEBER, 2009).

A aplicação exógena de citocininas em diversas culturas de cereais tem sido estudada. Diversos efeitos foram relatados, desde aspectos particulares do desenvolvimento das plantas até a quantidade e peso dos grãos produzidos, com impacto direto na produtividade da colheita (KOPRINA et al., 2016).

O tratamento de sementes de trigo e cevada com benziladenina (BA) e cinetina (CIN), estimulou a produção de grãos quando as plantas foram submetidas a condições de estresse por salinidade do solo. Em arroz e milho, o tratamento das sementes com CIN levou ao incremento na capacidade de germinação (WANG; ZHANG; SMITH, 1996).

Nas culturas de sorgo e milho, a aplicação exógena de cinetina em vários estágios fenológicos do desenvolvimento foi estudada, observando-se aumento de germinação, produção de biomassa e produtividade de grãos. O tratamento de sementes e a pulverização em momentos iniciais do desenvolvimento apresentaram um efeito estimulante significativo especialmente em condições de stress abiótico. (WANG; ZHANG; SMITH, 1996)

Em leguminosas, é comum ocorrer o abortamento de uma porção significativa de flores polinizadas causando perdas importantes na produtividade final. Como é bem conhecido, as citocininas têm papel fundamental na regulação do florescimento e desenvolvimento de brotos (FARIDUDDIN; AHMAD; HAYAT, 2004). Baseado nesse fato, diversos estudos mostraram que a aplicação exógena de citocininas, com destaque para a BA, durante a etapa reprodutiva previne o abortamento das flores e botões, e incrementa o peso das sementes e produtividade em soja e feijão-fava (PASSOS et al., 2008). Em lentilha, grão-de-bico e amendoim, a pulverização de cinetina, em conjunto com outras substâncias (por exemplo o IBA), nos estágios

iniciais do desenvolvimento das plantas ou no tratamento de sementes, levou ao aumento da formação de botões florais e produtividade (MADHUSUDHAN; SUDHAKAR, 2014).

Em hortifruti, a aplicação de BA exógena acelerou a floração na cultura do tomate, através da redução do tempo necessário para o desenvolvimento das flores. Em vegetais verdes, como o espinafre, observou-se um aumento substancial na biomassa da parte aérea e a mitigação de efeitos negativos induzidos por diferentes condições de stress. A combinação de BA com giberelina (GA) induziu um crescimento superior em tomate sob condições de stress abiótico (JACKSON; CAMPBELL, 1979).

A citocinina sintética tidiazuron (TDZ) é atualmente utilizada e registrada como um desfolhante para algodão e pode também aumentar o número de casulos, sem alterar a qualidade da fibra e a produtividade. A pulverização de BA e CIN induziram ao maior crescimento das plantas e qualidade das sementes e fibras de algodão, tanto em condições normais quanto sob stress abiótico (BURKE, 2011).

A pulverização de BA a 100 mg/L em macieiras duas semanas após a plena floração quando as frutas apresentavam diâmetros de 10 mm, resultou em aumento de peso e tamanho das maçãs, no entanto, algumas vezes sem efeito na produtividade final, ou seja, no número de frutas geradas por macieira (STERN; FLAISHMAN, 2003). Em pés de tangerina, a pulverização de CIN durante os estágios reprodutivos também resultou em frutas maiores e de melhor qualidade (KHALID et al., 2012). A Forclorfenuron (CPPU), citocinina sintética derivada de ureia, tem sido descrita como a mais efetiva para promover o aumento de tamanho de frutos em videiras (KOPRINA et al., 2016).

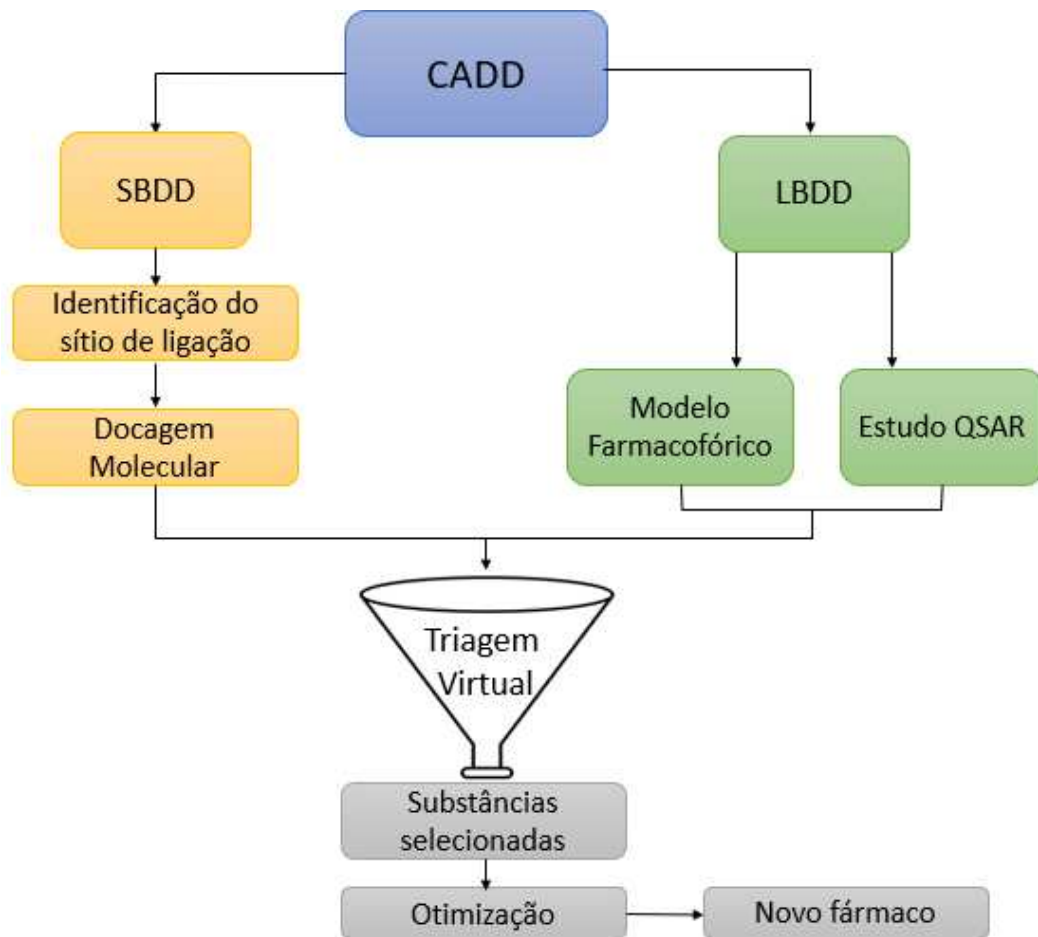
Estes trabalhos indicam claramente que o controle preciso dos níveis de citocinina em fases bem definidas do desenvolvimento vegetal, seja através de aplicação exógena ou controle endógeno, pode levar a melhores resultados agrônômicos e abrem caminho para o desenvolvimento de produtos agroquímicos baseados em citocininas e seus derivados para uso comercial.

1.5. MODELAGEM MOLECULAR

Atualmente, a descoberta de princípios ativos, fármacos e agroquímicos por exemplo, utiliza abordagens de bioquímica e modelagem molecular para uma eficiente

identificação e otimização de compostos líderes. A biologia e a bioquímica estão envolvidas na elucidação da função biológica do alvo molecular e os mecanismos de ação do modulador químico. Por outro lado, o desenho de fármacos (ou agroquímicos) assistido por computador (do inglês *computer-aided drug design* – CADD) faz uso do conhecimento das estruturas do alvo molecular (abordagem direta), de ligantes com atividades biológicas (abordagem indireta) ou de ambas as estruturas, para facilitar a seleção de compostos promissores (Esquema 5) (MACALINO et al., 2015).

Esquema 5. Fluxograma geral para o processo de desenho de fármacos (ou ingredientes ativos em geral) assistido por computador (CADD)



(fonte: adaptado de JAIN, 2017)

A modelagem molecular que não exige a informação sobre a topologia do alvo biológico, uma vez que o planejamento é baseado na estrutura do ligante, é chamada de indireta, ou em inglês *“Ligand-based drug design”* (LBDD). Enquanto na abordagem direta, conhecida em inglês como *“Structure-based drug design”* (SBDD), o planejamento é realizado baseado na estrutura do receptor, onde é necessário se

adquirir o conhecimento do arranjo topológico da macromolécula em estudo (Esquema 5). As informações da estrutura tridimensional (3D) do alvo molecular podem ser adquiridas por análise das estruturas obtidas por cristalografia de raio-X e RMN depositadas em bancos de dados como o Protein Data Bank (PDB) ou por construções de modelos por homologia (PICCIRILLO; DO AMARAL, 2018).

Os principais métodos aplicados na abordagem indireta (Esquema 5) são: relação quantitativa estrutura/atividade, do inglês “*Quantitative structure–activity relationship*” (QSAR), que se baseia na premissa de que mudanças na bioatividade estão associadas com variações estruturais e moleculares dentro de uma coleção de ligantes; modelo farmacofórico, cujo objetivo é identificar compostos com diferentes estruturas, porém com arranjo 3D dos grupos funcionais de interação similares (MACALINO et al., 2015).

Embora existam os métodos indiretos, a abordagem mais amplamente utilizada em CADD é a direta, ou seja, aquela que se baseia na estrutura conhecida do alvo molecular, sendo a docagem molecular (do inglês, *molecular docking*), a técnica mais comumente aplicada.

1.5.1. Docagem Molecular e Triagem Virtual

O método de docagem molecular é capaz de prever possíveis modos de ligação de um composto em um sítio de ligação específico e estimar a sua afinidade, baseado na conformação e orientações (pose) calculadas e, conseqüentemente, na complementaridade do ligante com o sítio ativo. A pontuação (do inglês, *score*) da ligação e a classificação dos compostos docados são etapas cruciais para realização da triagem virtual (em inglês, *virtual screening* - VS) (HUNG; CHEN, 2014). O VS se baseia na utilização de bibliotecas de pequenas moléculas para identificar compostos com bioatividade específica, e para possivelmente atuarem como substitutos para os ligantes existentes de um alvo biológico, ou mesmo na descoberta de novos ligantes para alvos pouco explorados, porém com conhecidas informações estruturais (MACALINO et al., 2015).

Vários programas de docagem molecular estão disponíveis, e diferem entre si em relação às suas funções de pontuação, classificadas como funções empíricas, baseadas em campo de força ou em conhecimento, utilizadas para estimar a afinidade

de interação entre o ligante e a macromolécula em cada pose (soluções) obtida pelo processo de docagem; e funções de busca, cujos métodos de busca utilizados nos algoritmos no processo de docagem molecular classificam-se como métodos sistemáticos, determinísticos e estocásticos (PICCIRILLO; DO AMARAL, 2018).

A busca sistemática utiliza um método de crescimento da molécula dentro do sítio ativo a partir de incremento e avaliação. O ligante é fragmentado em um núcleo rígido e cadeias laterais flexíveis, após o posicionamento do núcleo as cadeias laterais são incluídas de forma incremental, considerando sua amostragem em relação aos seus graus de liberdade. A busca determinística caracteriza-se pela produção da nova conformação a partir da estrutura inicial do ligante, garantindo a convergência para um mínimo de energia devido a utilização da dinâmica molecular (HALPERIN et al., 2002).

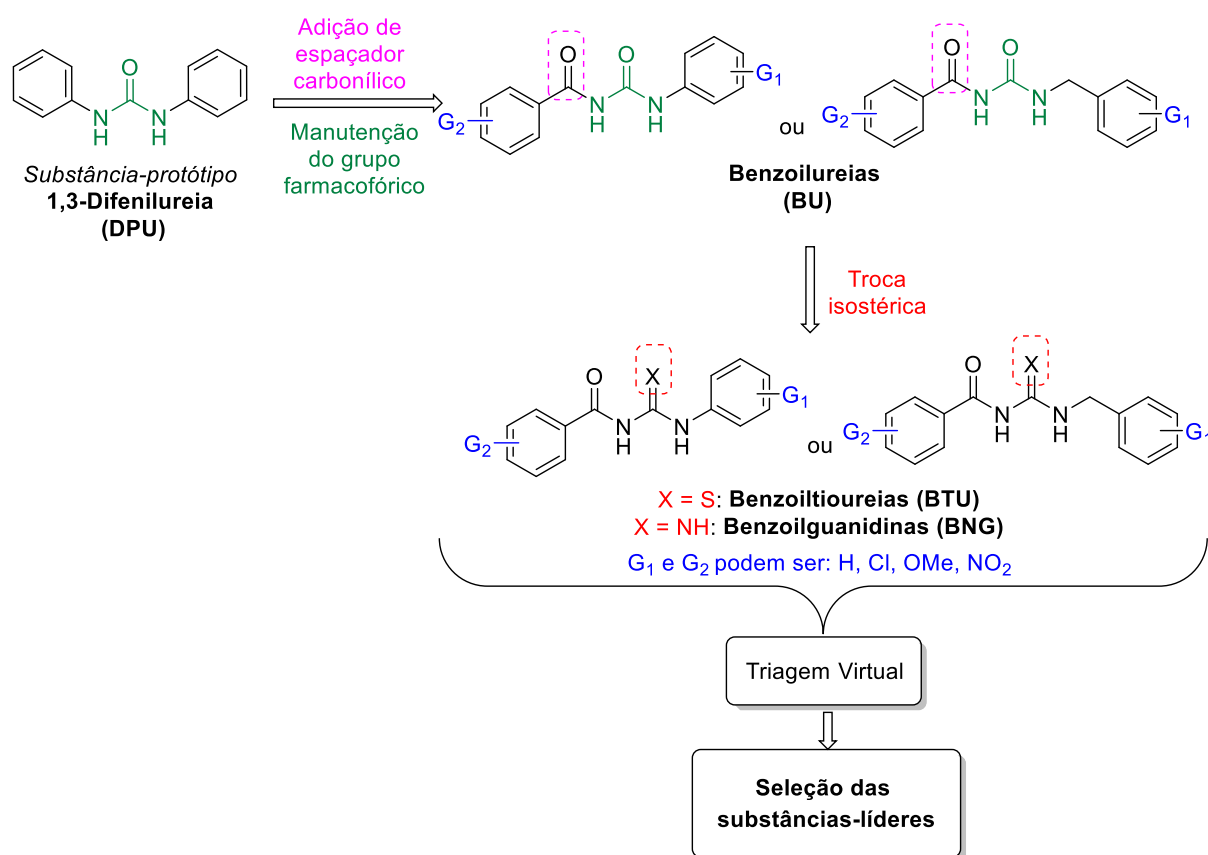
Já os métodos estocásticos utilizam abordagens como Monte Carlo e algoritmos genéticos, que consistem em fazer uma modificação aleatória e teste posterior, baseando-se na teoria de evolução de Darwin, da evolução das espécies. Assim, populações de poses do ligante (cromossomos) formados por diferentes ângulos diedros e vetores translacionais e rotacionais (genes) evoluem até mutações ou cruzamentos entre si. Populações melhores pontuadas são usadas para reproduzir novas populações, repetidamente, até atingir determinado critério. Exemplos de programas que usam algoritmo genético são o AutoDock, AutoDock Vina, GOLD (do inglês, “Genetic Optimization for Ligand Docking”), e DockThor (HALPERIN et al., 2002) (MUNIZ, 2018) (PICCIRILLO; DO AMARAL, 2018).

O software empregado no presente trabalho foi o GOLD, desenvolvido pelo Centro de Dados Cristalográficos de Cambridge (em inglês, “Cambridge Crystallographic Data Centre” – CCDC). Esta escolha é pautada no fato do programa utilizar variações do algoritmo genético na busca de uma população de possíveis poses (soluções), o que torna a etapa de cálculos computacionais viáveis, em contrapartida do que seria observado na utilização de um método sistemático, por elevar o custo computacional de modo exaustivo devido aos graus de liberdade do ligante. Quatro funções de pontuação estão disponíveis no GOLD, sendo elas empíricas como a ChemPLP (“Piecewise Linear Potential”) e ChemScore, baseadas em campo de força como a GoldScore, e baseadas em conhecimento como a ASP (“Astex Statistical Potential”) (JONES et al., 1997).

1.6. PLANEJAMENTO ESTRUTURAL

As substâncias utilizadas para o presente trabalho foram planejadas com base na substância-protótipo 1,3-difenilureia (DPU) através da introdução do grupamento carbonila como espaçador entre a porção ureia, gerando assim as respectivas benzoilureias (BU) correspondentes. Por meio de uma troca isostérica na estrutura das BU, o átomo de oxigênio da carbonila da ureia é substituído por um enxofre ou por um grupo NH, originando assim as análogas benzoiltioureias (BTU) e benzoilguanidinas (BNG), respectivamente. Com um intuito de se realizar um estudo de relação estrutura-atividade, são introduzidos substituintes com diferentes características estereo-eletrônicas na porção aminofenil e/ou benzoíla, através do qual, será possível mapear o grupo farmacofórico e os pontos-críticos para a atividade biológica, bem como identificar as substâncias-líderes por meio da triagem virtual baseada em docagem molecular

Esquema 6. Planejamento estrutural para a seleção de substâncias-líderes com potencial atividade citocinínica.



(fonte: próprio autor)

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho tem como objetivo selecionar substâncias derivadas de ureia, tioureia e guanidina previamente sintetizadas por nosso grupo de pesquisa como potenciais citocininas, através de modelagem molecular e ensaios agronômicos *in vivo*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

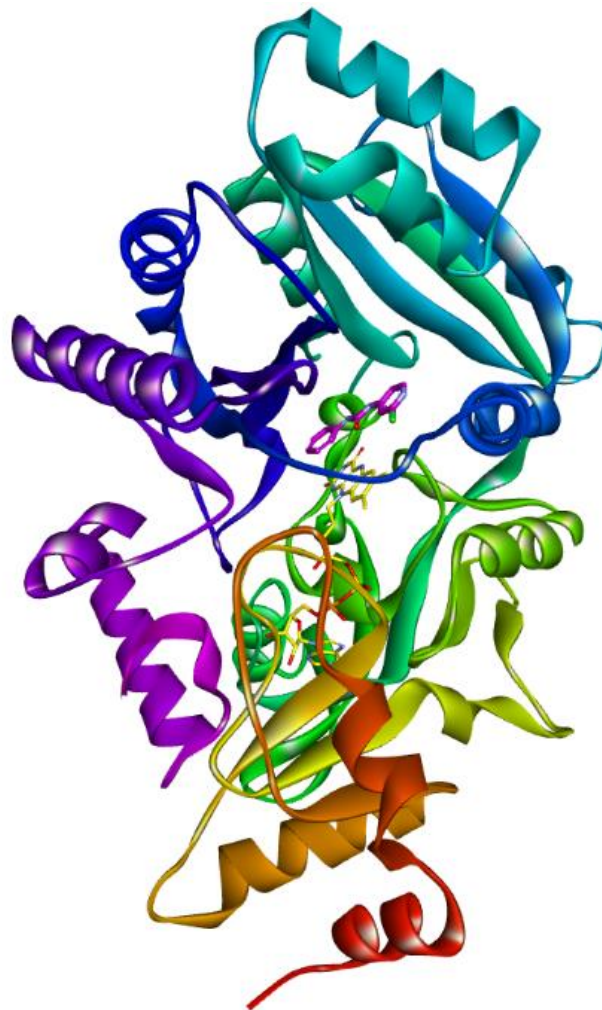
- Realizar uma triagem virtual baseada em docagem molecular a partir da quimioteca de compostos do LASMMed utilizando a enzima ZmCKO1 como alvo molecular.
- Estudar as interações ligante-alvo molecular dos compostos selecionados na triagem virtual com a ZmCKO1 por meio de docagem molecular.
- Executar uma análise *in silico* dos compostos selecionados na triagem virtual quanto a critérios *pesticide-likeness*.
- Estudar as interações ligante-alvo molecular dos compostos selecionados na triagem virtual com o receptor AHK4, utilizando a técnica de docagem molecular.
- Realizar um estudo *in vivo* dos dois compostos selecionados através de testes agronômicos em plantas de milho.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO DE DOCAGEM MOLECULAR

Existem alguns trabalhos na literatura que apresentam as estruturas das citocininas oxidases/desidrogenases provenientes da espécie *Zea mays*, foi possível obter no Banco de Dados de Proteínas (Protein Data Bank - PDB), disponibilizado pelo código 2QKN, a estrutura tridimensional da citocinina oxidase 1, na sua forma natural (*wild type*) complexada com o inibidor Forclorfenuron (CPPU) no sítio ativo, em resolução de 2,15 Å (Figura 16).

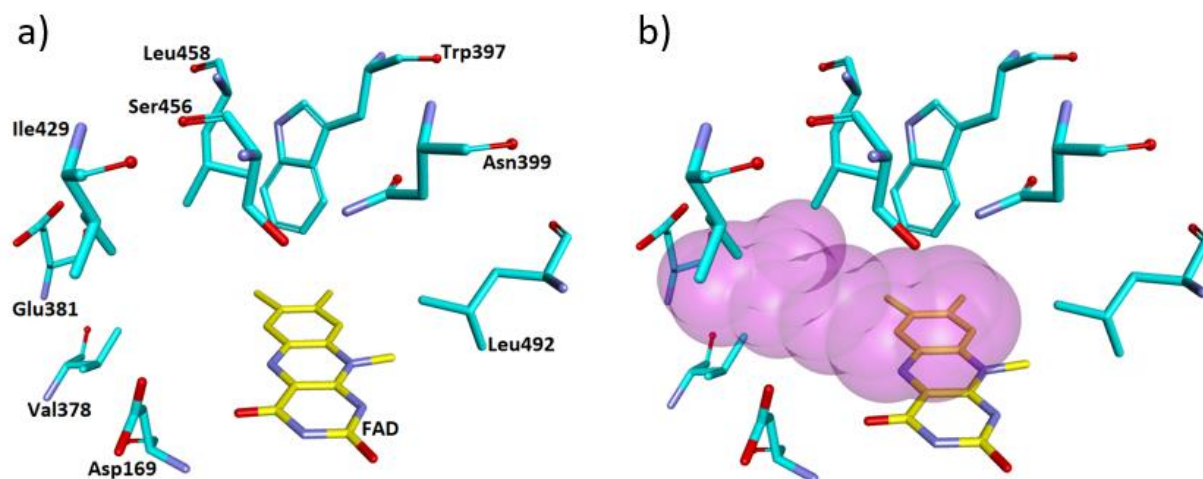
Figura 16. Estrutura cristalográfica tridimensional da ZmCKO1 ligada a CPPU (PDB: 2QKN).



(Fonte: próprio autor, com base na estrutura do PDB 2QKN. Legenda: O ligante apresenta-se em bastões de cor violeta e, em amarelo, o cofator FAD)

Com base na estrutura obtida no PDB, foi possível efetuar os estudos de docagem molecular, extraindo-se o ligante CPPU e adicionando-se os inibidores candidatos na posição específica do sítio ativo (Figura 17).

Figura 17. a) Representação dos resíduos de aminoácidos (em bastões azuis) do sítio ativo da ZmCKO1, e da porção flavina do cofator FAD (em bastões amarelos). b) representação tridimensional do sítio ativo preenchido pela superfície molecular do ligante CPPU



(Fonte: próprio autor, com base na estrutura do PDB 2QKN)

O protocolo de validação de docagem molecular mais utilizado, quando em posse da estrutura da macromolécula complexada com um ligante, é conhecido como *redocking*, no qual avalia-se a capacidade do programa em reproduzir a pose do ligante no mesmo local que o obtido experimentalmente para o co-cristal. Considera-se validado o protocolo de docagem ao se obter poses que apresentam RMSD (do inglês, *Root-Mean-Square Deviation*) menor que 2,00 Å, indicando alto grau de sobreposição entre os resultados computacionais e experimentais.

A validação do protocolo foi realizada através da comparação dos valores de RMSD obtidos nas 4 diferentes funções de pontuação disponíveis no programa GOLD: ChemScore, ChemPLP, GoldScore e ASP. As coordenadas foram definidas com base na posição do ligante CPPU no complexo co-cristalizado ($x=37,0910$; $y=7,4120$; $z=3,2613$). Com base no tamanho médio das moléculas dos ligantes candidatos, que variam entre 10 e 15 Å definiu-se o raio de ligação em 15 Å. Os resultados obtidos no estudo de redocking são apresentados na Tabela 3.

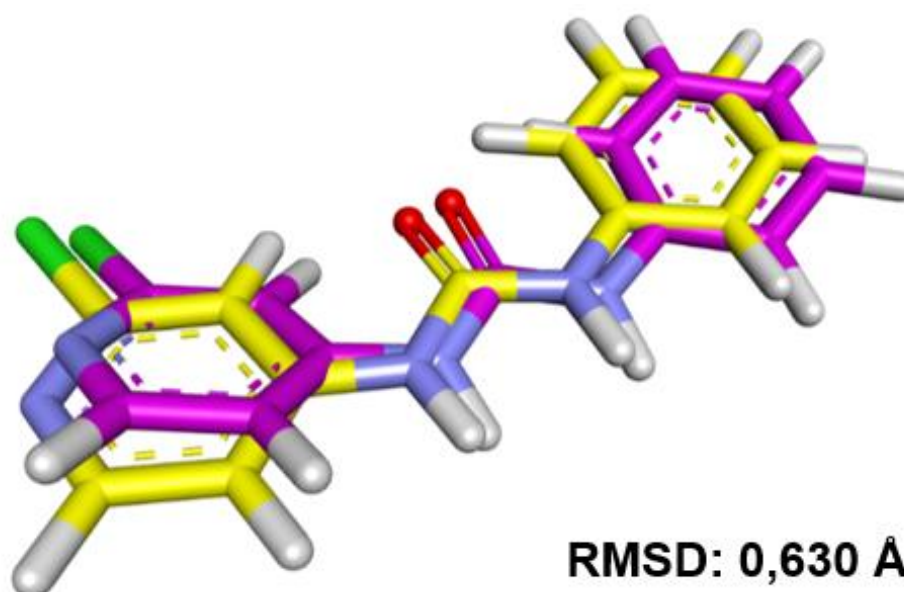
Tabela 3. Resultados obtidos no redocking, utilizando o ligante CPPU na enzima ZmCKO1 com o programa GOLD

RMSD (Å)	Fitness	RMSD (Å)	Fitness	RMSD (Å)	Fitness	RMSD (Å)	Fitness
ASP		CHEMPLP		ChemScore		GoldScore	
0,630	36,788	8,574	45,5029	6,526	148,1050	0,479	54,4672
0,762	35,766	9,561	50,5636	6,566	163,1850	6,657	54,8921
6,178	25,64	9,851	47,2192	6,613	159,2960	6,932	54,7274
6,392	25,728	9,866	47,2390	6,620	150,2590	6,934	54,8365
6,695	37,532	9,928	46,4246	6,624	163,2010	6,936	54,834
6,703	37,05	10,060	48,5788	6,651	160,9000	6,937	54,935
6,706	37,02	10,070	48,5992	6,654	161,0830	6,937	54,7794
6,711	35,824	10,085	48,6121	6,675	170,3020	6,938	54,7281
6,728	37,08	10,092	48,5269	6,682	160,2730	6,941	54,7171
6,993	34,336	10,095	48,4768	6,909	170,7230	6,942	54,6968

(fonte: próprio autor. Destacado em azul os valores de RMSD menores que 2,00 Å)

Observa-se na Tabela 3 que a função de pontuação ASP retornou dois valores de RMSD menores que 2,00 Å e a GoldScore um valor, enquanto ChemPLP e ChemScore resultaram em valores bem maiores. Definiu-se então a função ASP como a mais indicada para o estudo de docagem dos ligantes, considerando o protocolo validado para os parâmetros aqui apresentados. Não se observou uma correlação entre menores RMSD e maiores Fitness nas quatro funções de pontuação aplicadas. Na Figura 18 é apresentada a sobreposição da pose obtida no redocking de menor RMSD com a função ASP e a experimental.

Figura 18. Sobreposição de poses do ligante CPPU no sítio ativo da enzima ZmCKO1 de menor RMSD utilizando função de pontuação ASP

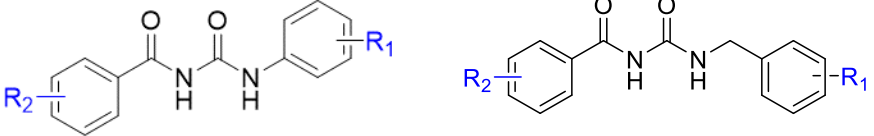
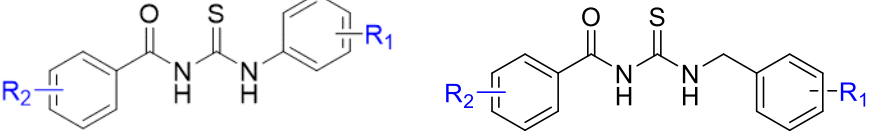
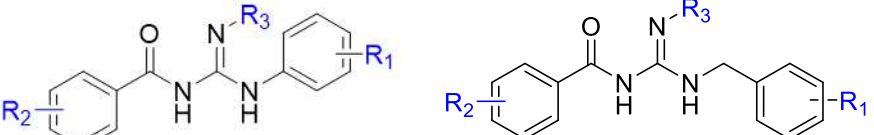
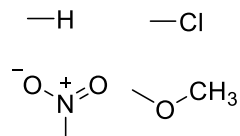
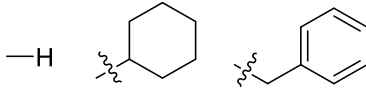


(Fonte: próprio autor. Legenda: Em violeta, a pose obtida por docagem molecular e, em amarelo, a experimental)

3.2. TRIAGEM VIRTUAL

Foram avaliados 154 compostos no processo de VS: 5 benzoilureias (BU), 103 benzoiltioureas (BTU) e 34 benzoilguanidinas (BNG). Entretanto, ao serem contabilizados os possíveis tautômeros de BNG tem-se 98 estruturas, gerando um total de 206 estruturas. As características estruturais gerais dos ligantes são apresentados na Tabela 4.

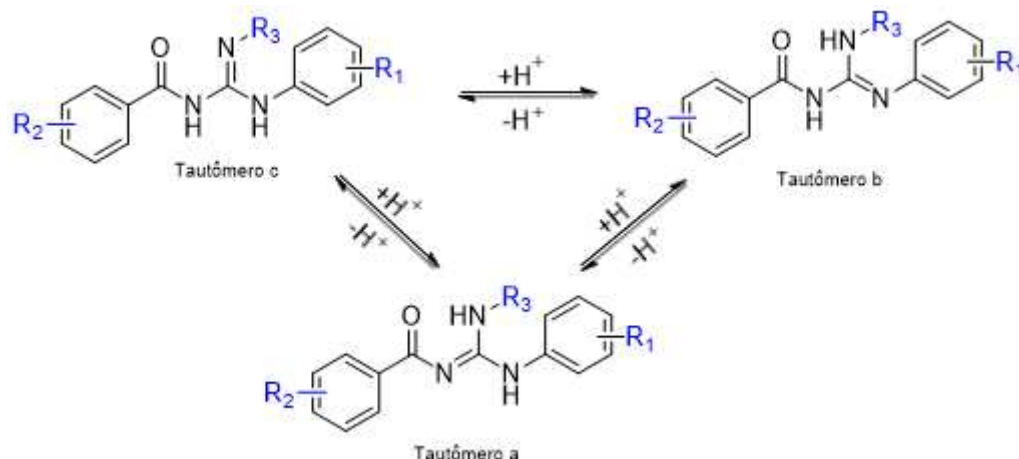
Tabela 4. Características estruturais gerais dos compostos utilizados para o VS, os grupos R1 e R2 apresentam-se em diferentes posições (orto, meta e para)

Classes de moléculas	Estruturas
Benzoilureias (BU)	
Benzoiltioureias (BTU)	
Benzoilguanidinas (BNG)	
Substituintes R ₁ e R ₂	
Substituintes R ₃	

(fonte: próprio autor)

Como mencionado anteriormente, as benzoilguanidinas podem se apresentar como diferentes tautômeros, em função das propriedades do meio em que estão solubilizadas, sendo este um caso particular de isomeria funcional conhecido como tautomeria (GHIVIRIGA et al., 2009), como exemplificado na Figura 19 para uma BNG genérica. O pH e a constante dielétrica do meio são fatores determinantes para a maior estabilidade de uma espécie com relação às demais (GHIVIRIGA et al., 2009) Portanto, todos os possíveis tautômeros (formas a, b e c) foram considerados com o objetivo de se investigar a influência desse tipo de isomeria no processo de reconhecimento molecular.

Figura 19. Equilíbrio químico entre três tautômeros (formas a, b e c) de uma BNG genérica.



(fonte: próprio autor)

O procedimento conhecido como triagem virtual, (*virtual screening*, em inglês) foi realizado com o intuito de classificar os ligantes quanto à afinidade de interação com a enzima ZmCKO1. Os parâmetros foram os mesmos estabelecidos no protocolo de redocking, realizando todas as simulações em uma única “corrida” no programa GOLD, com 10 resultados de fitness obtidos para cada molécula e seus tautômeros. Apenas a pose de melhor encaixe (maior fitness) foi selecionada para tabulação dos resultados e comparação, como descrito na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados da triagem virtual, apenas a pose de maior fitness foi selecionada para cada ligante e seus tautômeros

Ligante	Fitness (ASP)	Ligante	Fitness (ASP)	Ligante	Fitness (ASP)	Ligante	Fitness (ASP)
BNG20c	50,4116	BTU64	36,2697	BTU100	32,4355	BNG28a	29,5345
BNG6a	47,5215	BTU4	36,2578	BTU94	32,2586	BTU6	29,4376
BNG22c	46,8266	BTU17	36,1826	BNG18c	32,1502	BTU87	29,4095
BNG19a	46,2394	BTU37	36,1663	BNG9c	32,1252	BTU38	29,3704
BNG22a	46,2283	BTU67	35,8514	BTU7	32,1206	BTU48	29,3201
BNG11c	46,0732	BTU107	35,5977	BNG9b	32,1014	BU2	29,2990
BNG11a	46,0535	BTU57	35,5535	BTU92	32,0368	BTU99	29,2947
BNG20a	45,3806	BTU10	35,3946	BTU46	31,9359	BTU2	29,2687
BNG7a	44,8790	BTU55	35,3370	BNG24b	31,8528	BNG12b	29,2551
BNG6c	44,6233	BTU86	35,3166	BTU28	31,8224	BNG13a	29,2211
BTU54	44,3776	BTU12	35,2242	BNG15a	31,7398	BTU58	29,1852
BNG13c	44,0323	BTU11	35,1619	BNG28b	31,6770	BTU59	29,1425
BNG7c	43,9586	BNG24a	35,1121	BTU68	31,6387	BU3	29,0729

Continuação da Tabela 5. Resultados da triagem virtual, apenas a pose de maior fitness foi selecionada para cada ligante e seus tautômeros

BNG11b	43,6306	BNG3c	35,0541	BNG14a	31,6127	BTU43	28,9394
BNG19c	43,2374	BNG10b	34,9356	BTU41	31,5488	BTU32	28,9205
BNG3b	43,1553	BTU106	34,9355	BTU27	31,5254	BTU78	28,8719
BNG19b	43,0597	BTU44	34,8839	BNG8a	31,5070	BTU110	28,8710
BNG33b	42,9695	BTU18	34,7689	BTU21	31,4793	BNG25b	28,7345
BNG27a	42,9264	BNG15b	34,7327	BNG12c	31,4312	BTU75	28,6888
BNG34a	42,2262	BTU13	34,5989	BNG9a	31,3922	BTU88	28,6068
BNG34b	41,8033	BTU14	34,2612	BTU97	31,3004	BNG31a	28,5639
BNG20b	41,7383	BNG14c	34,0708	BTU40	31,2601	BNG26a	28,5564
BNG4a	41,5257	BTU19	34,0253	BTU23	31,2287	BNG32a	28,4585
BNG32b	41,1889	BTU47	34,0241	BTU108	31,2246	BTU90	28,4091
BNG7b	40,8238	BTU69	34,0229	BNG33a	31,2073	BNG26c	28,4031
BNG27b	40,5574	BNG18b	33,9991	BTU61	31,1304	BTU82	28,2700
BNG34c	40,3135	BTU8	33,9340	BTU85	31,0950	BTU84	28,1129
BNG4b	40,2530	BTU36	33,8631	BNG5a	31,0089	BTU65	28,1117
BNG2a	40,1186	BNG18a	33,8534	BTU53	30,8389	BTU31	27,9591
BTU95	39,9144	BTU24	33,7649	BTU70	30,8190	BTU71	27,9001
BTU5	39,8753	BTU50	33,7281	BTU62	30,7964	BTU111	27,8498
BNG27c	39,6914	BTU109	33,7119	BTU73	30,6511	BTU34	27,8075
BNG3a	39,6672	BTU103	33,5283	BTU81	30,6166	BNG35	27,6936
BNG2c	39,6195	BNG14b	33,5080	BTU93	30,6105	BTU72	27,6711
BNG6b	39,5739	BTU16	33,4718	BTU63	30,5054	BTU91	27,4019
BNG4c	39,5362	BTU9	33,4577	BU4	30,4678	BNG29a	27,4014
BNG13b	38,9477	BTU26	33,4343	BTU20	30,4619	BNG21a	27,2626
BNG12a	38,2298	BTU52	33,4107	BTU113	30,3938	BTU105	27,2450
BNG2b	38,0885	BTU74	33,2839	BTU102	30,2833	BTU98	27,2418
BNG10a	37,8277	BTU22	33,2441	BNG30a	30,2812	BTU3	27,1280
BNG10c	37,7893	BTU51	33,2365	BTU76	30,1771	BTU29	27,0676
BNG1a	37,7705	BTU56	33,1707	BTU101	30,0450	BU5	27,0245
BTU15	37,6459	BTU25	33,0165	BNG31b	30,0397	BTU66	26,6124
BNG5b	37,4782	BNG21b	32,9534	BU1	29,9363	BNG25a	26,5890
BNG16	37,3544	BNG21c	32,8396	BTU89	29,9100	BTU39	26,3026
BTU80	37,2662	BTU33	32,7701	BNG1b	29,8516	BNG29b	26,1227
BNG8b	37,1038	BTU83	32,7413	BTU60	29,7828	BNG26b	25,4786
BNG30b	37,0980	BTU45	32,6631	BTU35	29,7264	BNG25c	25,4245
BNG22b	37,0303	BTU42	32,5966	BTU1	29,5766	BTU112	25,3809
BNG23	37,0163	BNG24c	32,5208	BTU79	29,5760	BTU96	24,8881
BTU104	36,4079	BTU30	32,4977	BTU49	29,5739		
BNG1c	36,3824	BTU77	32,4414	BNG15c	29,5567		

(fonte: próprio autor)

Em comparação com o valor de fitness obtido para a CPPU, que foi de 37,4956, obtiveram-se 43 resultados superiores e 163 inferiores. De modo geral as BNG apresentaram maiores valores de fitness com relação as BTU e BU, sendo que das BU testadas nenhuma apresentou maior pontuação com a enzima do que o ligante de referência, CPPU. Os 10 maiores valores obtidos foram com BNGs, sendo que a BNG6, a BNG11, a BNG20 e a BNG22 aparecem duas vezes cada em diferentes tautômeros, que é característica estrutural marcante das benzoilguanidinas.

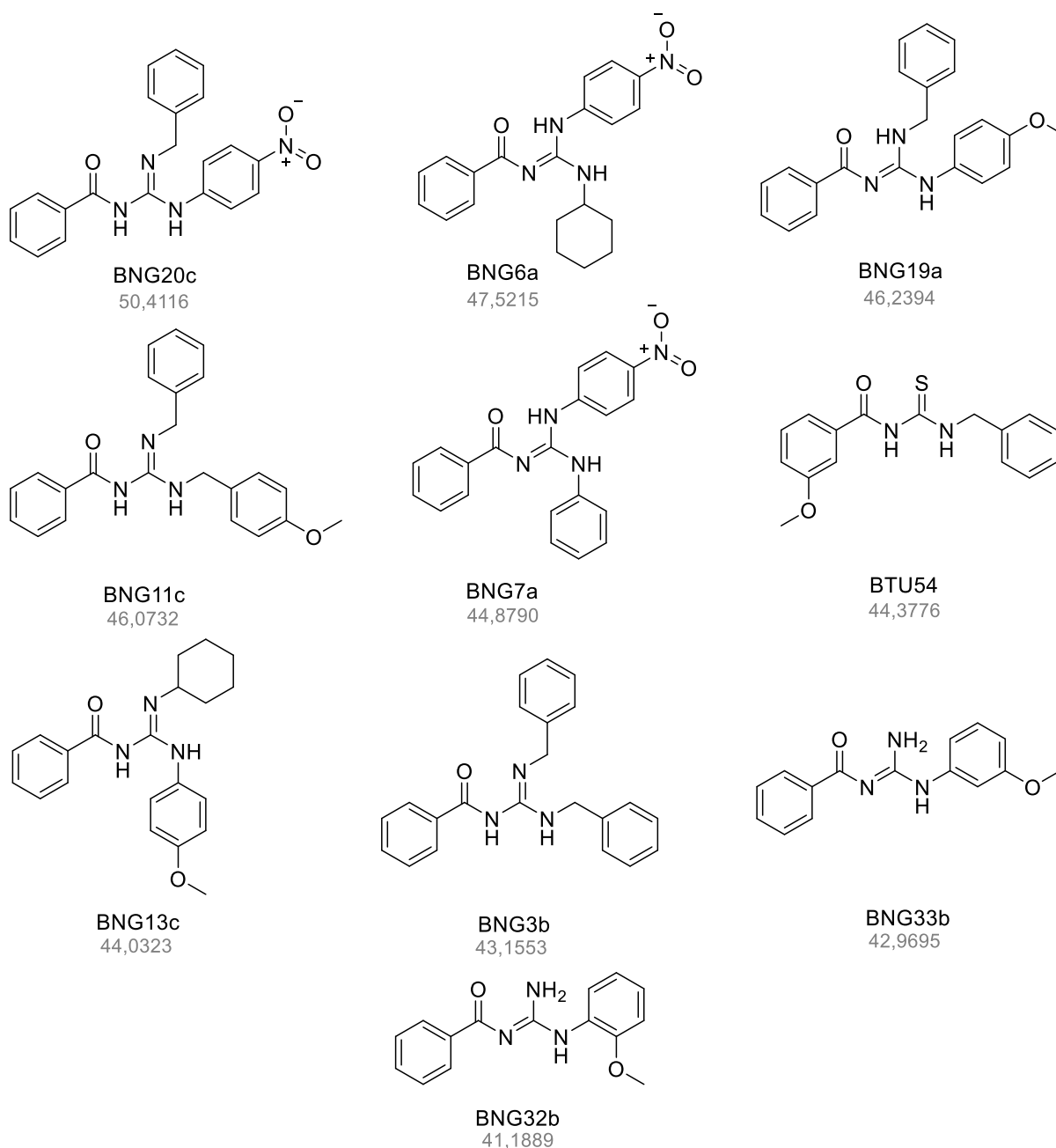
Uma lista com os 10 compostos selecionados é apresentada na Tabela 6, e suas estruturas químicas na Figura 20.

Tabela 6. Dez maiores valores de fitness obtidos considerando apenas o tautômero de maior fitness.

Ligante	Fitness (ASP)
BNG20c	50,4116
BNG6a	47,5215
BNG19a	46,2394
BNG11c	46,0732
BNG7a	44,8790
BTU54	44,3776
BNG13c	44,0323
BNG3b	43,1553
BNG33b	42,9695
BNG32b	41,1889

(fonte: próprio autor)

Figura 20. Estruturas moleculares dos 10 compostos selecionados na triagem virtual com os respectivos valores de Fitness apresentado abaixo de cada molécula)



(Fonte: próprio autor)

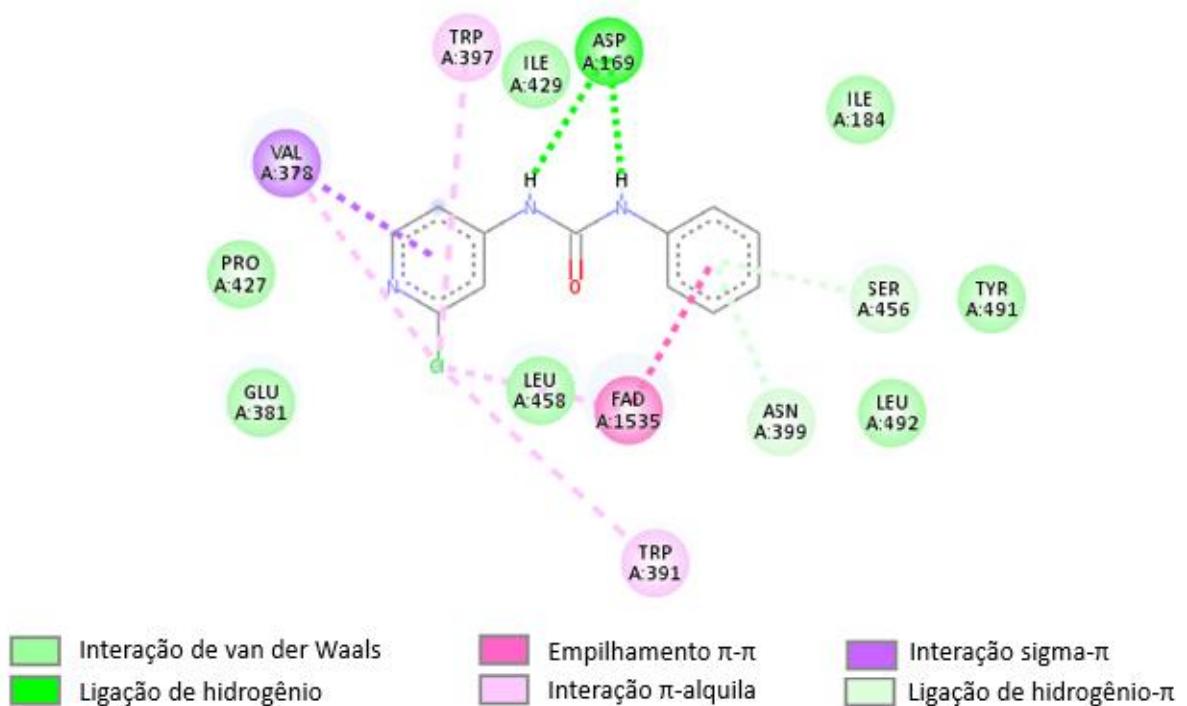
3.3. ANÁLISE DAS POSES SELECIONADAS NA TRIAGEM VIRTUAL NA ENZIMA ZMCKO1

Uma análise dos complexos gerados no processo de triagem virtual e daquele obtido via PDB (código 2QKN) foi conduzida, com o intuito de comparar os modos de interação dos ligantes selecionados com relação ao inibidor CPPU descrito na literatura.

No complexo co-cristalizado da ZmCKO1 com a CPPU (PDB: 2QKN) pode-se destacar as ligações de hidrogênio que os nitrogênios da ureia realizam com o átomo de oxigênio da cadeia lateral do Asp169, sendo que as interações com este resíduo de aminoácido são primordiais para que a reação enzimática ocorra. De acordo com Popelka e colaboradores (2016) a substituição do Asp169 por uma asparagina resultou em uma atividade enzimática 100 vezes menor quando comparada à enzima nativa.

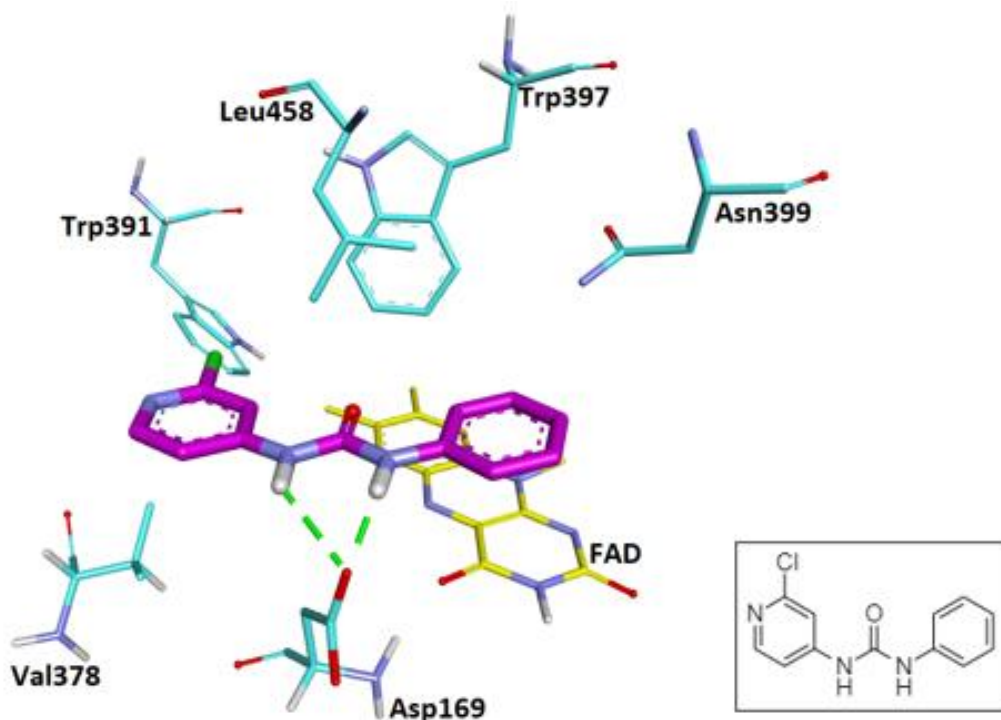
O oxigênio carbonílico da ureia é cercado pelo anel aromático do Trp397 e a cadeia lateral da Leu458. O anel benzênico da CPPU interage com o anel flavina (isoaloxazina) do cofator FAD por empilhamento π - π . A Figura 21 em 2D e a Figura 22 em 3D, geradas no programa Discovery Studio, destacam as interações ligante-receptor.

Figura 21. Representação bidimensional das interações realizadas pela CPPU com o sítio catalítico da enzima ZmCKO1



(Fonte: próprio autor, com base na estrutura do PDB 2QKN)

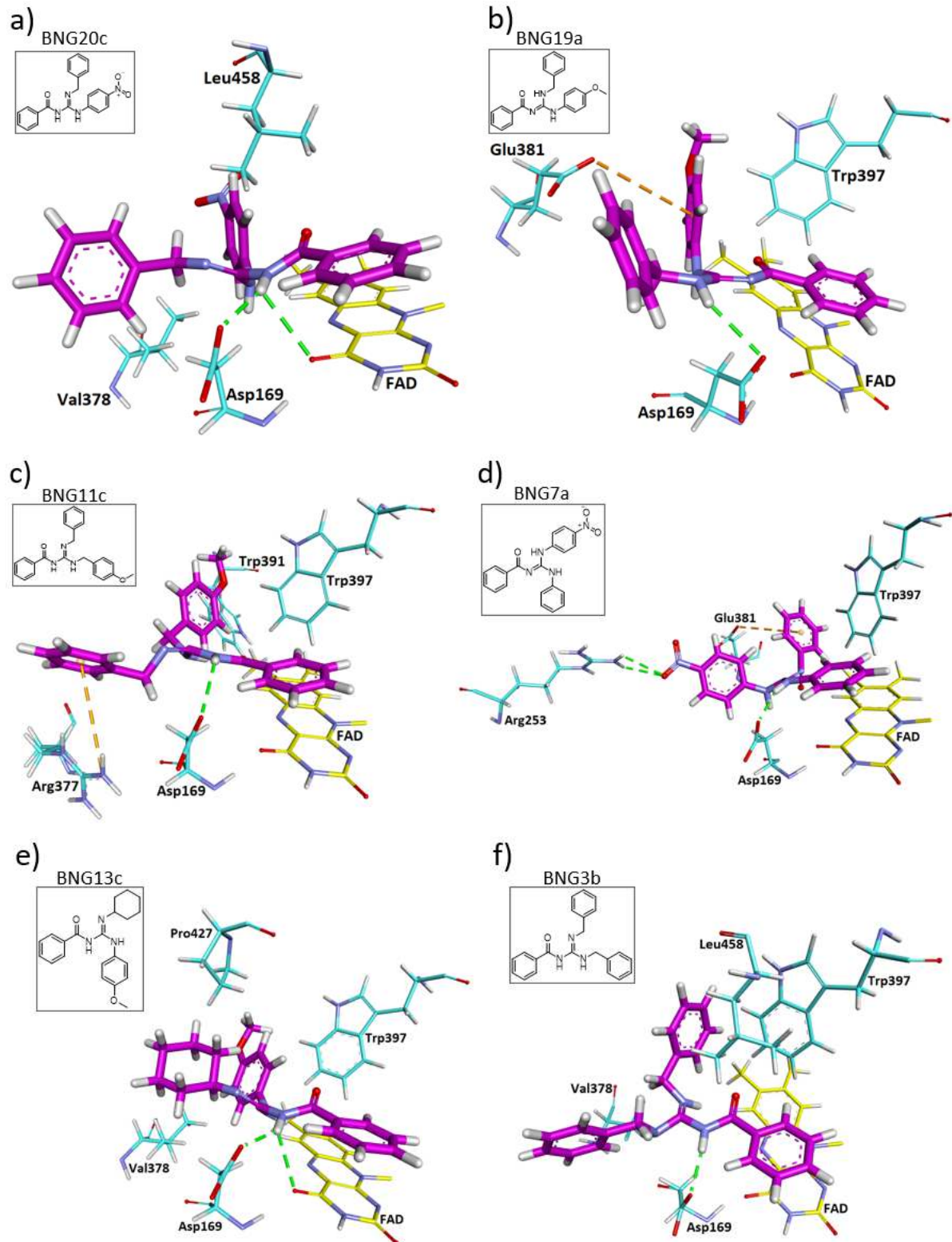
Figura 22. Representação das principais interações da CPPU com os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico da ZmCKO1

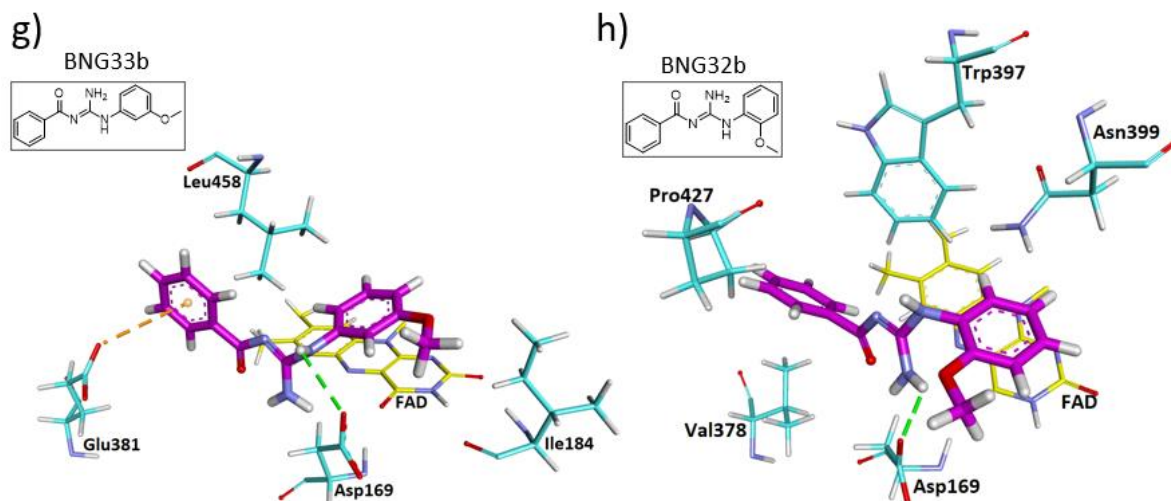


(Fonte: próprio autor, com base na estrutura do PDB 2QKN. Legenda: O ligante apresenta-se em bastões de cor violeta, os resíduos de interação são representados na cor azul e, em amarelo, a porção do FAD correspondente ao anel isoaloxazina, omitindo-se o restante da molécula do cofator. As linhas tracejadas em verde representam as interações de ligações de hidrogênio com resíduos.)

Observam-se semelhanças nas interações moleculares, com relação a CPPU, principalmente nos complexos obtidos para os ligantes BNG20c, BNG19a, BNG11c, BNG7a, BNG13c, BNG3b, BNG33b e BNG32b, devido à presença de ligação de hidrogênio entre pelo menos um dos hidrogênios das guanidinas com a carbonila da cadeia lateral do Asp169 (Figura 23). Além disso, estes mesmos hidrogênios da porção guanidina, nos BNG20c e BNG13c, estabelecem ligações de hidrogênio com uma das carbonilas do anel de isoaloxazina do cofator FAD (Figura 23a e Figura 23e).

Figura 23. Representação das interações dos ligantes selecionados através da triagem virtual com os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico da ZmCKO1. a) BNG20c; b) BNG19a; c) BNG11c; d) BNG7a; e) BNG13c; f) BNG3b; g) BNG33b; h) BNG32b

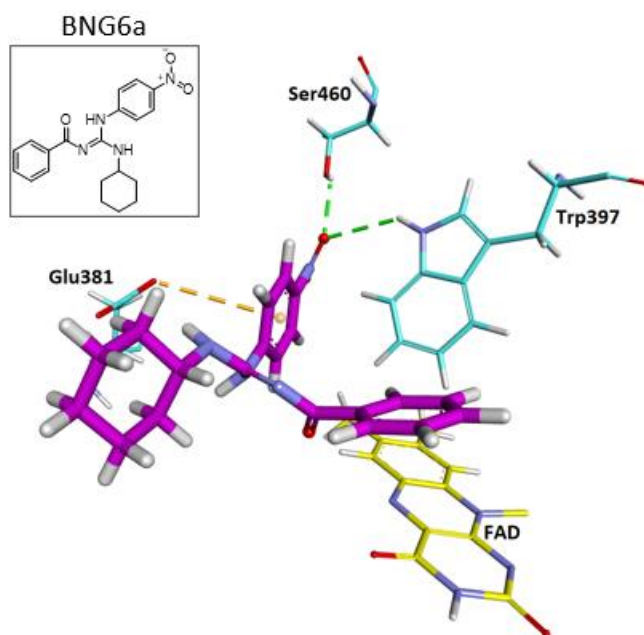




(Fonte: próprio autor. Legenda: os ligantes apresentam-se em bastões de cor violeta, os resíduos de interação são representados na cor azul e, em amarelo, a porção do FAD correspondente ao anel isoaloxazina, omitindo-se o restante da molécula do cofator. As linhas tracejadas em verde representam as interações de ligações de hidrogênio com resíduos e as alaranjadas correspondem a interações do tipo ânion- π)

O ligante BNG7a interage com a Arg253 através de duas ligações de hidrogênio entre um oxigênio do grupo nitro e dois hidrogênios da amina terminal do resíduo de aminoácido, sendo esta interação apenas observada para esta BNG (Figura 23d). Os ligantes BNG19a, BNG7a, BNG33b e BNG6a interagem com o Glu381 através de uma aproximação do tipo ânion- π , contribuindo de forma relevante para os altos valores de fitness observados (Figura 23b, Figura 23d, Figura 23g e Figura 24, respectivamente). Na pose obtida com a BNG6a são observadas ligações de hidrogênio convencionais entre o oxigênio do grupo nitro do ligante e a hidroxila da cadeia lateral do resíduo Ser460 e entre este mesmo átomo de oxigênio do ligante e o hidrogênio do nitrogênio indólico do Trp397 (Figura 24).

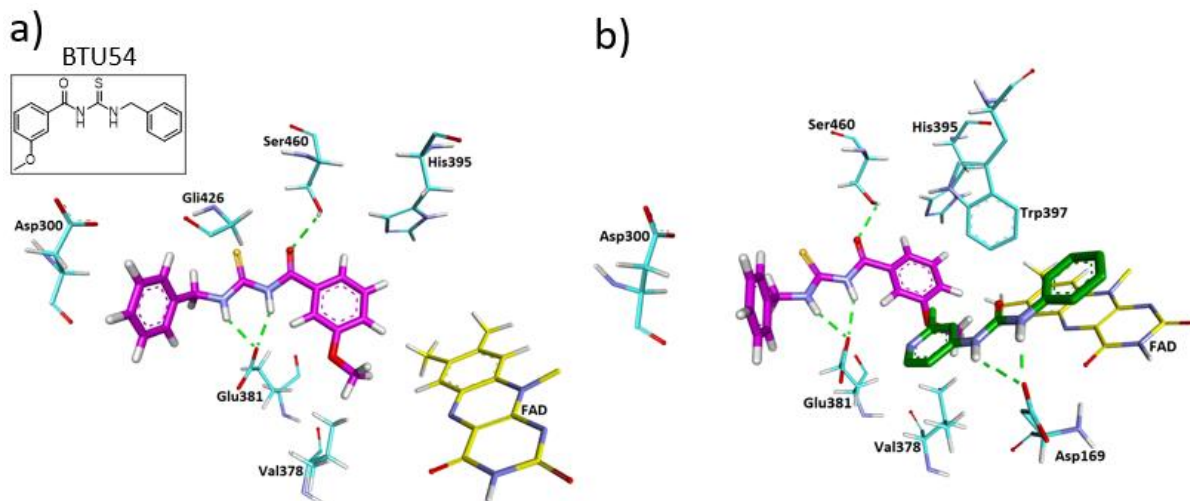
Figura 24. Representação das interações da BNG6a com os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico da ZmCKO1.



(Fonte: próprio autor. Legenda: o ligante apresenta-se em bastões de cor violeta, os resíduos de interação são representados na cor azul e, em amarelo, a porção do FAD correspondente ao anel isoaloxazina, omitindo-se o restante da molécula do cofator. As linhas tracejadas em verde representam as interações de ligações de hidrogênio com resíduos e as alaranjadas correspondem a interações do tipo ânion-pi)

A BTU54 estabelece ligações de hidrogênio com o Glu381 através de seus grupos amino da porção tiourea e a carboxila do Glu381, e através da carbonila do ligante com a hidroxila da cadeia lateral da Ser460 (Figura 25). A pose obtida para a BTU54 foi a única que não apresentou empilhamento π - π entre anéis aromáticos laterais do ligante e a porção isoaloxazina, porém foram detectadas interações do tipo π -alquila entre os grupos metílenos e anéis aromáticos de ambas as moléculas. Esta grande diferença nas interações intermoleculares entre o complexo obtido com a BTU54 em comparação à CPPU é consequência de uma ligeira variação na posição que os ligantes ocupam dentro do sítio ativo da enzima considerando-se o raio de 15 Å, previamente definido no procedimento de docagem (Figura 25).

Figura 25. a) Representação das interações da BTU54 com os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico da ZmCKO1. b) Sobreposição das poses da BTU54 e da CPPU (obtida do complexo co-cristalizado)



(Fonte: próprio autor. Os ligantes apresentam-se em bastões de cor violeta (BTU54) e verde (CPPU), os resíduos de interação são representados na cor azul e, em amarelo, a porção do FAD correspondente ao anel isoaloxazina, omitindo-se o restante da molécula do cofator. As linhas tracejadas em verde representam as interações de ligações de hidrogênio com resíduos)

De modo geral, observaram-se várias similaridades nos pontos de interação ligante-receptor nas poses geradas virtualmente no programa GOLD, em comparação com o complexo co-cristalizado (ZmCKO1 com CPPU). Estes resultados indicam que os dez compostos selecionados na triagem virtual possivelmente apresentam grande afinidade com a enzima ZmCKO1, que atua oxidando as citocininas endógenas em plantas de milho, e conseqüentemente, inibindo sua atividade o que resultaria em maiores níveis de citocinina ativa no organismo vegetal.

3.4. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS *IN SILICO* DOS CANDIDATOS SELECIONADOS

Com o objetivo de selecionar dentre as 10 substâncias identificadas no procedimento de triagem virtual quais apresentariam melhores propriedades para serem submetidas a testes *in vivo*, em plantas de milho, utilizou-se a plataforma SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) e o Virtual Computational Chemistry Laboratory (<http://www.vcclab.org/lab/alogps>) para prever as propriedades físico-químicas dos ligantes. Com base nestas informações, realizou-se uma avaliação de

“pesticide-likeness”, ou seja, analisou-se se os valores preditos *in silico* de massa molecular, MlogP, AlogP, número de doadores de ligação de hidrogênio (DLH), número de aceptores de ligação de hidrogênio (ALH) e número de ligações rotacionáveis (LR), encontram-se dentro dos intervalos sugeridos por Tice e colaboradores (TICE, 2001), apresentados na Tabela 7. Para avaliação do perfil “pesticide-likeness” considerou-se que as potenciais citocininas apresentariam modo de aplicação e ação semelhantes à dos herbicidas pós-emergentes, pois atuam em plantas já estabelecidas através da pulverização foliar.

Tabela 7. Regras propostas para “pesticide-likeness” e regra dos 5 de Lipinski (TICE, 2001)

Parâmetro	Fármacos (Lipinski)	Herbicidas pós-emergentes	Inseticidas
Massa Molecular (g/mol)	≤ 500	≥ 150 e ≤ 500	≥ 150 e ≤ 500
MlogP	≤ 4,15	≤ 3,5	≥ 0 e ≤ 5,0
AlogP	---	≤ 5,0	≥ 0 e ≤ 6,5
DLH	≤ 5	≤ 3	≤ 2
ALH	≤ 10	≥ 2 e ≤ 12	≥ 1 e ≤ 12
Ligações Rotacionáveis	---	≤ 12	≤ 12

(fonte: TICE, 2001)

Os dados *in silico* obtidos nas plataformas de predição para as 10 substâncias selecionadas na triagem virtual estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Parâmetros físico-químicos preditos na plataforma SwissADME e VCC (indicado com *) para as 10 substâncias selecionadas na triagem virtual, CPPU e cinetina

Substância	Massa Molecular (g/mol)	LR	ALH	DLH	MlogP	AlogP*	logS*
BNG20c	374,39	8	4	2	2,70	2,76	-4,85
BNG6a	366,41	7	4	2	1,96	2,89	-4,42
BNG19a	359,42	8	3	2	3,38	3,88	-5,05
BNG11c	351,44	7	3	2	2,99	3,97	-5,24
BNG7a	361,37	7	3	3	2,74	2,80	-4,67
BTU54	300,38	7	2	2	2,38	2,77	-3,52
BNG13c	351,44	7	3	2	2,99	4,44	-4,83
BNG3b	344,43	8	1	3	3,68	4,04	-5,16
BNG33b	269,30	5	3	2	1,97	2,47	-3,59
BNG32b	269,30	5	3	2	2,38	2,48	-3,57
CPPU	247,68	4	2	2	1,97	2,88	-3,55
Cinetina	225,25	3	3	2	1,20	1,63	-3,65

(fonte: próprio autor. Legenda: em vermelho valores que violam as regras de *pesticide-likeness*; em violeta valores de AlogP e logS indesejáveis)

Aplicando-se as regras propostas por Tice (TICE, 2001) para “pesticide-likeness” apenas a BNG3b não atende a todos os parâmetros (conforme indicado na Tabela 7 para herbicidas pós-emergentes) apresentando MlogP maior que 3,5 e número de átomos aceptores de ligações de hidrogênio menor que 2. A BNG20c, BNG6a, BNG19a, BNG11c, BNG7a, BNG13c e BNG3b apresentam valores considerados altos de MlogP e AlogP, embora ainda dentro dos limites propostos pelas regras de Tice, resultando nos valores mais negativos de logS, portanto as substâncias menos solúveis em água deste conjunto. Testes de solubilidade preliminares indicaram que a BNG20c apresentou precipitação em menos de 10 minutos após diluição em água à 2,09 $\mu\text{mol/L}$. Por outro lado, a BTU54, BNG33b e BNG32b apresentaram os maiores valores de logS, podendo inclusive ser classificadas como moderadamente solúveis em água, como seria esperado levando-se em conta que apresentam estruturas moleculares com os heteroátomos dos grupos tioureas e guanidinas não substituídos, enquanto as demais moléculas possuem

grupos alquila apolares ligados em todas as posições. De modo geral, os resultados preditos para a BTU54 e BNG33b aproximam-se consideravelmente aos valores obtidos para a CPPU, sendo este um bom indicativo da viabilidade dos compostos serem bem absorvidos nas plantas.

Em função dos valores de logS e levando em conta os maiores fitness obtidos na triagem virtual, os ligantes BTU54 e BNG33b foram selecionados para estudos *in vivo*, em plantas de milho (*Zea mays*), e docagem molecular no receptor de citocininas *Arabidopsis* Histidine-kinase 4 (AHK4)

Adicionalmente aos parâmetros *in silico* apresentados, realizou-se a predição de ecotoxicidade para a BNG33b e BTU54 através da plataforma ADMETSar 2. Os parâmetros de ecotoxicidade são de importância fundamental na pesquisa e desenvolvimento de novos princípios ativos ou formulados agroquímicos, uma vez que estas substâncias são pulverizadas no meio ambiente e potencialmente podem entrar em contato com insetos benéficos (abelhas, por exemplo) ou se concentrar em diferentes fontes naturais de água. Os resultados obtidos (Tabela 9) indicam que ambas as substâncias não são potencialmente tóxicas às abelhas, a BNG33b possivelmente não é tóxica para crustáceos, mas sim para peixes, enquanto a BTU54 apresenta potencialidade de ser tóxica para crustáceos e peixes. Estes resultados não inviabilizam a utilização das substâncias, uma vez que não se leva em conta a concentração na casa de μM na qual os hormônios vegetais são aplicados, no entanto, futuramente diversos ensaios de ecotoxicidade *in vivo*, citotoxicidade *in vitro* e toxicidade a mamíferos (incluindo humanos) seriam obrigatórios para registro, produção e comercialização de formulações contendo alguma dessas substâncias.

Tabela 9. Parâmetros de ecotoxicidade preditos pela plataforma ADMETSar para as substâncias selecionadas na VS e análise *in silico*

Ecotoxicidade	BNG33b	BTU54
	Resultado Predito	
Abelhas	Não	Não
Crustáceos (aquática)	Não	Sim
Peixes (aquática)	Sim	Sim

(fonte: próprio autor)

3.5. DOCAGEM MOLECULAR NO RECEPTOR AHK4

Com o intuito de obter maior certeza a respeito da possibilidade dos ligantes candidatos selecionados, no VS e predição *in silico*, de atuarem como citocininas, realizou-se uma nova etapa de docagem molecular, utilizando-se o receptor AHK4 como alvo biológico.

Dentre um conjunto de receptores eucarióticos histidina-quinase, que atuam como receptores de membranas nas plantas, o *Arabidopsis* histidina-quinase 4 (AHK4) é o mais profundamente descrito em literatura. Este receptor contém um módulo citoplasmático de histidina quinase e um domínio sensorial de aproximadamente 270 resíduos que formam o sítio de ligação das citocininas (HEYL et al., 2007).

Duas estruturas 3D foram obtidas no PDB, os complexos co-cristalizados do AHK4 ligado à cinetina (código 3T4S) em 1,6 Å de resolução, substrato natural do receptor (Figura 26), e ligado ao tidiazuron (código 3T4T) em 1,7 Å de resolução, uma citocinina derivada de ureia com comprovada ação agrônômica.

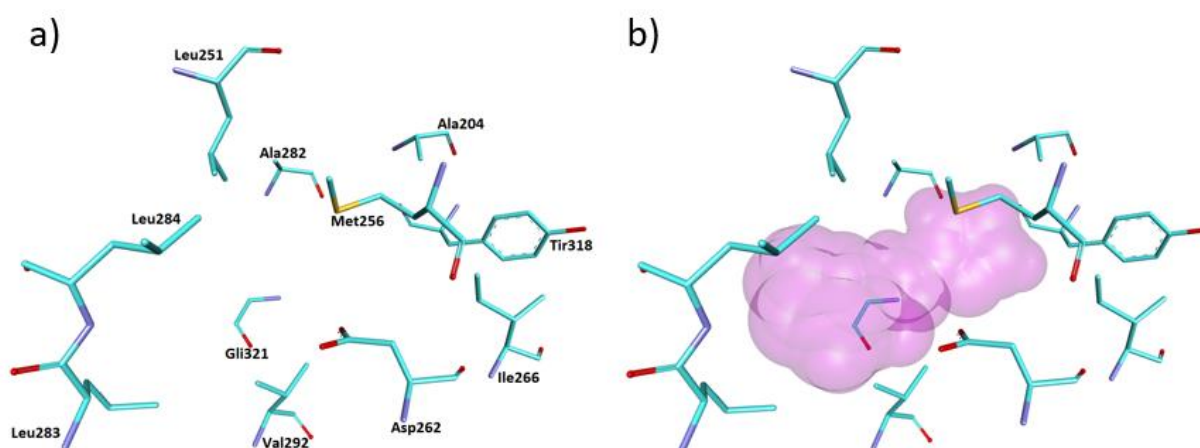
Figura 26. Estrutura cristalográfica tridimensional do AHK4 ligado a cinetina (PDB: 3T4S)



(fonte: próprio autor, com base na estrutura do PDB 3T4S. Legenda: o ligante apresenta-se em bastões de cor violeta)

A estrutura molecular do AHK4 é caracterizada por apresentar dois sítios de ligação exatamente iguais, portanto para os estudos de docagem molecular e comparação de resultados apenas o sítio de ligação da cadeia A foi considerado (na parte da direita da Figura 26). Os resíduos de aminoácidos que formam o sítio de ligação e o bolsão da parte A são apresentados na Figura 27.

Figura 27. a) Resíduos de aminoácidos do sítio de ligação do receptor AHK4. b) representação tridimensional do sítio de ligação preenchido pela superfície molecular do ligante cinetina.



(fonte: próprio autor, com base na estrutura do PDB 3T4S)

Com base na estrutura obtida no PDB (AHK4 complexado com a cinetina, PDB: 3T3S), foi possível efetuar os estudos de docagem molecular, extraindo-se uma das moléculas de cinetina e substituindo pelos inibidores candidatos na posição específica do sítio ativo. A estrutura do complexo co-cristalizado de AHK4 com cinetina foi a escolhida, e não a com TDZ, pelo fato de a cinetina ser uma citocinina natural endógena, além disso essa substância foi utilizada neste trabalho nos ensaios *in vivo*.

O procedimento de docagem molecular foi mais uma vez validado através de redocking, comparando-se os valores de RMSD obtidos nas 4 diferentes funções de pontuação disponíveis no programa GOLD: ChemScore, ChemPLP, GoldScore e ASP. O ponto de ligação foi definido com base na posição da cinetina na cadeia A do complexo co-cristalizado ($x=5,3495$; $y=22,3826$; $z=25,3867$). Com base no tamanho médio das moléculas dos ligantes candidatos, que variam entre 10 e 15 Å definiu-se o raio de ligação em 15 Å. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 10.

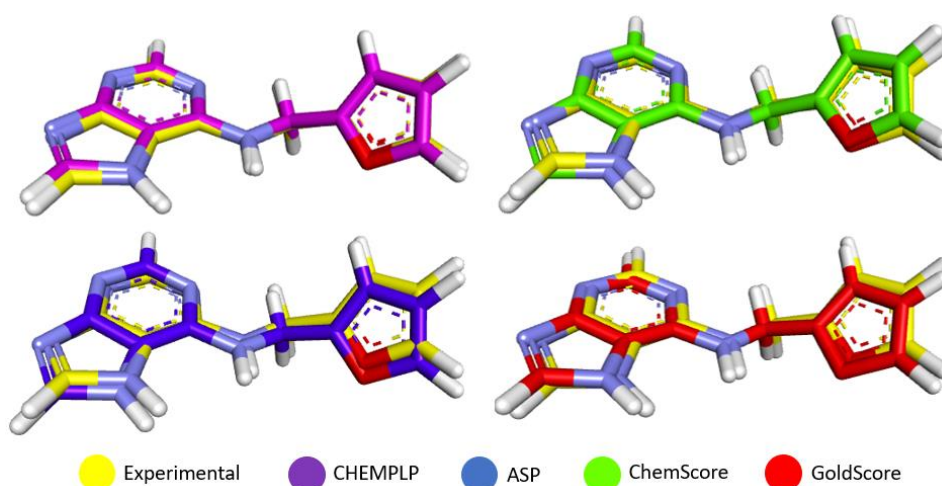
Tabela 10. Resultados obtidos no redocking, utilizando o ligante cinetina no receptor AHK4 com o programa GOLD

RMSD (Å)	Fitness	RMSD (Å)	Fitness	RMSD (Å)	Fitness	RMSD (Å)	Fitness
ASP		CHEMPLP		ChemScore		GoldScore	
0,4255	35,8052	0,1724	67,3278	0,3421	24,3333	0,3304	64,4643
0,429	35,5687	0,2059	67,3504	0,3739	24,4002	0,3471	64,7855
0,5438	35,9276	0,2065	67,4479	0,3834	24,2994	0,367	64,6779
0,5688	34,7402	0,2149	67,271	0,4118	24,3353	0,3717	64,6449
0,5773	35,346	0,2973	67,4181	0,4328	24,3658	0,3927	64,9982
0,6737	35,3805	0,3074	67,6243	0,4386	24,3401	0,4003	64,2841
0,7203	35,5815	0,4017	67,6454	0,4888	24,3009	0,4259	64,6127
0,9555	34,9723	0,6943	67,7594	0,4908	24,3262	0,4271	64,8171
1,055	35,2659	6,1998	61,9074	0,5276	24,3178	0,433	64,3626
6,1686	35,5443	6,2881	62,518	0,5311	24,4162	0,5333	65,0117

(fonte: próprio autor. Destacado em azul os valores menores que 2,00 Å)

Observa-se na Tabela 10 que a função de pontuação CHEMPLP retornou os menores RMSD, sendo esta a escolhida para o estudo de docagem, embora as quatro funções resultaram em valores menores que 2,00 Å. O protocolo foi considerado validado para os parâmetros aqui apresentados. Na Figura 28 são apresentadas as sobreposições das poses obtidas no redocking de menor RMSD para cada função de pontuação e a experimental. Observa-se que com a CHEMPLP a sobreposição é sutilmente mais perfeita do que com as demais funções.

Figura 28. Sobreposição de poses do ligante cinetina no sítio de ligação do receptor AHK4 de menor RMSD utilizando as funções de pontuação CHEMPLP, ASP, ChemScore e GoldScore



(fonte: próprio autor)

Os resultados obtidos na docagem molecular com a BNG33b e a BTU54 são apresentados na Tabela 11. Também foram utilizados nesse estudo a cinetina e o TDZ, com intuito de comparação das interações moleculares ligante-receptor, visto que são substratos do AHK4 já citados na literatura.

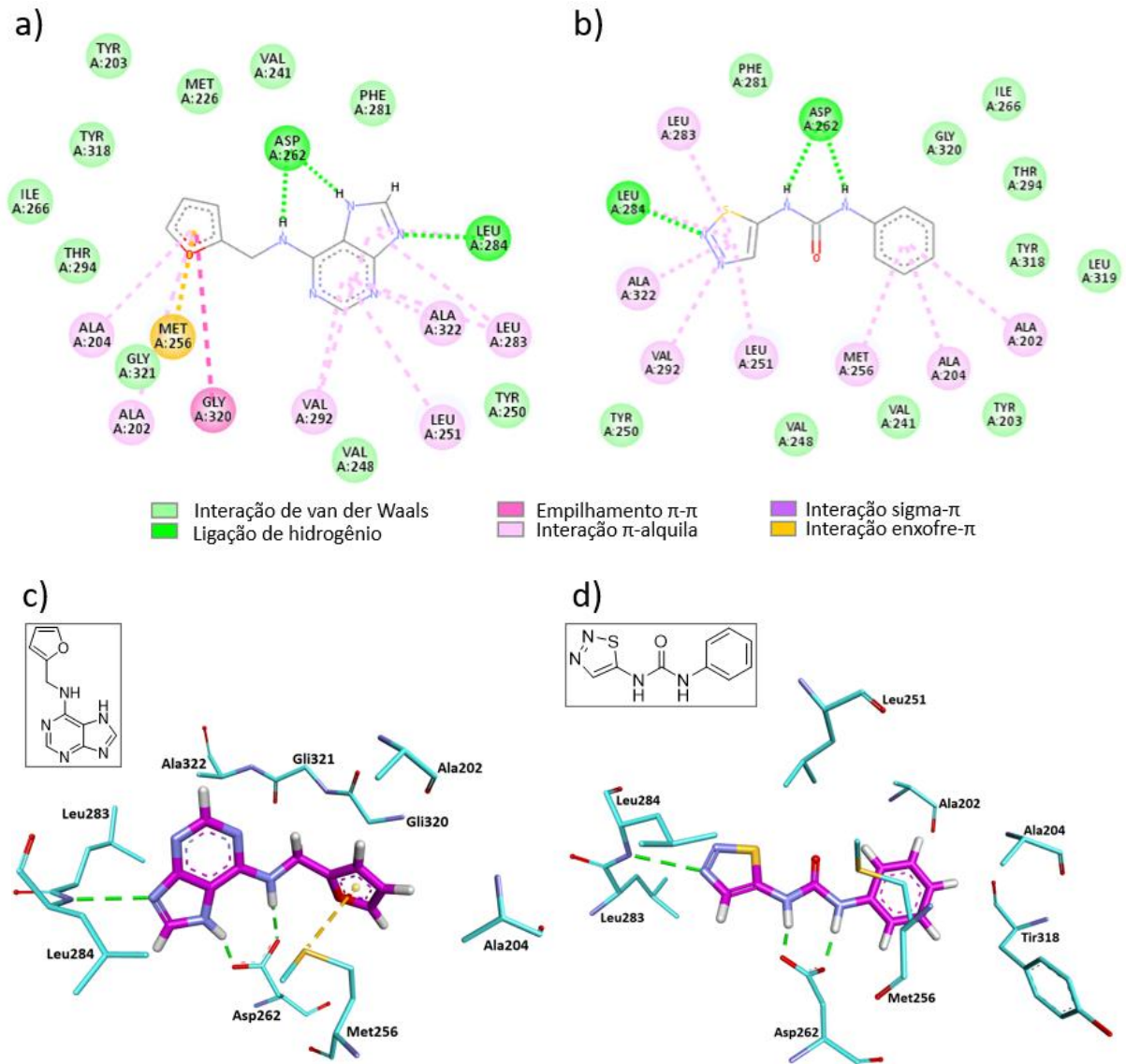
Tabela 11. Resultados de docagem molecular com os dois ligantes selecionados na triagem virtual, a cinetina e o TDZ

Ligante	Fitness (CHEMPLP)
BNG33b	73,2470
BTU54	75,8725
Cinetina	68,0332
TDZ	64,5189

(fonte: próprio autor)

Observa-se que os ligantes candidatos apresentaram valores de fitness moderadamente maiores que a cinetina e TDZ, indicando que possuem afinidade molecular parecida com o receptor em comparação aos ligantes originais. Nos complexos co-cristalizados do AHK4 com a cinetina e com a TDZ (PDB: 3T4S e 3T4T, respectivamente), destacam-se principalmente as ligações de hidrogênio estabelecidas por ambos ligantes com o Asp262 e a Leu284 do receptor, realizadas a partir dos grupos amina secundária e terciária dos ligantes, respectivamente. Na Figura 29 são apresentadas as interações estabelecidas pelos ligantes cinetina e TDZ com o sítio de ligação do receptor, tanto em 2D como em 3D (obtidas a partir das estruturas disponíveis no PDB, visualizadas no programa Discovery Studio v21). Nota-se que a posição das aminas da ureia mimetiza a estrutura observada no hormônio endógeno, muito provavelmente sendo este o fator determinante para a ação biológica desencadeada pelo TDZ.

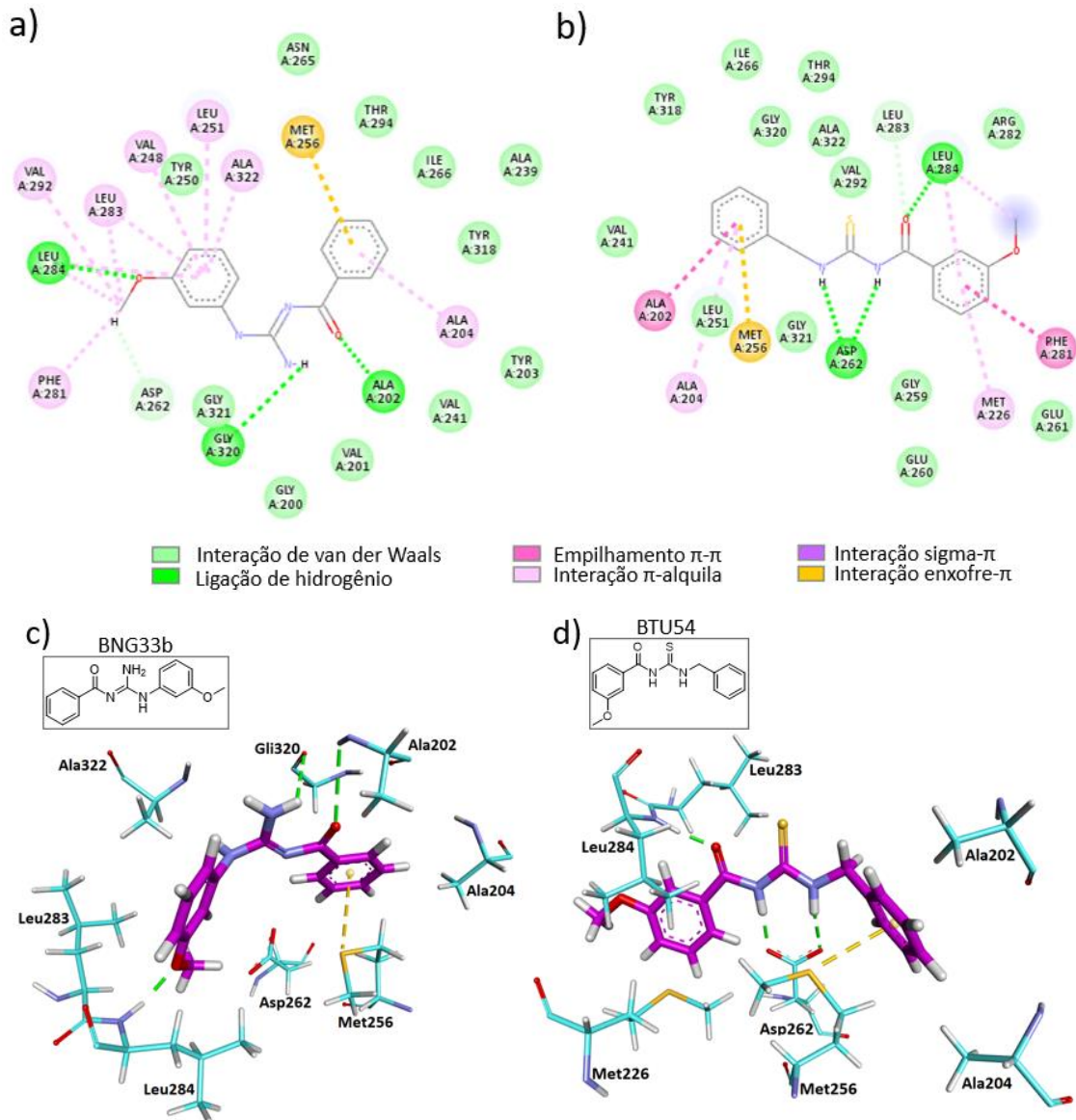
Figura 29. Representação bidimensional das interações realizadas pela cinetina (a) e TDZ (b) com o sítio de ligação do receptor AHK4. Representação 3D das principais interações da cinetina (c) e TDZ (d) com os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação do AHK4.



(Fonte: próprio autor. Legenda: o ligante apresenta-se em bastões de cor violeta e os resíduos de interação são representados na cor azul. As linhas tracejadas em verde representam as interações de ligações de hidrogênio com resíduos e a amarela interação do tipo π -enxofre)

As poses obtidas por docagem molecular com os ligantes candidatos são apresentadas em 2D e 3D na Figura 30.

Figura 30. Representação bidimensional das interações realizadas pela BNG33b (a) e BTU54 (b) com o sítio de ligação do receptor AHK4 obtidas por docagem molecular. Representação tridimensional das principais interações da BNG33b (c) e BTU54 (d) com os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação do AHK4.



(Fonte: próprio autor. Legenda: O ligante apresenta-se em bastões de cor violeta e os resíduos de interação são representados na cor azul. As linhas tracejadas em verde representam as interações de ligações de hidrogênio com resíduos e a amarela interação do tipo π -enxofre)

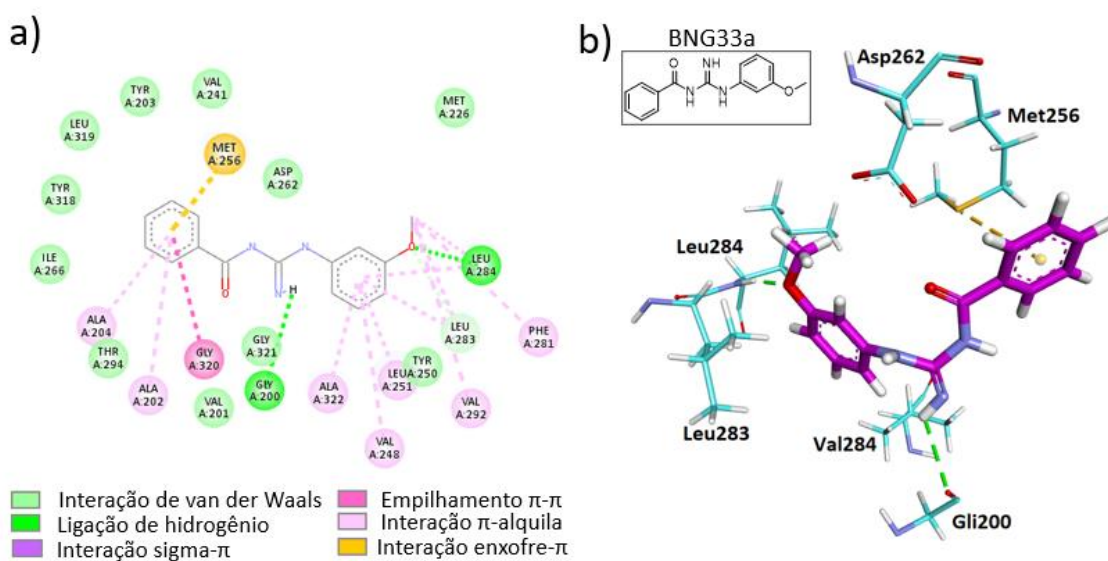
O complexo obtido para a BTU54 via docagem molecular sugere interações ligante-receptor muito parecidas àquelas observadas para a cinetina e o TDZ, com grande destaque para as duas ligações de hidrogênio convencionais estabelecidas entre os grupos amino da porção tioureia e o Asp262, além de outra ligação de hidrogênio entre a carbonila do ligante e a cadeia lateral da Leu284. Uma interação

do tipo π -enxofre também foi detectada com o resíduo de Met256 e elétrons π do anel benzênico, semelhante ao que se observa experimentalmente para a cinetina ligada ao AHK4. De modo geral, pode-se inferir que a BTU54 apresentaria interações com resíduos de aminoácidos do sítio de ligação do receptor extremamente similares ao observado experimentalmente com o hormônio natural endógeno, a cinetina.

Observando a pose obtida para a BNG33b (Figura 30a e Figura 30c), interações importantes com o sítio de ligação diferem quando comparadas à cinetina e TDZ (Figura 29), nota-se uma ligação de hidrogênio entre a amina secundária da porção guanidina e a carbonila da Gli320, e entre a carbonila do ligante e um hidrogênio da amina da Ala202. A ligação de hidrogênio com a Leu284 mantém-se, assim como a interação do tipo π -enxofre com a Met256.

Aplicou-se a docagem molecular com o outro tautômero quimicamente estável da BNG33, obtendo-se a pose de maior Fitness (valor de 77,0014) exibida na Figura 31. Observa-se uma ligação de hidrogênio com a Leu284 e uma interação tipo π -enxofre assim como para o tautômero “b”, no entanto as demais ligações de hidrogênio diferem, com relação a cinetina, TDZ e tautômero “b”, obtendo-se apenas uma, entre um hidrogênio da porção guanidina e a cadeia lateral da Gli200.

Figura 31. Representação bidimensional (a) e tridimensional (b) das principais interações realizadas pela BNG33a com o sítio de ligação do receptor AHK4 obtidas por docagem molecular.



(Fonte: próprio autor. Legenda: O ligante apresenta-se em bastões de cor violeta e os resíduos de interação são representados na cor azul. As linhas tracejadas em verde representam as interações de ligações de hidrogênio com resíduos e a amarela interação do tipo π -enxofre)

Em resumo, de acordo com as simulações por docagem molecular, a BNG33 se ligaria ao sítio ativo do receptor AHK4 através de diferentes pontos, em comparação à cinetina e TDZ, porém com alta afinidade em função da presença de três ligações de hidrogênio.

3.6. ENSAIOS AGRONÔMICOS EM PLANTAS DE MILHO

3.6.1. Velocidade de Germinação

O ensaio de velocidade de germinação tem por objetivo evidenciar a possível influência de um determinado tratamento sobre o estágio inicial do desenvolvimento vegetal. Para tanto, uma contabilização do número de plântulas saudáveis formadas em função do tempo (medido em dias) é estabelecida (MONDO et al., 2008).

Levando em consideração que as citocininas atuam na etapa de germinação (MIRANSARI; SMITH, 2014) aumentando as taxas de multiplicação celular, e possivelmente acelerando o desenvolvimento do processo germinativo. O experimento foi conduzido a fim de comparar a influência da BNG33b e BTU54 com relação a cinetina, e um tratamento em branco (controle). Os resultados são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Resultados de plântulas normais germinadas por dia e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) calculado

Tratamento	Plântulas Germinadas				IVG
	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	
Branco	2	6	2	0	2,03
BTU54	2	6	2	0	2,03
BNG33b	1	5	2	2	1,87
Cinetina	2	4	3	1	1,94

(fonte: próprio autor)

Os resultados de IVG obtidos não evidenciaram uma grande diferença entre os tratamentos realizados, sendo que o Branco e a BTU54 foram iguais e superiores à cinetina, enquanto o tratamento com BNG33b resultou em menor IVG. Por outro lado, não foi observada influência negativa na germinação das sementes de milho, sendo

este um resultado importante, tendo-se em conta que as etapas iniciais do desenvolvimento da plântula são extremamente sensíveis (TUAN et al., 2018). Além disso, os resultados apresentaram-se muito próximos ao obtido com a cinetina, indicando também que tanto a BTU54 quanto a BNG33b podem ser estudadas mais profundamente como alternativas à citocinina natural.

Possivelmente, este mesmo tipo de experimento, se realizado em escala muito maior, por exemplo com 100 unidades de repetição, em diferentes substratos, regimes hídricos e outras espécies vegetais, tem o potencial de evidenciar com grande precisão a influência dos tratamentos, o que infelizmente não foi observado para o ensaio aqui apresentado, em função das limitações operacionais.

3.6.2. Estudos em Câmara de Crescimento de Plantas

3.6.2.1. Ensaio agrônomico utilizando cinetina como referência

Dois experimentos foram realizados utilizando a câmara climática, ambos com plantas de milho, totalizando 10 dias cada um. Ensaio preliminar de germinação foram executados apenas com o intuito de definir a quantidade ótima de plantas por área de substrato e o regime hídrico aplicado, sendo definido como 85 cm² por planta, com espaçamento de 9 cm entre cada planta. O regime hídrico foi estabelecido em 10 mL de água por planta a cada 48h, aplicados via seringa na região radicular.

Foram utilizadas 6 plantas para o primeiro ensaio podendo-se descartar uma repetição em caso de não germinação ou deformação visível. Os tratamentos realizados, ou seja, as “soluções hormonais” aplicadas nas plantas e as médias dos resultados obtidos estão apresentados na Tabela 13. As “soluções “hormonais” são soluções aquosas de Alkest TW20 0,25% e 1,23 µmol/L de ácido indol-butírico (IBA) e 2,09 µmol/L para a cinetina, BTU54 e BNG33, os tratamentos foram executados aplicando-se as “soluções hormonais” sobre as sementes no momento da semeadura e sobre as folhas após 7 dias do início dos experimentos, na quantidade de 2mL por semente/planta.

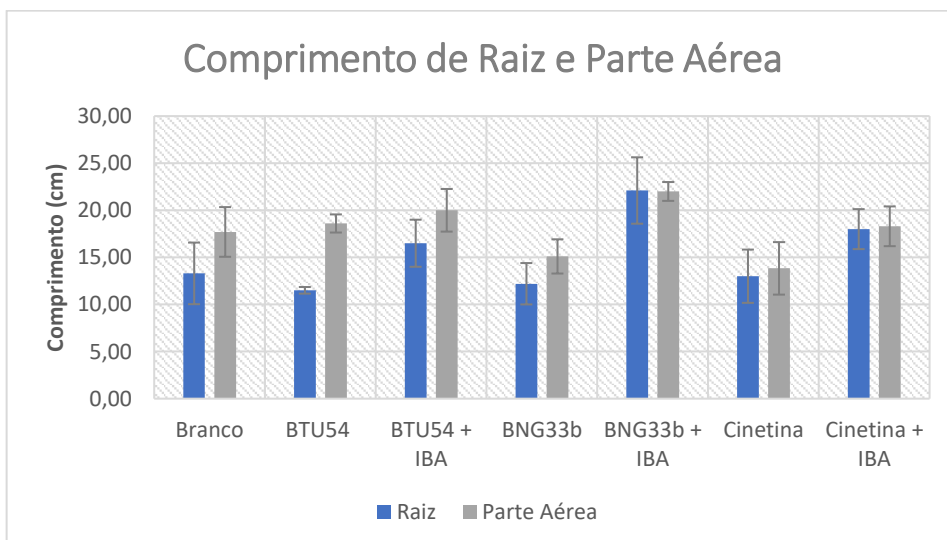
Tabela 13. Média dos resultados obtidos no primeiro ensaio sob diferentes tratamentos (IBA: 1,23 $\mu\text{mol/L}$; cinetina, BTU54 e BNG33b: 2,09 $\mu\text{mol/L}$)

Tratamento	Comprimento (cm)		Massa Seca (g)	
	Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea
Branco	13,3 ^a	17,7 ^a	0,059 ^a	0,080 ^a
BTU54	11,5 ^a	18,6 ^a	0,065 ^a	0,080 ^a
BTU54 + IBA	16,5 ^a	20,0 ^b	0,082 ^b	0,085 ^a
BNG33b	12,2 ^a	15,1 ^a	0,069 ^a	0,062 ^b
BNG33b + IBA	22,1 ^b	22,0 ^b	0,070 ^a	0,094 ^c
Cinetina	13,0 ^a	13,8 ^a	0,068 ^a	0,079 ^a
Cinetina + IBA	18,0 ^c	18,3 ^a	0,082 ^b	0,075 ^a

(fonte: próprio autor. Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste t de Student (P < 0,05))

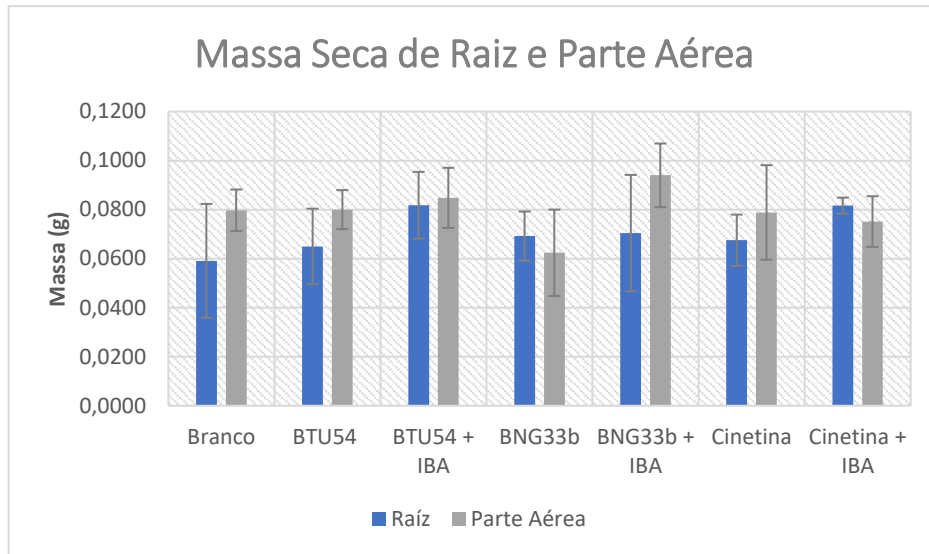
Com o objetivo de melhorar a avaliação dos resultados, os dados obtidos foram plotados em gráficos de barras agregando-se uma linha de erros referente ao desvio padrão calculado para cada observação. Na Figura 32 estão os resultados de comprimento de raiz e parte aérea (medidas a partir da base do vegetal até o topo da maior folha). Na Figura 33 são apresentados os valores médios das massas secas do sistema radicular e parte aérea para cada tratamento (os dados na íntegra estão disponíveis nos Apêndices).

Figura 32. Comprimento médio das plantas após 10 dias de desenvolvimento em câmara de crescimento vegetal



(fonte: próprio autor)

Figura 33. Média das massas secas obtidas do sistema radicular e parte aérea das plantas após 10 dias de desenvolvimento em câmara de crescimento vegetal



(fonte: próprio autor)

A avaliação do comprimento da parte aérea e sistema radicular das plantas em estágio inicial de desenvolvimento não oferece muitas informações a respeito da influência da aplicação exógena de hormônios vegetais. No entanto o estiolamento, que é o crescimento vertical excessivo do caule é regulado pelas citocininas (HABERER; KIEBER, 2002). Observaram-se valores médios superiores de comprimentos radicular e aéreo para cada um dos tratamentos realizados com a BTU54, BNG33b e cinetina em conjunto com o IBA em comparação ao branco, assim pode-se notar que a associação ao IBA elevou o comprimento médio das plantas nos tratamentos quando comparadas aos tratamentos apenas com BTU54, BNG33b e cinetina. Estes resultados estão de acordo com o observado por Argueso e colaboradores (2009), no qual os autores afirmam que citocinina age em conjunto com a auxina para regular o desenvolvimento vascular, sendo que a citocinina promove o desenvolvimento do floema enquanto a auxina regula o desenvolvimento do xilema através de um sistema de interação mutuamente inibitório. Destacam-se os resultados observados no tratamento com BNG33b+IBA (Tabela 13) como estatisticamente superiores aos obtidos com cinetina+IBA, através do teste t a um nível de 95% de significância, enquanto o tratamento com BTU54+IBA é estatisticamente igual à referência (cinetina+IBA).

Dentre as 4 variáveis observadas neste estudo a massa seca do sistema radicular é a mais afetada pela ação dos hormônios vegetais durante as etapas iniciais

do desenvolvimento, devido ao processo intenso de multiplicação celular e pelo fato de ser a primeira parte da plântula a ser formada durante a germinação. Os tratamentos realizados com a BTU54, BNG33b e cinetina em conjunto com o IBA resultaram em valores médios superiores ao branco, como esperado em função da ação hormonal. No entanto, apenas o tratamento com BTU54+IBA e a referência (cinetina+IBA) foram estatisticamente superiores ao branco, ao mesmo tempo que são considerados iguais entre si pelo teste t a 95% de significância. Os resultados médios de massa seca da parte aérea indicam o tratamento com BNG33b+IBA como estatisticamente superior aos demais. De forma geral, neste ensaio, todos os resultados mostraram que os tratamentos associados ao IBA foram superiores e que tanto a BTU54 quanto a BNG33b apresentaram resultados de comprimentos e massas secas similares à cinetina.

Um segundo experimento foi realizado utilizando-se exatamente o mesmo procedimento, porém focando nos tratamentos com BTU54, BNG33b e cinetina em associação com o IBA, com o intuito de comparar os melhores resultados obtidos até então com a referência e com um tratamento controle (branco). Os resultados estão apresentados na Tabela 14, Figura 34 e Figura 35 (os dados na íntegra estão disponíveis nos Apêndices).

Tabela 14. Média dos resultados obtidos no segundo ensaio sob diferentes tratamentos

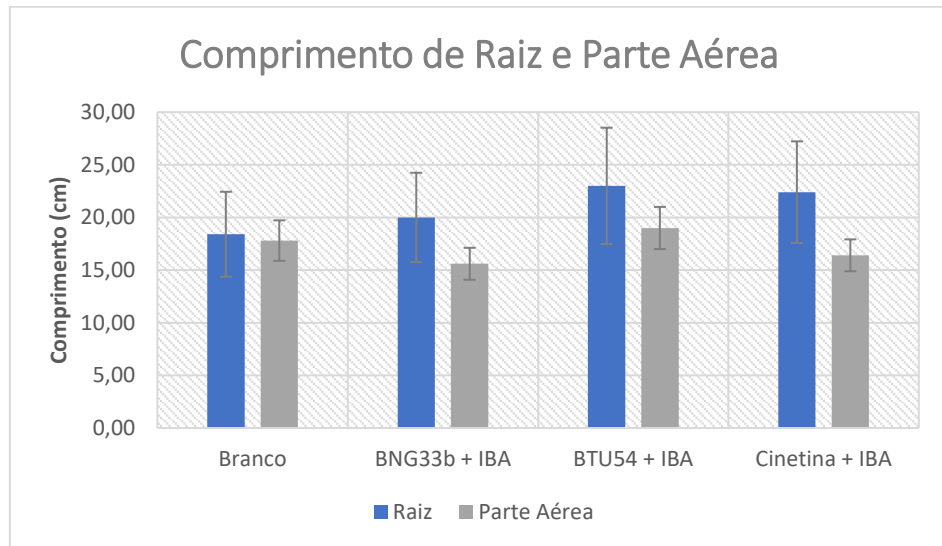
Tratamento	Comprimento (cm)		Massa Seca (g)	
	Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea
Branco	18,4 ^a	17,8 ^a	0,054 ^b	0,067 ^a
BNG33b + IBA	20,0 ^a	15,6 ^b	0,064 ^a	0,057 ^a
BTU54 + IBA	23,0 ^a	19,0 ^a	0,077 ^c	0,064 ^a
Cinetina + IBA	22,4 ^a	16,4 ^a	0,067 ^a	0,063 ^a

(fonte: próprio autor. Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste t de Student (P < 0,05))

Os comprimentos do sistema radicular foram numericamente maiores do que o branco para os três tratamentos realizados, embora estatisticamente os valores médios sejam considerados iguais, a 95% de significância. O mesmo se observa para os valores de comprimento médio de parte aérea, com exceção ao resultado de BNG33b+IBA que se mostrou estatisticamente inferior ao branco, resultado que pode

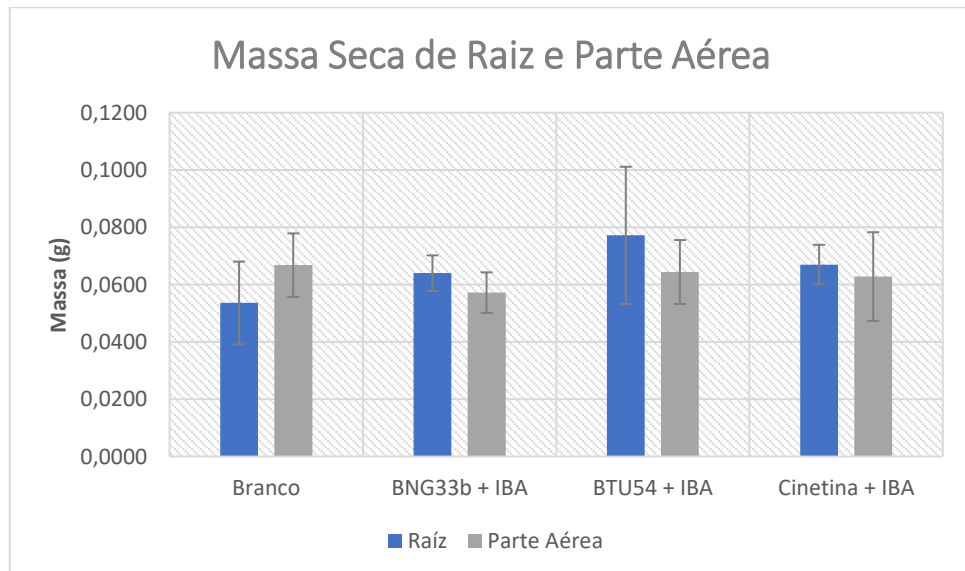
ter acontecido em função de maior crescimento lateral das plantas e menor no sentido vertical, visto que as massas secas são estatisticamente iguais.

Figura 34. Comprimento médio das plantas após 10 dias de desenvolvimento em câmara de crescimento vegetal



(fonte: próprio autor)

Figura 35. Média das massas secas obtidas do sistema radicular e parte aérea das plantas após 10 dias de desenvolvimento em câmara de crescimento vegetal



(fonte: próprio autor)

Os resultados médios de massa seca de raiz indicaram novamente valores estatisticamente maiores para os tratamentos com BTU54+IBA e a referência quando comparados ao tratamento controle (branco) enquanto os valores para a parte aérea

das plantas mostraram-se iguais no teste de significância a 95%. Assim sendo, uma nova evidência aponta para a atividade citocinina da BTU54, equivalente à cinetina e superior a BNG33b, visto que este resultado foi observado nos dois ensaios realizados em câmara climática.

3.6.3. Estudo em Casa de Vegetação

Um experimento com 28 dias de duração foi conduzido em casa de vegetação, utilizando 15 plantas por tratamento, a fim de minimizar as variações observadas naturalmente no processo de desenvolvimento vegetal. De cada vaso com três plantas, a de menor desenvolvimento foi descartada no momento da avaliação, analisando-se 10 plantas por tratamento. Os tratamentos foram realizados utilizando-se as “soluções “hormonais” (soluções aquosas de Alkest TW20 0,25% e 1,23 $\mu\text{mol/L}$ de IBA e 2,09 $\mu\text{mol/L}$ para a cinetina, BTU54 e BNG33b), que foram aplicadas sobre as sementes no momento da semeadura e sobre as folhas aos 7, 14 e 21 dias do início dos experimentos, na quantidade de 2mL por semente/planta. Os resultados na íntegra estão disponíveis nos Apêndices e os valores médios calculados na Tabela 15.

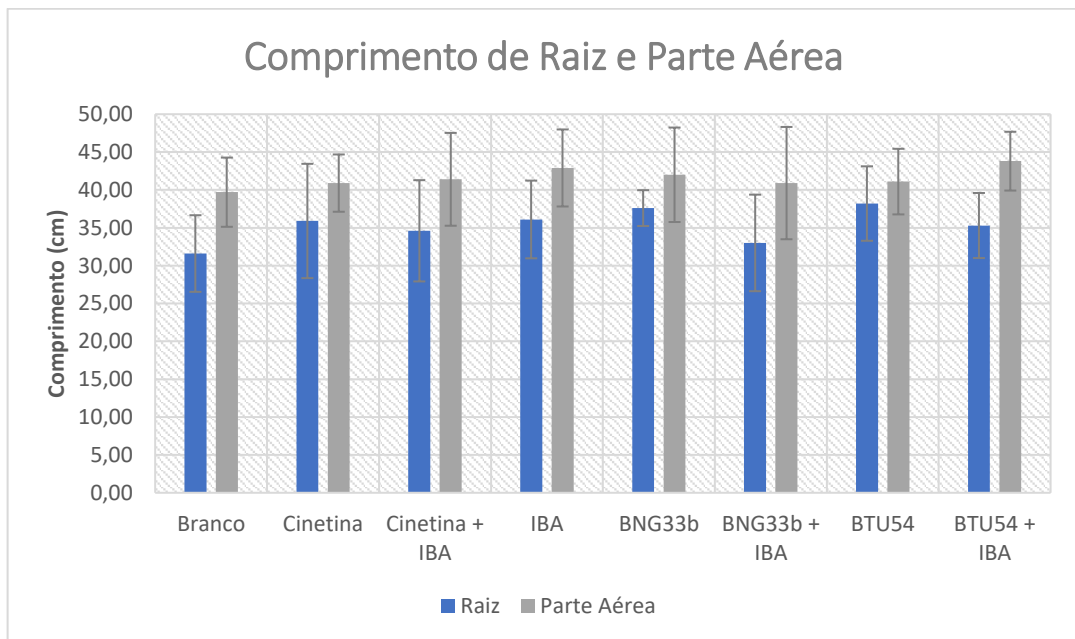
Tabela 15. Média dos resultados obtidos no estudo em casa de vegetação

Tratamento	Comprimento (cm)		Massa Seca (g)		Espessura de colmo (mm)
	Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	
Branco	31,6 ^a	39,7 ^a	0,668 ^a	0,949 ^a	5,75 ^a
Cinetina	35,9 ^b	40,9 ^a	0,955 ^b	1,069 ^b	6,20 ^b
Cinetina + IBA	34,6 ^a	41,4 ^a	0,892 ^b	1,187 ^b	6,60 ^b
IBA	36,1 ^b	42,9 ^a	0,931 ^b	1,169 ^b	6,25 ^b
BNG33b	37,6 ^b	42,0 ^a	1,035 ^b	1,213 ^b	6,90 ^b
BNG33b + IBA	33,0 ^a	40,9 ^a	0,918 ^b	1,262 ^b	6,45 ^b
BTU54	38,2 ^b	41,1 ^a	0,898 ^b	1,294 ^b	7,20 ^c
BTU54 + IBA	35,3 ^b	43,8 ^b	0,883 ^b	1,291 ^b	6,85 ^b

(fonte: próprio autor. Letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos pelo teste t de Student ($P < 0,05$))

Os resultados médios de todas as variáveis observadas foram superiores ao branco. Foi possível mensurar a espessura do colmo das plantas com um paquímetro, sendo este mais um fator a ser interpretado como ponto de influência dos hormônios vegetais. A Figura 36 apresenta os resultados médios de comprimentos de raiz e parte aérea dos tratamentos.

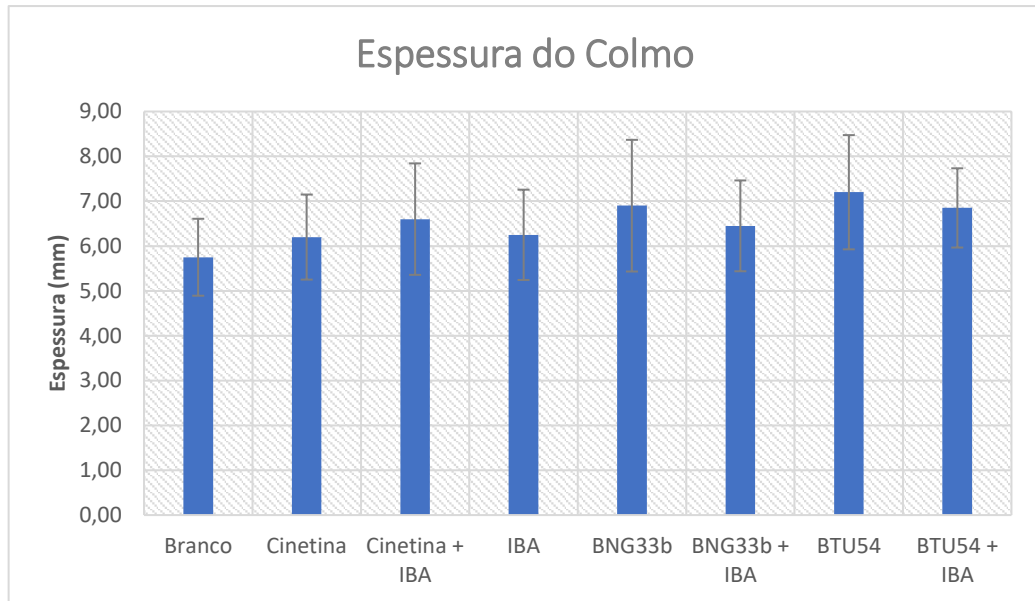
Figura 36. Comprimento médio das plantas após 28 dias de desenvolvimento em casa de vegetação



(fonte: próprio autor)

Após análise estatística dos conjuntos de dados obtidos para cada tratamento observa-se que a aplicação da BTU54+IBA resultou em maiores valores de comprimento de raiz e parte aérea em comparação ao controle (branco) e até mesmo à referência (cinetina+IBA). O tratamento com BNG33b+IBA se mostrou, na média, igual à referência e ao branco, enquanto os resultados obtidos com tratamentos mono substância apresentaram maiores variações, servindo mais como um controle negativo, ou seja, para observar potenciais resultados negativos no desenvolvimento vegetal. O comprimento das plantas como um todo não oferece clara evidência de maior ou menor desenvolvimento, no entanto a altura do vegetal pode ser correlacionada com o processo de estiolamento, muito regulado pelas citocininas, e neste caso, pode-se inferir que se observou tal efeito para o tratamento a BTU54 e também com a BNG33b em menor magnitude.

Figura 37. Valores médios de espessura do colmo após 28 dias de desenvolvimento em casa de vegetação

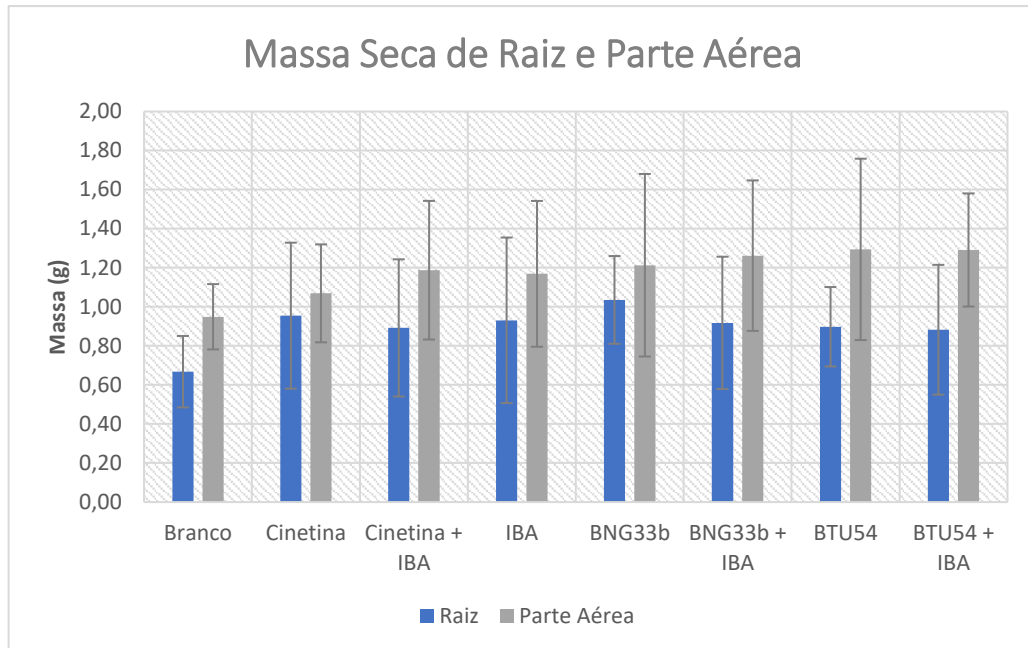


(fonte: próprio autor)

Através do teste t de Student verifica-se que os resultados obtidos com BTU54+IBA e cinetina+IBA são iguais na média, e superiores ao controle e ao tratamento com BNG33b+IBA. Os resultados obtidos com BTU54 e BNG33b foram superiores ao observado no tratamento com cinetina, embora exista uma dispersão alta nos valores que compõe a média. A espessura do colmo é parâmetro relevante na estruturação das plantas, sendo que a citocinina atua aumentando a multiplicação celular especificamente do sistema vascular (ARGUESO; FERREIRA; KIEBER, 2009).

Na Figura 38 estão representados por meio de gráfico de barras os valores médios das massas secas do sistema radicular e parte aérea das plantas. Nota-se que as massas foram maiores que o branco em todos os tratamentos realizados, muito embora os resultados obtidos com BNG33b e BTU54 aplicadas isoladamente apresentam alta dispersão, observando-se as alturas das barras de erros. Analisando-se estatisticamente os resultados observa-se que os tratamentos BNG33b+IBA, BTU54+IBA e cinetina+IBA foram superiores ao branco, ao mesmo tempo que suas médias podem ser consideradas equivalentes entre si, a um nível de 95% de significância.

Figura 38. Valores médios de massa seca das plantas após 28 dias de desenvolvimento em casa de vegetação



(fonte: próprio autor)

Em resumo, os tratamentos realizados com as substâncias selecionadas inicialmente na triagem virtual e análise *in silico* apresentaram resultados muito similares aos da cinetina, porém superiores, neste experimento agrônômico. No entanto, este pequeno incremento de massa no desenvolvimento inicial das plantas pode levar a resultados muito significativos ao final do ciclo da cultura, com maiores rendimentos de colheita e/ou aumento da concentração de substâncias de interesse presentes no metabolismo vegetal.

4. CONCLUSÕES

A triagem virtual utilizando as substâncias previamente sintetizadas pelo grupo de pesquisa revelou alta afinidade de alguns candidatos com o sítio de ligação da enzima ZmCKO1, comparando-se com o ligante CPPU, descrito na literatura como inibidor. Os resultados indicaram, de forma geral, que as BNG e BTU substituídas por grupos nitro e metoxila (Figura 20) apresentaram as maiores afinidades pelo alvo dentre a quimioteca analisada.

Os parâmetros preditos *in silico* foram cruciais para a escolha das substâncias a serem aplicadas nos testes agronômicos. Embora apenas a BNG3b tenha ficado fora das regras de “pesticide-likeness”, a escolha de compostos mais solúveis em água é desejável para utilização nos testes agronômicos, portanto a BTU54 e a BNG33b foram selecionados.

A segunda rodada de docagem molecular utilizando os dois compostos selecionados indicou uma alta similaridade dos pontos de interação dos ligantes com o domínio de ligação da cinetina do receptor AHK4, principalmente para a BTU54. Essa benzoiltiourea estabelece interações muito semelhantes, segundo a docagem molecular realizada, às observadas experimentalmente e citadas na literatura para o TDZ e a cinetina.

Os ensaios agronômicos em câmara climática e casa de vegetação indicaram que a BTU54 apresentou performance estatisticamente igual à cinetina, enquanto a BNG33b mostrou-se inferior de modo geral. Estes resultados corroboram os observados nas simulações computacionais, visto que a BTU54 proporcionou uma pose no complexo com o sítio de ligação do receptor AHK4 muito similar ao obtido experimentalmente com cinetina e TDZ.

Finalmente, conclui-se que a sequência e a combinação de procedimentos adotados foram satisfatórias, e a substância selecionada, a BTU54, apresenta potencial de atuar como citocinina, influenciando diversos aspectos do desenvolvimento vegetal. Como perspectiva, seria interessante propor novas alterações estruturais sobre esta substância para uma nova seleção, realizar um número alto de testes agronômicos e biológicos, e determinar experimentalmente parâmetros toxicológicos e ecotoxicológicos da substância-líder.

5. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

5.1. PROCEDIMENTOS PARA A TRIAGEM VIRTUAL E DOCAGEM MOLECULAR

Obteve-se a estrutura cristalográfica da enzima ZmCKO1 no Banco de Dados de Proteínas (<http://www.rcsb.org>, PDB), disponibilizada pelo código PDB 2QKN, com resolução de 2,15 Å. A região de interesse do sítio ativo foi definida com base nas coordenadas do ligante CPPU originalmente presente, em $x=37,091059$, $y=7,412059$ e $z=3,261353$.

A estrutura cristalográfica do receptor AHK4 ligado à cinetina foi obtida no PDB através do código 3T4S, com resolução de 1,6 Å. A região de interesse do sítio de ligação foi definida com base na posição do ligante cinetina, em $x=5,349500$, $y=22,382625$ e $z=25,386750$.

As estruturas 3D dos ligantes candidatos e seus tautômeros (no caso das BNG) foram construídas utilizando o programa ChemDraw e otimizando-se a geometria usando o Campo de força MM2, implementado no programa ChemBio3D (versão 12.0, PerkinElmer Informatics).

A docagem molecular foi realizada utilizando o programa GOLD (Genetic Optimization for Ligand Docking, Cambridge Crystallographic Data Centre, versão 2020.1), utilizando as funções de pontuação GoldScore, ChemScore, ASP e ChemPLP. Os átomos de hidrogênio polares foram adicionados à proteína com base na ionização inferida pelo programa, o número de operações genéticas em cada execução e outros parâmetros foram definidos como padrão. As moléculas de água foram excluídas da estrutura. O local de ligação foi definido em raio de 15 Å para as análises no sítio ativo. Além disso, os ligantes foram submetidos a 10 execuções iterativas.

A função de pontuação selecionada para o estudo completo de todos ligantes foi definida com base no cálculo de desvio quadrático médio (RMSD) através de procedimento conhecido como redocagem, do inglês “redocking”, realizado diretamente no programa GOLD.

As análises das soluções obtidas no procedimento de docagem molecular e a geração das imagens foram realizadas no programa Discovery Studio Visualizer

(Dassault Systems BIOVIA, Discovery Studio Modeling Environment, versão 2021, San Diego: Dassault Systems, 2020)

5.2. PROCEDIMENTOS PARA OBTENÇÃO DOS PARÂMETROS *IN SILICO*

O estudo *in silico* utilizando as estruturas das substâncias candidatas foi realizado para os ligantes selecionados na triagem virtual para prever os parâmetros físico-químicos: lipofilicidade, solubilidade em água, área de superfície polar topológica (TPSA), número de ligações rotacionáveis e massa molecular. Os parâmetros foram preditos utilizando a plataforma online SwissADME (<http://www.swissadme.ch>), com exceção ao AlogP que foi predito através da plataforma online VCCLab (Virtual Computational Chemistry Laboratory) (<http://www.vcclab.org/lab/alogps/>). Os valores avaliados foram aqueles que estão relacionados a “Regra dos Cinco” de Lipinski (LIPINSKI et al., 1997), com as adaptações sugeridas por Tice (TICE, 2001) para substâncias candidatas à novos pesticidas, especificamente herbicidas pós-emergentes.

Os parâmetros de toxicidade (a abelhas, crustáceos e peixes foram preditos utilizando-se a plataforma ADMETSar (<http://mmmd.ecust.edu.cn/admetsar2/>)).

5.3. PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA ENSAIOS AGRONÔMICOS

As BU, BTU e BNG utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho de pesquisa foram anteriormente sintetizadas por nosso grupo de pesquisa de acordo com o procedimento descrito por Brito e colaboradores (BRITO et al., 2015). A cinetina (importada e distribuída por Galvanotec Ltda) e o ácido indol-butírico (IBA) (importado e distribuído por Galvanotec Ltda) adquiridos e cedidos pela empresa Inquima.

Os reguladores de crescimento (cinetina e IBA) e as substâncias líderes foram inicialmente diluídos em DMSO (marca Synth) na concentração de 12,2 g/L para o ácido indol-butírico e 22,0 g/L para a cinetina e as substâncias líderes, nomeadas de “soluções concentradas”. Então, seguiu-se a preparação das “soluções estoque”, diluindo-se 0,41 mL das “soluções concentradas” em 100 mL de uma solução aquosa contendo 1,0% em massa de Alkest TW20 (monolaurato de sorbitan etoxilado 20EO), 5,0% em massa de propilenoglicol e 0,1% em massa de Acticide LBP44 (conservante).

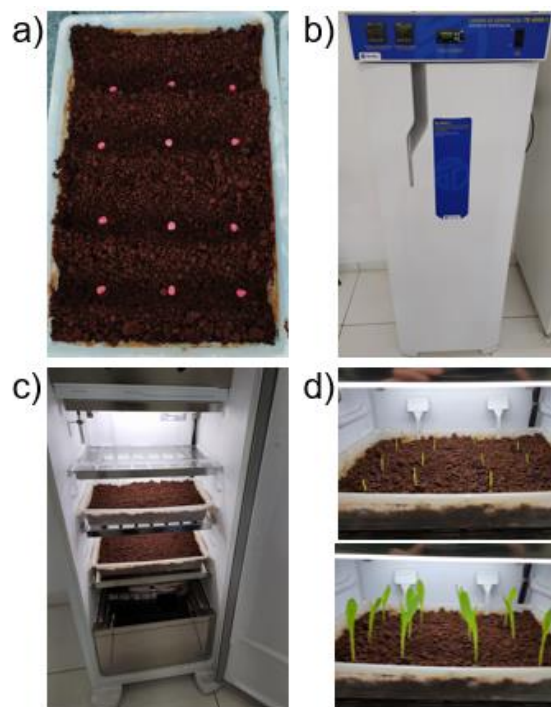
5.4. PROCEDIMENTOS PARA ENSAIOS AGRONÔMICOS EM CÂMARA DE CRESCIMENTO DE PLANTAS

As “soluções estoque” foram diluídas em solução aquosa de Alkest TW20 0,25% nas proporções adequadas para se obter concentrações de 1,23 $\mu\text{mol/L}$ para o IBA e 2,09 $\mu\text{mol/L}$ para a cinetina e as substâncias candidatas líderes, gerando as “soluções hormonais”.

As sementes de milho utilizadas foram cedidas pela empresa Inquima, da marca Dekalb DKB 230 Pro3. Utilizou-se substrato estéril para crescimento de mudas formulado na Inquima, composto por 25% turfa (marca Bioma Brady), 25% areia virgem estéril e 50% solo argiloso virgem estéril (umidade do substrato: 25%) (MONDO et al., 2008).

O desenvolvimento das plantas de milho foi conduzido em câmara climática com controle preciso de temperatura, umidade e fotoperíodo (Figura 39b, Figura 39c), mantendo-se o ambiente em 25°C com 50% de umidade relativa do ar e 12 horas/dia de luz durante todo o tempo de incubação (3 pares de lâmpadas LED, 70 μmol fótons por prateleira) (Figura 39).

Figura 39. a) Bandeja contendo substrato e as sementes de milho no momento da semeadura; b) e c) Câmara Climática utilizada nos experimentos; d) Diferentes etapas do desenvolvimento vegetal durante o tempo de incubação



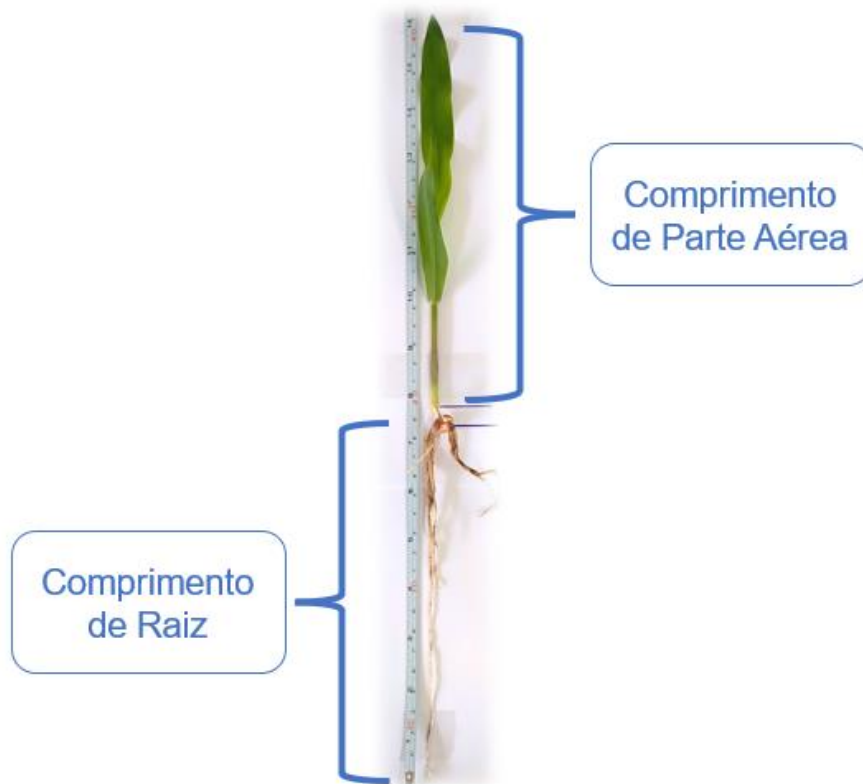
(fonte: próprio autor)

A sementeira foi realizada em bandejas tipo Gerbox, a 2 cm de profundidade, estipulando-se 6 plantas por tratamento (Figura 39a), sendo que a de menor desenvolvimento foi sempre descartada no momento da avaliação.

A aplicação das “soluções hormonais” foi executada sobre as sementes no momento da sementeira e sobre as folhas após 7 dias do início dos experimentos, na quantidade de 2mL por semente/planta. O regime hídrico estabelecido foi de 10 mL por planta a cada 48h aplicados com uma seringa na região radicular.

Após 10 dias de desenvolvimento, a partir da sementeira, as plantas foram removidas integralmente e lavadas (Figura 40). Foram avaliados os seguintes parâmetros: comprimento da parte aérea e do sistema radicular, massa seca da parte aérea e das raízes (OLIVEIRA; PLETSCH; COSTA, 2019).

Figura 40. Exemplo de planta ao final do período de desenvolvimento em câmara climática, removida e lavada, para a determinação de comprimento radicular e de parte aérea



(fonte: próprio autor)

Os resultados obtidos foram analisados realizando-se o teste t de Student (com significância de 95%) para comparar valores em pares, considerando-se variâncias

iguais ou diferentes a partir do teste F (com significância de 95%) previamente executado. Para realização da avaliação estatística utilizou-se o Microsoft Excel 2019.

5.5. PROCEDIMENTOS PARA ENSAIOS AGRONÔMICOS EM CASA DE VEGETAÇÃO

O ensaio foi conduzido em casa de vegetação com regime hídrico automatizado. Foram utilizados vasos plásticos de 3L, contendo aproximadamente 2 kg de substrato, adicionando-se 350 mL de água inicialmente. Adotou-se um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 8 tratamentos e 5 repetições totalizando 40 unidades experimentais contendo 3 plantas cada.

As “caldas hormonais” foram aplicadas sobre as sementes exatamente após o plantio, na relação de 2 mL por semente e após 7, 14 e 21 dias a partir da data da semeadura.

Após 28 dias de desenvolvimento, a partir da semeadura, as plantas foram removidas integralmente e lavadas, descartando-se o exemplar de menor desenvolvimento por vaso. Foram avaliados os seguintes parâmetros: comprimento da parte aérea e do sistema radicular, massa seca da parte aérea e das raízes e espessura do colmo (OLIVEIRA; PLETSCHE; COSTA, 2019). Para determinação das massas secas as plantas foram mantidas em estufa com circulação de ar a 60°C por 72h.

Os resultados obtidos foram analisados realizando-se o teste t de Student (com significância de 95%) para comparar valores em pares, considerando-se variâncias iguais ou diferentes a partir do teste F (com significância de 95%) previamente executado. Para realização da avaliação estatística utilizou-se o Microsoft Excel 2019.

5.6. DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO

O procedimento adotado consistiu em realizar a germinação das plântulas de milho em caixas do tipo Gerbox preenchidas com substrato estéril (umidade de 25%) (MONDO et al., 2008) em câmara climática com controle preciso de temperatura, umidade e fotoperíodo, mantendo-se o ambiente em 25°C com 50% de umidade relativa do ar e 12 horas/dia de luz durante todo o tempo de incubação. A semeadura foi realizada a 2 cm de profundidade aplicando-se 2 mL das “soluções hormonais” sobre as sementes.

As avaliações das plântulas foram realizadas diariamente, as 9:00h, a partir do dia em que surgem as primeiras normais (definidas como as de no mínimo 30 mm de altura nas quais está presente a primeira folha verdadeira (Figura 41)). Essas plântulas normais são computadas e retiradas do substrato. O procedimento descrito de avaliação prosseguiu até o dia da última contagem. Ao fim do teste, com os dados diários do número de plântulas normais, calculou-se o índice de velocidade de germinação (IVG) empregando a Equação 1 (KRZYZANOWSKI; VIEIRA; NETO, 1999).

Equação 1. Cálculo do Índice de Velocidade de Germinação (IVG)

$$IVG = \frac{G1}{N1} + \frac{G2}{N2} + \dots + \frac{Gn}{Nn}$$

Onde:

IVG = índice de velocidade de germinação

G1, G2, Gn = número de plântulas normais computadas na primeira contagem, na segunda contagem e na última contagem

N1, N2, Nn = número de dias da semente à primeira, à segunda e à última contagem

Figura 41. Desenvolvimento de plântula de milho da germinação aos estágios vegetativos iniciais



(fonte: adaptado de PIONEER SEMENTES, Online)

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARGUESO, C. T.; FERREIRA, F. J.; KIEBER, J. J. Environmental perception avenues: The interaction of cytokinin and environmental response pathways. **Plant, Cell and Environment**, v. 32, n. 9, p. 1147–1160, 2009.

ASHIKARI, M. et al. Cytokinin Oxidase Regulates Rice Grain Production. **Science**, v. 309, n. 5735, p. 741 LP – 745, 29 jul. 2005.

BAJGUZ, A.; PIOTROWSKA, A. Conjugates of auxin and cytokinin. **Phytochemistry**, v. 70, n. 8, p. 957–969, 2009.

BARTRINA, I. et al. Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell**, v. 23, n. 1, p. 69–80, 2011.

BILYEU, K. D. et al. Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. **Plant Physiology**, v. 125, n. 1, p. 378–386, 2001.

BRITO, T. O. et al. Design, syntheses and evaluation of benzoylthioureas as urease inhibitors of agricultural interest. **RSC Advances**, v. 5, n. 55, p. 44507–44515, 2015.

BRUNONI, F. et al. The adjuvant activity of two urea derivatives on cytokinins: an example of serendipitous dual effect. **Plant Growth Regulation**, v. 95, n. 2, p. 169–190, 2021.

BURKE, J. J. 6-Benzyladenine Enhancement of Cotton. **The Journal of Cotton Science**, v. 15, p. 206–214, 2011.

FARIDUDDIN, Q.; AHMAD, A.; HAYAT, S. Responses of *Vigna radiata* to Foliar Application of 28-Homobrassinolide and Kinetin. **Biologia Plantarum**, v. 48, n. 3, p. 465–468, 2004.

FENG, J. et al. 3 - Cytokinins. In: LI, J.; LI, C.; SMITH, S. M. (Eds.). . **Hormone Metabolism and Signaling in Plants**. [s.l.] Academic Press, 2017. p. 77–106.

GHIVIRIGA, I. et al. Tautomerism of guanidines studied by ^{15}N NMR : 2-hydrazono-3-phenylquinazolin-4 (3 H) -ones and related compounds †. v. 4, n. 735547, p. 4110–4119, 2009.

HABERER, G.; KIEBER, J. J. Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. **Plant Physiology**, v. 128, n. 2, p. 354–362, 2002.

HALPERIN, I. et al. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 47, n. 4, p. 409–443, 2002.

HEYL, A. et al. Evolutionary proteomics identifies amino acids essential for ligand-binding of the cytokinin receptor CHASE domain. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, p. 1–8, 2007.

HOTHORN, M.; DABI, T.; CHORY, J. Structural basis for cytokinin recognition by *Arabidopsis thaliana* histidine kinase 4. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 11, p. 766–768, 2011.

HUNG, C.-L.; CHEN, C.-C. Computational approaches for drug discovery. **Drug development research**, v. 75, n. 6, p. 412–418, set. 2014.

INOUE, T. et al. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. **Nature**, v. 409, n. February, p. 48–51, 2001.

JACKSON, M. B.; CAMPBELL, D. J. Effects of Benzyladenine and Gibberellic Acid on the Responses of Tomato Plants to Anaerobic Root Environments and to Ethylene. **The New Phytologist**, v. 82, n. 2, p. 331–340, 1979.

JAIN, A. Computer aided drug design. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 884, n. 1, p. 504–509, 2017.

JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of molecular biology**, v. 267, n. 3, p. 727–748, abr. 1997.

KHALID, S. et al. Influence of exogenous applications of plant growth regulators on fruit quality of young “Kinnow” mandarin (*Citrus nobilis* × *C. deliciosa*) trees. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 14, n. 2, p. 229–234, 2012.

KIEBER, J. J.; SCHALLER, G. E. Cytokinin signaling in plant development. **Development (Cambridge, England)**, v. 145, n. 4, p. 1–7, 2018.

KOPEČNÝ, D. et al. Kinetic and structural investigation of the cytokinin oxidase/dehydrogenase active site. **FEBS Journal**, v. 283, n. 2, p. 361–377, 2016.

KOPRNA, R. et al. Use of cytokinins as agrochemicals. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 3, p. 484–492, 2016.

KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; NETO, J. DE B. F. **Vigor de Sementes: Conceitos e Testes**. Londrina: Associação Brasileira de Sementes, 1999.

KUCERA, B.; COHN, M. A.; LEUBNER-METZGER, G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. **Seed Science Research**, v. 15, n. 4, p. 281–307, 2005.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1, p. 3–25, 1997.

LOMIN, S. N. et al. Receptor Properties and Features of Cytokinin Signaling. **Acta Naturae**, v. 4, n. 3, p. 31–45, 2012.

MACALINO, S. J. Y. et al. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, n. 9, p. 1686–1701, 2015.

MADHUSUDHAN, K. V.; SUDHAKAR, C. Morphological responses of a high yielding groundnut cultivar (*Arachis hypogaea* L. cv. K-134) under water stress. **Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research**, v. 2, n. 01, p. 35–38, 2014.

MALITO, E. et al. Structures of Michaelis and product complexes of plant cytokinin

dehydrogenase: Implications for flavoenzyme catalysis. **Journal of Molecular Biology**, v. 341, n. 5, p. 1237–1249, 2004.

MIRANSARI, M.; SMITH, D. L. Plant hormones and seed germination. **Environmental and Experimental Botany**, v. 99, p. 110–121, 2014.

MÖGLICH, A.; AYERS, R. A.; MOFFAT, K. Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains. **Structure (London, England : 1993)**, v. 17, n. 10, p. 1282–1294, out. 2009.

MONDO, V. H. V. et al. Teste de germinação de sementes de *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan (Fabaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 2, p. 177–183, 2008.

MOTYKA, V. et al. Changes in cytokinin content and cytokinin oxidase activity in response to derepression of ipt gene transcription in transgenic tobacco calli and plants. **Plant Physiology**, v. 112, n. 3, p. 1035–1043, 1996.

MUNIZ, H. DOS SANTOS. **Métodos híbridos em docagem molecular: implementação, validação e aplicação**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2018.

O'BRIEN, J. A.; BENKOVÁ, E. Cytokinin cross-talking during biotic and abiotic stress responses. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. NOV, p. 1–11, 2013.

OLIVEIRA, P. C. DE; PLETSCH, T.; COSTA, D. Avaliação do crescimento de plantas jovens de milho cultivadas em diferentes tipos de solo. **DOAJ, AGRIS, Latindex, Journal TOCs, CORE, Discoursio Open Science**, v. 12, n. September, p. 10–14, 2019.

PASSOS, A. M. A. DOS et al. Cinetina e nitrato de potássio em características agrônômicas de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 925–928, 2008.

PICCIRILLO, E.; DO AMARAL, A. T. Virtual screening of bioactive compounds: Concepts and applications. **Química Nova**, v. 41, n. 6, p. 662–677, 2018.

POPELKA, H. et al. Kinetic and structural investigation of the cytokinin oxidase / dehydrogenase active site. **FEBS Journal**, v. 283, p. 361–377, 2016.

RICCI, A.; BERTOLETTI, C. Urea derivatives on the move: Cytokinin-like activity and adventitious rooting enhancement depend on chemical structure. **Plant Biology**, v. 11, n. 3, p. 262–272, 2009.

STERN, R. A.; FLAISHMAN, M. A. Benzyladenine effects on fruit size, fruit thinning and return yield of 'Spadona' and 'Coscia' pear. **Scientia Horticulturae**, v. 98, n. 4, p. 499–504, 2003.

TICE, C. M. Selecting the right compounds for screening: Does Lipinski's rule of 5 for pharmaceuticals apply to agrochemicals? **Pest Management Science**, v. 57, n. 1, p. 3–16, 2001.

TUAN, P. A. et al. **Molecular mechanisms of seed germination**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

WANG, Q.; ZHANG, F.; SMITH, D. L. Application of Ga₃ and kinetin to improve corn and soybean seedling emergence at low temperature. **Environmental and Experimental Botany**, v. 36, n. 4, p. 377–383, 1996.

WHEELDON, C. D.; BENNETT, T. There and back again: An evolutionary perspective on long-distance coordination of plant growth and development. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 109, n. April, p. 55–67, 2021.

ZALABÁK, D. et al. Maize cytokinin dehydrogenase isozymes are localized predominantly to the vacuoles. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 104, p. 114–124, 2016.

7. APÊNDICES

Tabela A 1. Resultados de todas as observações realizadas nas plantas de milho após 10 dias de desenvolvimento em câmara climática – 1º experimento

Tratamento	Comprimento (cm)		Massa Seca (g)	
	Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea
Branco	17,0	20,0	0,072	0,086
Branco	15,5	20,0	0,041	0,087
Branco	14,0	18,5	0,044	0,075
Branco	11,0	14,0	0,045	0,068
Branco	9,0	16,0	0,094	0,083
BTU54	11,0	19,0	0,085	0,089
BTU54	11,5	18,5	0,051	0,077
BTU54	11,5	17,5	0,048	0,074
BTU54	12,0	20,0	0,071	0,088
BTU54	11,5	18,0	0,070	0,072
BTU54 + IBA	17,0	21,0	0,067	0,081
BTU54 + IBA	13,0	17,5	0,102	0,081
BTU54 + IBA	15,0	20,5	0,078	0,085
BTU54 + IBA	19,0	23,0	0,074	0,105
BTU54 + IBA	18,5	18,0	0,088	0,072
BNG33b	15,0	16,5	0,073	0,069
BNG33b	10,0	12,0	0,058	0,031
BNG33b	10,0	16,0	0,060	0,069
BNG33b	12,5	15,0	0,082	0,072
BNG33b	13,5	16,0	0,073	0,071
BNG33b + IBA	23,0	21,0	0,095	0,101
BNG33b + IBA	26,0	21,0	0,068	0,106
BNG33b + IBA	19,5	23,0	0,059	0,078
BNG33b + IBA	17,5	22,0	0,038	0,082
BNG33b + IBA	24,5	23,0	0,092	0,103
Cinetina	13,0	16,0	0,073	0,071
Cinetina	9,0	10,0	0,054	0,059
Cinetina	13,0	11,0	0,058	0,060
Cinetina	17,0	17,0	0,081	0,096
Cinetina	11,0	14,0	0,064	0,079
Cinetina	15,0	15,0	0,075	0,107
Cinetina + IBA	19,0	17,5	0,079	0,062
Cinetina + IBA	21,0	22,0	0,086	0,091
Cinetina + IBA	18,0	17,0	0,078	0,073
Cinetina + IBA	16,0	18,0	0,082	0,073
Cinetina + IBA	16,0	17,0	0,083	0,076

Tabela A 2. Resultados de todas as observações realizadas nas plantas de milho após 10 dias de desenvolvimento em câmara climática – 2º experimento

Tratamento	Comprimento (cm)		Massa Seca (g)	
	Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea
Branco	24,0	21,0	0,075	0,073
Branco	21,0	18,0	0,062	0,064
Branco	17,0	17,0	0,043	0,053
Branco	16,0	17,0	0,046	0,082
Branco	14,0	16,0	0,042	0,062
BNG33b + IBA	24,0	14,0	0,060	0,065
BNG33b + IBA	14,0	14,0	0,065	0,046
BNG33b + IBA	24,0	16,0	0,056	0,061
BNG33b + IBA	20,0	17,0	0,067	0,057
BNG33b + IBA	18,0	17,0	0,072	0,057
BTU54 + IBA	21,0	22,0	0,087	0,060
BTU54 + IBA	16,0	18,0	0,072	0,066
BTU54 + IBA	21,0	17,0	0,070	0,055
BTU54 + IBA	27,0	20,0	0,111	0,083
BTU54 + IBA	30,0	18,0	0,046	0,058
Cinetina + IBA	28,0	18,0	0,074	0,062
Cinetina + IBA	17,0	15,0	0,066	0,070
Cinetina + IBA	26,0	18,0	0,073	0,085
Cinetina + IBA	18,0	16,0	0,057	0,047
Cinetina + IBA	23,0	15,0	0,065	0,050

Tabela A 3. Resultados de todas as observações realizadas nas plantas de milho após 28 dias de desenvolvimento em casa de vegetação

Tratamento	Comprimento (cm)		Massa Seca (g)		Espessura do colmo (mm)
	Raiz	Parte Aérea	Raiz	Parte Aérea	
Branco	28,0	41,0	0,486	1,001	6,5
Branco	30,0	37,0	0,425	1,105	6,0
Branco	29,0	33,0	0,508	0,704	6,5
Branco	29,0	41,0	0,651	1,008	6,5
Branco	39,0	44,0	0,798	0,913	5,0
Branco	28,0	40,0	0,669	0,814	4,5
Branco	42,0	46,0	1,021	1,145	7,0
Branco	29,0	45,0	0,861	1,050	5,5
Branco	34,0	36,0	0,606	1,077	5,0
Branco	28,0	34,0	0,652	0,672	5,0
Cinetina	36,0	44,0	0,781	1,376	8,0
Cinetina	25,0	38,0	0,485	0,965	6,5
Cinetina	38,0	36,0	0,912	0,713	5,0

Continuação da Tabela A 4. Resultados de todas as observações realizadas nas plantas de milho após 28 dias de desenvolvimento em casa de vegetação

Cinetina	45,0	45,0	1,236	1,231	7,0
Cinetina	42,0	43,0	1,306	1,153	6,0
Cinetina	32,0	43,0	1,100	1,318	6,0
Cinetina	43,0	45,0	1,446	1,095	6,0
Cinetina	43,0	42,0	1,240	1,191	7,0
Cinetina	30,0	38,0	0,719	1,049	5,5
Cinetina	25,0	35,0	0,320	0,597	5,0
Cinetina + IBA	41,0	49,0	1,420	1,510	8,0
Cinetina + IBA	49,0	53,0	1,554	1,917	8,0
Cinetina + IBA	37,0	39,0	0,725	1,045	7,5
Cinetina + IBA	37,0	39,0	0,789	1,042	6,0
Cinetina + IBA	28,0	40,0	0,765	0,965	5,5
Cinetina + IBA	32,0	40,0	1,052	1,399	8,0
Cinetina + IBA	28,0	32,0	0,450	0,710	5,0
Cinetina + IBA	28,0	36,0	0,621	0,827	5,0
Cinetina + IBA	33,0	45,0	0,685	1,205	6,0
Cinetina + IBA	33,0	41,0	0,858	1,253	7,0
IBA	43,0	48,0	1,374	1,500	7,0
IBA	38,0	48,0	1,037	1,108	6,0
IBA	35,0	41,0	0,591	1,172	6,5
IBA	35,0	38,0	0,659	0,962	6,5
IBA	29,0	35,0	0,412	0,641	5,0
IBA	26,0	37,0	0,371	0,690	5,0
IBA	39,0	43,0	1,669	0,960	5,0
IBA	40,0	45,0	0,947	1,311	6,5
IBA	38,0	50,0	1,031	1,776	7,0
IBA	38,0	44,0	1,217	1,567	8,0
BNG33b	42,0	52,0	0,937	1,108	6,0
BNG33b	38,0	48,0	1,317	1,646	9,0
BNG33b	35,0	37,0	0,481	0,850	6,5
BNG33b	37,0	42,0	1,118	1,663	9,0
BNG33b	36,0	38,0	1,065	0,743	5,0
BNG33b	40,0	32,0	1,024	0,479	5,0
BNG33b	37,0	40,0	1,038	1,152	6,0
BNG33b	40,0	50,0	1,256	1,916	7,5
BNG33b	36,0	40,0	1,041	0,998	7,0
BNG33b	35,0	41,0	1,075	1,572	8,0
BNG33b + IBA	28,0	42,0	0,609	1,268	6,0
BNG33b + IBA	27,0	30,0	0,618	0,808	6,0
BNG33b + IBA	31,0	52,0	1,465	1,559	6,0
BNG33b + IBA	29,0	46,0	1,158	1,986	8,0
BNG33b + IBA	24,0	35,0	0,459	0,737	5,0
BNG33b + IBA	32,0	30,0	0,518	0,864	5,0
BNG33b + IBA	42,0	49,0	1,134	1,446	7,0
BNG33b + IBA	42,0	43,0	1,081	1,480	7,5
BNG33b + IBA	38,0	42,0	1,035	1,220	7,0

Continuação da Tabela A 5. Resultados de todas as observações realizadas nas plantas de milho após 28 dias de desenvolvimento em casa de vegetação

BNG33b + IBA	37,0	40,0	1,100	1,250	7,0
BTU54	39,0	39,0	0,751	1,198	7,0
BTU54	45,0	42,0	1,192	1,804	9,5
BTU54	30,0	36,0	0,860	0,985	7,0
BTU54	38,0	50,0	1,332	2,217	8,5
BTU54	43,0	41,0	0,818	0,880	5,0
BTU54	33,0	36,0	0,765	0,809	6,0
BTU54	34,0	45,0	0,781	1,582	7,5
BTU54	37,0	39,0	0,740	1,274	8,0
BTU54	44,0	44,0	0,939	1,374	7,0
BTU54	39,0	39,0	0,800	0,817	6,5
BTU54 + IBA	45,0	49,0	1,612	1,747	8,0
BTU54 + IBA	37,0	39,0	1,265	1,119	7,0
BTU54 + IBA	37,0	45,0	0,638	1,545	7,0
BTU54 + IBA	31,0	45,0	0,785	1,270	6,0
BTU54 + IBA	34,0	43,0	0,741	1,158	6,0
BTU54 + IBA	37,0	46,0	1,093	1,602	8,0
BTU54 + IBA	37,0	47,0	0,720	0,877	8,0
BTU54 + IBA	32,0	47,0	0,697	1,495	6,0
BTU54 + IBA	32,0	39,0	0,659	0,986	6,5
BTU54 + IBA	31,0	38,0	0,615	1,110	6,0