



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA CRISTINA PREISLER

**NANOPARTÍCULAS CONTENDO DOADOR DE ÓXIDO
NÍTRICO: ABSORÇÃO, TRANSPORTE E EFEITOS NO
PROCESSO GERMINATIVO E EM ASPECTOS
MORFOFISIOLÓGICOS DA SOJA**

ANA CRISTINA PREISLER

**NANOPARTÍCULAS CONTENDO DOADOR DE ÓXIDO
NÍTRICO: ABSORÇÃO, TRANSPORTE E EFEITOS NO
PROCESSO GERMINATIVO E EM ASPECTOS
MORFOFISIOLÓGICOS DA SOJA**

Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina- UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Halley Caixeta, de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Londrina
2024

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

P924n Preisler, Ana Cristina.

Nanopartículas contendo doador de óxido nítrico: Absorção, transporte e efeitos no processo germinativo e em aspectos morfofisiológicos da soja / Ana Cristina Preisler. - Londrina, 2024.

130 f.

Orientador: Halley Caixeta de Oliveira.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2024.

Inclui bibliografia.

1. S-nitrosoglutathione - Tese. 2. Nanotecnologia - Tese. 3. Nanopartículas poliméricas - Tese. 4. Glycine max L. Merr. - Tese. I. Caixeta de Oliveira, Halley .

II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

CDU 63

ANA CRISTINA PREISLER

**NANOPARTÍCULAS CONTENDO DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO:
ABSORÇÃO, TRANSPORTE E EFEITOS NO PROCESSO
GERMINATIVO E EM ASPECTOS MORFOFISIOLÓGICOS DA SOJA**

Tese de doutorado apresentada ao Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina- UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Halley Caixeta, de Oliveira (orientador)
Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Dra. Camila Neves Lange
Universidade Federal do ABC (UFABC)

Profa. Dra. Neidiquele Maria Silveira
Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Profa. Dra. Ines Cristina Batista Fonseca
Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Prof. Dr. Claudemir Zucareli
Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Londrina
2024

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo a Deus primeiramente, por ter uma presença tão forte na minha vida, sendo sempre sinônimo de força, promessas e perseverança.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, à Fundação Araucária referente ao pagamento de Bolsa Técnico II (BT-NS) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia: Nanotecnologia para Agricultura Sustentável (ICT NanoAgr, CANPq #405924/2022-4, CAPES, FAPESP).

Agradeço a UEL pelo acolhimento, formação e estrutura que foram fundamentais no desenvolvimento do trabalho.

Uma grande gratidão ao meu orientador Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira por ter me aceitado como sua aluna, pelos seus ensinamentos, e por ser essas pessoas íntegra, digna e extremamente dedicado aos seus alunos, sendo um exemplo profissional para minha vida.

Ao professor Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior e sua aluna Amanda M. Dionisio pela disponibilidade de me auxiliar na utilização do microscópio confocal. Agradeço ainda à Universidade Federal do ABC/Santo André em especial a professora Dra. Amedea Barozzi Seabra pelo apoio, fornecendo as formulações e me recebendo em seu laboratório sempre que necessário.

Aos meus companheiros e amigos de laboratório, em especial a Giovanna Camargo do Carmo, ao Rafael Caetano da Silva e ao Leonardo Fernandes Tavares meu muito obrigada por dividirem seus conhecimentos, dedicarem de seu tempo a ensinar o que sabem e me apoiarem em todos os momentos.

Agradecer sempre aos meus pais Pedra Eva e Jose Arlindo, por toda preocupação, apoio incondicional, pela paciência, pelas noites em claro, pelo amor e carinho durante esse trajeto. Aos meus grandes amigos, amigas, irmãos e irmãs da vida, professores, a vocês que tanto me ensinam e aturam durante as crises, meus eternos agradecimentos!

PREISLER, Ana Cristina. **Nanopartículas contendo doador de óxido nítrico: Absorção, transporte e efeitos no processo germinativo e em aspectos morfofisiológicos da soja**. 2024. 130 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

RESUMO

O uso de nanocarreadores poliméricos tem demonstrado ser uma estratégia eficaz para a aplicação de óxido nítrico (NO) em plantas, protegendo as moléculas doadoras da degradação e garantindo a liberação sustentada do ativo. Entretanto, as propriedades físico-químicas das partículas podem afetar a interação com a planta e influenciar a eficácia do composto nanoencapsulado. Portanto, o objetivo geral deste trabalho foi estudar o modo de ação de nanopartículas poliméricas liberadoras de NO, de diferentes composições e cargas, em plantas de soja (*Glycine max* L. Merr.). Foram utilizadas nanopartículas de quitosana e de alginato contendo doador de NO (S-nitrosoglutationa, GSNO), aplicadas no tratamento de sementes e nas raízes de plantas de soja. Os objetivos específicos foram abordados em 2 capítulos, sendo eles: 1) avaliar os efeitos do tratamento de sementes de soja com nanopartículas de diferentes composições e cargas contendo GSNO no processo germinativo. Além disso, buscou-se investigar se o tratamento de sementes com as nanopartículas favoreceria a nodulação e o crescimento de plantas de soja; 2) avaliar o modo de ação de nanopartículas liberadoras de NO em resposta a aplicação via raiz e qual o impacto dessas nanopartículas na homeostase do NO. Para esses estudos foram empregados diferentes tratamentos, incluindo GSNO livre, nanopartículas de quitosana contendo glutathione (GSH) com/sem NO (NP CS-GSNO/ NP CS-GSH), nanopartículas de alginato com/sem NO (NP AI-GSNO/ NP AI-GSH), além do controle tratado com água. No primeiro capítulo, para os estudos *in vitro* foi realizada uma curva das formulações nas concentrações de 0; 0,125; 0,250; 0,500; 1,0 e 2,0 mM, avaliando o processo germinativo da soja. Os dados bioquímicos foram obtidos apenas na concentração de 1,0 mM, selecionada com base na curva previamente estabelecida. A mesma concentração foi utilizada para o experimento em que se avaliou a nodulação de plantas de soja após o tratamento de sementes. NP CS-GSNO demonstrou aumento na taxa de germinação para 71% contra 60% da porcentagem inicial na concentração de 1,0mM, no comprimento de raiz (CR) e no número de raízes laterais (NRL), além de ser a única a promover maior acúmulo de massa seca de raiz (MSR), mantendo sempre um efeito constante para a concentração de 1,0 mM. A molécula de GSNO livre também mostrou efeitos positivos na germinação para 1,0 mM. NP AI-GSNO, aumentou o NRL em função do aumento das concentrações, além de ser a única formulação que aumentou a massa seca da parte aérea. Nos estudos de nodulação, a massa seca do nódulo foi significativamente maior para os tratamentos NP CS-GSNO. Foi observada, ainda, uma redução dos parâmetros fotossintéticos para NP CS-GSH e GSNO. No segundo capítulo, nanopartículas de quitosana marcadas com rodamina B foram aplicadas às raízes de soja, possibilitando a detecção nos tecidos por microscopia espectral confocal. Os níveis de NO nas raízes foram medidos simultaneamente com o uso da sonda fluorescente DAF-2DA. Como controle para NO, a fluorescência foi quelada pelo sequestrador de NO cPTIO. A escolha da nanopartícula de quitosana foi baseada em experimentos anteriores. A intensidade de fluorescência, a porcentagem de co-localização, e os parâmetros bioquímicos foram medidos nos intervalos de 30 minutos e 24 horas após a exposição. Para NP CS

GSNO foi possível detectar após 30 minutos de exposição 46% de co-localização entre as nanopartículas e NO na zona de maturação e mais de 60% na zona de ramificação da raiz. Com 24 h, o percentual foi reduzido para 7% e 13% respectivamente. A baixa intensidade de fluorescência detectada em raízes incubadas com cPTIO confirmou a especificidade da sonda DAF-2DA para NO. Após 30 minutos, observou-se ainda um maior teor de H₂O₂ nas raízes tratadas com NP CS-GSNO. Além disso, verificou-se um aumento nos níveis de S-nitrosotióis (RSNO) nas raízes tratadas com NP CS-GSNO e NP CS-GSH. No geral, o uso de NP CS-GSNO mostra-se promissor para melhorar o processo germinativo, os aspectos morfofisiológicos da soja. Além disso, nanopartículas de quitosana foram absorvidas pelas raízes, sendo detectadas nos tecidos vasculares, mostrando a eficiência da entrega do NO às raízes. No geral, estes resultados fornecem insights sobre os mecanismos envolvidos na homeostase do NO e na interação entre as raízes de soja e as nanopartículas.

PALAVRAS-CHAVE: S-nitrosoglutathione. Nanotecnologia. Quitosana. Alginato. *Glycine max* L. Merr.

PREISLER, Ana Cristina. Mode of action of nanoencapsulated nitric oxide donors in soybean plants. 2024. 130 p. Thesis (PhD in Agronomy) - State University of Londrina, Londrina, 2024.

ABSTRACT

The use of polymeric nanocarriers has been demonstrated to be an effective strategy for applying nitric oxide (NO) in plants, protecting the donor molecules from degradation and ensuring the sustained release of the active ingredient. However, the physicochemical properties of the particles can affect the interaction with the plant and influence the effectiveness of the nanoencapsulated compound. Therefore, the general objective of this work was to study the mode of action of NO-releasing polymeric nanoparticles of different compositions and charge in soybean plants (*Glycine max* L. Merr.). Chitosan and alginate nanoparticles containing NO donor (S-nitrosoglutathione, GSNO) were used to treat the seeds and roots of soybean plants. The specific objectives were addressed in 2 chapters, namely: 1) evaluate the effects of treating soybean seeds with nanoparticles of different compositions and fillers containing GSNO on the germination process. Furthermore, we sought to investigate whether seed treatment with nanoparticles would favor nodulation and growth of soybean plants; 2) evaluate the mode of action of NO-releasing nanoparticles in response to root application and the impact of these nanoparticles on NO homeostasis. For these studies, different treatments were used, including free GSNO, chitosan nanoparticles containing glutathione (GSH) with/without NO (NP CS-GSNO/ NP CS-GSH), alginate nanoparticles with/without NO (NP AI-GSNO/ NP AI-GSH), in addition to the water-treated control. In the first chapter, for in vitro studies, a curve of the formulations was carried out at concentrations of 0; 0.125; 0.250, 0.500; 1.0, and 2.0 mM, evaluating the soybean germination process. Biochemical data were obtained only at a concentration of 1.0 mM, selected based on the previously established curve. The same concentration was used for the experiment in which the nodulation of soybean plants after seed treatment was evaluated. NP CS-GSNO demonstrated an increase in the germination rate to 71% against 60% of the initial percentage at a concentration of 1.0 mM, in root length (CR) and the number of lateral roots (NRL), in addition to being the only one to promote greater accumulation of root dry mass (MSR), always maintaining a constant effect at a concentration of 1.0 mM. The free GSNO molecule also showed positive effects on germination at 1.0 mM. NP AI-GSNO increased the NRL due to increasing concentrations, in addition to being the only formulation that increased the dry mass of the shoot. In nodulation studies, nodule dry mass was significantly higher for NP CS-GSNO treatments. A reduction in photosynthetic parameters was also observed for NP CS-GSH and GSNO. In second chapter, chitosan nanoparticles labeled with rhodamine B were applied to soybean roots, enabling tissue detection by confocal spectral microscopy. NO levels in roots were measured simultaneously using the fluorescent probe DAF-2DA. As a control for NO, fluorescence was chelated by the NO scavenger cPTIO. The choice of chitosan nanoparticle was based on previous experiments. Fluorescence intensity, percentage of co-localization, and biochemical parameters measured at intervals of 30 minutes and 24 hours after exposure. For NP CS GSNO, it was possible to detect, after 30 minutes of exposure, 46% co-localization between nanoparticles and NO in the maturation zone and more than 60% in the root branching zone. After 24 hours, the percentage reduced to 7% and 13% respectively. The low fluorescence intensity detected in roots incubated with cPTIO confirmed the

specificity of the DAF-2DA probe for NO. After 30 minutes, a higher H₂O₂ content observed in the roots treated with NP CS-GSNO. Furthermore, there was an increase in the levels of S-nitrosothiols (RSNO) in roots treated with NP CS-GSNO and NP CS-GSH. Overall, the use of NP CS-GSNO shows promise for improving the germination process and the morphophysiological aspects of soybean. Furthermore, chitosan nanoparticles were absorbed by the roots, being detected in the vascular tissues, showing the efficiency of NO delivery to the roots. Overall, these results provide insights into the mechanisms involved in NO homeostasis and the interaction between soybean roots and nanoparticles.

KEYWORDS: S-nitrosoglutathione. Nanotechnology. Chitosan. Alginate. *Glycine max* L. Merr.

LISTA DE FIGURAS – ARTIGO A

- Figura 1** – Esquema representativo do tratamento de sementes. O passo 1 refere-se às etapas de nitroação das nanopartículas com nitrito de sódio e ao tratamento de sementes por imersão. O passo 2 abrange os procedimentos realizados durante os experimentos de germinação e crescimento inicial de plântulas. O passo 3 envolve os procedimentos realizados durante o experimento de nodulação.....64
- Figura 2** – Curvas cinéticas de liberação de NO a partir de nanopartículas de quitosana e alginato carregadas com S-nitrosoglutathione (NP CS-GSNO e NP AI-GSNO).....65
- Figura 3** – Efeitos do tratamento de sementes com nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSNO e NP CS-GSH), nanopartículas de alginato com e sem NO (NP AI-GSNO e NP AI-GSH), e GSNO livre sobre a porcentagem de germinação de sementes de *Glycine max* L. Merr. O controle foi estipulado como a concentração zero (água destilada). Os valores representam as médias (n = 4). (A-C). As curvas de regressão foram ajustadas para as concentrações dentro de cada formulação (p < 0,05) sendo elas: NP CS-GSNO, NP CS-GSH e Free GSNO respectivamente. (D) Letras diferentes acima das barras indicam médias diferentes com base na ANOVA seguida pelo teste Scott Knott para o tratamento NP AI-GSH (p < 0,05).....69
- Figura 4** – Efeito do tratamento de sementes com nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSNO e NP CS-GSH), nanopartículas de alginato com e sem GSNO (NP AI-GSNO e NP AI), e Free GSNO no comprimento de raiz de plantas de *Glycine max* L. Merr. O controle foi estipulado como a concentração zero (água destilada). Os valores representam as médias (n = 4). As curvas de regressão foram ajustadas para as concentrações dentro de cada formulação (p < 0,05).....70
- Figura 5** – Efeito do tratamento de sementes com nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSNO e NP CS-GSH), nanopartículas de alginato com e sem GSNO (NP AI-GSNO e NP AI), e Free GSNO no

comprimento da parte aérea de plantas de *Glycine max* L. Merr. O controle foi estipulado como a concentração zero (água destilada). Os valores representam as médias (n = 4). As curvas de regressão foram ajustadas para as concentrações dentro de cada formulação (p < 0,05).....71

Figura 6 – Efeito do tratamento de sementes com nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSNO e NP CS-GSH), nanopartículas de alginato com e sem GSNO (NP AI-GSNO e NP AI), e Free GSNO no número de raízes laterais de plantas de *Glycine max* L. Merr. O controle foi estipulado como a concentração zero (água destilada). Os valores representam as médias (n = 4). As curvas de regressão foram ajustadas para as concentrações dentro de cada formulação (p < 0,05).....72

Figura 7 – Efeito do tratamento de sementes com nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSNO e NP CS-GSH), nanopartículas de alginato com e sem NO (NP AI-GSNO e NP AI-GSH), e GSNO na (A) massa seca de raiz e (B) massa seca da parte aérea de plantas de *Glycine max* L. Merr. O controle foi estipulado como a concentração zero (água destilada). Os valores representam as médias (n = 4). As curvas de regressão foram ajustadas para as concentrações dentro de cada formulação (p < 0,05).....73

Figura 8 – Teor de água (%) em sementes de *Glycine max* L. Merr. em intervalos de tempo crescentes após o tratamento com nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSNO e NP CS-GSH), nanopartículas de alginato com e sem NO (NP AI-GSNO e NP AI-GSH), GSNO livre e com água (water) na concentração de 1,0 mM. Os valores representam as médias (n = 4). As curvas de regressão foram ajustadas para o tempo dentro de cada tratamento (p < 0,05).....74

Figura 9 – Efeito do tratamento de sementes com nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSNO e NP CS-GSH), nanopartículas de alginato com e sem NO (NP AI-GSNO e NP AI-GSH), Free GSNO e água destilada (controle) no conteúdo de S-nitrosotiois (RSNO) da (A) parte aérea e (B) das raízes em plântulas de *Glycine max* L. Merr.

coletadas após 8 dias. Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão (n = 4). Letras diferentes acima das barras indicam médias diferentes com base na ANOVA seguida pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).....75

Figura 10 –Efeito do tratamento de sementes com nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSNO e NP CS-GSH), nanopartículas de alginato com e sem NO (NP AI-GSNO e NP AI-GSH), GSNO livre e água (controle) na fotossíntese líquida (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), transpiração ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e, relação entre concentrações de CO_2 interna/ambiente (C_i/C_a) medidas em plantas de *Glycine max* L. Merr. com 35 dias de crescimento em casa de vegetação (estádio V3-V4). Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão (n = 6). Letras diferentes na coluna indicam médias diferentes com base na ANOVA seguida pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).....76

Figura 11 –Efeito do tratamento de sementes com nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSNO e NP CS-GSH), nanopartículas de alginato com e sem NO (NP AI-GSNO e NP AI-GSH), e GSNO na (A) massa seca de raiz, (B) massa seca dos nódulos, (C) massa fresca, (D) número total de nódulos, (E) comprimento de parte aérea e raiz e (F) massa seca de parte aérea de plantas de *Glycine max* L. Merr cultivadas em casa de vegetação. O controle foi estipulado como água. Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão (n = 5). Letras diferentes acima das barras indicam médias diferentes com base na ANOVA seguida pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).....77

LISTA DE FIGURAS – ARTIGO B

- Figura 1** – Esquema representativo do experimento de microscopia confocal. O passo 1 refere-se às etapas de coleta, incubação e lavagem das amostras a serem analisadas. O passo 2 abrange os procedimentos realizados durante a montagem das lamínas. O passo 3 envolve a visualização e quantificação das amostras no microscópio confocal.....104
- Figura 2** – Imagens representativas ilustrando a localização confocal microscópica de NO em 20x da zona de maturação radicular de plantas de soja (*Glycine max* L. Merr.) 30 min após o tratamento com água destilada (CONTROLE), GSNO livre e nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSH e NP CS-GSNO). Para cada tratamento, foi realizada a incubação com cPTIO (10 μ M) como controle negativo. Cilindro vascular (vc), região do córtex (c), epiderme (ep) e pelos absorventes (rh). Barras = 100 μ m.....108
- Figura 3** – Imagens representativas ilustrando a localização confocal microscópica de NO em 20x da zona de maturação radicular de plantas de soja (*Glycine max* L. Merr.) 24 h após o tratamento com água destilada (CONTROLE), GSNO livre e nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSH e NP CS-GSNO). Para cada tratamento, foi realizada a incubação com cPTIO (10 μ M) como controle negativo. Região do córtex (c), epiderme (ep) e pelos absorventes (rh). Barras = 100 μ m.....108
- Figura 4** – Intensidade de fluorescência medida como arbitrary fluorescence units (A.F.U.) por microscopia confocal com ampliação de 20 $\times$ na zona de maturação radicular de plantas de soja (*Glycine max* L. Merr.) (A) 30 min e (B) 24 h após o tratamento com água destilada (CONTROLE) GSNO livre e nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSH e NP CS-GSNO). Para cada tratamento, foi realizada a incubação com cPTIO (10 μ M) como controle negativo. Os dados representam média $\pm$ erro padrão (n = 5). Letras diferentes acima das barras indicam médias diferentes com base na ANOVA seguida pelo teste Scott-Knott (p < 0,05).....110

Figura 5 – Imagens representativas ilustrando a co-localização confocal microscópica de NO e da rodamina em 20x da zona de maturação radicular de plantas de soja (*Glycine max* L. Merr.) após 30 minutos de exposição a água destilada (CONTROLE), nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSH e NP CS-GSNO) e GSNO. I) Sonda fluorescente de NO (DAF-2DA), II) Sequestrador de NO (cPTIO). Região do córtex (c), epiderme (ep), cilindro vascular (vc). Barras = 100 µm.....113

Figura 6 – Imagens representativas ilustrando a co-localização confocal microscópica de NO e da rodamina em 20x da zona de ramificação radicular (zona perto do colo) de plantas de soja (*Glycine max* L. Merr.) após 30 minutos de exposição a água destilada (CONTROLE), nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSH e NP CS-GSNO) e GSNO. I) Sonda fluorescente de NO (DAF-2DA), II) Sequestrador de NO (cPTIO). Região do córtex (c), epiderme (ep), cilindro vascular (vc), elementos de vaso (ve). Barras = 100 µm.....115

Figura 7 – Imagens representativas ilustrando a co-localização confocal microscópica de NO e da rodamina em 20x da zona de maturação radicular de plantas de soja (*Glycine max* L. Merr.) após 24 horas de exposição a água destilada (CONTROLE). nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSH e NP CS-GSNO) e GSNO. I) Sonda fluorescente de NO (DAF-2DA), II) Sequestrador de NO (cPTIO). Cilindro vascular (vc). Barras = 100 µm.....117

Figura 8 – Imagens representativas ilustrando a co-localização confocal microscópica de NO e da rodamina em 20x da zona de ramificação radicular (zona perto do colo) de plantas de soja (*Glycine max* L. Merr.) após 24 horas de exposição a água destilada (CONTROLE), nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSH e NP CS-GSNO) e GSNO. I) Sonda fluorescente de NO (DAF-2DA), II) Sequestrador de NO (cPTIO). Região do córtex (c), epiderme (ep), cilindro vascular (vc), elementos de vaso (ve). Barras = 100 µm.....119

Figura 9 – Conteúdo de S-nitrosotiois (RSNO) em raízes de *Glycine max* L.

Merr coletadas com 30 mi e 24 h após exposição das formulações: Controle (água destilada), nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSH e NP CS-GSNO) e GSNO livre. Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão (n = 5). Letras diferentes na coluna indicam médias diferentes com base na ANOVA seguida pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).....122

Figura 10 –(A) Teores de H_2O_2 e (B) conteúdo de malondialdeído em raízes de *Glycine max* L. Merr coletadas com 30 min e 24 h após exposição das formulações: Control (água destilada), nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSH e NP CS-GSNO) e GSNO livre. Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão (n = 5). Letras diferentes acima das barras indicam médias diferentes com 124

LISTA DE TABELAS – ARTIGO B

Tabela 1 – Concentração final de sais na solução nutritiva.....	103
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Fotossíntese
Al	Alginato
C_i/C_a	Razão entre as concentrações internas e ambientais de CO_2
CPA	Comprimento de parte aérea
cPTIO	2-4-carboxyphenil-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide
CR	Comprimento de raiz
CS	Quitosana
DAF-2DA	4,5-diaminofluorescein diacetate (sonda)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FITC	Fluoresceína
g_s	Condutância estomática
GSH	Glutathione
GSNO	S-nitrosoglutathione
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
IF	Intensidade de fluorescência
MDA	Conteúdo de malondialdeído
MSPA	Massa seca da parte aérea
MSR	Massa seca de raiz
NO	Óxido Nítrico
NPs Al	Nanopartículas de alginato
NP Al-GSH	Nanopartículas de alginato sem NO
NP Al-GSNO	Nanopartículas de alginato contendo GSNO
NPs CS	Nanopartículas de quitosana
NP CS-GSH	Nanopartículas de quitosana sem NO
NP CS-GSNO	Nanopartículas de quitosana contendo GSNO

NRL	Número de raízes laterais
RSNOs	S-nitrosotióis
Tr	Transpiração

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	ASPECTOS DA CULTURA DA SOJA	22
2.2	TRATAMENTO DE SEMENTES EM SOJA	24
2.3	FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO	26
2.3.1	<i>Bradyrhizobium</i> e o Processo de Nodulação na Cultura da Soja	27
2.4	ÓXIDO NÍTRICO	28
2.5	NANOTECNOLOGIA NA AGRICULTURA	32
2.5.1	Nanopartículas Poliméricas	34
2.5.2	Nanopartículas Poliméricas com Óxido Nítrico	38
	REFERÊNCIAS	39
3	ARTIGO A: EFEITOS DO TRATAMENTO DE SEMENTES COM NANOPARTÍCULAS DE DIFERENTES COMPOSIÇÕES E CARGAS CONTENDO GSNO PROCESSO GERMINATIVO E NA NODULAÇÃO DE SOJA	56
3.1	INTRODUÇÃO	58
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	61
3.2.1	Preparo das Formulações	61
3.2.1.1	Nanopartículas de quitosana (NPs CS)	61
3.2.1.2	Nanopartículas de alginato (NPs Al)	62
3.2.1.3	S-nitrosoglutamina livre (GSNO)	62
3.2.1.4	Caracterização das nanopartículas e ensaio de liberação de NO	62
3.2.2	Material Vegetal e Tratamentos	63
3.2.2.1	Experimento <i>in vitro</i>	63
3.2.2.1.1	Processo germinativo	65
3.2.2.1.2	Curva de absorção de água	65

3.2.2.1.3	Análises bioquímicas.....	65
3.2.2.2	Experimento em casa de vegetação	66
3.2.3	Análises Estatísticas.....	67
3.3	Resultados.....	67
3.3.1	Caracterização de NP e cinética de liberação de NO.....	67
3.3.2	Experimento <i>In Vitro</i>	67
3.3.2.1	Processo germinativo.....	68
3.3.2.2	Análises bioquímicas.....	75
3.3.3	Experimento em Casa de Vegetação.....	76
3.3.2.1	Análises morfofisiológicas: crescimento, desenvolvimento e nodulação....	76
3.4	Discussão.....	77
3.5	Conclusão.....	85
	REFERÊNCIAS	86
4	ARTIGO B: INTERAÇÃO DE DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO LIVRE E NANOENCAPSULADO COM AS RAÍZES DE PLANTAS DE SOJA	97
4.1	INTRODUÇÃO	99
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	102
4.2.1	Preparo Das Formulações.....	102
4.2.1.1	Nanopartículas de quitosana (NPs CS)	102
4.2.1.2	S-nitrosoglutationa livre (GSNO).....	102
4.2.2	Material Vegetal e Condições de Cultivo.....	102
4.2.3	Análises de Microscopia Confocal.....	103
4.2.4	Análises Bioquímicas.....	105
4.2.4	Análise Estatística.....	105
4.3	RESULTADOS	106
4.3.1	Microscopia Confocal.....	106
4.3.2	Análises Bioquímicas.....	120
4.4	CONCLUSÃO	124
	REFERÊNCIAS	125
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	130

1 INTRODUÇÃO

A agricultura é constantemente pressionada a aumentar a produtividade mesmo diante de uma série de eventos desfavoráveis, como a ocorrência de patógenos, plantas daninhas, limitações nutricionais, altas temperaturas e déficit hídrico. Esses estresses desencadeiam uma série de distúrbios fisiológicos e morfológicos, que podem afetar de forma irreversível o crescimento, desenvolvimento e desempenho produtivo da planta. Diante de todos esses cenários e como uma forma de melhorar os aspectos morfofisiológicos das culturas, o óxido nítrico (NO) surge como uma molécula de grande relevância.

O NO é uma molécula diatômica e pequena, sendo um radical livre capaz de se difundir livremente através da fase lipídica das biomembranas (KAPIL et al., 2020). É uma importante molécula sinalizadora em plantas, com participação em vários processos biológicos, tais como superação de dormência de sementes, mobilização de reservas durante a germinação, formação e arquitetura de raízes, na modulação entre planta e as bactérias simbióticas, promovendo a formação de estruturas especializadas como os nódulos radiculares, florescimento, senescência, movimento estomático e proteção das plantas contra diferentes estresses (SIMONTACCHI, et al., 2015).

A capacidade do NO em interagir com compostos reguladores de crescimento, como fitohormônios e antioxidantes, confere a molécula um papel central na coordenação de múltiplos processos durante a germinação e diversas outras etapas do desenvolvimento vegetal. A bioatividade do NO pode se manifestar por meio de algumas alterações proteicas que podem ser induzidas por processos redox, como a S-nitrosilação e nitração das proteínas (KOLBERT et al., 2019; LEON et al., 2020; PANDE et al., 2021; KHAN et al., 2023; KHATOR et al., 2024). Assim, a aplicação exógena da molécula é uma ferramenta interessante para a agricultura, podendo mitigar problemas que afetam a produtividade, bem como promover um desenvolvimento inicial mais vigoroso das plantas quando atrelado ao tratamento de sementes.

Para operacionalizar a aplicação exógena de NO, é necessária a utilização de moléculas doadoras de NO. Isso porque, existe uma dificuldade de manipulação do NO em sua forma gasosa além da sua baixa estabilidade no ambiente, onde é rapidamente degradado. As moléculas doadoras de NO fornecem

uma forma mais eficiente de disponibilizar a molécula de NO de maneira controlada, garantindo sua disponibilidade para as plantas.

Entre os doadores existentes, os mais utilizados são os S-nitrosotióis, como a GSNO (S-nitrosoglutationa), e como o SNP (nitroprussiato de sódio) também estão disponíveis. Porém, é importante considerar que alguns doadores acabam gerando subprodutos da sua decomposição, como cianeto no caso do SNP, que podem afetar as células vegetais e o ambiente (FEELISCH 1998). Além da instabilidade intrínseca, os doadores de NO frequentemente enfrentam desafios adicionais devido à fotossensibilidade, o que pode resultar em sua rápida degradação e na liberação indesejada de NO (FLORYSZAK-WIECZOREK et al., 2006).

Nesse cenário, a nanotecnologia surge como uma estratégia promissora que pode revolucionar a aplicação de NO exógeno na agricultura, permitindo a encapsulação dos compostos doadores, o aumento da estabilidade da molécula e a liberação gradativa do NO. Atualmente existem diversos nanomateriais capazes de formar nanopartículas que podem ser utilizados como sistemas carreadores no transporte de bioativos, com baixa toxicidade e impacto ambiental. Por exemplo, nanopartículas de quitosana carreando doadores de NO têm demonstrado ser mais eficazes que o doador de NO livre (molécula não nanoencapsulada) na proteção de plantas contra estresses abióticos, sob diferentes formas de aplicação.

Em plantas de milho (*Zea mays*) expostas à salinidade, a aplicação de nanopartículas às raízes protegeu contra os efeitos deletérios do estresse, aumentando os níveis de S-nitrosotióis da folha (OLIVEIRA et al. 2016). Em cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), os efeitos do estresse hídrico foram atenuados pela aplicação foliar das nanopartículas doadoras de NO, resultando no aumento da taxa fotossintética e da biomassa das raízes (SILVEIRA et al., 2019). Resultados preliminares do nosso grupo de pesquisa, indicam que as nanopartículas doadoras de NO também possuem efeito protetor em sementes (SOUZA, 2023).

Porém, apesar dos benefícios demonstrados na literatura, é importante ressaltar que as propriedades da nanoformulação (como composição, carga, tamanho, hidrofobicidade e dose) e as características fisiológicas (metabolismo fotossintético) e morfológicas (superfície da folha, como tricomas, hidatódios, cutícula) das espécies vegetais bem como a forma de tratamento (tratamento de sementes, aplicação em raízes ou pulverização foliar) podem afetar a absorção, internalização, distribuição, transporte e eficiência das partículas (PREISLER et al., 2022; BAI et al.,

2021; ZHANG et al., 2023).

Dessa forma, os modos (como absorção, distribuição, transporte) pelos quais as nanopartículas doadoras de NO interagem com as plantas de forma a resultar em maior eficiência devem ser avaliados. Nesse contexto, evidências qualitativas de translocação baseadas em microscopia são fundamentais para demonstrar a presença dessas partículas em nível tecidual e celular. A microscopia confocal, por exemplo, permite imagens dos nanocarreadores nos tecidos vegetais em diferentes profundidades, e assim direcionar para elucidação das vias de absorção ou translocação, principalmente se forem analisadas em conjunto com seus efeitos morfofisiológicos e bioquímicos na planta.

O objetivo geral deste trabalho foi estudar o modo de ação de nanopartículas poliméricas liberadoras de NO, de diferentes composições e cargas, em plantas de soja (*Glycine max* L. Merr.). Foram utilizadas nanopartículas de quitosana e de alginato contendo doador de NO (S-nitrosoglutathione, GSNO), aplicadas no tratamento de sementes e nas raízes de plantas de soja. Os objetivos específicos foram abordados em 2 capítulos, sendo eles: 1) avaliar os efeitos do tratamento de sementes de soja com nanopartículas de diferentes composições e cargas contendo GSNO no processo germinativo. Além disso, buscou-se investigar se o tratamento de sementes com as nanopartículas favoreceria a nodulação e o crescimento de plantas de soja; 2) avaliar o modo de ação de nanopartículas liberadoras de NO em resposta a aplicação via raiz e qual o impacto dessas nanopartículas na homeostase do NO.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DA SOJA

A produção de soja mundial em 2023/2024 foi de 422,262 milhões de toneladas, sendo o Brasil o maior produtor mundial do grão com 40% desse montante, seguido por Estados Unidos e Argentina. A produção nacional nessa safra foi de aproximadamente 169 milhões de toneladas (Mato Grosso 26%, Paraná 15%, Rio Grande do Sul 14%, Goiás 10%, Mato Grosso do Sul 8%) (USDA, 2024). No país, a cultura da soja é o principal produto destinado a exportação. O complexo soja (grãos, farelo e óleo) obteve um total de US\$ 12,44 bilhões em vendas no primeiro trimestre

de 2024 (MAPA, 2024).

A importância comercial da soja advém de suas diversas aplicações. Por ser um ingrediente rico em proteínas, é usada na alimentação humana na forma de grãos inteiros ou processados (sucos, molhos, tofu, proteínas texturizadas) e na alimentação animal. Além disso, é matéria prima para produção de biocombustíveis (BOEREMA et al., 2016; GABBI et al., 2020).

Oriunda da Ásia, a soja é uma planta pertencente à família das leguminosas que foi domesticada há cerca de 4500-4800 anos com objetivo inicial de ser utilizada na alimentação humana. A difusão da cultura teve início em 1739 na Europa, em 1765 nos Estados Unidos e no Brasil foi introduzida em meados de 1882 na região da Bahia e posteriormente São Paulo (1891) e Rio Grande do Sul (1914). Foi a partir da década de 60 que a cultura passou a ter uma expansão comercial significativa, incentivando pesquisas sobre cultura e melhorias nos maquinários. Em pouco tempo, foi incorporada ao sistema de rotação de verão com milho e em sucessão com outras culturas (trigo, cevada, aveia) (MUNDSTOCK e THOMAS, 2005; BACAXIXI et al., 2011).

Conhecida cientificamente como *Glycine max* (L.) Merr. (família Fabaceae), a soja é uma planta anual, herbácea, de porte ereto e com desenvolvimento dividido em duas fases principais: o estágio vegetativo (V) e o estágio reprodutivo (R). O estágio vegetativo da planta abrange desde a germinação e emergência até o florescimento inicial, sendo necessário para seu crescimento condições edafoclimáticas adequadas. Esse estabelecimento inicial das plantas vai influenciar na produtividade da cultura, visto que irá determinar o número de plantas por área, a formação do dossel (folhas), das ramificações dos caules e o número potencial de locais com gemas florais. O estágio reprodutivo tem início com o surgimento da primeira flor, seguido do desenvolvimento da vagem, desenvolvimento do grão e a maturação plena dos grãos. Durante o florescimento, tem-se o acúmulo de matéria seca e nutrientes nas folhas, ramos e raízes, assim como aumento da taxa de fixação de nitrogênio (N₂) pelos nódulos (MUNDSTOCK e THOMAS, 2005).

Os hábitos de crescimento da cultura podem ser classificados em 2 tipos principais: determinado e indeterminado. As variedades disponíveis com hábito de crescimento determinado possuem um crescimento mais compacto, com a planta cessando seu crescimento em altura no início do florescimento, o que resulta em uma maturação com maior uniformidade das vagens. Já as indeterminadas não cessam o

crescimento após o início da floração, o que pode possibilitar a colheita escalonada das vagens ao longo do tempo (SHRESTHA et al., 2023).

A disponibilidade hídrica no solo constitui a principal limitação no desenvolvimento da soja, principalmente nas fases de germinação-emergência e floração-enchimento de grão. Nessas etapas, os problemas podem ser mais graves tanto no excesso quanto no déficit hídrico, já que a água atua praticamente em todos os processos fisiológicos e bioquímicos da planta. A necessidade hídrica vai aumentando conforme a planta se desenvolve, atingindo o pico durante a floração-enchimento dos grãos, e diminui após esse período (FARIAS et al., 2007).

A soja apresenta sensibilidade ao fotoperíodo, sendo este um aspecto importante para definir a adaptabilidade das cultivares em diferentes regiões de produção. Assim como o fotoperíodo, a temperatura interfere no desenvolvimento da cultura. Temperaturas na faixa de 20 a 30 °C são consideradas ideais para o crescimento e desenvolvimento da soja. Por outro lado, temperaturas inferiores a 13 °C inibem o florescimento e acima de 40 °C prejudicam a taxa de crescimento e a capacidade de retenção das vagens (MUNDSTOCK e THOMAS, 2005; FARIAS et al., 2007; TEJO et al., 2019). Entretanto, essas características podem variar conforme a cultivar e assim impactar de diferentes maneiras na produtividade da cultura.

2.2 TRATAMENTO DE SEMENTES EM SOJA

O tratamento de sementes em soja é uma prática agrícola essencial que consiste na aplicação de compostos químicos (como fungicidas, inseticidas, nematicidas, macro e micronutrientes, reguladores de crescimento) e biológicos (inoculantes) em geral, previamente à semeadura, sob a forma de tratamento, revestimento ou peletização, atuando como uma ferramenta na proteção as plantas contra o ataque de pragas, doenças e outros fatores adversos que possam inviabilizar as primeiras fases do desenvolvimento da cultura no campo (AYESHA et al., 2021).

As sementes submetidas ao tratamento são tratadas com formulações secas (produtos aplicados em pó) ou úmidas (produtos aplicados na forma líquida). Além disso, durante o tratamento comercial ou *on farm*, pode ser realizado a inoculação com microrganismos benéficos para a cultura, como *Trichodermas*, *Pseudomonas* e *Rhizobio* (AYESHA et al., 2021).

É importante salientar, que em questões de custo, o tratamento de

sementes pré-semeadura com os microrganismos apresenta baixo custo, pois requer apenas uma aplicação e geralmente os compostos associados são em baixas concentrações (CARDARELLI et al., 2024).

A tecnologia é primordial para garantir uma emergência uniforme, resultando em aérea mais homogênea e plântulas mais saudáveis e, conseqüentemente, em uma maior produtividade da cultura, pois os compostos aplicados durante o tratamento de sementes podem ser absorvidos tanto pelas sementes quanto pelas plântulas. A importância da tecnologia utilizada no tratamento de sementes advém de a fase de semeadura ser uma das mais críticas e fundamentais no cultivo, pois as sementes são suscetíveis aos fatores bióticos e abióticos que podem afetar a germinação e o seu desenvolvimento (PEREIRA et al., 2021; ZAIM et al., 2023).

Alguns trabalhos relataram que o tratamento de sementes industrial (TSI) com agroquímicos melhorou a taxa de germinação, o vigor de sementes e a biomassa de plântulas de soja (DAN et al., 2012; CARDARELLI et al., 2022). No entanto os autores ressaltam que a concentração, tipo de ingrediente ativo bem como a cultivar devem ser considerados nesse processo. Ignorar tais fatores pode levar a redução da qualidade fisiológica da semente, sendo assim crucial analisar o impacto do tratamento nas diferentes culturas agrícolas.

Todavia outros autores discutem que sementes tratadas quimicamente podem ser frequentemente armazenadas até a semeadura sem prejuízos a qualidade (ROCHA et al., 2024; DORNELES et al., 2019).

De forma geral, os benefícios do tratamento de sementes em soja são diversos e significativos. Primeiramente, proporciona uma proteção, fator crucial, já que a emergência irregular de plântulas pode acarretar a uma competição desigual, resultando em menor eficiência no uso de recursos disponíveis como luz, água e nutrientes. Segundo que a tecnologia pode otimizar a utilização dos insumos, seja através da redução nas concentrações aplicadas ou no número de aplicações requeridas. Por último, o tratamento de sementes auxilia as plantas a superarem condições adversas, como pragas, seca, altas temperaturas, estresse hídrico, e assim contribuir para um melhor estabelecimento da cultura (LENSEN, 2013; ZANDONÁ et al., 2019).

2.3 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O nitrogênio é um dos nutrientes mais exigidos pelas plantas, participando da estrutura de moléculas importantes como clorofila, proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos (VANCE et al., 2001). Para a produção agrícola, o nitrogênio é um fator limitante para elevadas produtividades, visto que a cultura da soja pode requerer em torno de 80 kg de nitrogênio a cada 1.000 kg de grãos (SALVAGIOTTI et al., 2008). Assim, fontes de nitrogênio são cruciais para o crescimento e desenvolvimento das espécies vegetais (HACHIYA E SAKAKIBARA, 2017; SILVA et al., 2024).

O solo é a principal via de obtenção deste nutriente para as plantas, sendo encontrado principalmente na forma de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+), que podem ser provenientes da decomposição da matéria orgânica, da adubação nitrogenada e da fixação biológica (VANCE et al., 2001; SILVA et al., 2024). Apesar da contribuição significativa dos fertilizantes nitrogenados o incremento de mais fertilizante nessas áreas pode acarretar uma série de danos ao meio ambiente, visto que para produção desses fertilizantes são necessárias grandes quantidades de combustíveis fósseis. Além disso, grande parte do nitrogênio aplicada ao solo é perdida ao ambiente por lixiviação e volatilização (SOUMARE et al., 2020). Nesse contexto, uma opção eficiente para contornar esse problema é a fixação biológica de nitrogênio (FBN), que atualmente representa a maior fonte de fornecimento de nitrogênio para a cultura.

A FBN simbiótica é o processo natural pelo qual o nitrogênio atmosférico (N_2) é convertido em amônia (NH_3) através da associação entre um grupo específico de bactérias diazotróficas e plantas. Essa reação é catalisada pela enzima nitrogenase, que catalisa através de um alto custo de ATP a clivagem da molécula de N_2 (SIGNORELLI et al., 2020; SOUMARE et al., 2020; WANG et al., 2018). Em meio aquoso, a NH_3 formada pelo complexo nitrogenase é convertida em amônio (NH_4^+), que é então transportado para o citosol das células dos nódulos e incorporado à molécula de glutamato (SCHUBERT, 1995).

A associação simbiótica mais comum em sistemas agrícolas é entre leguminosas e rizóbios (bactérias dos gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*). Aqui, ocorre uma troca mutualística entre os organismos, já que as bactérias fornecem o nitrogênio fixado para a planta

hospedeira em troca de fotoassimilados (SIGNORELLI et al., 2020). Todo esse processo ocorre em órgãos especializados denominados nódulos, local onde se encontram os rizóbios e o complexo nitrogenase.

2.3.1 *Bradyrhizobium* e o processo de nodulação na cultura da soja

Na cultura da soja, o gênero *Bradyrhizobium* é um dos vários gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio com capacidade de formar nódulos em leguminosas. É comumente utilizado para inoculação, pois apresenta alta afinidade associativa com a cultura, suprimindo a demanda de nitrogênio exigida para que a planta expresse seu potencial produtivo. A inoculação pode ser realizada durante o tratamento de sementes ou aplicação no sulco de semeadura. Zilli et al. (2010) observaram desempenho semelhante na FBN na inoculação na semente e no sulco, não havendo diferenças na massa seca e no rendimento de grãos.

As zonas de maturação e zona de alongamento são consideradas as principais regiões para infecção das bactérias e desenvolvimento dos nódulos (BHUVANESWARI et al., 1980). De forma geral, os processos de infecção e organogênese do nódulo ocorrem simultaneamente. Os rizóbios aderidos aos pelos radiculares liberam os fatores Nod (fatores de nodulação bacteriana) que induzem ao enrolamento e crescimento das células dos rizóbios. Ainda em reposta ao fator Nod, ocorre a degradação da parede celular que permite a formação de uma estrutura tubular e intracelular, conhecida como canal de infecção (SIGNORELLI et al., 2020, TAIZ e ZEIGER, 2017). O canal de infecção cresce em direção a base do pelo radicular e então funde-se com a membrana celular da parede da raiz. Ocorre a ramificação do canal de infecção pelas células corticais, a liberação dos rizóbios no citosol, a diferenciação das células corticais e a formação do primórdio nodular (SIGNORELLI et al., 2020, GAGE, 2004). Ao receber um sinal da planta, as bactérias se diferenciam morfológica e fisiologicamente em bacteroides, organelas endossimbióticas capazes de fixar o nitrogênio atmosférico (SIGNORELLI et al., 2020).

A fixação do nitrogênio é realizada por meio do complexo da enzima nitrogenase, que é formada por duas proteínas (Fe-proteína e MoFe-proteína). Na presença de oxigênio, a enzima é inativada. Nesse cenário, o nódulo proporciona um ambiente de baixo teor de oxigênio, protegendo o complexo nitrogenase. Na

associação leguminosa e rizóbio, essa proteção da enzima pode ocorrer por meio de composição estrutural do nódulo, como paredes mais espessas, ou através da presença da leg-hemoglobina, que tem alta afinidade com moléculas de oxigênio, reduzindo a sua concentração e consequentemente protegendo a enzima. Outra via é o transporte de oxigênio para a cadeia respiratória do bacteroide. A citocromo c oxidase apresenta alta afinidade com o oxigênio, o que permite o seu funcionamento sob baixos níveis de oxigênio (SIGNORELLI et al., 2020, TAIZ e ZEIGER, 2017, GAGE, 2004).

É importante destacar que a eficiência da nodulação pode ser influenciada por diversos fatores, incluindo a disponibilidade de nutrientes no solo, a compatibilidade entre a planta hospedeira e a bactéria, além de fatores ambientais como pH, temperatura e umidade do solo. Portanto, uma abordagem interativa entre práticas agrícolas que promovam um ambiente adequado para essa interação simbiótica é fundamental para otimizar a produtividade da soja.

2.4 ÓXIDO NÍTRICO

Em primeira instância, o óxido nítrico (NO) foi estudado como um produto endógeno da planta e as emissões dessa molécula estavam relacionadas à atividade da enzima nitrato redutase (NR) (YAMASAKI et al., 2000; KOLBERT et al., 2019; KHATOR et al., 2024). Em plantas, a NR tem papel chave da via de redução e de assimilação do nitrogênio (BERGER et al., 2020).

O NO é uma pequena molécula diatômica, radical livre, gasosa, multifuncional, que atua como sinalizadora nas células vegetais, participando de processos bioquímicos, fisiológicos e morfológicos durante as etapas de germinação, formação de raízes e nódulos, floração, movimento dos estômatos e na proteção das plantas contra diferentes estresses abióticos e bióticos (SELIGMAN, et al., 2008; KOLBERT et al., 2019; LEON et al., 2020; BERGER et al., 2019; PANDE et al., 2021; KHATOR et al., 2024).

O NO apresenta interações com várias moléculas sinalizadoras, incluindo Ca^{2+} , glutathione (GSH), espécies reativas de oxigênio (EROs) e hormônios vegetais (FARNESE et al., 2016; PANDE et al., 2021), além de alterar a expressão gênica e a atividade das proteínas (SIMONTACCHI et al., 2015). A S-nitrosilação tem sido estabelecida como uma modificação pós-tradução que pode modular de forma

direta as funções de proteínas (KOLBERT et al., 2019).

A molécula de NO atua como um intermediário importante na via de transdução de sinal do ácido abscísico (ABA) que regula o movimento estomático (AHAMMED et al., 2020). Alguns trabalhos observaram que o NO induz a abertura estomática através de resíduos de cisteína S-nitrosiladas, como na posição Cys 137 da proteína quinase OST1/SnRK2.6 (SHAH et al., 2023). A sinalização do ABA em células-guardas foi prejudicada em plantas com gene mutante *gsnor1-3*. Além disso, o acúmulo de NO nos mutantes *gsnor1* aumentou a S-nitrosilação de *SnRK2.6*, culminando na falta de sensibilidade ao ABA nas células-guardas (WANG et al., 2015). A S-nitrosilação induzida por ABA de *SnRK2.6* atua como um regulador negativo na rede de sinalização do ABA em plantas, processo que favorece a abertura dos estômatos, bem como assimilação de CO₂ (SINGHAL et al., 2021; WANG et al., 2015). Ahammed et al. (2021) verificaram um papel importante na regulação estomática quando avaliaram plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) com o gene *SIWRKY81* silenciado.

Por outro lado, no fechamento estomático, acredita-se que a rota de produção de NO intermediada pela NR seja responsável por ativar uma cascata de sinalização de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (DESIKAN et al. 2002; BRIGHT et al. 2006). Alguns autores têm mostrado que o acúmulo de NO intermediado a partir da redução do nitrito pela NR é crucial para o fechamento estomático (LI et al., 2021; AHAMMED et al., 2021).

Por décadas, vem sendo demonstrado o envolvimento do NO em praticamente todas as etapas no processo de simbiose leguminosa-rizóbio, inclusive na nodulação (BERGER et al., 2020; PANDE et al., 2021). Durante as primeiras horas dessa interação, ocorre aumento da produção de NO nas raízes. Além disso, foi demonstrado que há produção de NO no início da organogênese, na maturidade e durante a senescência do nódulo, o que sugere que a molécula tem um papel sinalização e/ou nas funções metabólicas do processo de simbiose (BERGER et al., 2019; SIGNORELLI et al., 2020). Em nódulos de *Medicago truncatula*, observou-se a presença de NO em nódulos com 10 e 30 dias após a inoculação (BAUDOUIN et al., 2006). Esse acúmulo de NO também foi detectado durante a senescência dos nódulos em *Lotus japonicus* (CAM et al., 2012; FUKUDOME et al., 2019). Calvo-Begueira et al. (2018) identificaram a formação de NO em células infectadas de nódulos de plantas soja e feijão e no parênquima de nódulos de soja. Outro ponto a ser destacado é que

o NO pode ser um potente modulador da atividade da nitrogenase, de forma que controlar seus níveis em nódulos maduros é crucial (SIGNORELLI et al., 2020).

O NO também desempenha um papel importante na germinação das sementes bem como na formação e desenvolvimento do sistema radicular, podendo promover aumento do comprimento da raiz principal e formação de raízes laterais, raízes adventícias e pelos radiculares (LOMBARDO e LAMATTINA, 2018; ALTAMURA et al., 2023; KHATOR et al., 2024).

Estudos mostraram aumento do nível de NO no início da fase II da germinação (menor absorção de água e metabolismo acelerado) de sementes de sorgo (*Sorghum bicolor* L.) tratadas com nitrato, juntamente com baixa concentração de radicais lipídicos. Além disso, os autores comprovaram a formação do NO dependente da NR, com um aumento significativo da atividade da enzima nos estágios iniciais do desenvolvimento da semente (SIMONTACCHI et al., 2004). O aumento de NO também foi observado em sementes de romã e cevada a partir da embebição. Além disso, foi reportado um aumento da atividade da GSNOR nas sementes de cevada germinadas (SHALIMU et al., 2016; MA et al., 2017; MA et al., 2016). A aplicação de doadores de NO mitigou os efeitos deletérios do envelhecimento de sementes, melhorando o vigor e aumento da taxa de germinação (CIACKA et al., 2022). Sementes de tomate tratadas com SNP em baixas concentrações aumentaram significativamente a germinação, a atividade da NR e o crescimento de raiz e parte aérea (HAYAT et al., 2014).

O NO como subproduto da conversão da auxina ácido indol-3-butírico (IBA) na auxina mais ativa ácido indol-3-acético (IAA) promove a formação de raízes adventícias (ALTAMURA et al., 2023). Além disso, alguns autores relataram que o NO integra a rede de sinalização ABA-IAA no crescimento de raízes em plantas de tomate sob estresse salino (SANTOS et al., 2020). Em plântulas de tomates, a indução de primórdios de raízes laterais ocorreu em função do NO (CORREA-ARAGUNDE et al., 2006). Em *Arabidopsis* a aplicação de GSNO junto com selênio aumentou o crescimento de raízes laterais em tipo selvagem (FEIGL et al., 2019).

Dentre os mecanismos discutidos para a produção de NO estão a via oxidativa a partir de L-arginina e a via redutiva a partir do nitrito (NO_2^-) (GUPTA et al., 2011; LEON et al., 2020; PANDE et al., 2021; KHAN et al., 2023). A enzima nitrato redutase (NR) está envolvida na produção do NO, seja reduzindo diretamente o NO_2^- a NO ou fornecendo o NO_2^- para ser reduzido por outras vias (ROCKEL et al., 2002;

PLANCHET et al., 2005). A produção de NO a partir de NO_2^- pode ocorrer também pela rota não enzimática no apoplasto (WILSON et al., 2008; BESSON-BARD et al., 2008; PANDE et al., 2021) ou pela cadeia respiratória mitocondrial (GUPTA et al., 2017). A via mitocondrial ganha grande importância principalmente em condições de deficiência de oxigênio (LEON, et al., 2020).

A literatura vem demonstrando a importância do NO como um sequestrador de EROs, além de induzir a atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a ascorbato peroxidase (APX). Todavia, os efeitos protetores do NO em plantas dependem de baixas concentrações desse gás. Em altos níveis, o NO estimula a produção de EROs (CLARK et al., 2000; DELLEDONNE et al., 2001; BELIGNI et al., 2001; KHAN et al., 2023), culminando em alterações intracelulares denominadas de “estresse nitro-oxidativo”, podendo exercer toxicidade para as células e tecidos (CORPAS et al., 2008; VALDERRAMA et al., 2007; SANTISREE et al., 2015; KHAN et al., 2023).

Para o controle dos níveis endógenos de NO, é realizada a sua ligação a tióis de cisteína, formando o S-nitrosotióis (RSNOs), em um processo denominado S-nitrosilação (PANDE et al., 2021). RSNOs são conhecidos como eficientes reservatórios, transportadores e liberadores de NO para aplicações em plantas (OLIVEIRA et al., 2016; do CARMO et al., 2021). Diferentemente da S-nitrosilação, que é modificação reversível na sinalização, a nitratação é permanente e é favorecida em situações em que os níveis de NO e EROS estão elevados, com a formação de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (RIDNOUR et al., 2004).

A enzima S-nitrosoglutationa redutase (GSNOR) é um regulador da sinalização de NO, podendo controlar o conteúdo de S-nitrosoglutationa (GSNO), (SPADORO et al., 2010; LETERRIER et al., 2011; JAHNOVÁ et al., 2019). Dentre os S-nitrosotióis, a GSNO, produto relativamente estável, é formada pela ligação do NO e da glutatona (GSH), tendo a função de armazenar e transportar o NO (KOLBERT et al., 2019).

Devido à importância do NO como sinalizador, a aplicação exógena dessa molécula vem sendo muito estudada. Nesse sentido, o uso de doadores de NO é uma importante estratégia para regulação dos processos fisiológicos dependentes de NO (CORREA-ARAGUNDE et al., 2006; SINGH et al., 2018).

Os doadores de NO mais utilizados são o SNP (nitroprussiato de sódio) e os S-nitrosotióis, como SNAP (S-nitroso-N-acetilpenicilamina) e GSNO (S-

nitrosoglutationa). No entanto, vários doadores de NO geram subprodutos de decomposição, que podem afetar negativamente as células vegetais. Por exemplo, o doador de NO mais utilizado é o SNP, um complexo inorgânico que gera cianeto como subproduto (CALABRESE et al., 2023) e que depende da luz para a liberação de NO através de reações fotoquímicas (HARRISON et al., 1993; FEELISCH 1998; YAMAMOTO et al., 2000).

Entre os S-nitrosotióis, a GSNO e a SNAP são os mais utilizados. Os RSNOs se decompõem e liberam NO por meio da quebra homolítica, e essa decomposição pode ser acelerada na presença de luz (FLORYSZAK-WIECZOREK et al. 2006). Tendo em vista as características distintas dos doadores de NO e a sua relativa instabilidade, a sua aplicação na agricultura é limitada (SANTISREE et al., 2015). Nesse contexto, as nanopartículas doadoras de NO surgem com uma estratégia promissora.

2.5 NANOTECNOLOGIA NA AGRICULTURA

Apesar das divergências na literatura em relação à definição, a nanotecnologia é conhecida como um ramo da tecnologia, ciência e engenharia de materiais que visa projetar, produzir e utilizar estruturas e instrumentos na escala nanométrica (PARIS et al., 2015; SRIL, 2023).

Na agricultura, a nanotecnologia tem atuado frente ao desenvolvimento de soluções inteligentes e na entrega direcionada de diversos compostos (como fertilizantes, hormônios vegetais e pesticidas). As nanoformulações têm sido alternativas promissoras frente ao cenário global de mudanças climáticas, visto a importância de reduzir as concentrações de ativos aplicadas no ambiente, bem como a redução das doses aplicadas e incremento da eficiência de práticas agrícolas (CHOUDHARY et al., 2019).

Alguns estudos vêm demonstrando os efeitos na germinação, no crescimento, no desenvolvimento e na proteção de plantas e sementes, através de nanopartículas poliméricas biodegradáveis de liberação sustentada ou por meio de técnicas de revestimento de sementes. Essas tecnologias visam proteger as sementes durante o armazenamento pós-colheita, bem como torná-las mais resistentes durante seu estabelecimento em campo, podendo ter os efeitos atenuadores de estresses (SEKHON, 2014; WANG et al., 2016; FRACETO et al.,

2016, MAHAKHAM et al., 2017; USMAN et al., 2020; PEREIRA et al., 2021; TAMILMANI et al., 2023).

A nanotecnologia pode ser empregada ainda na melhoria da qualidade do solo, através de estratégias como o uso de nanopartículas de hidrogel visando melhorar a retenção de água, nanopartículas capazes de se ligar a poluentes metálicos ou nanobiossensores capazes de monitorar e analisar sistemas biológicos em nível microscópico, funcionando como um dispositivo de triagem na detecção de doenças e da qualidade do solo. Independentemente da prática, todas contribuem significativamente para a modernização da agricultura e redução do impacto ambiental (PASCOLI et al., 2018; SEKHON, 2014; PARISI et al., 2015; FRACETO et al., 2016, LOWRY et al., 2019; SINGH et al., 2020; USMAN et al., 2020; GUPTA et al., 2023).

De forma geral, o uso de nanopartículas permite um sistema de liberação gradual, sustentável e direcionado do produto, melhorando sua solubilidade, protegendo contra degradação, além de possibilitar a redução de doses e número de aplicações necessárias para atingir o controle satisfatório, com isso, reduzindo o risco de contaminação ambiental e a toxicidade para seres humanos e organismos não-alvo (PASCOLI et al., 2018; WANG et al., 2022; OLIVEIRA e RISTROPH, 2024).

Na indústria alimentícia, a nanotecnologia pode melhorar a distribuição e entrega de compostos ativos, como a introdução de nanopartículas antibacterianas, bem como adotar de embalagens capazes de controlar a permeabilidade dos gases, aumentando o tempo de prateleira dos produtos (GIRI et al., 2023).

Os nanomateriais empregados têm origem distintas, podendo ser materiais mais maleáveis, como os polímeros, ou também mais rígidos, como os nanotubos de carbono, ambos sendo incorporados a produtos com diferentes características e finalidades (KAH et al., 2018). Entretanto, na literatura, os nanomateriais baseados em polímeros biodegradáveis e biocompatíveis vêm se destacando (COUVREUR, 2013).

Nesse sentido, o uso de nanopartículas carreadoras apresenta o potencial de melhorar a estabilidade e solubilidade dos compostos encapsulados, prolongar o seu período de ação e aumentar a sua segurança e eficácia (MITCHELL, et al., 2020). Entretanto, apesar dos inúmeros benefícios descritos, na literatura, as pesquisas relacionadas ao modo de ação dos nanocarreadores ainda são escassos e são comumente conduzidos através de aplicação foliar ou solo, e poucos trabalhos

avaliaram sistematicamente o efeito das propriedades dos nanocarreadores na absorção e translocação e na aplicação via tratamento de sementes.

2.5.1 Nanopartículas poliméricas

Um polímero é conhecido como uma macromolécula com centenas de unidades de monômeros unidas através de ligações covalentes (CANEVAROLO, 2006; SOUTO et al., 2012). A síntese das nanopartículas poliméricas pode ser realizada com vários tipos de polímeros sintéticos ou naturais, tais como poli (ϵ -caprolactona) (PCL), zeína, celulose, quitosana e alginato (CARVALHO et al., 2023; PEREIRA et al., 2014; SEABRA et al., 2015; SEABRA et al., 2017; KUMARI et al., 2024). Nanomateriais baseados em polímeros biodegradáveis e biocompatíveis vêm sendo testados na agricultura, por apresentarem grande potencial para aplicações de bioativos e redução de contaminação de recursos ambientais (VEMULA et al., 2023, CHOUDHARY et al., 2019). Dentre eles, a quitosana tem sido o mais amplamente utilizado.

A quitosana é um biopolímero formado pela repetição do monômero β -1,4-glucosamina, apresentando carga positiva em meio ácido. A produção da quitosana tem origem a partir da desacetilação da quitina, que é um elemento estrutural obtido principalmente a partir do exoesqueleto dos crustáceos (camarões, lagostas e caranguejos) (NAGPAL et al., 2010; RIDOLFI et al., 2012; ELGADIR et al., 2014) e da parede celular de fungos (BASTIAENS et al., 2019; HU et al., 2004; KUMAR et al., 2020). Suas propriedades de biodegradabilidade e biocompatibilidade permitem diversas aplicações biológicas. Possui ainda propriedades mucoadesivas, que melhoram o transporte de compostos bioativos através das membranas celulares, sendo esta uma característica importante na indústria agroquímica.

Além disso, ela apresenta alta capacidade de adsorção, eficiente atividade antioxidante e baixa toxicidade (DUTTA et al., 2004; SEABRA et al., 2015; HARISH et al., 2007; KUMAR et al., 2019). Por exemplo, o priming de sementes de milho com quitosana promoveu a germinação e o desenvolvimento das plântulas sob condições de baixa temperatura (15 °C) (GUAN et al., 2009). De fato, a quitosana induz em plantas diversas respostas contra estresses abióticos e bióticos (HIDANGMAYUM et al., 2019), podendo ser um importante material para síntese de nanocarreadores. Entre os vários métodos desenvolvidos para preparar

nanopartículas de quitosana, a gelificação iônica usando tripolifosfato de sódio (TPP) é o mais prático e fácil de controlar, além de não utilizar solventes orgânicos (AGNIHOTRI et al., 2004; FAN et al., 2012), sendo assim fortemente empregado na agricultura.

Estudos recentes mostraram efeito positivo da nanoquitosana na germinação das sementes e crescimento das plântulas de trigo (*Triticum aestivum* L.) em uma concentração 10 vezes menor em comparação com a quitosana não-nano (LI et al., 2019). O uso de nanopartículas de quitosana contendo NPK (nitrogênio, fósforo e potássio), aplicada via foliar, demonstrou ser eficiente no aumento da produtividade da cultura (ABDEL-AZIZ et al., 2016).

Em folhas de feijão, foi possível identificar a presença de nanofertilizante nos feixes vasculares e elementos do floema após a exposição as NPs (HASANEEN et al., 2016). Nanopartículas de quitosana contendo zinco aplicadas em sementes e via foliar no milho controlaram a doença de mancha foliar (*Curvularia*), além de aumentar o rendimento de grãos (CHOUDHARY et al., 2019). O tratamento de sementes de arroz com nanopartículas de quitosana e quitosana convencional melhoraram a porcentagem de germinação e o vigor em plantas expostas a salinidade. Além disso, nos parâmetros fisiológicos, houve aumento no conteúdo de carotenoides e no teor de proteína (SONI et al., 2023). A nanoquitosana também tem demonstrado ser um sistema eficiente como absorvente de poluentes orgânicos e inorgânicos durante processo de tratamento de água (BANDARA et al., 2020).

O alginato é um biopolímero de origem marinha, abundante no ambiente, que, assim como a quitosana, permite diversas aplicações biológicas. É um polissacarídeo aniônico (carregado negativamente) que consiste em copolímeros lineares contendo resíduos de β -D-manuronato (M) e α -L-guluronato (G) ligados por β -glicosídicos (REMMINGHORST e REHM, 2006).

É biocompatível, biodegradável e não apresenta toxicidade, o que torna um material promissor para indústria farmacêutica, alimentícia (filmes de revestimento) e ambiental, podendo substituir polímeros derivados do petróleo. Vale ressaltar que o composto é aprovado pela Food and Drug Administration (FDA). Apesar de ser solúvel em água, a capacidade de solubilização do alginato vai depender da sua composição (relação β -D-manuronato e α -L-guluronato), bem como das propriedades químicas do meio em que estiver dispersa. (FDA, 2024).

O composto é encontrado na parede celular de Phaeophyceae (algas

marrons). Atualmente é comercializado a partir da extração de *Laminaria hyperborean*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera* species (REMMINGHORST e REHM, 2006; LEE e MOONEY, 2012; DODERO et al., 2021). O alginato pode ainda ser sintetizado a partir bactérias *Pseudomonas* e *Azobacter* (REMMINGHORST e REHM, 2006).

Devido a suas propriedades e baixa toxicidade, o uso do material dentro da nanotecnologia vem sendo explorado nos últimos anos, principalmente na área biomédica. Atualmente existe diversos nanomateriais a base de alginato, com diferentes composições, tamanho e funcionalidades, e formas de síntese (DODERO et al., 2021).

Estudos recentes relataram que as nanopartículas de alginato aumentaram a estabilidade da curcumina encapsulada, além de melhorar a especificidade, a capacidade antioxidante e a liberação de forma gradativa (LIU et al., 2019). Como estratégia para o controle de pragas, a liberação do inseticida acetamipride utilizando nanopartículas alginato/quitosana demonstrou que o pH influencia no processo de liberação da molécula, visto que 50% do inseticida foi liberado após 36 horas em pH 7,0 e 4,0 enquanto em pH 10 a liberação foi com apenas 24 horas (MALUIN et al., 2020).

Nanohidrogéis de alginato, sintetizados a partir de um molde emulsionado com óleo de girassol, mostraram ser eficientes no encapsulamento de dicamba, além de possibilitar sua liberação prolongada e sustentada ao longo do tempo (ARTUSIO et al., 2021). Silva et al. (2011) demonstraram que nanopartículas alginato/quitosana alteram o perfil de liberação do herbicida paraquat, assim como a interação com o solo. Micropartículas de alginato/quitosana mostraram liberação controlada e gradativa do midacloprid. Além disso, foi observado maior toxicidade contra adultos de *M. dermestoides* (GUAN et al., 2008).

As atividades biológicas de nanopartículas de quitosana/TPP e alginato/quitosana com ácido giberélico (GA₃) foram comparadas no tratamento de sementes de feijão. Foi possível observar que liberação inicial foi mais lenta para as nanopartículas alginato/quitosana, mas essas apresentaram efeitos mais intensos benéficos em relação ao desenvolvimento foliar e do nível de carotenoides (PEREIRA et al., 2017). Trabalhos com nanofertilizantes utilizando as nanopartículas alginato/quitosana também em tratamento de sementes indicam benefícios no crescimento das mudas de *Fortunella margarita*, sugerindo que podem ser uma

alternativa eficiente para entrega de fertilizantes (LEONARDI et al., 2021).

Na agricultura, o uso de nanopartículas de alginato, bem como a compreensão dos efeitos em plantas sem estar associado a outro composto, ainda é muito restrito, sendo necessários estudos mais detalhados para compreender sua interação com a planta e o ambiente. Além de apresentarem diferença na composição (quitosana e alginato), esses dois sistemas nanocarreadores apresentam cargas opostas (PEREIRA et al. 2017), o que pode influenciar sua interação com as plantas conforme sua aplicabilidade na agricultura (PEREIRA et al., 2021).

Os processos de absorção e translocação de nanopartículas poliméricas pela planta, assim como a eficiência de entrega dos bioativos, estão relacionados as características físico-químicas das nanopartículas, como carga superficial, tamanho, estabilidade, biocompatibilidade, tipo de material e também do composto a ser encapsulado (TRIPATHI et al., 2017; MIERNICKI et al. 2019, VEMULA et al., 2023). Os mecanismos pelo quais as nanopartículas de quitosana e alginato atuam nas plantas ainda não estão totalmente elucidados. Nesse sentido, importante adotar estratégias e desenvolver metodologias que possam ser utilizadas para estudar o modo de ação tanto via semente, quanto pela raiz e folha. Dentre as estratégias, o rastreamento utilizando sondas fluorescentes é uma alternativa promissora.

Existem algumas estratégias de funcionalização com sonda fluorescente que podem ser utilizadas para nanopartículas, como a ligação covalente da sonda ao polímero (PRASAD et.al., 2017) ou através da incorporação da sonda à fase oleosa da nanopartícula (BOMBO et al., 2019). O monitoramento de nanocarreadores em plantas por técnicas de fluorescência desempenha um papel importante na compreensão da absorção, movimentação ou interação dos nanocarreadores em compartimentos celulares e intracelulares (OLIVEIRA e RISTROPH, 2024).

Visando preencher esta lacuna, quanto a compreensão das vias de absorção e transporte, recentemente em estudos com nanopartículas poliméricas de zeína e nanopartículas lipídicas marcadas com sondas fluorescentes, foram observadas a adesão e a absorção por raízes de cana-de-açúcar e soja. Foi possível ainda identificar uma porção das nanopartículas carreadoras sendo translocadas via xilema para a folha (NGUYEN et al., 2016; PRASAD et.al., 2017). Outros autores demonstraram, na aplicação foliar, ser possível absorção das nanopartículas de PCL via estômatos (BOMBO et al., 2019).

Recentemente, nanopartículas de PCL marcadas com fluorescência foram rastreadas em plantas de mostarda (*Brassica juncea*). As nanopartículas foram rapidamente absorvidas pelas raízes e detectadas nos tecidos vasculares e nas folhas 1 hora após aplicação, indicando a translocação das nanopartículas para parte aérea via xilema (PREISLER et al., 2022).

Estudos utilizando polímeros marcados com sonda fluorescente (FITC) mostraram que a adsorção de nanopartículas de quitosana na superfície das sementes de trigo foi maior do que a de quitosana não-nano (LI et al., 2019). Trabalhos com nanopartículas de quitosana contendo NPK (nitrogênio, fósforo e potássio) demonstraram absorção via estômatos em plantas de trigo. Por microscopia eletrônica de varredura, foram verificados a absorção foliar e o transporte através dos tecidos do floema. Além disso, o uso de nanopartículas foi eficiente no aumento da produtividade da cultura (ABDEL-AZIZ et al., 2016). Em folhas de feijão, foi possível identificar a presença de nanofertilizante nos feixes vasculares e elementos do floema (HASANEEN et al., 2016).

Alguns autores observaram ainda a adesão e a absorção por raízes de mostarda, utilizando nanopartículas poliméricas de PCL (PREISLER et al., 2020). Carvalho et al. (2023) observaram resultados semelhantes, porém com baixa eficiência de transporte para a parte aérea de *Bidens pilosa*, utilizando nanopartículas de zeína. Lipossomas lipídicos à base de plantas de (~90 nm), foram observados nas raízes de tomate cereja 72 horas após a exposição foliar (KARNY et al., 2018).

Alguns trabalhos vêm sugerindo, que os nanomateriais podem ser internalizados nas raízes juntamente com água e nutrientes, e assim translocados para a partes aérea (KRANJC et al., 2019). Entretanto, estudos ainda são necessários para compreender melhor o modo de ação das nanopartículas poliméricas doadoras de NO em plantas.

2.5.2 Nanopartículas poliméricas com óxido nítrico

Apesar da importância do NO em plantas, a aplicação de NO exógeno na agricultura ainda é limitada. Isso porque os doadores de NO são compostos que apresentam relativa instabilidade e que podem ter rápida degradação em ambientes de altas temperaturas e luminosidade, podendo reduzir a eficiência sinalizadora da molécula e potencializar a toxicidade (SEABRA e DURÁN, 2010; SEABRA et al., 2015;

SEABRA et al., 2022). Além disso, o tratamento exógeno em concentrações mais altas pode acarretar toxicidade para os organismos alvo e ao ambiente. Nesse contexto, a nanoencapsulação dos doadores de NO é uma estratégia inovadora que pode proteger as formulações e aumentar a eficiência de liberação do NO. Até o momento, as nanopartículas de quitosana têm sido reconhecidas como as primeiras para a liberação de NO em plantas.

Methela et al. (2023) demonstraram efeitos positivos no crescimento de soja sob estresse hídrico tratadas com nanopartículas de quitosana contendo GSNO. Plantas tratadas com 50 μM de NP CS-GSNO (via solo e foliar) permaneceram esverdeadas e com maior porte em relação ao controle e as plantas sob estresse. Nesse estudo, os autores relatam ainda, que concentrações mais elevadas de 75 μM demonstram efeitos positivos apenas nas raízes. Além disso, sob condições não estressantes, na concentração de 50 μM NP CS-GSNO, o vazamento de eletrólitos foi menor em relação as plantas não tratadas, indicando efeitos positivo da partícula na integridade da parede celular em nível celular. Os dados mostram ainda menor teor de prolina e peroxidação lipídica e acúmulo de pigmentos fotossintéticos para as plantas tratadas com NP CS-GSNO sob estresse hídrico e aumento no número de nódulos em comparação com as plantas não tratadas.

A aplicação exógena de NO nanoencapsulado no solo também protegeu as plantas de soja contra o excesso de cobre, estimulando o crescimento da raiz e a fotossíntese, além proteger contra o estresse oxidativo (GOMES et al., 2022). Nanopartículas de quitosana com doador de NO (MSA), quando aplicadas no substrato (areia), protegeram as plantas de milho contra a salinidade de forma mais eficiente que o doador livre, aumentando os níveis de S-nitrosotióis da folha, a atividade do fotossistema II e os níveis de clorofilas (OLIVEIRA et al., 2016).

Em mudas de espécies arbóreas expostas ao estresse luminoso, as nanopartículas doadoras de NO favoreceram a fotossíntese e o crescimento das mudas (LOPES OLIVEIRA et al., 2019). De forma similar, em mudas de *Heliocarpus popayanensis* submetidas ao déficit hídrico, o uso dos nanocarreadores potencializou o efeito protetor do doador de NO, destacando a potencial importância dessa formulação para os programas de reflorestamento (do CARMO et al., 2021).

Os efeitos de déficit hídrico em cana-de-açúcar também foram atenuados pela pulverização foliar de nanopartículas doadoras de NO, aumentando a taxa fotossintética e a biomassa das raízes (SILVEIRA et al., 2019). Silveira et al.

(2021) relataram que o tratamento foliar com SNAC atenuou de forma parcial o impacto negativo sobre a fotossíntese e eficiência do uso da água em plantas de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico. Além disso, os doadores SNAC e GSNO mostraram efeitos benéficos na fotossíntese durante o período de recuperação das plantas expostas à seca.

Estudos preliminares em tratamento de sementes de trigo com nanopartículas doadoras de NO também demonstraram o efeito protetor da formulação contra o déficit hídrico (SOUZA, 2023). O uso de NP CS-GSNO no priming de sementes de soja mostrou efeito benéfico na germinação e no crescimento de plântulas devido à regulação positiva na expressão de GA e à regulação negativa na expressão de ABA (STEVEN et al., 2024).

O uso de nanopartículas de alginato/quitosana com GSNO em plantas de milho e soja mostraram liberação gradativa do NO ao longo do tempo. Além disso, nas concentrações (1 e 5 mM) testadas não houve efeito fitotóxico no crescimento e desenvolvimento das plantas de soja e milho (PEREIRA et al., 2015).

Apesar dos resultados indicarem a eficácia do tratamento com as nanopartículas doadoras de NO em diferentes aplicações, ainda existe uma lacuna relacionada aos mecanismos de interação entre esses nanomateriais e plantas. Além disso, em todos os estudos com plantas, apenas nanopartículas de quitosana foram utilizadas para carregar os doadores de NO, sendo importante avaliar a aplicação de outros tipos nanopartículas, como as de alginato, que possuem características distintas que podem alterar a sua interação com as plantas.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-AZIZ; H. MM.; HASANEEN, M. NA.; OMER, A. M. Nano chitosan-NPK fertilizer enhances the growth and productivity of wheat plants grown in sandy soil. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 14, p. 17, 2016.
- AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery, **Journal of Controlled Release**, v. 100, p. 5–28, 2004.
- AHAMMED, G. J.; LI, X.; MAO, Q.; WAN, H.; ZHOU, G.; CHENG, Y. The SIWRKY81 transcription factor inhibits stomatal closure by attenuating nitric oxide accumulation in the guard cells of tomato under drought. **Physiologia Plantarum**, v. 172, 885-895, 2021.
- ALTAMURA, M. M.; PIACENTINI, D.; DELLA ROVERE, F.; FATTORINI, L.; FALASCA, G.; BETTI, C. New paradigms in brassinosteroids, strigolactones, sphingolipids, and nitric oxide interaction in the control of lateral and adventitious root formation. **Plants**, v. 12, p. 413, 2023.
- ARTUSIO, F.; CASÀ, D.; GRANETTO, M.; TOSCO, T.; PISANO, R. Alginate nanohydrogels as a biocompatible platform for the controlled release of a hydrophilic herbicide. **Processes**, v. 9, p. 1641, 2021.
- AYESHA, M. S.; SURYANARAYANAN, T. S.; NATARAJA, K. N.; PRASAD, S. R.; & SHAANKER, R. U. Seed treatment with systemic fungicides: time for review. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 654512, 2021.
- BACAXIXI, P.; RODRIGUES, L. R.; BRASIL, E. P.; BUENO, C. E. M.; RICARDO, H. A.; EPIPHANO, P. D.; SILVA, D. P.; BARROS, B. M. C.; SILVA, T. F.; BOSQUÊ, G. G. A soja e seu desenvolvimento no melhoramento genético. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 10, 2011.
- BAI, T. ZHANG, P. GUO, Z. CHETWYND, A. J. ZHANG, M. ADEEL, M. LI, M. GUO, K. GAO, R. LI, J. HAO, Y. RUI, Y. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 25542-25551, 2021.
- BANDARA, S.; DU, H.; CARSON, L.; BRADFORD, D.; KOMMALAPATI, R. Agricultural and biomedical applications of chitosan based nanomaterials. **Nanomaterials**, v. 10, p. 1903, 2020.

- BASTIAENS, L.; SOETEMANS, L.; D'HONDT, E.; ELST, K. Sources of chitin and chitosan and their isolation. **Chitin and Chitosan: Properties and Applications**, p. 1-34, 2019.
- BAUDOUIN, E.; PIEUCHOT, L.; ENGLER, G.; PAULY, N.; PUPPO, A. Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* functional nodules. **Molecular plant-microbe Interactions**, v. 19, p. 970-975, 2006.
- BESSON-BARD, A.; PUGIN, A.; WENDEHENNE, D. New insights into nitric oxide signaling in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 21-39, 2008.
- BELIGNI, M. V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide: a non-traditional regulator of plant growth. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 508-509, 2001.
- BERGER, A.; BOSCARI, A.; HORTA ARAÚJO, N.; MAUCOURT, M.; HANCHI, M.; BERNILLON, S.; ROLIN, D.; PUPPO, A.; BROUQUISSE, Plant nitrate reductases regulate nitric oxide production and nitrogen-fixing metabolism during the *Medicago truncatula*–*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1313, 2020.
- BHUVANESWARI, T. V.; TURGEON, B. G.; BAUER, W. D. Early Events in the Interfection of Soybean (*Glycine max* L. Merr) by *Rhizobium japonicum*. **Plant Physiology**, v. 66, p. 1027-1031, 1980.
- BOEREMA, A.; PEETERS, A.; SWOLFS, S.; VANDEVENNE, F.; JACOBS, S.; STAES, J.; MEIRE, P. Soybean trade: balancing environmental and socio-economic impacts of an intercontinental market. **Plos One**, v. 11, p. e0155222, 2016.
- BOMBO, A. B.; PEREIRA, A. E. S.; LUSA, M. G.; DE MEDEIROS OLIVEIRA, E.; DE OLIVEIRA, J. L.; CAMPOS, E. V. R.; JESUS, M. B. de.; OLIVEIRA, H.C.; de.; FRACETO, L. F.; MAYER, J. L. S. A mechanistic view of interactions of a nanoherbicide with target organism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, p. 4453-4462, 2019.
- BRIGHT, J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. T.; WEIR, I. S.; NEILL, S. J. ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. **The Plant Journal**, v. 45, p. 113-122, 2006.
- CALABRESE, E.; J.; AGATHOKLEOUS, E. Nitric oxide, hormesis and plant biology. **Science of the Total Environment**, v. 866, p. 161299, 2023.
- CALVO-BEGUERIA, L.; RUBIO, M. C.; MARTÍNEZ, J. I.; PÉREZ-RONTOMÉ, C.; DELGADO, M. J.; BEDMAR, E. J.; BECANA, M. Redefining nitric oxide production in legume nodules through complementary insights from electron paramagnetic

resonance spectroscopy and specific fluorescent probes. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, p. 3703-3714, 2018.

CAM, Y.; PIERRE, O.; BONCOMPAGNI, E.; HÉROUART, D.; MEILHOC, E.; BRUAND, C. Nitric oxide (NO): a key player in the senescence of *Medicago truncatula* root nodules. **New Phytologist**, v. 196, p. 548-560, 2012.

CANEVAROLO S. Ciência dos Polímeros 2do ed. **Artliber**, Disponível em: <http://www.ifba.edu.br>. Acesso em: 20 de maio de 2019.

CARVALHO, L. B.; GODOY, I. S.; PREISLER, A. C.; DE FREITAS PROENÇA, P. L.; SARAIVA-SANTOS, T.; VERRI, W. A.; OLIVEIRA, H. C.; FRACETO, L. F. Pre-emergence herbicidal efficiency and uptake of atrazine-loaded zein nanoparticles: a sustainable alternative to weed control. **Environmental Science: Nano**, v.10p. 1629-1643, 2023.

CHOUDHARY, R. C. KUMARASWAMY, R. V. KUMARI, S. SHARMA, S. S. PAL, A. RALIYA, R. SAHARAN, V. Zinc encapsulated chitosan nanoparticle to promote maize crop yield. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.127, p. 126-135, 2019.

CIACKA, K.; STASZEK, P.; SOBCZYNSKA, K.; KRASUSKA, U. GNIAZDOWSKA, A. Nitric oxide in seed biology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, p. 14951, 2022.

CLARK, D.; DURNER, J.; NAVARRE, D. A.; KLESSIG, D. F. Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, p. 1380-1384, 2000.

CORREA-ARAGUNDE, N.; GRAZIANO, M.; CHEVALIER, C.; LAMATTINA, L. Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 581-588, 2006.

CORPAS, F. J.; CHAKI, M.; FERNANDEZ-OCANA, A.; VALDERRAMA, R.; PALMA, J. M.; CARRERAS, A.; BEGARA-MORALES, J. C.; AIRAKI, M.; DEL RÍO, L. A.; BARROSO, J. B. Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. **Plant & Cell Physiology**, v. 49, p. 1711-1722, 2008.

COUVREUR, Patrick. Nanoparticles in drug delivery: past, present and future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, p. 21-23, 2013.

da SILVA, H. A. P. CAETANO, V. S. PESSÔA, D. D. V. PACHECO, R. S. MENESES, C. H. S. SIMÕES-ARAÚJO, J. L. Unraveling the drought-responsive transcriptomes in

nodules of two common bean genotypes during biological nitrogen fixation. *Frontiers in Plant Science*, v. 15, p. 1345379, 2024.

Dan, L. D. M.; Dan, H. D. A.; Piccinin, G. G.; Ricci, T. T.; Ortiz, A. H. T. **Insecticide treatment and physiological quality of soybean seeds**, 2011.

DELLEDONNE, M.; ZEIER, J.; MAROCCO, A.; LAMB, C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, p. 13454-13459, 2001.

DESIKAN, R.; GRIFFITHS, R.; HANCOCK, J.; NEILL, S. A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 16314-16318, 2002.

do CARMO, G. C.; IASTRENSKI, L. F.; DEBIASI, T. V.; DA SILVA, R. C.; GOMES, D. G.; PELEGRINO, M. T.; OLIVEIRA, H. C. Nanoencapsulation improves the protective effects of a nitric oxide donor on drought-stressed *Heliocarpus popayanensis* seedlings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 225, p. 112713, 2021.

DODERO, A. ALBERTI, S. GAGGERO, G. FERRETTI, M. BOTTER, R. VICINI, S. CASTELLANO, M. An Up-to-Date Review on Alginate Nanoparticles and Nanofibers for Biomedical and Pharmaceutical Applications. **Advanced Materials Interfaces**, v. 8, p. 2100809, 2021.

DUTTA, P. K.; DUTTA, J.; TRIPATHI, V. S. Chitin and chitosan: chemistry, properties and applications. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v.63, p. 20-31, 2004.

ELGADIR, M.A.; UDDIN, M.S.; FERDOSH, S.; ADAM, A.; CHOWDHURY, A.J.K.; SARKER, M.Z.I. Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: a review. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, p. 619- 629, 2014.

FAN, W.; YAN, W.; XU, Z. S.; NI, H. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, p. 21–27, 2012.

FARNESE F. S.; MENEZES-SILVA, P. E.; GUSMAN, G. S.; OLIVEIRA, J. A. When bad guys become good ones: the key role of reactive oxygen species and nitric oxide in the plant responses to abiotic stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 471, 2016.

FEELISCH, M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 358, p. 113-122, 1998.

- FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N. Ecofisiologia da soja. **Embrapa Soja-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2007.
- FEIGL, G.; HORVÁTH, E.; MOLNÁR, Á.; OLÁH, D.; POÓR, P.; KOLBERT, Z. Interação etileno-óxido nítrico durante a emergência de raízes laterais induzida por selênio em *Arabidopsis*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.38, p. 1481-1488, 2019.
- FLORYSZAK-WIECZOREK, J.; MILCZAREK, G.; ARASIMOWICZ, M.; CISZEWSKI, A. Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? **Plant**, v. 224, p. 1363-1372, 2006.
- FRACETO, L. F.; GRILLO, R.; DE MEDEIROS, G. A.; SCOGNAMIGLIO, V.; REA, G.; BARTOLUCCI, C. Nanotechnology in agriculture: which innovation potential does it have? **Frontiers in Environmental Science**, v. 4, p. 20, 2016.
- FUKUDOME, M.; WATANABE, E.; OSUKI, K. I.; IMAIZUMI, R.; AOKI, T.; BECANA, M.; UCHIUMI, T. Stably transformed *Lotus japonicus* plants overexpressing phytoglobin LjGlb1-1 show decreased nitric oxide levels in roots and nodules as well as delayed nodule senescence. **Plant and Cell Physiology**, v. 60(4), p. 816-825, 2019.
- GABBI, M.T. T.; COSTA, N. L.; OLIVEIRA, G. N.; GELATTI, E.; RHODEN, A. C. Análise das trajetórias das exportações de Brasil e Argentina no comércio internacional do complexo soja (1993-2018). **COLÓQUIO – Revista do Desenvolvimento Regional**, v. 17, p. 28-47, 2020.
- GAGE, D. J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68(2), p. 280-300, 2004.
- GIRI, N. G.; SHUKLA, S. K. Nanotechnology in Agricultural Practices: Prospects and Potential. **Materials Research Foundations**, v. 148, 2023.
- GOMES, D. G. DEBIASI, T. V. PELEGRINO, M. T. PEREIRA, R. M. ONDRASEK, G. BATISTA, B. L. OLIVEIRA, H. C. Soil treatment with nitric oxide-releasing chitosan nanoparticles protects the root system and promotes the growth of soybean plants under copper stress. **Plants**, v. 11(23), p. 3245, 2022.
- GUPTA, K. J.; HINCHA, D. K.; MUR, L. A. J. NO way to treat a cold. **The New Phytologist**, v. 189, p. 360–363, 2011.
- GUPTA, K. J.; LEE, C. P.; RATCLIFFE, R. G. Nitrite protects mitochondrial structure and function under hypoxia. **Plant and Cell Physiology**, v. 58, p. 175-183, 2017.

GUPTA, P.; SHARMA, M.; SHARMA, S. **Nanotechnology in agriculture: Prospect, Opportunities and Challenges**, 2023.

GUAN, H.; CHI, D.; YU, J.; LI, X. A novel photodegradable insecticide: Preparation, characterization and properties evaluation of nano-Imidacloprid. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 92, p. 83-91, 2008.

GUAN, Y. J.; HU, J.; WANG, X. J.; SHAO, C. X. Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. *Journal of Zhejiang University Science B*, v. 10, p. 427-433, 2009.

HASANEEN, M. N. A. G.; ABDEL-AZIZ, H. M. M.; OMER, A. M. Effect of foliar application of engineered nanomaterials: carbon nanotubes NPK and chitosan nanoparticles NPK fertilizer on the growth of French bean plant. *Biochemistry and Biotechnology Research*, v. 4, p. 68-76, 2016.

HARISH-PRASHANTH, K. V.; THARANATHAN, R. N. Chitin/chitosan: Modifications and their unlimited application potential an overview. *Trends in Food Science & Technology*, v.18, p. 117–131, 2007.

HAYAT, S.; YADAV, S. ALYEMENI, M. N.; AHMAD, A. Effect of sodium nitroprusside on the germination and antioxidant activities of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Bulgarian Journal Agricultural Science*, v. 20, 140-4, 2014.

HIDANGMAYUM, A.; DWIVEDI, P.; KATIYAR, D.; HEMANTARANJAN, A. Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, v. 25, p. 313-326, 2019.

Hu, K. J.; Hu, J. L.; Ho, K. P.; Yeung, K. W. Screening of fungi for chitosan producers, and copper adsorption capacity of fungal chitosan and chitosanaceous materials. *Carbohydrate Polymers*, v. 58, p.45-52, 2004.

JAHNOVÁ, J; LUHOVÁ, L; PETŘIVALSKÝ, M. The master regulator of protein S-nitrosation in plant NO signaling. *Plants*, v. 8, p. 48, 2019.

KHAN, M.; ALI, S.; AL AZZAWI, T. N. I.; YUN, B. W. Nitric Oxide Acts as a Key Signaling Molecule in Plant Development under Stressful Conditions. *International journal of molecular sciences*, v. 24, p. 4782, 2023.

KAPIL, V. KHAMBATA, R. S. JONES, D. A. RATHOD, K. PRIMUS, C. MASSIMO, G. AHLUWALIA, A. The noncanonical pathway for in vivo nitric oxide generation: the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway. *Pharmacological Reviews*, v. 72, p. 692-766, 2020.

- KHATOR, K. PARIHAR, S. JASIK, J.; SHEKHAWAT, G. S. Nitric oxide in plants: an insight on redox activity and responses toward abiotic stress signaling. **Plant Signaling & Behavior**, v. 19, p. 2298053, 2024.
- KOLBERT, Z.; BARROSO, J. B.; BROUQUISSE, R.; CORPAS, F. J.; GUPTA, K. J.; LINDERMAYR, C.; G. J.; LOAKE, J. M.; PALMA, M.; PETŘIVÁLSKÝ, D.; HANCOCK, J. T. A forty year journey: The generation and roles of NO in plants. **Nitric Oxide**, v. 93, p. 53-70, 2019.
- KRANJC E, DROBNE D. Nanomaterials in plants: a review of hazard and applications in the agri-food sector. **Nanomaterials**. p.1094, 2019.
- KUMAR, D.; SHAHID, M. Natural Materials and Products from Insects: Chemistry and Applications. **Springer Nature**, 2020.
- KUMAR, S.; YE, F.; DOBRETISOV, S.; DUTTA, J. Chitosan nanocomposite coatings for food, paints, and water treatment applications. **Applied Sciences**, v. 9, p. 2409, 2019.
- KUMARI, A. GUPTA, A. K. SHARMA, S. JADON, V. S. SHARMA, V. CHUN, S. C. SIVANESAN, I. Nanoparticles as a Tool for Alleviating Plant Stress: Mechanisms, Implications, and Challenges. **Plants**, v. 13(11), p. 1528, 2024.
- LEON, J.; COSTA-BROSETA, A. Present knowledge and controversies, deficiencies, and misconceptions on nitric oxide synthesis, sensing, and signaling in plants. **Plant, Cell & Environment**, v.43, p.1-15,2020.
- LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 1, p. 106-126, 2012.
- LENSEN, A. W. Biofield and fungicide seed treatment influences on soybean productivity, seed quality and weed community. **Agricultural Journal**, p. 138-143, 2013.
- LEONARDI, M.; CARUSO, G. M.; CARROCCIO, S. C.; BONINELLI, S.; CURCURUTO, G. ZIMBONE, M.; ALLEGRA, M.; TORRISI, B.; FERLITO, F.; MIRITELLO, M. Smart nanocomposites of chitosan/alginate nanoparticles loaded with copper oxide as alternative nanofertilizers. **Environmental Science: Nano**, v. 8, p. 174-187, 2021.
- LETERRIER, M.; CHAKI, M.; AIRAKI, M.; VALDERRAMA, R.; PALMA, J. M.; BARROSO, J. B.; CORPAS, F. J. Function of S-nitrosogluthathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, p. 789-793, 2011.

- LI, R.; HE, J.; XIE, H.; WANG, W.; BOSE, S. K.; SUN, Y.; HU, J.; YIN H. Effects of chitosan nanoparticles on seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 91-100, 2019.
- LIU, Q.; JING, Y.; HAN, C.; ZHANG, H.; TIAN, Y. Encapsulation of curcumin in zein/caseinate/sodium alginate nanoparticles with improved physicochemical and controlled release properties. **Food Hydrocolloids**, p.432-442, 2019.
- LIU, Y.; ZHANG, H. Reactive oxygen species and nitric oxide as mediators in plant hypersensitive response and stomatal closure. **Plant Signaling & Behavior**, v. 16, p. 1985860, 2021.
- LOMBARDO, M. C.; LAMATTINA, L. Nitric oxide is essential for vesicle formation and trafficking in Arabidopsis root hair growth. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 4875-4885, 2012.
- LOMBARDO, M. C.; LAMATTINA, L. Absciscic acid and nitric oxide modulate cytoskeleton organization, root hair growth and ectopic hair formation in Arabidopsis. **Nitric Oxide**, v. 80, p. 89-97, 2018.
- LOPES-OLIVEIRA, P. J.; GOMES, D. G.; PELEGRINO, M. T.; BIANCHINI, E. PIMENTA, J. A.; STOLF-MOREIRA, R.; SEABRA, A.M.; OLIVEIRA, H. C. Effects of nitric oxide-releasing nanoparticles on neotropical tree seedlings submitted to acclimation under full sun in the nursery. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-10, 2019.
- LOWRY, G. V.; AVELLAN, A.; GILBERTSON, L. M. Opportunities and challenges for nanotechnology in the agri-tech revolution. **Nature Nanotechnology**, v. 14, p. 517-522, 2019.
- MA Z, BYKOVA N. V; IGAMBERDIEV A. U. Cell signaling mechanisms and metabolic regulation of germination and dormancy in barley seeds. **The Crop Journal**. v.1, p. 459-77, 2017.
- MA Z, MARSOLAIS F.; BYKOVA N.V. IGAMBERDIEV AU. Nitric oxide and reactive oxygen species mediate metabolic changes in barley seed embryo during germination. **Frontiers in Plant Science**. v.16, p. 138, 2016.
- MAHAKHAM, W.; SARMAH, A. K.; MAENSIRI, S.; THEERAKULPISUT, P. Nanoprimer technology for enhancing germination and starch metabolism of aged rice seeds using phytosynthesized silver nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-21, 2017.

MALUIN, F. N.; HUSSEIN, M. Z. Chitosan-based agronanochemicals as a sustainable alternative in crop protection. **Molecules**, v. 25, p. 1611, 2020.

MAPA. Estatísticas de Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/exportacoes-do-agronegocio-brasileiro-batem-recorde-no-primeiro-trimestre-de-2024-e-atingem-us-37-44bilhoes/Notaimprensa03_2024ANO.docx. Acesso em: maio 2024.

METHELA, N. J. ISLAM, M. S. LEE, D. S. YUN, B. W.; MUN, B. G. S-nitrosoglutathione (GSNO)-mediated lead detoxification in soybean through the regulation of ROS and metal-related transcripts. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, p. 9901, 2023.

MIERNICKI, M.; HOFMANN, T. EISENBERGER; I. VON DER KAMMER, F.; PRAETORIUS, A. Legal and practical challenges in classifying nanomaterials according to regulatory definitions. **Nature Nanotechnology**, v. 14, p. 208-216, 2019.

MITCHELL, M. J.; BILLINGSLEY, M. M.; HALEY, R. M.; WECHSLER, M. E.; PEPPAS, N. A.; LANGER, R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, p. 101-124, 2021.

MUNDSTOCK, C.M.; THOMAS, A.L. Soja: fatores que afetam o crescimento e rendimento de grãos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p.31, 2005.

NAGPAL, K.; SINGH, S. K.; MISHRA, D. N. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, p. 1423-1430, 2010.

NEILL, S.J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.T. Nitric oxide signalling in plants. **The New Phytologist**, v. 159, p. 11–35, 2003.

NGUYEN, M. H.; HWANG, I. C.; BUI, C. B.; PARK, H. J. Effects of the physical state of nanocarriers on their penetration into the root and upward transportation to the stem of soybean plants using confocal laser scanning microscopy. **Crop Protection**, v. 87, p. 25-30, 2016.

OLIVEIRA, H. C.; GOMES, B. C. R.; PELEGRINO, M. T.; SEABRA, A. B. Nitric oxide-releasing chitosan nanoparticles alleviate the effects of salt stress in maize plants. **Nitric Oxide**, v. 61. p. 10-19, 2016.

OLIVEIRA, S. B. L.; RISTROPH, L. K. D. Critical Review: Uptake and Translocation of Organic Nanodelivery Vehicles in Plants. **Environmental Science & Technology**, v. 58, p. 5646-5669, 2024.

- W.NO Network for Plant – Microbe Communication Underground: Uma revisão. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 431, 2021.
- PARISI, C.; VIGANI, M.; RODRÍGUEZ-CEREZO, E. Agricultural nanotechnologies: what are the current possibilities? **Nano Today**, v. 10, p. 124-127, 2015.
- PASCOLI, M.; LOPES-OLIVEIRA, P. J.; FRACETO, L. F.; SEABRA, A. B.; OLIVEIRA, H. C.; State of the art of polymeric nanoparticles as carrier systems with agricultural applications. **Energy, Ecology, and Environment**, v. 3, p. 137-148, 2018.
- PEREIRA A. E. S.; GRILLO, R.; MELLO, N. F.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Application of poly (epsilon caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an alternative technique to control weeds and reduce damage to the environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 268, p. 207–215, 2014.
- PEREIRA, A. E. S.; OLIVEIRA, H. C. FRACETO, L. F.; SANTAELLA, C. Nanotechnology Potential in Seed Priming for Sustainable Agriculture. **Nanomaterials**, v. 11, 267, 2021.
- PLANCHET, E.; GUPTA, K. J.; SONODA, M.; KAISER, W. M. Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. **The Plant Journal**, v. 41, p. 732-743, 2005.
- PRASAD, A.; ASTETE, C. E.; BODOKI, A. E.; WINDHAM, M.; BODOKI, E.; SABLIOV, C. M. Zein nanoparticles uptake and translocation in hydroponically grown sugar cane plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 66, p. 6544-6551, 2017.
- PREISLER, A. C.; CARVALHO, L. B.; SARAIVA-SANTOS, T.; VERRI JR, W. A.; MAYER, J. L. S.; FRACETO, L. F.; DALAZEN, G.; OLIVEIRA, H. C. Interaction of nanoatrazine and target organism: evaluation of fate and photosystem II inhibition in hydroponically grown mustard (*Brassica juncea*) plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, p. 7644-7652, 2022.
- REMMINGHORST, U. REHM, B. H. Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. **Biotechnology letters**, v. 28, p. 1701-1712, 2006.
- RIDNOUR, L. A.; THOMAS, D. D.; MANCARDI, D.; ESPEY, M. G.; MIRANDA, K. M. PAOLOCCI, N.; FEELISH, M.; FUKUTO, J.; WINK, D. A. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. **Biological Chemistry**, v. 385, p. 1-10, 2004.

- RIDOLFI, D. M.; MARCATO, P. D.; JUSTO, G. Z.; CORDID, L.; MACHADO, D.; DURAN, N. Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 93, p. 36-40, 2012.
- ROCHA, D. K.; CARVALHO, E. R.; REIS, V. U. V.; NARDELLI, A. C. P.; ANDRADE, D. B. D.; MESQUITA, A. P. Dose effectiveness and quality of soybean seed treatment in Brazilian agriculture as a function of application technology. **Journal of Seed Science**, v. 46, p. e202446018, 2024.
- ROCKEL, P.; STRUBE, F.; ROCKEL, A.; WILDT, J.; KAISER, W. M. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 366, p. 103-110, 2002.
- PEREIRA, A. E. S.; SILVA, P. M.; OLIVEIRA, J. L.; OLIVEIRA, H. C.; FRACETO, L. F. Chitosan nanoparticles as carrier systems for the plant growth hormone gibberellic acid. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 150, p.141-152, 2017.
- SALVAGIOTTI, F. CASSMAN, K. G. SPECHT, J. E. WALTERS, D. T. WEISS, A. DOBERMANN, A. Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review. **Field Crops Research**, v.108, p.1-13, 2008.
- SANTISREE, P.; BHATNAGAR-MATHUR, P.; SHARMA, K. K. NO to drought-multifunctional role of nitric oxide in plant drought: Do we have all the answers? **Plant Science**, v. 239, p. 44-55, 2015.
- SANTOS, M. P.; ZANDONADI, D. B.; DE SÁ, A. F. L.; COSTA, E. P.; DE OLIVEIRA, C. J. L.; PEREZ, L. E.; BRESSAN-SMITH, R. Absciscic acid-nitric oxide and auxin interaction modulates salt stress response in tomato roots. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 32, p. 301-313, 2020.
- SCHUBERT, S. Nitrogen assimilation by legumes-processes and ecological limitations. **Fertilizer Research**, v. 42, p. 99-107, 1995.
- SEABRA, A. B.; JUSTO, G. Z.; HADDAD, P. S. State of the art, challenges and perspectives in the design of nitric oxide-releasing polymeric nanomaterials for biomedical applications. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1370–1379, 2015.
- SEABRA, A. B.; DURÁN, N. Nitric oxide releasing vehicles for biomedical applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, p.1624-1637, 2010.
- SEABRA, A. B. FABBRI, G. K. PELEGRINO, M. T. SILVA, L. C. RODRIGUES, T. Synthesis, characterization and cytotoxicity of S-nitroso-mercaptosuccinic acid-containing alginate/chitosan nanoparticles. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 838, p. 012032, 2017.

- SEABRA, A. B.; SILVEIRA, N. M. RIBEIRO, R. V. PIERETTI, J. C. BARROSO, J. B. CORPAS, F. J. OLIVEIRA, H. C. Nitric oxide-releasing nanomaterials: from basic research to potential biotechnological applications in agriculture. **New Phytologist**, v. 234, p. 1119-1125, 2022.
- SEKHON, B. S. Nanotechnology in agri-foods production: an overview. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 7, p. 31, 2014.
- SELIGMAN, K.; SAVIANI, E.E.; OLIVEIRA, H.C.; PINTO-MAGLIO, C.A; SALGADO, I. 2008. Floral transition and nitric oxide emission during flower development in *Arabidopsis thaliana* is affected in nitrate reductase-deficient plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 49, p.1112–1121, 2008.
- SHAH, S.; CHEN, C.; SUN, Y.; WANG, D.; NAWAZ, T.; EL-KAHTANY, K. FAHAD, S. Mechanisms of nitric oxide involvement in plant-microbe interaction and its enhancement of stress resistance. **Plant Stress**, p. 100191, 2023.
- SHALIMU D; S J, BASKIN C. C; BASKIN J. M, SUN L, LIU Y. Changes in oxidative patterns during dormancy break by warm and cold stratification in seeds of an edible fruit tree. **AoB Plants**. v.8, p. plw024, 2016.
- SHRESTHA, Pratiksha et al. Journal of Agriculture and Food Research. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 11, p. 100526, 2023.
- SIGNORELLI, S.; SAINZ, M. TABARES-DA-ROSA, S; MONZA, J. The role of nitric oxide in nitrogen fixation by legumes. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 521, 2020.
- SILVA, M. S.; COCENZA, D. S. GRILLO, R. DE MELO, N. F. S. TONELLO, P. S. DE OLIVEIRA, L. C.; CASSIMIRO, A. H. ROSA, C. A. H.; FRACETO, L. F. Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: preparation, characterization and soil sorption studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, p. 366-374, 2011.
- SILVEIRA, N. M.; FRUNGILLO, L.; MARCOS, F. C. PELEGRINO; M. T. MIRANDA, M. T.; SEABRA, A. B.; RIBEIRO, R. V. Exogenous nitric oxide improves sugarcane growth and photosynthesis under water deficit. **Planta**, v. 244, p. 181-190, 2016.
- SILVEIRA, N. M. SEABRA, A. B. MARCOS, F. C. PELEGRINO, M. T. MACHADO, E. C. RIBEIRO, R. V. Encapsulation of S-nitrosoglutathione into chitosan nanoparticles improves drought tolerance of sugarcane plants. **Nitric Oxide**, v.84, p. 38-44, 2019.
- SILVEIRA, N. M. PRATAVIERA, P. J. PIERETTI, J. C. SEABRA, A. B. ALMEIDA, R. L. MACHADO, E. C.; RIBEIRO, R. V. Chitosan-encapsulated nitric oxide donors enhance physiological recovery of sugarcane plants after water deficit. **Environmental and Experimental Botany**, v.190, p. 104593, 2021.

- SIMONTACCHI M.; GALATRO, A.; RAMOS-ARTUSO, F.; SANTA-MARÍA, G. E. Plant survival in a changing environment: The role of nitric oxide in plant responses to abiotic stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 977, 2015.
- SIMONTACCHI, M. JASID, S. PUNTARULO, S. Nitric oxide generation during early germination of sorghum seeds. **Plant Science**, v. 167, n. 4, 839-847, 2004.
- SINGHAL, R. K.; JATAV, H. S.; AFTAB, T.; PANDEY, S.; MISHRA, U. N.; CHAUHAN, J.; AHMED, S. Roles of nitric oxide in conferring multiple abiotic stress tolerance in plants and crosstalk with other plant growth regulators. **Journal of Plant Growth Regulation**, p. 1-26, 2021.
- SINGH, N; BHATLA, S. C. Nitric oxide regulates lateral root formation through modulation of ACC oxidase activity in sunflower seedlings under salt stress. **Plant Signaling & Behavior**, v. 13, p. e1473683, 2018.
- SINGH, R.P.; HANDA, R.; MANCHANDA, G. Nanopartículas na agricultura sustentável: uma oportunidade emergente. **Journal of Controlled Release**, 2020.
- SINGH, P. M. TIWARI, A. MAITY, D. SAHA, S. Recent progress of nanomaterials in sustainable agricultural applications. **Journal of Materials Science**, v. 57, 10836-10862, 2022.
- SONI, A. T.; ROOKES, J. E.; ARYA, S. S. Chitosan Nanoparticles as Seed Priming Agents to Alleviate Salinity Stress in Rice (*Oryza sativa* L.) Seedlings. **Polysaccharides**, v. 4, p. 129-141, 2023.
- SOUMARE, A.; DIEDHIOU, A. G.; THUITA, M.; HAFIDI, M.; OUHDOUCH, Y.; GOPALAKRISHNAN, S.; E KOUISNI, L. Exploiting biological nitrogen fixation: a route towards a sustainable agriculture. **Plants**, v. 9, p. 1011, 2020.
- SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; & SANTANA, M. H. A. Preparation of polymeric nanoparticles by polymerization of monomers: part I. **Polímeros**, v. 22, p.96-100, 2012.
- SPADARO, D. YUN, B. W. SPOEL, S. H. CHU, C. WANG, Y. Q. LOAKE, G. J. The redox switch: dynamic regulation of protein function by cysteine modifications. *Physiologia plantarum*, v. 138, p. 360-371, 2010.
- SRIL, V. S. Nanotechnology in Agriculture. Chief Editor Dr. Anil Kumar Saxena, ed. 1, p. 76, 2023.
- STEVEN, S. ISLAM, M. S. GHIMIRE, A. METHELA, N. J. KWON, E. H. YUN, B. W. KIM, Y. Chitosan-GSNO Nanoparticles and Silicon Priming Enhance the Germination and Seedling Growth of Soybean (*Glycine max* L.). **Plants**, v. 13, p. 1290, 2024.

- TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.; MURPHY, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. 6.ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2017.
- TAMILMANI, E. SHANMUGAM, K. MADURAIMUTHU, D. THANABALU, T. LE, Q. H. PUGAZHENDHI, A. Unleashing the potential of nanoparticles on seed treatment and enhancement for sustainable farming. **Environmental Research**, p. 116849, 2023.
- TEJO, D.; FERNANDES, C. H. S.; BURATTO, J. S. Soja: fenologia, morfologia e fatores que interferem na produtividade. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia da FAEF**. v. 35, 2019.
- TRIPATHI, D. K.; SINGH, S.; SINGH, S.; PANDEY, R.; SINGH, V. P.; SHARMA, N. C.; PRASAD, S.M.; DUBEY, N.K.; CHAUHAN, D. K. An overview on manufactured nanoparticles in plants: uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 110, p. 2-12, 2017.
- USDA. United States **Department of Agriculture**. **World Agricultural Production**.Disponívelem:<https://ipad.fas.usda.gov/cropexplorer/cropview/commodityView.aspx?cropid=2222000>. Acesso em: maio 2024.
- USMAN, M.; FAROOQ, M.; WAKEEL, A.; NAWAZ, A.; CHEEMA, S. A.; UR REHMAN, H.; REHAMAN, H.UR.; ASHRAF, I.; SANAULLAH, M. Nanotechnology in agriculture: Current status, challenges and future opportunities. **Science of the Total Environment**, v. 721, p. 137778, 2020.
- VALDERRAMA, R.; CORPAS, F. J.; CARRERAS, A.; FERNÁNDEZ-OCAÑA, A.; CHAKI, M.; LUQUE, F.; GÓMEZ-RODRÍGUEZ, M. V.; COLMENERO-VAREA, P.; DEL RÍO, L. A.; BARROSO, J. B. Nitrosative stress in plants. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 581, p. 453–461, 2007.
- VANCE, C. P. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. **Plant physiology**, v.127, p. 390-397, 2001.
- VEMULA, M.; REDDY, A. Polymeric nanoparticles as effective delivery systems in agriculture sustainability. **Nanotechnology for Environmental Engineering**, p. 1-10, 2023.
- WANG, D.; SALEH, N. B.; BYRO, A. ZEPP, R. SAHLE-DEMESSIE, E. LUXTON, T. P. HO, K. T. BURGESS, R. M. FLURY, M. WHITE, J. C. SU, C. **Nature Nanotechnology**, v. 17, p. 347-360, 2022.

- WANG, P.; DU, Y.; HOU, Y. J.; ZHAO, Y.; HSU, C. C.; YUAN, F.; ZHU, J. K. Nitric oxide negatively regulates abscisic acid signaling in guard cells by S-nitrosylation of OST1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, 613-618, 2015.
- WANG, Q.; LIU, J. ZHU, H. Genetic and molecular mechanisms underlying symbiotic specificity in legume-rhizobium interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 313, 2018.
- WANG, M.; ZHANG, G.; ZHOU, L.; WANG, D.; ZHONG, N.; CAI, D.; WU, Z. Fabrication of pH-controlled-release ferrous foliar fertilizer with high adhesion capacity based on nanobiomaterial. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, p. 6800-6808, 2016.
- WILSON, I. D.; NEILL, S. J.; HANCOCK, J. T. Nitric oxide synthesis and signalling in plants. **Plant, Cell & Environment**, v. 31, p. 622-631, 2008.
- ZHANG, Y.; MARTINEZ, M. R.; SUN, H.; SUN, M.; YIN, R.; YAN, J.; LOWRY, G. V. Charge, Aspect Ratio, and Plant Species Affect Uptake Efficiency and Translocation of Polymeric Agrochemical Nanocarriers. **Environmental Science & Technology**, 2023.
- YAMAMOTO, Tadahiko; BING, Richard J. Nitric Oxide Donors. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 225, p. 200-206, 2000.
- YAMASAKI, H.; SAKIHAMA, Y. Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. **FEBS letters**, v. 468, p. 89-92, 2000.
- ZANDONÁ, R. R. PAZDIORA, P. C. PAZINI, J. D. B. SEIDEL, E. J. ETHUR, L. Z. Chemical and biological seed treatment and their effect on soybean development and yield. *Revista Caatinga*, v. 32, p. 559-565, 2019.
- ZAIM, N. S. H. B. H. TAN, H. L. RAHMAN, S. M. A. ABU BAKAR, N. F. OSMAN, M. S. THAKUR, V. K. RADACSI, N. Recent advances in seed coating treatment using nanoparticles and nanofibers for enhanced seed germination and protection. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.42, p. 7374-7402, 2023.
- ZHAO, L.; LU, L.; WANG, A.; ZHANG, H.; HUANG, M.; WU, H.; JI, R. Nano-biotechnology in agriculture: use of nanomaterials to promote plant growth and stress tolerance. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, v.68, p. 1935-1947, 2020.
- ZILLI, J. É.; GIANLUPPI, V.; CAMPO, R. J.; ROUWS, J. R. C.; HUNGRIA, M. Inoculação da soja com Bradyrhizobium no sulco de semeadura alternativamente à inoculação de sementes. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 1875-1881, 2010.

3 ARTIGO A) Efeitos do tratamento de sementes com nanopartículas de diferentes composições e cargas contendo GSNO processo germinativo e na nodulação de soja

RESUMO

O NO é uma importante molécula sinalizadora multifuncional em plantas, com participação em vários processos biológicos, tais como germinação, formação e arquitetura de raízes, associação com bactérias e formação de nódulos. A aplicação exógena de NO em plantas necessita de doadores como a S-nitrosoglutationa (GSNO). No entanto, esses compostos são relativamente instáveis e se degradam rapidamente. Nessa premissa, o uso de nanopartículas poliméricas pode ser um importante aliado para a aplicação dos doadores de NO na agricultura. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do tratamento de sementes de soja com nanopartículas de diferentes composições e cargas contendo GSNO no processo germinativo. Além disso, buscou-se investigar se o tratamento de sementes com as nanopartículas favoreceria a nodulação e o crescimento de plantas de soja. As sementes foram previamente tratadas por imersão nas seguintes formulações: GSNO livre, nanopartículas de quitosana sem/com NO (NP CS-GSH e NP CS-GSNO), e nanopartículas de alginato sem/com NO (NP AI-GSH e NP AI-GSNO). Para o experimento *in vitro*, as concentrações de GSNO ou GSH nas formulações foram 0,125 mM, 0,250 mM, 0,500 mM, 1,0 mM e 2,0 mM. Para o experimento de nodulação, foram testadas apenas as nanoformulações na concentração de 1,0 mM e, após a embebição, as sementes foram inoculadas com *Bradyrhizobium japonicum*. NP CS-GSNO mostrou um aumento na taxa de germinação saindo de 60% (controle) para 71% na concentração de 1,0 mM, no comprimento de raiz e no número de raízes laterais. Além disso foi a única a promover maior acúmulo de massa seca de raiz. Em contrapartida, NP AI-GSNO foi a única a aumentar o acúmulo de massa seca da parte aérea nessa concentração. Para NP AI-GSNO, o número de raízes laterais foi aproximadamente três vezes maior nas concentrações mais altas (0,500, 1,0 e 2,0 mM). Já a molécula livre apresentou efeitos positivos apenas na raiz. NP CS-GSH reduziu o comprimento da raiz e da parte aérea. Nos estudos de nodulação, a massa seca do nódulo foi significativamente maior para os tratamentos NP CS-GSNO. Foi observada, ainda, redução dos parâmetros fotossintéticos para NP CS-GSH e GSNO. Com isso, nossos resultados destacam o potencial das nanopartículas de quitosana na melhoria da aplicação de doadores de NO nas sementes de soja, principalmente na concentração de 1,0 mM.

Palavra-chave: Tratamento de sementes; Nanocarreadores; Nanoformulações; Nódulo; S-nitrosoglutationa

3 ARTICLE A) Effects of seed treatment with nanoparticles of different compositions and fillers containing GSNO on germination process and soybean nodulation

ABSTRACT

NO is an important multifunctional signaling molecule in plants, participating in several biological processes, such as germination, root formation and architecture, association with bacteria, and nodule formation. The exogenous application of NO in plants requires donor molecules such as S-nitrosoglutathione (GSNO). However, these compounds are relatively unstable and degrade quickly. Based on this premise, the use of polymeric nanoparticles can be an important ally for the application of NO donors in agriculture. The objective of this study was to evaluate the effects of treating soybean seeds with nanoparticles of different compositions and fillers containing GSNO on the germination process. Furthermore, we sought to investigate whether seed treatment with nanoparticles would favor nodulation and growth of soybean plants. The seeds were previously treated by immersion in the following formulations: free GSNO, chitosan nanoparticles without/with NO (NP CS-GSH and NP CS-GSNO), and alginate nanoparticles without/with NO (NP AI-GSH and NP AI- GSNO). For the in vitro experiment, the concentrations of GSNO or GSH in the formulations were 0.125 mM, 0.250 mM, 0.500 mM, 1.0 mM and 2.0 mM. . NP CS-GSNO showed an increase in the germination rate from 60% (control) to 71% at a concentration of 1.0 mM, in root length and in the number of lateral roots. Furthermore, it was the only one to promote greater accumulation of dry root mass. In contrast, NP AI-GSNO was the only one to increase the accumulation of shoot dry mass at this concentration. For AI-GSNO NP, the number of lateral roots was approximately three times higher at the highest concentrations (0.500, 1.0, and 2.0 mM). The free molecule showed positive effects only on the root. NP CS-GSH reduced root and shoot length. In nodulation studies, nodule dry mass was significantly higher for NP CS-GSNO treatments. A reduction in photosynthetic parameters was also observed for NP CS-GSH and GSNO. Therefore, our results highlight the potential of chitosan nanoparticles in improving the application of NO donors in soybean seeds, especially at a concentration of 1.0 mM.

KEYWORD: Seed treatment; Nanocarriers; Nanoparticles; Nodule; S-nitrosoglutathione

3. 1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merr) é uma das principais fontes de óleos e proteínas vegetais para a alimentação humana e animal, desempenhando um papel crucial na economia agrícola mundial (BOEREMA et al., 2016; GABBI et al., 2020). Assim, sementes de alta qualidade, capazes de expressar seu máximo potencial de germinação e vigor, são essenciais para assegurar uma população de plantas saudáveis e produtivas, condição indispensável para alcançar altos rendimentos nas lavouras. A fase de germinação ou emergência das plântulas desempenha um papel crítico no estabelecimento da cultura (STEVEN et al., 2024). Nesse contexto, uma germinação rápida e síncrona é fundamental, pois garante uniformidade no desenvolvimento inicial das plantas, favorecendo a competitividade e a resiliência da lavoura frente a estresses bióticos e abióticos.

Na cultura da soja, o tratamento de sementes é um manejo realizado como forma de proteger a semente no campo e prolongar a sua vida útil (ZHANG et al., 2014; SEABRA et al., 2017; ARIF et al., 2023). Outro aspecto importante relacionado a cultura é a elevada demanda de nitrogênio, que pode ser adquirido da decomposição da matéria orgânica no solo, da aplicação de fertilizantes nitrogenados ou através da fixação biológica do nitrogênio (FBN), por meio da simbiose entre raízes e bactérias (*Bradyrhizobium*) que apresentam o complexo nitrogenase, capaz de fixar o N₂ atmosférico (SOUWARE et al., 2020; BERGER et al., 2020). Essa interação planta-microrganismo é responsável pela formação de estruturas especializadas, denominadas de nódulos, onde ocorre a FBN (LIU et al., 2016; SOUWARE et al., 2020). Assim, a inoculação é uma das principais práticas culturais em sementes de soja, já que se realizada de forma eficiente, possibilita maior FBN, maior disponibilidade de nitrogênio para a cultura e consequentemente potencializa seu rendimento. Nesse contexto, o tratamento de sementes e a inoculação são práticas agrícolas que se complementam.

Além da complexa interação entre plantas e microrganismos para a fixação de nitrogênio, o óxido nítrico (NO) desempenha um papel crucial no desenvolvimento vegetal. O NO é uma molécula gasosa com amplo espectro de funções no crescimento e desenvolvimento de diversos organismos, incluindo as espécies vegetais, além de ser um importante sinalizador em condições de estresse (CALABRESE et al., 2023).

O NO pode atuar na redução dos teores de ABA e na mobilização de reservas durante a germinação, bem como no desenvolvimento de raízes e formação de estruturas especializadas como os nódulos (LOMBARDO et al., 2012; KOLBERT et al., 2019; LEON et al., 20; PANDE et al., 2021; KHAN et al., 2023).

Nos nódulos, o NO participa ativamente de várias etapas como no reconhecimento, na infecção, na organogênese e durante o período de senescência. Em plantas de soja, foi detectada a presença do NO em nódulos funcionais (MEAKIN et al., 2007). Em plantas de soja sob estresse salino, o tratamento com NO protegeu contra os efeitos deletérios da salinidade na biomassa e no número de nódulos. Cam et al. (2012) demonstraram, através de microscopia confocal em *Medicago truncatula*, que o NO está presente em nódulos maduros e que as bactérias respondem ao NO. O NO foi detectado em maior quantidade em nódulos formados pela cepa *hmp* em relação à cepa selvagem de *S. meliloti*, indicando a importância da enzima Hmp na modulação dos níveis de NO em nódulos.

Entretanto, apesar dos benefícios, a aplicação exógena desta molécula requer o uso de doadores, como S-nitrosoglutationa (GSNO), que pode apresentar relativa instabilidade e rápida degradação e liberação do NO dependendo das condições ambientais. Neste sentido, a utilização da nanotecnologia na agricultura tem se mostrado como uma alternativa promissora para o tratamento de sementes, permitindo a liberação gradativa do NO, protegendo o composto contra a degradação e potencializando a entrega e a eficiência de compostos ativos (PEREIRA et al., 2021; SEABRA et al., 2022; KUMARI et al., 2024). Nos últimos anos, vários tipos de nanopartículas foram sintetizados a partir de polímeros para a entrega de vários compostos bioativos, dentre elas as nanopartículas de quitosana (FUKAMACHI et al., 2019; LI et al., 2019; SCHNOOR et al., 2018; SINGH et al., 2022).

O priming de sementes de milho com quitosana convencional sob condições de baixa temperatura demonstrou aumentar o índice de germinação e os parâmetros morfológicos das plântulas (GUAN et al., 2009). Estudos em sementes de trigo mostraram efeito positivo da nanoquitosana na germinação e no crescimento inicial em uma concentração 10 vezes menor em comparação com a quitosana convencional (LI et al., 2019). Em sementes de soja, o tratamento com nanopartículas de quitosana reduziu a taxa de respiração, o conteúdo de etileno e a peroxidação lipídica durante o armazenamento, além de proporcionar aumento no índice de vigor e na taxa de germinação (ARIF et al., 2023). A aplicação exógena de doador de NO

livre e nanoencapsulado melhorou o crescimento e manteve a atividade fotossintética em plantas de soja sob condições de estresse por metais, como o cobre (GOMES et al., 2022).

No geral, os doadores de NO são utilizados para aumentar os níveis de NO endógeno em plantas, mediando respostas fisiológicas e morfológicas, principalmente em condições de estresse. Nesse sentido, a nanoquitosana é uma aliada importante para essas aplicações, considerando a entrega atenuada desse composto bem como proteção contra degradação. Methela et al. (2023) observaram que nanopartículas de quitosana carregadas com GSNO promoveram crescimento positivo em plantas de soja sob estresse hídrico, tratadas por pulverização foliar e solo. A concentração de 50 μM de NP CS-GSNO resultou em plantas com maior comprimento em comparação ao controle e plantas estressadas. Altas concentrações, (75 μM) mostraram efeitos benéficos principalmente nas raízes. Já em plantas não submetidas ao estresse, o vazamento de eletrólitos foi menor nas plantas tratadas com 50 μM de NP CS-GSNO, indicando benefícios na integridade da parede celular. Além disso, houve redução dos parâmetros bioquímicos (MDA), aumento nos parâmetros fotossintéticos, e incremento no número de nódulos.

O tratamento de sementes de soja com NP CS-GSNO mostrou efeito benéfico na germinação e no crescimento de plântulas devido à regulação positiva na expressão de GA e à regulação negativa na expressão de ABA (STEVEN et al., 2024). Souza (2023) mostrou efeitos positivos nos parâmetros morfológicos e bioquímicos de sementes de trigo tratadas com NP CS-GSNO na concentração 500 μM .

Nesse sentido, considerando os benefícios do encapsulamento de doadores de NO, testar novos biopolímeros como o alginato seria importante para comparar os efeitos considerando que as partículas apresentariam cargas opostas, além de compreender como eles atuam em condições ambientalmente favoráveis.

O conhecimento acerca da interação entre plantas e nanopartículas poliméricas ainda é limitado. Os nanomateriais podem apresentar efeitos distintos em plantas, como inibição da germinação, modificações no desenvolvimento das plantas, indução de estresse oxidativo, aprisionamento celular das partículas, e variações na taxa de absorção e transporte, todos relacionados às suas propriedades físico-químicas, como composição, carga superficial, tamanho e estabilidade e concentração (SINGH et al., 2021; SPIELMAN-SUN et al., 2019; YUSEFI-TANHA et al., 2020; VERMA et al., 2021; BAI et al., 2021). Preisler et al. (2022) relataram que

nanopartículas poliméricas com balanço de carga superficial mais positiva acumularam-se principalmente na superfície da semente de *Brassica juncea*, enquanto as com carga mais negativa foram mais absorvidas e consequentemente se acumularam mais interior da semente ao longo do tempo.

Portanto, o objetivo deste avaliar os efeitos do tratamento de sementes de soja com nanopartículas de diferentes composições e cargas contendo GSNO no processo germinativo. Além disso, buscou-se investigar se o tratamento de sementes com as nanopartículas favoreceria a nodulação e o crescimento de plantas de soja.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Preparo das Formulações

3.2.1.1 Nanopartículas de quitosana (NPs CS)

As nanopartículas de quitosana (NPs CS) foram preparadas por gelificação ionotrópica (SILVEIRA et al., 2019; SEABRA et al., 2017). Resumidamente quitosana ($2,6 \text{ mg mL}^{-1}$) e GSH (20 mM) foram misturados através de agitação magnética em solução aquosa de ácido acético (1%) durante 90 min. Tripolifosfato de sódio (TPP) ($0,6 \text{ mg mL}^{-1}$) aquoso foi adicionado em gotas à suspensão quitosana/GSH, obedecendo à proporção volumétrica de 3 CS/GSH:1 TPP. A mistura foi agitada durante 90 minutos à temperatura ambiente, levando à formação de suspensão aquosa de NPs CS contendo GSH (sem NO) na concentração de 20 mM. Para obter nanopartículas de quitosana contendo GSNO, foi realizada a S-nitrosilação adicionando quantidades equimolares de nitrito de sódio (NaNO_2) à suspensão de NPs CS-GSH. A solução final foi homogeneizada e mantida por 60 min protegida da luz, a 5°C (SILVEIRA et al., 2016). Também foram utilizados tratamentos com NPs CS contendo GSH não S-nitrosilada, para se avaliar o efeito da formulação sem o NO.

3.2.1.2 Nanopartículas de alginato (NPs Al)

As nanopartículas de alginato (NPs Al) foram sintetizadas por gelificação ionotrópica com íons de cálcio (Ca^{2+}). Uma solução aquosa (40 mL) de

alginato (0,475 mg/mL) foi preparada e agitada durante 3 h. Al e GSH foram misturados através de agitação magnética por 5 min. Para o preparo da solução de cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Synth), este foi dissolvido em 100 mL de água deionizada, produzindo uma solução de CaCl_2 a 2,25 mmol/L. Em seguida, a quantidade necessária de GSH foi dissolvida juntamente a 6 mL da solução de alginato de sódio a 0,475 mg/L. Utilizando uma bomba peristáltica da Marte (MVA-500), 4,0 mL da solução de CaCl_2 a 2,25 mmol/L foram gotejados na solução inicial a uma taxa de 2 gotas por minuto. Após a adição total, a mistura foi agitada por 1 h levando à formação de NPs Al contendo GSH, obtendo 10 mL de formulação (sem NO) (URZEDO et al., 2020). Para obter as nanopartículas de alginato contendo GSNO, foi realizada a S-nitrosilação adicionando quantidades equimolares de nitrito de sódio (NaNO_2) à suspensão NPs Al contendo GSH. A suspensão final foi agitada por 60 min, a 5 °C, protegida da luz, formando então as NPs Al-GSNO (SEABRA et al., 2017). Também foram utilizados tratamentos com NPs Al contendo GSH não S-nitrosilada, para se avaliar o efeito da formulação sem o NO.

3.2.1.3 S-nitrosoglutationa livre (GSNO)

Para obter o doador S-nitrosoglutationa livre (GSNO), a glutathione reduzida (GSH) foi dissolvida em ácido clorídrico (1 mol/L). Para a S-nitrosilação, uma quantidade equimolar de nitrito de sódio (NaNO_2) foi adicionada à solução de GSH e mantida em banho de gelo por 40 min e agitação magnética. Acetona foi adicionada para precipitação da GSNO. O precipitado de GSNO foi lavado algumas vezes com água fria e o sólido então foi liofilizado por 24 h (PELEGRINO et al., 2021).

3.2.1.4 Caracterização das nanopartículas e ensaio de liberação de NO

Para determinar o tamanho hidrodinâmico das NPs (por intensidade), o índice de polidispersidade (PDI) e o potencial zeta foi utilizada a técnica de espalhamento dinâmico de luz (Nano ZS Zetasizer, Malvern Inst. Ltd, Worcestershire, Reino Unido) (OLIVEIRA et al., 2016; LOPES-OLIVEIRA et al., 2019; SILVEIRA et al., 2019; do CARMO et al., 2021). O perfil de liberação de NO nanoencapsulado (ambas as nanoformulações a 20 mM), foi monitorado por UV através as mudanças espectrais em 545 nm (PEREIRA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016; PELEGRINO et al., 2017).

As medidas de absorvância foram realizadas a cada 30 minutos nas amostras nanoencapsuladas, mantidas à temperatura ambiente (25 ± 1 °C) por 5 horas. As análises foram conduzidas no escuro para minimizar a exposição das formulações à luz. Cada ponto da curva cinética representa a média de dois experimentos independentes, com os dados expressos como a taxa total de NO liberado.

3.2.2 Material Vegetal e Tratamentos

3.2.2.1 Experimento *in vitro*

As sementes de soja (*Glycine max* L. Merr. cv. BRS 257) foram obtidas da Embrapa Soja Londrina. Os tratamentos foram: a) controle (água destilada); b) NPs CS contendo GSNO (NP CS-GSNO); c) NPs AI contendo GSNO (NP AI-GSNO); d) NPs CS-GSH (sem NO); e) NPs AI-GSH (sem NO); f) GSNO na forma livre. As concentrações das formulações foram 0,125 mM, 0,250 mM, 0,500 mM, 1,0 mM e 1,5 mM de GSNO ou GSH.

Para a embebição das sementes, foram realizados testes mantendo-as submersas em água por 1, 5, 10 e 15 min. Com 10 e 15 min de embebição, foram observados danos em mais de 50% das sementes testadas, enquanto com 1 e 5 min não houve diferença no percentual de germinação (resultados não mostrados). Por isso, escolheu-se o tempo de 5 min para o tratamento das sementes.

Foram utilizadas 4 repetições biológicas, cada uma composta por 50 sementes, totalizando 200 sementes. As sementes foram colocadas em béqueres contendo as formulações citadas acima em um volume de 100 mL e mantidas sob agitação por 5 min. Após embebidas, as sementes foram secas em temperatura ambiente e protegidas da luz e em seguida foram distribuídas em papel germitest umedecido com quantidade de água destilada equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco. Os rolos de papel foram mantidos em BOD por 8 dias a 25 °C e fotoperíodo de 12 h (Figura 1 – STEP 1 e 2).

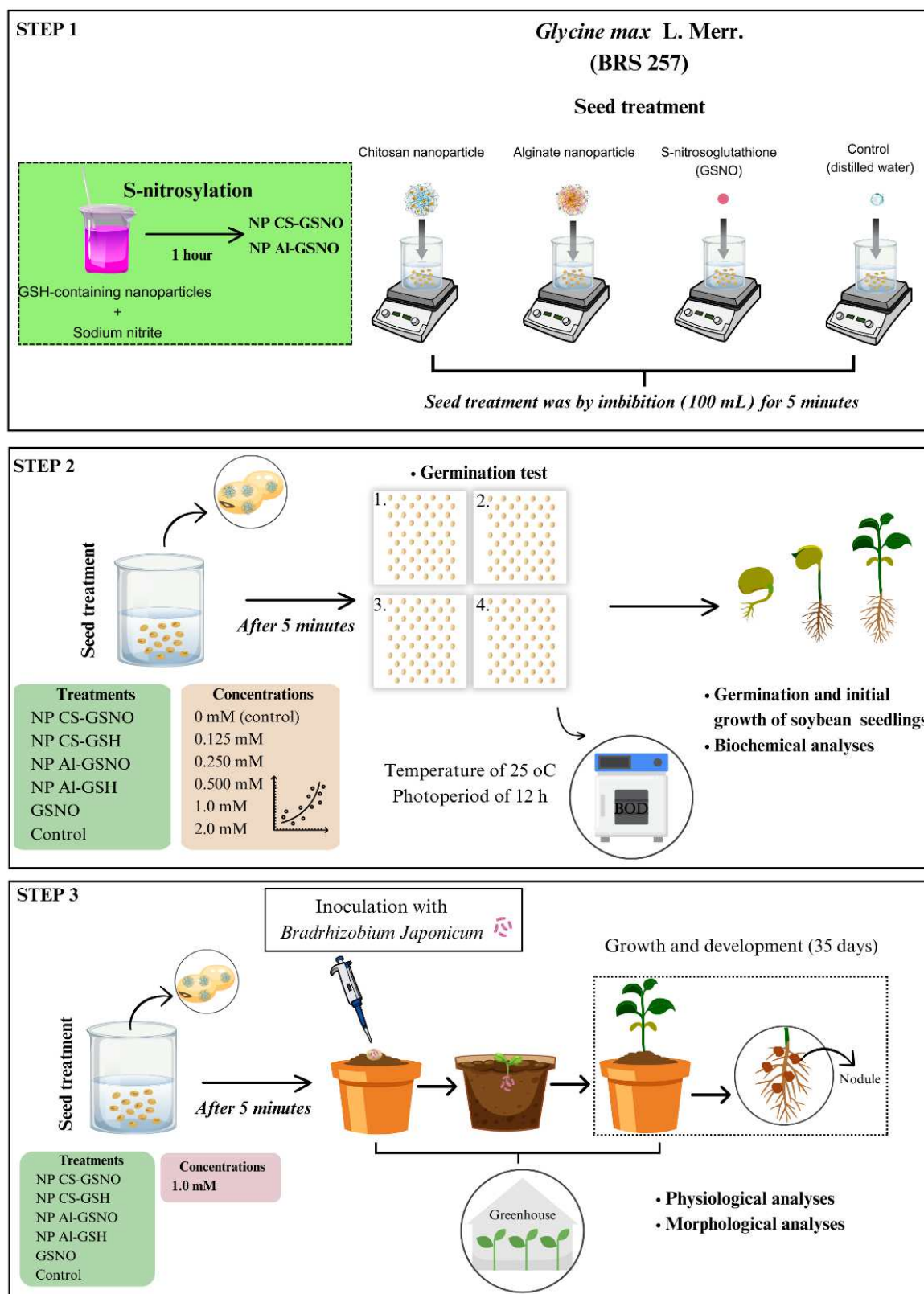


Fig 1. Esquema representativo do tratamento de sementes. O passo 1 refere-se às etapas de nitrosação das nanopartículas com nitrito de sódio e ao tratamento de sementes por imersão. O passo 2 abrange os procedimentos realizados durante os experimentos de germinação e crescimento inicial de plântulas. O passo 3 envolve os procedimentos realizados durante o experimento de nodulação.

3.2.2.1.1 Processo germinativo

A porcentagem de germinação foi realizada ao oitavo dia de semeadura, conforme as descrições contidas nas Regras para Análise de Sementes (MAPA, 2009), utilizando a equação (1).

$$\text{Germinação (\%)} = (N / TS) \times 100 \quad (1)$$

onde N corresponde ao número de sementes germinadas e TS ao total de sementes utilizadas.

A plântula foi considerada normal quando apresentou radícula protuberante com mais de 1 mm de comprimento e desenvolvimento normal do mesocótilo (SINGKAEW et al., 2017). O comprimento da raiz principal, o número de raízes secundárias e a massa seca da parte aérea e das raízes foram avaliados em amostras aleatórias de 10 plântulas por repetição. Para a massa seca, as amostras foram armazenadas em sacos de papel e mantidas a 70 °C em estufa por 72h.

3.2.2.1.2 Absorção de água

Foram utilizadas quatro caixas plásticas do tipo Gerbox (11 × 11 cm) contendo 50 sementes. O papel filtro foi umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco. Imediatamente após o tratamento, as sementes foram cuidadosamente secas e pesadas para obtenção da massa fresca inicial (MFi) antes de serem transferidas para as placas de Petri. Para monitorar a absorção de água, as sementes foram pesadas com 3 h, 6 h, 12 h, 24 h e 48 h. Após a avaliação final, as sementes foram secas em estufa a 70 °C para obtenção da massa seca (MS). O conteúdo de água absorvido para cada ponto de tempo foi calculado usando a Eq. (2) (OLIVEIRA e BOSCO, 2013; PREISLER et al., 2022).

$$\text{Teor de água (\%)} = \left(\frac{MFi - MS}{MFi} \right) \times 100 \quad (2).$$

3.2.2.1.3 Análises bioquímicas

Para as análises bioquímicas, foi selecionada a concentração de 1,0 mM, para todas as formulações com base nos parâmetros avaliados anteriormente. As amostras foram coletadas com 8 dias (100 mg), pesadas, pulverizadas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C. O conteúdo de S-nitrosotiois (RSNO) nas raízes e na parte aérea foram medidos como indicador de biodisponibilidade de NO. As amostras foram misturadas com 1 mL de solução de NEM (5 mmol L⁻¹ preparado em PBS, pH 7,4), sonificados por 10 s (45 kHz) e centrifugados por 5 min a 15 645 × g. Soluções de 0,1 mol L⁻¹ de CuCl₂ foram preparadas e utilizadas para estabilizar o sensor. A coleta de dados foi realizada adicionando 20 µL do extrato da planta, utilizando um analisador de radicais livres WPI TBR4100/1025 (World Precision Instruments Inc., Sarasota FL, EUA) equipado com sensor específico de NO (ISO-NOP 2 mm). Os dados foram comparados com a curva padrão obtida para GSNO. Os foram realizados em três réplicas técnicas para cada amostra (OLIVEIRA et al., 2016 , LOPES-OLIVEIRA et al., 2019 , SILVEIRA et al., 2019).

3.2.2.2 Experimento em casa de vegetação

Para a avaliação de nodulação, foram testadas apenas as nanoformulações (com e sem NO) na concentração de 1,0 mM. Cada tratamento foi composto por 10 repetições. As sementes foram tratadas por 5 min em béqueres contendo 100 mL das formulações e seguindo as mesmas etapas citadas anteriormente (Figura 1 – STEP 1 e 3). Após a embebição, elas foram inoculadas uma a uma com o inoculante comercial a base de *Bradyrhizobium japonicum* (7x10⁹ UFC/mL) seguindo as recomendações técnicas do fabricante.

Foram utilizados vasos plásticos de 1 L (10,5 cm de altura x 14,5 cm de diâmetro superior) contendo aproximadamente 800 g de latossolo vermelho coletado de uma área com atividade agrícola ativa. Por vaso foram semeadas três sementes, mantendo após 14 dias apenas uma planta para avaliação final dos experimentos.

3.2.2.2.1 Análises morfofisiológicas

Após 35 dias de cultivo (estádio V4), foram avaliados os parâmetros fisiológicos e morfológicos das plantas de soja.

A folha mais jovem totalmente expandida de cada planta foi utilizada para análises fisiológicas. Os parâmetros foram medidos em dias ensolarados entre 7h e 11h. A fotossíntese líquida (A), a condutância estomática (g_s) transpiração ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a razão entre as concentrações internas e ambientais de CO_2 (C_i/C_a) foram determinadas com base no analisador de gases infravermelho portátil modelo LICOR 6400 XT (Biosciences, Lincoln NE, EUA), conectada a uma câmara de 6 cm^2 sob radiação fotossinteticamente ativa saturada ($1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), com vazão de 400 mL min^{-1} (do CARMO et al., 2021).

Como parâmetros morfológicos foram analisados o comprimento da parte aérea e da raiz (cm), com uma régua milimetrada; número de nódulos; massa fresca (g) de nódulos; massa seca (g) de parte aérea, raízes e nódulos. Para a determinação da massa seca, o material vegetal foi seco em estufa a 70°C por 72h.

3.2.3 Análises Estatísticas

Os dados foram testados quanto à normalidade (Shapiro Wilk-W) e homogeneidade de variâncias (Bartlett) e submetidos a análise de variância (ANOVA) de uma via em cada tratamento (Tabela S1). Para os ensaios de germinação, quando significativos, os dados foram ajustados considerando modelos de regressão polinomial. Quando o ajuste não foi possível, as médias foram comparado pelo teste de Scott-Knott. Para as análises bioquímicas, quando significativo, os dados foram comparados pelo teste de Scott-Knott. Para o experimento de absorção de água, as equações foram ajustadas para o tempo em cada tratamento por ANOVA de uma via em cada tratamento. Um nível de significância de 0,05 foi considerado para todas as análises.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Caracterização de NP e Cinética de Liberação de NO

NPs de quitosana (NPs CS) apresentaram tamanho $112,3 \text{ nm}$, PDI de $0,257$ e potencial zeta de $20,2 \text{ mV}$. NPs de alginato (NPs AI) apresentaram tamanho de $228,4 \text{ nm}$, PDI de $0,3$ e potencial zeta de $-15,3 \text{ mV}$. Estas caracterizações indicaram tamanho pequeno, distribuição de tamanho monodisperso, boa estabilidade

coloidal e alta eficiência de encapsulamento, respectivamente.

A figura 2 mostra o perfil de liberação de NO pelas nanopartículas de quitosana (NPs CS) e alginato (NPs Al) ao longo do tempo. Inicialmente, ambas as nanopartículas apresentam uma liberação baixa e similar nos primeiros 50 minutos. À medida que o tempo avança, observa-se um aumento gradual na porcentagem de liberação para ambas as NPs. No entanto, a liberação das NPs CS mostrou liberação mais acentuada, atingindo cerca de 14% após 300 minutos. Por outro lado, as NPs Alg apresentaram menor taxa de liberação, atingindo aproximadamente 8% no mesmo período.

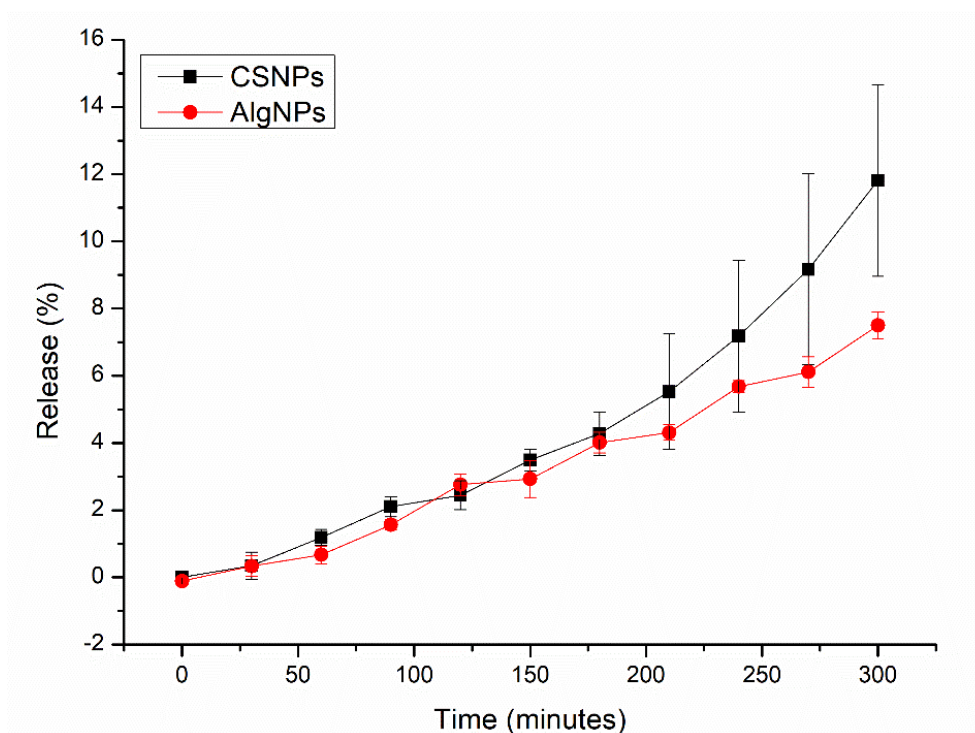


Fig 2. Curvas cinéticas de liberação de NO a partir de nanopartículas de quitosana e alginato carregadas com S-nitrosoglutationa (NP CS-GSNO e NP Al-GSNO).

3.3.2 Experimento *In Vitro*

3.3.2.1 Processo germinativo

As informações suplementares, quanto as análises estatísticas estão apresentadas na Tabela S1). A anova não foi significativa para NP Al-GSNO. As demais formulações apresentaram efeitos significativos. Para a porcentagem de germinação, as curvas de regressão foram ajustadas para os tratamentos NP CS-

GSNO, NP CS-GSH e GSNO (Figura 3). NP CS-GSNO demonstrou efeitos positivos quando comparada ao controle na concentração de 1,0 mM, aumentando a taxa de germinação para 71% contra 60% da porcentagem inicial. Efeitos similares foram observados para as demais concentrações. Na concentração de 0,125 mM e 0,250 mM, NP CS-GSH apresentaram menor germinação em relação ao controle, reduzindo a taxa em 49 e 41% respectivamente. A concentração de 2,0 mM reduziu a germinação em relação ao controle para as formulações NP CS-GSH e GSNO livre. Para a formulação NP AI-GSH os dados foram comparados pelo teste de Scott-Knott (Figura 3D), já que não houve ajuste da curva de regressão. Aqui as melhores concentrações foram 0,125, 1,0 e 2,0 mM, com um aumento de 16%, 11% e 14% em relação ao controle, e diferentemente das nanopartículas de quitosana, a menor concentração não reduziu a taxa de germinação.

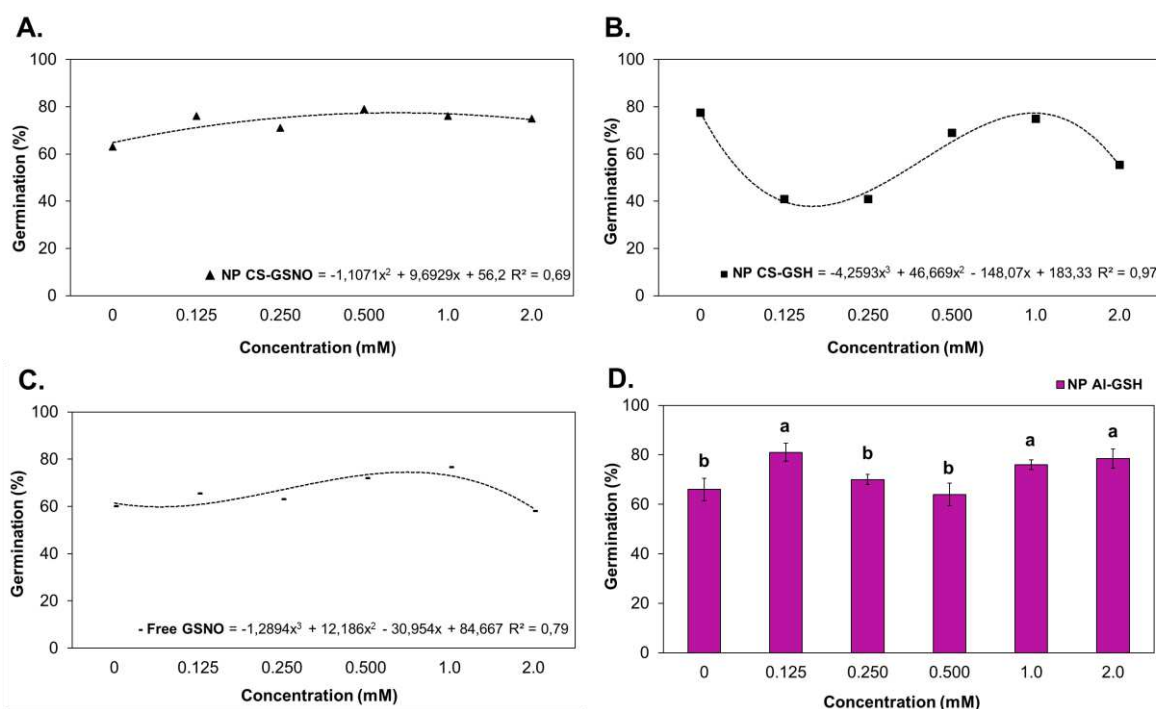


Fig 3. Efeitos do tratamento de sementes com nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSNO e NP CS-GSH), nanopartículas de alginato com e sem NO (NP AI-GSNO e NP AI-GSH), e GSNO livre sobre a porcentagem de germinação de sementes de *Glycine max* L. Merr. O controle foi estipulado como a concentração zero (água destilada). Os valores representam as médias ($n = 4$). (A-C). As curvas de regressão foram ajustadas para as concentrações dentro de cada formulação ($p < 0,05$) sendo elas: NP CS-GSNO, NP CS-GSH e Free GSNO respectivamente. (D) Letras diferentes acima das barras indicam médias diferentes com base na ANOVA seguida pelo teste Scott Knott para o tratamento NP AI-GSH ($p < 0,05$).

Para o comprimento de raiz (CR), as curvas de regressão foram ajustadas para os tratamentos com NP CS-GSNO, NP CS-GSH, NP AI-GSH e GSNO livre (Figura 4). A anova não foi significativa para NP AI-GSNO (Tabela S1). NP CS-

GSH foi o único tratamento que afetou negativamente esse parâmetro em comparação com o controle. Nas concentrações de 0,125, 0,250 e 0,500 mM, a formulação NP Al-GSH reduziu o CR. Entretanto NP CS-GSNO e GSNO livre aumentaram o CR. O maior CR para NP CS-GSNO foi com 1,0 mM enquanto para GSNO foi com 0,500 mM.

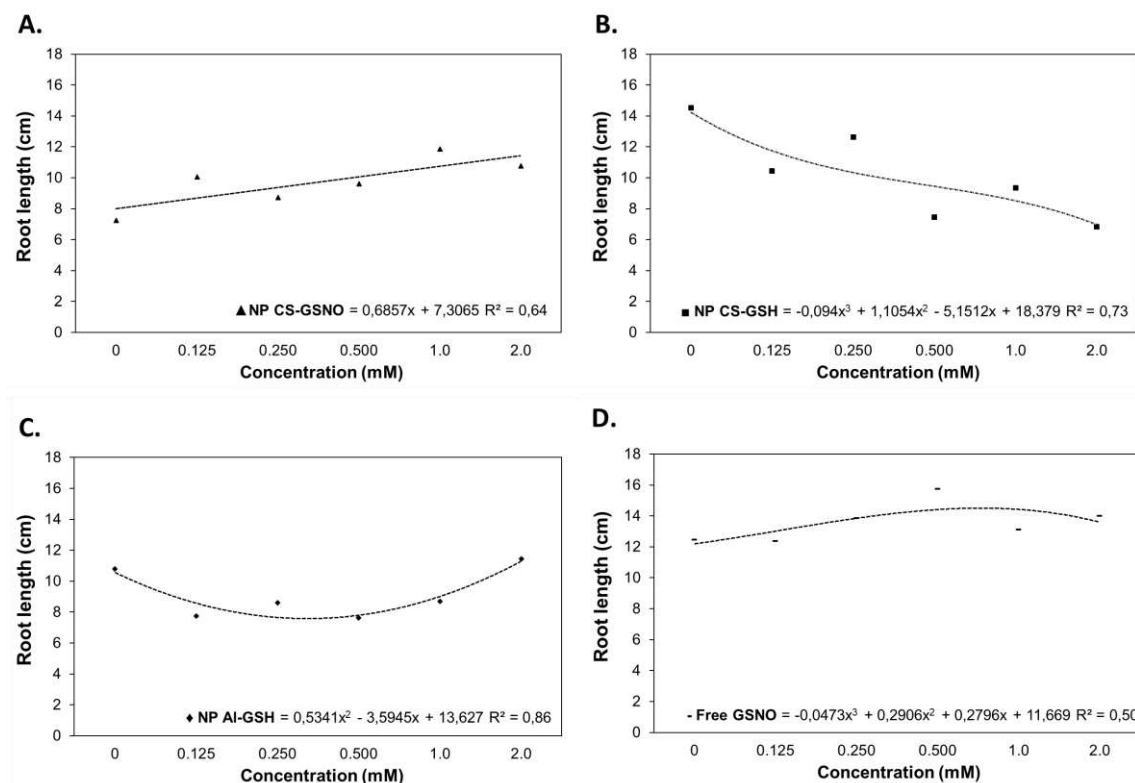


Fig 4. Efeito do tratamento de sementes com nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSNO e NP CS-GSH), nanopartículas de alginato com e sem GSNO (NP Al-GSNO e NP Al), e Free GSNO no comprimento de raiz de plantas de *Glycine max* L. Merr. O controle foi estipulado como a concentração zero (água destilada). Os valores representam as médias (n = 4). As curvas de regressão foram ajustadas para as concentrações dentro de cada formulação (p < 0,05).

Já no comprimento de parte aérea (CPA), as curvas de regressão foram ajustadas para os tratamentos com NP CS-GSNO, NP CS-GSH e NP Al-GSH (Figura 5). A anova não foi significativa para NP Al-GSNO e GSNO (Tabela S1). NP CS-GSH e NP Al-GSH afetaram negativamente esse parâmetro em comparação com o controle, sendo possível observar respectivamente uma redução de aproximadamente 54% na concentração de 2,0 mM e 28% para as concentrações intermediárias de 0,250 mM e 0,500 mM. Em contrapartida, as sementes tratadas com NP CS-GSNO mostraram aumento gradativo no CPA, com maior crescimento na concentração de 1,0 mM. GSNO mostrou um efeito positivo para a raiz, mas não para

a parte aérea.

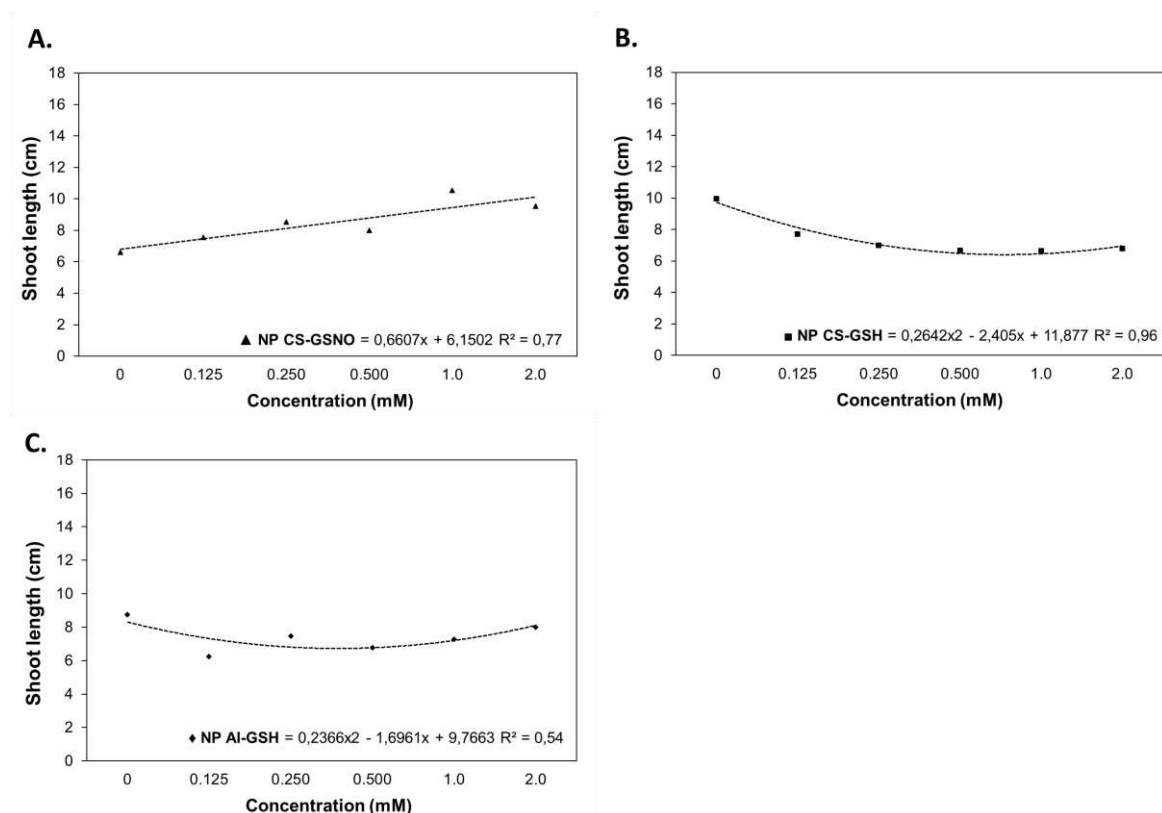


Fig 5. Efeito do tratamento de sementes com nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSNO e NP CS-GSH), nanopartículas de alginato com e sem GSNO (NP Al-GSNO e NP Al), e Free GSNO no comprimento da parte aérea de plantas de *Glycine max* L. Merr. O controle foi estipulado como a concentração zero (água destilada). Os valores representam as médias ($n = 4$). As curvas de regressão foram ajustadas para as concentrações dentro de cada formulação ($p < 0,05$).

Para o número de raízes secundárias (NRS), as curvas de regressão foram ajustadas para os tratamentos com NP CS-GSNO, NP Al-GSNO, NP CS e GSNO (Figura 6). A anova não foi significativa para NP Al-GSH (Tabela S1). Semelhante ao CR, NP CS-GSH foi o único tratamento que reduziu esse parâmetro em comparação com o controle. A melhor concentração para NP CS-GSNO foi de 2,0 mM enquanto para NP Al-GSNO foi de 0,250 mM, permanecendo com valores similares nas demais concentrações. De maneira geral, NP Al-GSNO foi aproximadamente três vezes maior nas concentrações mais altas. GSNO demonstrou comportamento semelhante a NP Al-GSNO, porém na maior concentração foi possível visualizar uma ligeira queda, reduzindo o NRS em aproximadamente 17%.

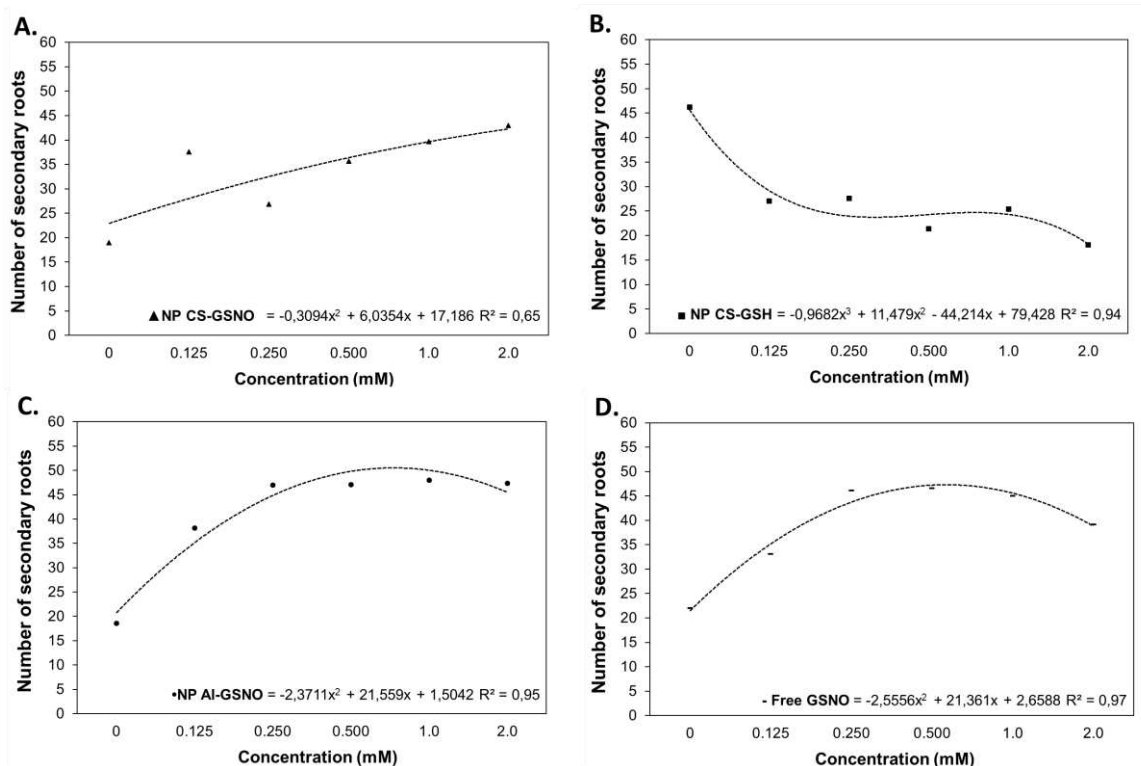


Fig 6. Efeito do tratamento de sementes com nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSNO e NP CS-GSH), nanopartículas de alginato com e sem GSNO (NP Al-GSNO e NP Al), e Free GSNO no número de raízes laterais de plantas de *Glycine max* L. Merr. O controle foi estipulado como a concentração zero (água destilada). Os valores representam as médias ($n = 4$). As curvas de regressão foram ajustadas para as concentrações dentro de cada formulação ($p < 0,05$).

Para a massa seca de raiz (MSR), as curvas de regressão foram ajustadas apenas para a formulação NP CS-GSNO (Figura 7A). A anova não foi significativa para as demais formulações (Tabela S1). Foi possível observar um aumento considerável para MSR nas maiores concentrações. Já para massa seca da parte aérea (MSPA), o ajuste de regressão foi possível para NP Al-GSNO (Figura 7B). A anova não foi significativa para as demais formulações (Tabela S1). Aqui, foi possível observar um aumento aproximado de 37% na concentração de 1,0 mM em relação ao controle.

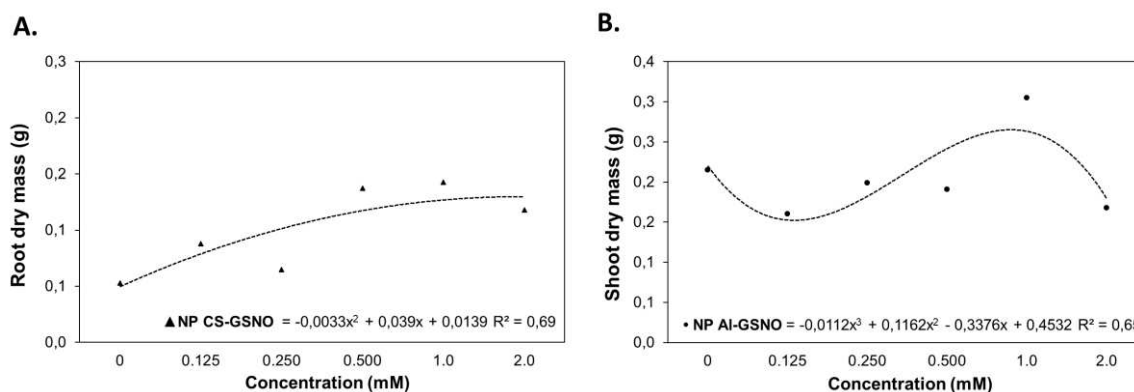


Fig 7. Efeito do tratamento de sementes com nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSNO e NP CS-GSH), nanopartículas de alginato com e sem NO (NP Al-GSNO e NP Al-GSH), e GSNO na (A) massa seca de raiz e (B) massa seca da parte aérea de plantas de *Glycine max* L. Merr. O controle foi estipulado como a concentração zero (água destilada). Os valores representam as médias ($n = 4$). As curvas de regressão foram ajustadas para as concentrações dentro de cada formulação ($p < 0,05$).

Com base nos resultados obtidos nos experimentos de germinação e morfologia, definimos a concentração de 1,0 mM como a dose ideal para os experimentos subsequentes. Esta decisão foi baseada na observação de que 1,0 mM proporcionou os resultados mais consistentes para os parâmetros avaliados, indicando um efeito benéfico e uma resposta otimizada aos tratamentos.

O teor de água inicial da semente era de aproximadamente 6% (valores obtidos por um analisador de umidade e impurezas G650i). Imediatamente após os tratamentos (tempo 0), o teor de água da semente passou a 18%, 17%, 16%, 22%, 18% e 19% para water (controle embebido em água destilada), NP CS-GSNO, NP CS-GSH, NP Al-GSNO, NP Al-GSH e GSNO livre, respectivamente (Figura 8). A absorção demonstrou um aumento rápido inicial seguido por uma estabilização gradativa independentemente do tratamento. Entretanto, ao comparar as partículas com NO, o teor de água absorvido foi maior para NP Al-GSNO em quase todos os intervalos avaliados (primeiras 24 h), o que pode indicar uma melhor capacidade de absorção após o tratamento ou uma maior eficiência na reativação metabólica inicial. Contudo, o maior teor de água (48%) foi para as sementes embebidas apenas em água. Ao final das 48 h, as demais formulações apresentaram teor de água de aproximadamente 44%.

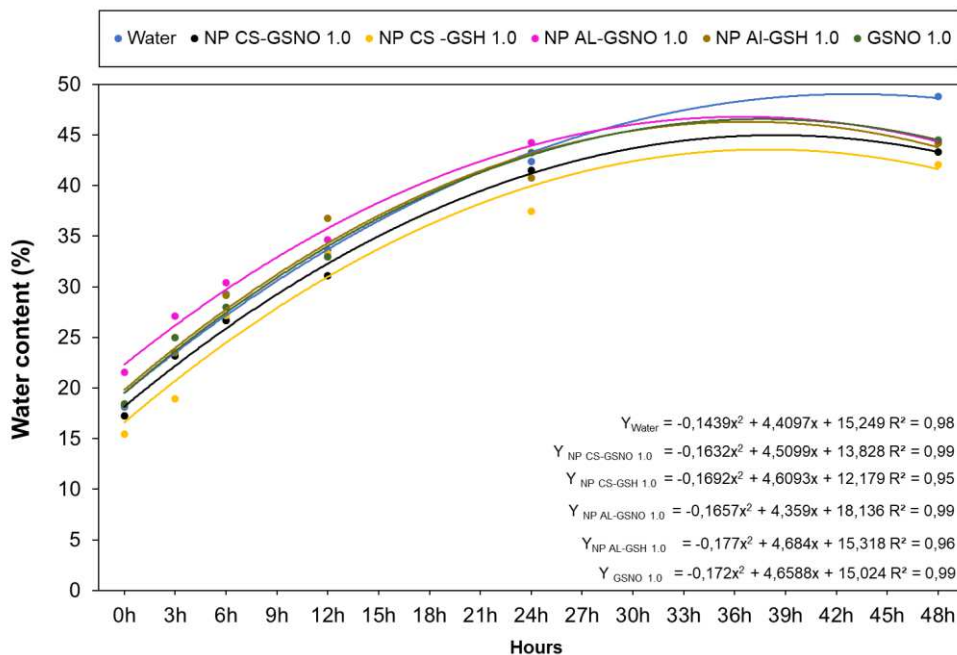


Fig 8. Teor de água (%) em sementes de *Glycine max* L. Merr. em intervalos de tempo crescentes após o tratamento com nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSNO e NP CS-GSH), nanopartículas de alginato com e sem NO (NP AI-GSNO e NP AI-GSH), GSNO livre e com água (water) na concentração de 1,0 mM. Os valores representam as médias (n = 4). As curvas de regressão foram ajustadas para o tempo dentro de cada tratamento (p < 0,05).

3.3.2.2 Análises bioquímicas

Na parte aérea, observou-se uma redução significativa no conteúdo de RSNO em plantas tratadas com NP CS-GSH e NP AI-GSH. Especificamente, NP CS-GSH apresentou uma redução de aproximadamente 81% em comparação com o controle, enquanto NP AI-GSH mostrou uma redução de cerca de 50%. As plantas tratadas com NP CS-GSNO, NP AI-GSNO e GSNO livre apresentaram níveis de RSNO semelhantes ao controle (Fig 9 A).

Nas raízes, os níveis mais altos de RSNO foram encontrados em plantas tratadas com NP CS-GSNO, NP AI-GSNO e NP AI-GSH. Esses tratamentos resultaram em um aumento de RSNO cerca de 4 vezes maior em comparação com o controle. Plantas tratadas com NP CS-GSH apresentaram níveis de RSNO semelhantes aos tratados com GSNO livre, porém significativamente maiores que o controle (Fig 9 B).

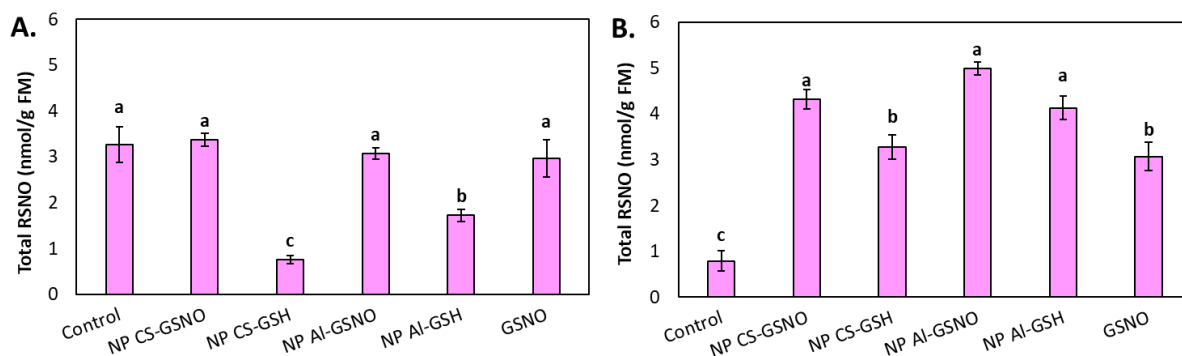


Fig 9. Efeito do tratamento de sementes com nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSNO e NP CS-GSH), nanopartículas de alginato com e sem NO (NP AI-GSNO e NP AI-GSH), Free GSNO e água destilada (controle) no conteúdo de S-nitrosotiois (RSNO) da (A) parte aérea e (B) das raízes em plântulas de *Glycine max* L. Merr. coletadas após 8 dias. Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão ($n = 4$). Letras diferentes acima das barras indicam médias diferentes com base na ANOVA seguida pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

3.3.3 Experimento em Casa de Vegetação

3.3.3.1 Análises morfofisiológicas

A condutância estomática (g_s) foi 2 vezes menor nos tratamentos NP CS-GSH e GSNO livre em comparação ao controle e as demais formulações (Figura 10). Resultados semelhantes foram observados para taxa de transpiração e da concentração interna de CO_2 (C_i/C_a). Todos esses efeitos combinados levaram a um decréscimo acentuado na taxa de fotossíntese líquida (A), sugerindo um possível efeito fitotóxico dos tratamentos sobre o processo fotossintético.

No entanto, os tratamentos NP CS-GSNO, NP AI-GSNO e NP AI-GSH mantiveram taxas de fotossíntese semelhantes ao controle, indicando que esses tratamentos não prejudicam a capacidade fotossintética das plantas.

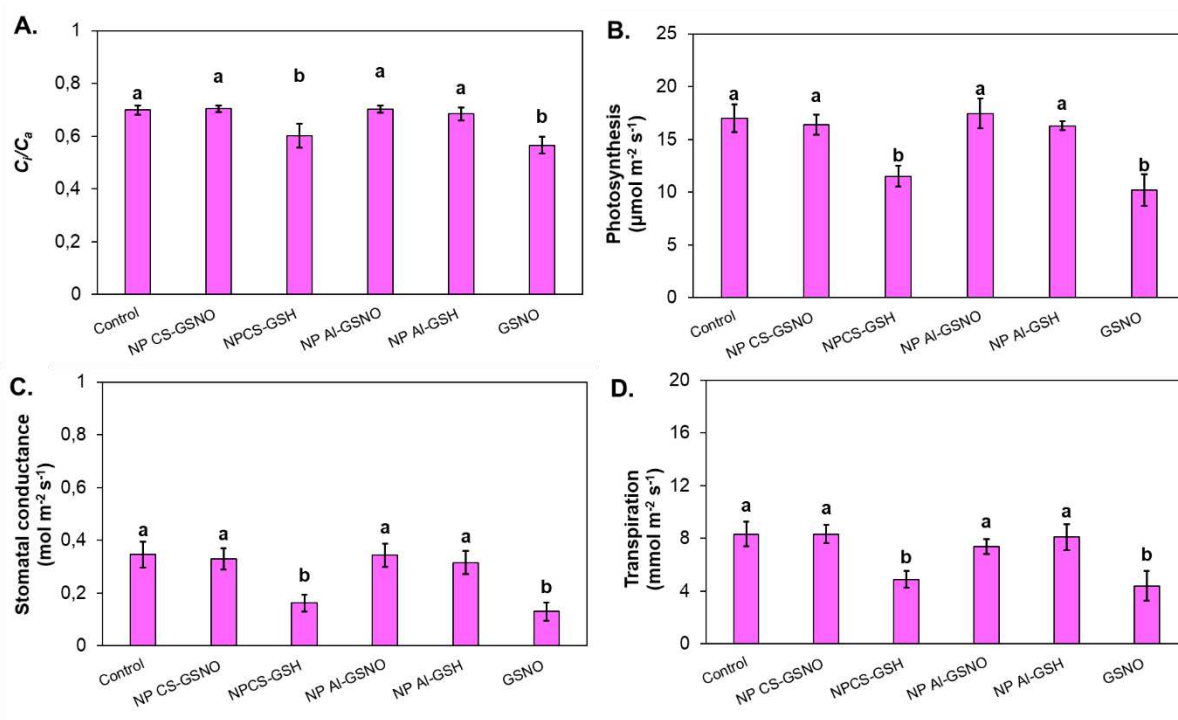


Fig 10. Efeito do tratamento de sementes com nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSNO e NP CS-GSH), nanopartículas de alginato com e sem NO (NP AI-GSNO e NP AI-GSH), GSNO livre e água (controle) na fotossíntese líquida (A, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), transpiração ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e, relação entre concentrações de CO_2 interna/ambiente (C_i/C_a) medidas em plantas de *Glycine max* L. Merr. com 35 dias de crescimento em casa de vegetação (estádio V3-V4). Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão ($n = 6$). Letras diferentes na coluna indicam médias diferentes com base na ANOVA seguida pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Os valores referentes a ANOVA estão apresentados na Tabela Suplementar 1. Na concentração de 1,0 mM (Figura 11), houve efeitos significativos dos tratamentos na massa seca de raiz e massa seca de nódulos. Os maiores valores de massa seca de raiz foram observados para os tratamentos NP CS-GSNO, NP AI-GSNO, NP AI sem NO e GSNO livre. Por outro lado, NP CS sem NO (não nitrosado) foi semelhante ao tratamento controle e significativamente menor quando comparado aos demais tratamentos. A massa seca do nódulo foi significativamente maior para o tratamento NP CS-GSNO, quando comparado aos demais tratamentos.

Os parâmetros de massa fresca (parte aérea, raiz e nódulos), número total de nódulos, comprimento de parte aérea e raiz e massa seca de parte aérea não diferiram significativamente entre os tratamentos (Fig 11 A-F).

Apesar de não quantitativo, foi possível observar de forma qualitativa maior intensidade da coloração interna dos nódulos, que expressa sua atividade, e maior diâmetro dos nódulos.

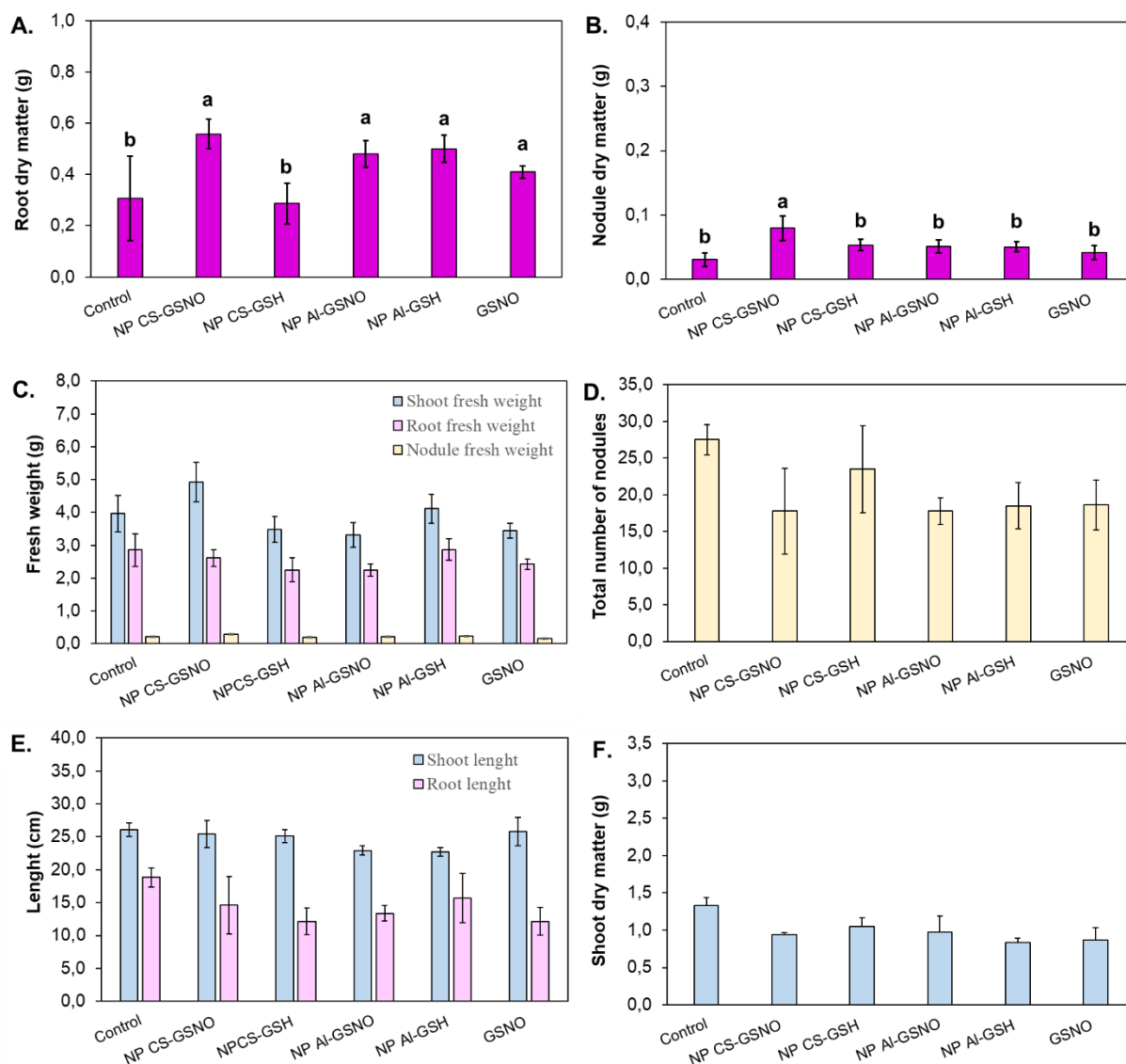


Fig 11. Efeito do tratamento de sementes com nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSNO e NP CS-GSH), nanopartículas de alginato com e sem NO (NP AI-GSNO e NP AI-GSH), e GSNO na (A) massa seca de raiz, (B) massa seca dos nódulos, (C) massa fresca, (D) número total de nódulos, (E) comprimento de parte aérea e raiz e (F) massa seca de parte aérea de plantas de *Glycine max* L. Merr cultivadas em casa de vegetação. O controle foi estipulado como água. Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão ($n = 5$). Letras diferentes acima das barras indicam médias diferentes com base na ANOVA seguida pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

3.4 DISCUSSÃO

Assim como vimos aqui, na literatura diversos estudos vêm demonstrando que nanoencapsulamento de doadores de óxido nítrico (NO), representa uma estratégia promissora para a aplicação exógena em plantas, especialmente considerando a baixa estabilidade KOLBERT et al., 2021). Além de possibilitar proteção para as moléculas, a nanoencapsulação proporciona uma

distribuição mais uniforme e direcionada do ativo em plantas, como por exemplo o NO, aumentando a eficácia das suas funções fisiológicas e bioquímicas, como a promoção do crescimento, desenvolvimento e na modulação de respostas a espécies reativas de oxigênio (OLIVEIRA et al., 2016; SILVEIRA et al., 2019; ZHAO et al., 2020; SINGH et al., 2022).

Contudo, as nanopartículas podem eventualmente exercer efeitos distintos após a sua aplicação, que dependem das propriedades físico-químicas das partículas (tais como tamanho, concentração do ativo nanoencapsulado, composição química e carga superficial), além da influência das espécies vegetais (ZHANG et al., 2021; SINGH et al., 2021; ZHANG et al., 2022; PARKINSON et al., 2022; KHAN et al., 2023).

Aqui, nós observamos que NP CS-GSNO e NP CS-GSH (sem NO) mostraram um efeito positivo na germinação em concentrações moderadas (0,500 mM e 1,0 mM), mas redução em concentrações mais altas (2,0 mM). NP CS-GSNO mostrou um aumento na taxa de germinação para 71% contra 60% da porcentagem inicial (1,0 mM). Entretanto, não houve efeitos negativos para NP AI-GSH na concentração mais alta, pelo contrário, a maior taxa de germinação foi observada nessa concentração (Fig 3). Isto demonstra que a maior concentração da suspensão nem sempre causa efeitos prejudiciais às plantas. Isso porque as nanopartículas de quitosana (NPs CS) possuem carga positiva, enquanto as de alginato (NPs AI) possuem carga negativa. Esta diferença de composição e carga superficial pode influenciar a interação das nanopartículas com as sementes.

As nanopartículas de carga positiva podem aderir mais facilmente ao tegumento das sementes, potencialmente causando uma maior precipitação e dificultando sua internalização em altas concentrações. Isso por sua vez, pode resultar em uma entrega mais gradativa do composto nanoencapsulado ao longo do tempo, podendo ser benéfica em concentrações moderadas, mas em concentrações muito altas, a agregação e precipitação das nanopartículas podem reduzir a eficiência do composto (NO). Essa tendência de liberação das NPs CS é mostrada no perfil de liberação na figura 2. Em contraste, as nanopartículas de carga negativa tendem a ser menos propensas a precipitar, o que pode favorecer uma maior internalização pelas células e um efeito mais imediato na germinação, mesmo em concentrações mais elevadas (RICO et al., 2017, BAI et al., 2021; PREISLER et al., 2022; ZHANG et al., 2023). Assim, a seleção da nanopartícula deve ser realizada pelo efeito desejado, seja

ele melhorar a biodisponibilidade, prolongar a liberação controlada, ou garantir a estabilidade do composto nanoencapsulado durante o armazenamento e aplicação. Essa abordagem, assegura que as propriedades da nanopartícula sejam otimizadas para atender às necessidades específicas em cada aplicação.

Diversos estudos na literatura vêm demonstrando que a absorção tende a ser favorecida por nanopartículas com carga negativa, enquanto partículas com carga positiva tendem a aderir mais a superfície de raiz, de folha, no tegumento de sementes ou a ficarem mais aprisionadas, reduzindo consequentemente o transporte para outras regiões da planta (NGUYEN ET AL., 2016; BOMBO et al., 2019; PREISLER et al., 2022; CARVALHO et al., 2023). Além disso, a exposição às nanopartículas também pode aumentar a absorção de água pelas sementes, culminando então no aumento da sua área de superfície e como consequência a possibilidade de maior penetração de NPs.

O gráfico de conteúdo de água apresentado aqui (Fig 8) fornece evidências adicionais de que as NP Al-GSNO e NP Al-GSH (carga negativa) são mais eficazes em promover a absorção de água pelas sementes, principalmente nas primeiras 24 horas, o que pode aumentar a área de superfície e favorecer a penetração das NPs. Em contraste, as NP CS-GSNO e NP CS-GSH (carga positiva) mostram uma absorção de água mais lenta e menor comparada às nanopartículas de alginato, possivelmente devido à maior adesão ao tegumento das sementes, limitando sua eficácia em altas concentrações. Já as sementes tratadas com GSNO livre e água destilada apresentam um comportamento intermediário. Esses resultados corroboram a discussão anterior sobre os efeitos das nanopartículas na germinação e no crescimento inicial das sementes de soja.

No entanto, sementes de soja são disponibilizadas comercialmente com um baixo teor de água, essencial para preservar sua integridade durante o armazenamento, transporte e manejo. Quando expostas a condições de umidade elevada, como excesso de água durante o tratamento ou períodos de chuvas intensas após a semeadura pode ocorrer problemas relacionados ao dano por embebição, podendo causar excessivo aumento de volume, levando a ruptura do tegumento ou até mesmo apodrecimento das sementes, o que compromete significativamente viabilidade e a capacidade de germinação (PARRISH e LEOPOLD et al., 1977; SATO et al., 2019). Nesse sentido, o tratamento de sementes com NPs que auxiliam em uma rápida absorção podem resultar em efeitos deletérios a médio e longo prazo.

O tratamento NP CS-GSNO, de forma geral, foi a única formulação que promoveu crescimento das plantas de soja (CR, CPA, NRL), além de ser a única a promover maior acúmulo de MSR, mantendo sempre um efeito constante para a concentração de 1,0 mM. As demais formulações apresentaram comportamento variável entre as concentrações a depender dos parâmetros analisados. Ainda quanto à arquitetura das raízes, é importante ressaltar que semelhante ao CR, NP CS-GSH foi o único tratamento que reduziu o NRL em comparação ao controle, permitindo inferir que os efeitos benéficos das NP CS-GSNO estão associados à molécula de NO e não a outros componentes das nanopartículas.

O óxido nítrico (NO) desempenha um papel crucial na germinação das sementes, integrando múltiplas vias de sinais, podendo interagir com íons de cálcio (Ca^{2+}), glutathione (GSH), espécies reativas de oxigênio (EROs) e hormônios vegetais. Essas interações são fundamentais para regular alguns dos processos fisiológicos durante a germinação. Por exemplo, o NO regula a homeostase de Ca^{2+} , fundamental para a sinalização celular e ativação enzimática durante a germinação. Ao interagir com GSH, o NO participa na mitigação do estresse oxidativo, protegendo as sementes contra danos nessa fase. Além disso, o NO regula os níveis de EROs, que funcionam como sinalizadores em concentrações controladas, mas que em altas índices pode causar danos celulares (SELIGMAN, et al., 2008; FARNESE et al., 2016; KOLBERT et al., 2019; LEON et al., 2020; ZHANG et al., 2023). A integração do NO com hormônios vegetais como ácido abscísico (ABA) e giberelina (GA) é também crucial, uma vez que esses hormônios têm funções opostas na germinação: enquanto o ABA tende a inibir a germinação, a GA a promove (YAN e CHEN, 2020). Assim, o NO auxilia na modulação desses hormônios, criando um ambiente celular propício para a ativação metabólica e o desenvolvimento inicial das plântulas.

Steven et al. (2024) observaram que os tratamentos de sementes com NP CS-GSNO aumentaram a taxa de germinação de sementes de soja em 20,3%, 12,8% e 7,7% após 3, 4 e 5 horas de exposição, respectivamente, em comparação com o tratamento controle. Aqui observamos efeitos similares no aumento da germinação em todas as concentrações para NP CS-GSNO. Os autores observaram um aumento dos níveis de ácido giberélico e redução no teor de ABA. Essas mudanças hormonais podem ajudar a explicar como o NO é capaz de modular o processo germinativo, favorecendo um ambiente interno nas sementes, tornando mais propício para o início da germinação.

Souza (2023) mostrou os efeitos positivos do tratamento de sementes de trigo com NP CS-GSNO 500 μ M na CPA, CR, MSPA e MSR das plântulas. Sob estresse hídrico, o tratamento de sementes com NP CS-GSNO levou a incrementos no comprimento de plântula em relação ao controle além de proporcionar aumento na taxa de germinação e na porcentagem de pelos absorventes.

Aqui nos observamos maior número de raízes laterais para NP CS-GSNO, NP AI-GSNO e GSNO, refletindo o papel crucial do NO na regulação da arquitetura da raiz. O NO modula a sinalização dos hormônios envolvidos no crescimento e desenvolvimento da raiz, podendo promover aumento do comprimento da raiz principal e formação de raízes laterais e pelos radiculares, além do envolvimento em praticamente todas as etapas no processo de simbiose leguminosa-rizóbio (LOMBARDO e LAMATTINA, 2018; BERGER et al., 2020; PANDE et al., 2021; ALTAMURA et al., 2023; KHATOR et al., 2024).

Nossos estudos mostraram, ainda, o conteúdo de RSNO na parte aérea e nas raízes como indicador de biodisponibilidade de NO. O estudo mostrou que nanopartículas contendo apenas GSH (ou seja, sem NO) encapsulado reduziram significativamente os níveis de RSNO, enquanto tratamentos com nanopartículas contendo NO e GSNO livre mantiveram níveis de RSNO semelhantes ao controle na parte aérea das plantas. Essa redução acentuada nos níveis de RSNO indica que essas nanopartículas estão reduzindo a biodisponibilidade de NO, possivelmente através da ação da GSH encapsulado. A glutatona pode estar interagindo com NO endógeno ou com os próprios RSNOs, reduzindo-os e, conseqüentemente, diminuindo os níveis de NO disponível. Essa diminuição pode ter efeitos significativos em processos como sinalização celular, e no crescimento, o que poderia ajudar a explicar os efeitos negativos desse tratamento no CR e NRL. Entretanto, nas raízes os níveis mais altos de RSNO foram encontrados em plantas tratadas com NP CS-GSNO, NP AI-GSNO e NP AI-GSH. Esses tratamentos resultaram em um aumento de RSNO cerca de 4 vezes maior em comparação com o controle. Além disso, aqui os tratamentos com NP CS-GSH apresentaram níveis de RSNO semelhantes aos tratados com GSNO livre, porém significativamente maiores que o controle (Fig 9 B). Em suma, o aumento de RSNO nas raízes indica uma maior disponibilidade de NO, o que é crucial para a regulação de uma ampla gama de processos biológicos que acontecem nessa estrutura.

Souza et al. (2023) mostraram em plântulas de trigo sobre estresse

hídrico, que o tratamento de sementes levou ao aumento no conteúdo de RSNO Oliveira et al. (2016), no qual os tratamentos de plantas de milho submetidas a estresse salino, mostraram que as com NPs CS contendo o doador S-nitroso-MSA resultaram em um maior teor de RSNO nas folhas em comparação com o doador livre.

Os resultados apresentados aqui e os trabalhos discutidos aqui sugerem que as nanopartículas contendo doador de NO são eficazes promover a germinação de sementes, bem como atuar de forma positiva nos parâmetros biométricos de diversas espécies vegetais, além de aumentar os níveis de RSNO, destacando seu potencial na agricultura.

Diante desses efeitos benéficos durante o processo germinativo, nossos estudos avaliaram a eficiência do tratamento em casa de vegetação e qual o impacto nos parâmetros fisiológicos e morfológicos das plantas e na nodulação das raízes de soja. Na literatura há relatos que nas primeiras horas da interação leguminosa-rizóbio, há um aumento na produção de NO nas zonas de ramificação das raízes. Além disso, o NO pode ser detectado durante o início da formação de órgãos, na fase madura e durante a senescência dos nódulos, indicando que o NO desempenha um papel tanto na sinalização quanto nas funções metabólicas do processo simbiótico (BERGER et al., 2019; SIGNORELLI et al., 2020).

Em relação aos parâmetros fisiológicos, nossos resultados mostram que a condutância estomática foi 2 vezes menor nos tratamentos NP CS-GSH e GSNO livre em comparação ao controle e as demais formulações contendo NO. Resultados semelhantes foram observados para taxa de transpiração e da concentração interna de CO₂. e na taxa de fotossíntese líquida. Os tratamentos NP CS-GSNO, NP Al-GSNO e NP Al-GSH mantiveram taxas de fotossíntese semelhantes ao controle, indicando que esses tratamentos não prejudicam a capacidade fotossintética das plantas. Além disso, o efeito protetor do NO na fotossíntese pode estar associado à manutenção dos níveis de g_s e CO₂ nas folhas induzida pelo GSNO. Estudos anteriores relataram que a aplicação de NO na escala de mM é importante para manutenção estomática (WANG et al., 2016; SILVEIRA et al., 2016; DE SOUSA et al., 2020).

O efeito das NP CS-GSH e do GSNO livre na fotossíntese aqui observado mostram um possível efeito negativo a longo prazo. Isso pode ocorrer em função de uma alta disponibilidade de forma rápida pensando na aplicação do doador na forma livre e de um possível efeito negativo da partícula contendo apenas GSH na

biodisponibilidade de NO.

Já em relação aos parâmetros biométricos, houve efeitos significativos dos tratamentos na MSR e MSN. Os maiores valores de MSR foram observados para os tratamentos NP CS-GSNO, NP AI-GSNO, NP AI sem NO e GSNO livre. Por outro lado, NP CS sem NO (não nitrosado) não diferiu do controle e foi significativamente menor quando comparado as demais formulações. Já a MSN foi significativamente maior para o tratamento NP CS-GSNO, quando comparado aos demais tratamentos. De acordo com esse resultado, a aplicação das diferentes nanoformulações de quitosana contendo GSNO melhorou significativamente os parâmetros relacionadas ao desenvolvimento radicular de plantas de soja sob condições normais (METHELA et al., 2023).

Em *M. truncatula*, observou-se a presença de NO em nódulos com 10 e 30 dias após a inoculação (BAUDOUIN et al., 2006). Durante o processo de senescência dos nódulos em *L. japonicus*, também foi observado um aumento na concentração de NO (CAM et al., 2012; FUKUDOME et al., 2018). Calvo-Begueira et al. (2018) identificaram a formação de NO em células infectadas de nódulos de plantas soja e feijão e no parênquima de nódulos de soja. Methela et al. (2023) observaram que nanopartículas de quitosana carregadas com GSNO promoveram aumento nos parâmetros fotossintéticos, e incremento no número de nódulos em plantas submetidas as nanoformulações em comparação com as não tratadas.

No geral, observamos que o NO desempenha um papel crucial em todas as fases do desenvolvimento da cultura. Além disso, vimos que a nanoencapsulação utilizando quitosana demonstrou melhorias significativas tanto no processo germinativo quanto na arquitetura radicular, na interação com bactérias e no sistema fotossintético. No entanto, até o momento, na literatura existe uma escassez de estudos baseadas em nanopartículas poliméricas contendo doadores de NO em especial com quitosana na germinação de sementes e nos efeitos a longo prazo, sendo necessário estudos mais detalhados para compreender a interação desses nanomateriais com as plantas.

A junção de nanopartículas e NO abre um caminho a ser explorado para melhorar e otimizar a resistência, o crescimento e o desenvolvimento de plantas, devido aos diversos papéis biológicos do NO e à amplacapacidade dessa molécula em interagir diretamente com muitas vias metabólicas na fisiologia vegetal. Diversos nanomateriais (quitosana, alginato, zeína, poli-ε-caprolactona) podem ser aliados ao

NO para entregar de forma sustentada a locais-alvo nas plantas, mas para isso é estritamente necessário conhecer as características de cada nanomaterial e a sua interação com as espécies vegetais e as formas de aplicação.

3.5 CONCLUSÃO

Através da utilização de nanopartículas de quitosana e alginato, foi possível observar resultados positivos tanto *in vitro* quanto em casa de vegetação, demonstrando que a nanoencapsulação de doador de óxido nítrico proporcionar efeitos positivos em plantas. De forma geral, a concentração de 1,0 mM de NP CS-GSNO foi identificada como a mais eficaz para promover resultados positivos nos parâmetros avaliados, destacando-se pela melhoria na germinação, desenvolvimento morfofisiológico, aumento no conteúdo de RSNO e na nodulação das plantas de soja. Apesar das nanopartículas de alginato carregadas com GSNO apresentar maior absorção inicial de água pelas sementes de soja em comparação com as nanopartículas de quitosana, isso não implica necessariamente em uma eficácia superior, como evidenciado pela variabilidade dos resultados nos parâmetros analisados. A diversidade de efeitos observados destaca a influência das propriedades físico-químicas das nanopartículas e suas interações específicas com diferentes espécies vegetais, destacando a importância de estudos mais aprofundados para uma melhor compreensão e otimização de sua aplicação na agricultura.

REFERÊNCIAS

- ALTAMURA, M. M.; PIACENTINI, D.; DELLA ROVERE, F.; FATTORINI, L.; FALASCA, G.; BETTI, C. New paradigms in brassinosteroids, strigolactones, sphingolipids, and nitric oxide interaction in the control of lateral and adventitious root formation. **Plants**, v. 12, p. 413, 2023.
- ARIF, A. B.; YULIANI, S.; HERNANI, Q.; AGUSTINISAR, I.; WINARTI, C. Effects of chitosan nanoparticles coating on delaying of seed soybean (*Glycine max*) deterioration. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v.35, p. 232-241, 2023.
- BAI, T. ZHANG, P. GUO, Z. CHETWYND, A. J. ZHANG, M. ADEEL, M. LI, M. GUO, K. GAO, R. LI, J. HAO, Y. RUI, Y. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 25542-25551, 2021.
- BAUDOUIN, E.; PIEUCHOT, L.; ENGLER, G.; PAULY, N.; PUPPO, A. Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* functional nodules. **Molecular plant-microbe Interactions**, v. 19, p. 970-975, 2006.
- BERGER, A.; BOSCARI, A.; HORTA ARAÚJO, N.; MAUCOURT, M.; HANCHI, M.; BERNILLON, S.; ROLIN, D.; PUPPO, A.; BROUQUISSE, Plant nitrate reductases regulate nitric oxide production and nitrogen-fixing metabolism during the *Medicago truncatula*–*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1313, 2020.
- BERGER, A.; BOSCARI, A.; FREND, P.; BROUQUISSE, R. Nitric oxide signaling, metabolism and toxicity in nitrogen-fixing symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, v. 70, p. 4505-4520, 2019.
- BOEREMA, A.; PEETERS, A.; SWOLFS, S.; VANDEVENNE, F.; JACOBS, S.; STAES, J.; MEIRE, P. Soybean trade: balancing environmental and socio-economic impacts of an intercontinental market. **Plos One**, v. 11, p. e0155222, 2016.
- BOMBO, A. B.; PEREIRA, A. E. S.; LUSA, M. G.; DE MEDEIROS OLIVEIRA, E.; DE OLIVEIRA, J. L.; CAMPOS, E. V. R.; JESUS, M. B. de.; OLIVEIRA, H.C.; de.; FRACETO, L. F.; MAYER, J. L. S. A mechanistic view of interactions of a nanoherbicide with target organism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, p. 4453-4462, 2019.
- CALABRESE, E.; J.; AGATHOKLEOUS, E. Nitric oxide, hormesis and plant biology. **Science of the Total Environment**, v. 866, p. 161299, 2023.

- CALVO-BEGUERIA, L.; RUBIO, M. C.; MARTÍNEZ, J. I.; PÉREZ-RONTOMÉ, C.; DELGADO, M. J.; BEDMAR, E. J.; BECANA, M. Redefining nitric oxide production in legume nodules through complementary insights from electron paramagnetic resonance spectroscopy and specific fluorescent probes. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, p. 3703-3714, 2018.
- CAM, Y.; PIERRE, O.; BONCOMPAGNI, E.; HÉROUART, D.; MEILHOC, E.; BRUAND, C. Nitric oxide (NO): a key player in the senescence of *Medicago truncatula* root nodules. **New Phytologist**, v. 196, p. 548-560, 2012.
- do CARMO, G. C.; IASTRENSKI, L. F.; DEBIASI, T. V.; DA SILVA, R. C.; GOMES, D. G.; PELEGRINO, M. T.; OLIVEIRA, H. C. Nanoencapsulation improves the protective effects of a nitric oxide donor on drought-stressed *Heliocarpus popayanensis* seedlings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 225, p. 112713, 2021.
- FEELISCH, M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 358, p. 113-122, 1998.
- FARNESE F. S.; MENEZES-SILVA, P. E.; GUSMAN, G. S.; OLIVEIRA, J. A. When bad guys become good ones: the key role of reactive oxygen species and nitric oxide in the plant responses to abiotic stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 471, 2016.
- FUKAMACHI, K.; KONISHI, Y. AND NOMURA, T. Disease control of *Phytophthora infestans* using cyazofamid encapsulated in poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 577, p.315-322, 2019.
- FUKUDOME, M.; WATANABE, E.; OSUKI, K. I.; IMAIZUMI, R.; AOKI, T.; BECANA, M.; UCHIUMI, T. Stably transformed *Lotus japonicus* plants overexpressing phytoglobin LjGlb1-1 show decreased nitric oxide levels in roots and nodules as well as delayed nodule senescence. **Plant and Cell Physiology**, v. 60, p. 816-825, 2019.
- GABBI, M.T. T.; COSTA, N. L.; OLIVEIRA, G. N.; GELATTI, E.; RHODEN, A. C. Análise das trajetórias das exportações de Brasil e Argentina no comércio internacional do complexo soja (1993-2018). **COLÓQUIO – Revista do Desenvolvimento Regional**, v. 17, p. 28-47, 2020.
- GOMES, D. G. DEBIASI, T. V. PELEGRINO, M. T. PEREIRA, R. M. ONDRASEK, G. BATISTA, B. L. OLIVEIRA, H. C. Soil treatment with nitric oxide-releasing chitosan nanoparticles protects the root system and promotes the growth of soybean plants under copper stress. **Plants**, v. 11, p. 3245, 2022.

- GUAN, Y. J.; HU, J.; WANG, X. J.; SHAO, C. X. Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 10, p. 427-433, 2009.
- KHAN, M.; ALI, S.; AL AZZAWI, T. N. I.; YUN, B. W. Nitric Oxide Acts as a Key Signaling Molecule in Plant Development under Stressful Conditions. **International journal of molecular sciences**, v. 24, p. 4782, 2023.
- KHATOR, K.; PARIHAR, S.; JASIK, J.; SHEKHAWAT, G. S. Nitric oxide in plants: an insight on redox activity and responses toward abiotic stress signaling. **Plant Signaling & Behavior**, v. 19, p. 2298053, 2024.
- KOLBERT, Z.; BARROSO, J. B.; BROUQUISSE, R.; CORPAS, F. J.; GUPTA, K. J.; LINDERMAYR, C.; G. J.; LOAKE, J. M.; PALMA, M.; PETŘIVÁLSKÝ, D.; HANCOCK, J. T. A forty year journey: The generation and roles of NO in plants. **Nitric Oxide**, v. 93, p. 53-70, 2019.
- KOLBERT, Z.; LINDERMAYR, C.; LOAKE, G. J. The role of nitric oxide in plant biology: current insights and future perspectives. **Journal of Experimental Botany**, v. 72, p. 777-780, 2021.
- KUMARI, A. GUPTA, A. K. SHARMA, S. JADON, V. S. SHARMA, V. CHUN, S. C. SIVANESAN, I. Nanoparticles as a Tool for Alleviating Plant Stress: Mechanisms, Implications, and Challenges. **Plants**, v. 13, p. 1528, 2024.
- LEON, J.; COSTA-BROSETA, A. Present knowledge and controversies, deficiencies, and misconceptions on nitric oxide synthesis, sensing, and signaling in plants. **Plant, Cell & Environment**, v.43, p.1-15, 2020.
- LI, R.; HE, J.; XIE, H.; WANG, W.; BOSE, S. K.; SUN, Y.; HU, J.; YIN H. Effects of chitosan nanoparticles on seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 91-100, 2019.
- LIU, C.W; MURRAY, J.D. The role of flavonoids in nodulation host-range specificity: an update. **Plants**, v. 5, p.33, 2016.
- LOMBARDO, M. C.; LAMATTINA, L. Nitric oxide is essential for vesicle formation and trafficking in Arabidopsis root hair growth. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 4875-4885, 2012.

LOMBARDO, M. C.; LAMATTINA, L. Absciscic acid and nitric oxide modulate cytoskeleton organization, root hair growth and ectopic hair formation in *Arabidopsis*. **Nitric Oxide**, v. 80, p. 89-97, 2018.

LOPES-OLIVEIRA, P. J.; GOMES, D. G.; PELEGRINO, M. T.; BIANCHINI, E. PIMENTA, J. A.; STOLF-MOREIRA, R.; SEABRA, A.M.; OLIVEIRA, H. C. Effects of nitric oxide-releasing nanoparticles on neotropical tree seedlings submitted to acclimation under full sun in the nursery. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-10, 2019.

MAPA. Estatísticas de Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/exportacoes-do-agronegocio-brasileiro-batem-recorde-no-primeiro-trimestre-de-2024-e-atingem-us-37-44bilhoes/Notaimprensa03_2024ANO.docx. Acesso em: maio 2024.

MAPA- Ministério da agricultura e Reforma Agrária, (2009). Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Regras para análise de sementes. Brasília: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoesinsumos/2946_regras_analise__sementes.pdf Acesso em: jan 2022.

MEAKIN, G. E.; BUENO, E.; JEPSON, B.; BEDMAR, E. J.; RICHARDSON, D. J.; DELGADO, M. J. The contribution of bacteroidal nitrate and nitrite reduction to the formation of nitrosylleghaemoglobin complexes in soybean root nodules. **Microbiology**, v.153, p. 411-419, 2007.

METHELA, N. J.; ISLAM, M. S.; LEE, D. S.; YUN, B. W.;MUN, B. G. S-nitrosoglutathione (GSNO)-mediated lead detoxification in soybean through the regulation of ROS and metal-related transcripts. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, p. 9901, 2023.

NGUYEN, M. H.; HWANG, I. C.; BUI, C. B.; PARK, H. J. Effects of the physical state of nanocarriers on their penetration into the root and upward transportation to the stem of soybean plants using confocal laser scanning microscopy. **Crop Protection**, v. 87, p. 25-30, 2016.

OLIVEIRA, A.B; BOSCO, M. R. O. Biometria, determinação da curva de absorção de água em sementes e emergência inicial de plântulas de *Copernicia hospita* Martius. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 8, p. 66-74, 2013.

OLIVEIRA, H. C.; GOMES, B. C. R.; PELEGRINO, M. T.; SEABRA, A. B. Nitric oxide-releasing chitosan nanoparticles alleviate the effects of salt stress in maize plants.

Nitric Oxide, v. 61, p. 10-19, 2016.

OLIVEIRA, S. B. L.; RISTROPH, L. K. D. Critical Review: Uptake and Translocation of Organic Nanodelivery Vehicles in Plants. **Environmental Science & Technology**, v. 58, p. 5646-5669, 2024.

PANDE, A.; MUN, B. G.; LEE, D. S.; KHAN, M.; LEE, G. M.; HUSSAIN, A.; YUN, B. W.NO Network for Plant – Microbe Communication Underground: Uma revisão. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 431, 2021.

PARKINSON, S.J.; TUNGSIRISURP, S.; JOSHI, C.; RICHMOND, B.L.; GIFFORD, M.L.; SIKDER, A.; LYNCH, I.; O'REILLY, R.K.; NAPIER, R.M. Polymer nanoparticles pass the plant interface. **Nature Communications**, v. 13, p.7385, 2022.

PARRISH, D. J.; LEOPOLD, A. C. Transient changes during soybean imbibition. **Plant Physiology**, v. 59, p. 1111-1115, 1977.

PELLEGRINO, M.T.; PIERETTI, J.C.; LANGE, C.N.; KOHATSU, M.Y.; FREIRE, B.M.; BATISTA, B.L.; FINCHEIRA, P.; TORTELLA, G.R.; RUBILAR, O.; SEABRA, A.B. Foliar spray application of CuO nanoparticles (NPs) and S-nitrosoglutathione enhances productivity, physiological and biochemical parameters of lettuce plants. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 96, p. 2185-2196, 2021.

PELEGRINO M. T.; WELLER R. B, CHEN X.; BERNARDES J. S.; SEABRA A. B. Chitosan nanoparticles for nitric oxide delivery in human skin. **Medicinal Chemistry Communincations**, v. 8, p.:713-9, 2017.

PEREIRA, A. E. S.; OLIVEIRA, H. C. FRACETO, L. F.; SANTAELLA, C. Nanotechnology Potential in Seed Priming for Sustainable Agriculture. **Nanomaterials**, v. 11, 267, 2021.

PEREIRA, A. E. S.; NARCISO, A. M.; SEABRA, A. B.; FRACETO, L. F. Evaluation of the effects of nitric oxide-releasing nanoparticles on plants. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 617, p. 012025, 2015.

PREISLER, A.C.; GUARIZ, H.R.; CARVALHO, L.B.; SANTO PEREIRA, A.D.E.; DE OLIVEIRA, J.L.; FRACETO, L.F.; DALAZEN, G. OLIVEIRA, H.C. Phytotoxicity evaluation of poly (ϵ -caprolactone) nanocapsules prepared using different methods and compositions in *Brassica juncea* seeds. **Plant Nano Biology**, v. 1, p. 100003, 2022.

- PREISLER, A. C.; CARVALHO, L. B.; SARAIVA-SANTOS, T.; VERRI JR, W. A.; MAYER, J. L. S.; FRACETO, L. F.; DALAZEN, G.; OLIVEIRA, H. C. Interaction of nanoatrazine and target organism: evaluation of fate and photosystem II inhibition in hydroponically grown mustard (*Brassica juncea*) plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, p. 7644-7652, 2022.
- SATO, K.; JITSUYAMA, Y.; YAMADA, T.; LIU, B.; ABE, J. Structural features of the aleurone layer of the seed coat associated with imbibition injury in soybean. **Breeding Science**, v. 69, p. 364-370, 2019.
- SCHNOOR, B.; ELHENDAWY, A.; JOSEPH, S.; PUTMAN, M.; CHACÓN-CERDAS, R.; FLORES-MORA, D.; SALVADOR-MORALES, C. Engineering atrazine loaded poly (lactico-glycolic acid) nanoparticles to ameliorate environmental challenges. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 7889-7898, 2018.
- SEABRA, A. B. FABBRI, G. K. PELEGRINO, M. T. SILVA, L. C. RODRIGUES, T. Synthesis, characterization and cytotoxicity of S-nitroso-mercaptosuccinic acid-containing alginate/chitosan nanoparticles. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 838, p. 012032, 2017.
- SEABRA, A. B.; SILVEIRA, N. M. RIBEIRO, R. V. PIERETTI, J. C. BARROSO, J. B. CORPAS, F. J. OLIVEIRA, H. C. Nitric oxide-releasing nanomaterials: from basic research to potential biotechnological applications in agriculture. **New Phytologist**, v. 234, p. 1119-1125, 2022.
- SELIGMAN, K.; SAVIANI, E.E.; OLIVEIRA, H.C.; PINTO-MAGLIO, C.A; SALGADO, I. 2008. Floral transition and nitric oxide emission during flower development in *Arabidopsis thaliana* is affected in nitrate reductase-deficient plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 49, p.1112–1121, 2008.
- SIGNORELLI, S.; SAINZ, M. TABARES-DA-ROSA, S; MONZA, J. The role of nitric oxide in nitrogen fixation by legumes. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 521, 2020.
- SILVEIRA, N. M.; FRUNGILLO, L.; MARCOS, F. C. PELEGRINO; M. T. MIRANDA, M. T.; SEABRA, A. B.; RIBEIRO, R. V. Exogenous nitric oxide improves sugarcane growth and photosynthesis under water deficit. **Planta**, v. 244, p. 181-190, 2016.
- SILVEIRA, N. M. SEABRA, A. B. MARCOS, F. C. PELEGRINO, M. T. MACHADO, E. C. RIBEIRO, R. V. Encapsulation of S-nitrosoglutathione into chitosan nanoparticles improves drought tolerance of sugarcane plants. **Nitric Oxide**, v.84, p. 38-44, 2019.

- SINGH, P. M. TIWARI, A. MAITY, D. SAHA, S. Recent progress of nanomaterials in sustainable agricultural applications. **Journal of Materials Science**, v. 57, 10836-10862, 2022.
- SINGH, K. R.; NAYAK, V.; SINGH, J.; SINGH, A. K.; SINGH, R. P. Potentialities of bioinspired metal and metal oxide nanoparticles in biomedical sciences. **RSC Advances**, v. 11, p. 24722-24746, 2021.
- SINGKAEW, J.; MIYAGAWA, S.; WONGS-AREE, C.; VICHITSOONTHONKUL, T.; SOKAOKHA, S.; PHOTCHANACHAI, S. Season, fruit maturity, and storage affect on the physiological quality of F1 hybrid 'VTM580' tomato seeds and seedlings. **The Horticulture Journal**, v. 86, p. 121-131, 2017.
- SOUMARE, A.; DIEDHIOU, A. G.; THUITA, M.; HAFIDI, M.; OUHDOUCH, Y.; GOPALAKRISHNAN, S.; E KOUISNI, L. Exploiting biological nitrogen fixation: a route towards a sustainable agriculture. **Plants**, v. 9, p. 1011, 2020.
- SPIELMAN-SUN, E.; AVELLAN, A.; BLAND, G. D.; TAPPERO, R. V.; ACERBO, A. S.; UNRINE, J. M.; GIRALDO, J.P.; LOWRY, G. V. Nanoparticle surface charge influences translocation and leaf distribution in vascular plants with contrasting anatomy. **Environmental Science: Nano**, v. 6, p. 2508-2519, 2019.
- STEVEN, S. ISLAM, M. S. GHIMIRE, A. METHELA, N. J. KWON, E. H. YUN, B. W. KIM, Y. Chitosan-GSNO Nanoparticles and Silicon Priming Enhance the Germination and Seedling Growth of Soybean (*Glycine max* L.). **Plants**, v. 13(10), p. 1290, 2024.
- TORTELLA, G.; RUBILAR, O.; PIERETTI, J. C.; FINCHEIRA, P.; DE MELO SANTANA, B.; FERNÁNDEZ-BALDO, M. A.; SEABRA, A. B. Nanoparticles as a promising strategy to mitigate biotic stress in agriculture. **Antibiotics**, v. 12, p. 338, 2023.
- TRIPATHI, D. K.; SINGH, S.; SINGH, S.; PANDEY, R.; SINGH, V. P.; SHARMA, N. C.; PRASAD, S.M.; DUBEY, N.K.; CHAUHAN, D. K. An overview on manufactured nanoparticles in plants: uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 110, p. 2-12, 2017.
- URZEDO, A. L.; GONCALVES, M. C.; NASCIMENTO, M. H.; LOMBELLO, C. B.; NAKAZATO, G.; SEABRA, A. B. Multifunctional alginate nanoparticles containing nitric oxide donor and silver nanoparticles for biomedical applications. **Materials Science and Engineering: C**, v.112, p. 110933, 2020.

- WANG, H.; HUANG, J.; LI, Y.; LI, C.; HOU, J.; LIANG, W. Involvement of nitric oxide-mediated alternative pathway in tolerance of wheat to drought stress by optimizing photosynthesis. **Plant Cell Reports**, v. 35, p.2033-2044, 2016.
- WANG, D.; SALEH, N. B.; BYRO, A. ZEPP, R. SAHLE-DEMESSIE, E. LUXTON, T. P. HO, K. T. BURGESS, R. M. FLURY, M. WHITE, J. C. SU, C. Nature Nanotechnology, v. 17, p. 347-360, 2022.
- YAN, A.; CHEN, Z. The control of seed dormancy and germination by temperature, light and nitrate. **The Botanical Review**, v. 86, p. 39-75, 2020.
- ZHANG, Y.; FU, L.; LI, S.; YAN, J.; SUN, M.; GIRALDO, J. P.; LOWRY, G. V. Star polymer size, charge content, and hydrophobicity affect their leaf uptake and translocation in plants. **Environmental Science & Technology**, v. 55, p. 10758-1076, 2021.
- YUSEFI-TANHA, E.; FALLAH, S.; ROSTAMNEJADI, A. AND POKHREL, L.R.; Particle size and concentration dependent toxicity of copper oxide nanoparticles (CuONPs) on seed yield and antioxidant defense system in soil grown soybean (Glycine max cv. Kowsar). **Science Of The Total Environment**, v. 715, p.136994, 2020.
- ZHANG, H. J.; ZHANG, N. A.; YANG, R. C.; WANG, L.; SUN, Q. Q.; LI, D. B.; GUO, Y. D. Melatonin promotes seed germination under high salinity by regulating antioxidant systems, ABA and GA 4 interaction in cucumber (C ucumis sativus L.). **Journal of pineal research**, v. 57, p. 269-279, 2014.
- ZHANG, L.; CHEN, D.; YU, D.; REGENSTEIN, J. M.; JIANG, Q.; DONG, J.; XIA, W. Modulating physicochemical, antimicrobial and release properties of chitosan/zein bilayer films with curcumin/nisin-loaded pectin nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 133, p. 107955, 2022.
- ZHANG, Y.; MARTINEZ, M. R.; SUN, H.; SUN, M.; YIN, R.; YAN, J.; LOWRY, G. V. Charge, Aspect Ratio, and Plant Species Affect Uptake Efficiency and Translocation of Polymeric Agrochemical Nanocarriers. **Environmental Science & Technology**, v. 133, p.107955, 2023.
- ZHAO, L.; LU, L.; WANG, A.; ZHANG, H.; HUANG, M.; WU, H.; JI, R. Nano-biotechnology in agriculture: use of nanomaterials to promote plant growth and stress tolerance. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, v.68, p. 1935-1947, 2020.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

*Statistical Analyses***Supplementary Table 1** Analysis of variance and *p* values.

Treatment	Figure number	F value	ANOVA	Normality test	Homogeneity test	Adjusted regression model	R ²
NP CS-GSNO	Fig. 3 A	5.474	0.0003*	0.8107	0.6157	$y = -1,1071x^2 + 9,6929x + 56,2$	0.69
NP CS-GSH	Fig. 3 B	6.319	0.0014*	0.4437	0.2489	$y = -4,2593x^3 + 46,669x^2 - 148,07x + 183,33$	0.97
Free GSNO	Fig. 3 C	1.675	0.0509*	0.1656	0.1722	$y = -1,2894x^3 + 12,186x^2 - 30,954x + 84,667$	0.79
NP AL-GSH	Fig. 3 D	2.995	0.0386**	0.0996	0.5808	not adjusted	-
NP AL-GSNO	-	1.592	0.2127 ^{ns}	0.1428	0.4277	-	-
NP CS-GSNO	Fig. 4 A	2.645	0.0501*	0.5847	0.1800	$y = 0,6857x + 7,3065$	0.64
NP CS-GSH	Fig. 4 B	10.451	0.0000*	0.2970	0.0912	$y = -0,094x^3 + 1,1054x^2 - 5,1512x + 18,379$	0.73
NP AI-GSH	Fig. 4 C	2.854	0.0454*	0.2532	0.6054	$y = 0,5341x^2 - 3,5945x + 13,627$	0.86
Free GSNO	Fig. 4 D	3.400	0.0244*	0.7999	0.8920	$y = -0,0473x^3 + 0,2906x^2 + 0,2796x + 11,669$	0.50
NP AL-GSNO	-	1.970	0.1322 ^{ns}	0.5140	0.3924	-	-
NP CS-GSNO	Fig. 5 A	3.575	0.0202*	0.9209	0.1883	$y = 0,6607x + 6,1502$	0.77

NP CS-GSH		Fig. 5 B	8.780	0.0002*	0.6085	0.5049	$y = 0,2642x^2 - 2,405x + 11,877$	0.96
NP AI-GSH		Fig. 5 C	2.898	0.0432*	0.0954	0.5708	$y = 0,2366x^2 - 1,6961x + 9,7663$	0.54
Free GSNO		-	1.477	0.2458 ^{ns}	0.8615	0.4123	-	-
NP AI-GSNO		-	2.103	0.1120 ^{ns}	0.9558	0.2952	-	-
NP CS-GSNO		Fig. 6 A	8.353	0.0003*	0.8107	0.6157	$y = -0,3094x^2 + 6,0354x + 17,186$	0.65
NP CS-GSH		Fig. 6 B	18.336	0.0000*	0.6040	0.3544	$y = -0,9682x^3 + 11,479x^2 - 44,214x + 79,428$	0.94
NP AI-GSNO		Fig. 6 C	2.804	0.0481*	0.5561	0.0912	$y = -2,3711x^2 + 21,559x + 1,5042$	0.95
Free GSNO		Fig. 6 D	11.334	0.0000*	0.3737	0.8867	$y = -2,5556x^2 + 21,361x + 2,6588$	0.97
NP AI-GSH		-	1.768	0.1702 ^{ns}	0.2822	0.2332	-	-
NP CS-GSNO	Root dry mass	Fig. 7 A	3.902	0.0142*	0.3990	0.3315	$y = -0,0033x^2 + 0,039x + 0,0139$	0.69
	Shoot dry mass	-	1.805	0.1625 ^{ns}	0.5640	0.2604	-	-
NP AI-GSNO	Root dry mass	-	1.606	0.2089 ^{ns}	0.0607	0.0657	-	-
	Shoot dry mass	Fig. 7 B	3.342	0.0261*	0.8411	0.7392	$y = -0,0112x^3 + 0,1162x^2 - 0,3376x + 0,4532$	0.65
NP CS-GSH	Root dry mass	-	2.452	0.0731 ^{ns}	0.4469	0.8016	-	-
	Shoot dry mass	-	2.036	0.1217 ^{ns}	0.7119	0.2212	-	-

NP AI-GSH	Root dry mass	-	0.932	0.4432 ^{ns}	0.3150	0.0570	-	-
	Shoot dry mass	-	2.611	0.0604 ^{ns}	0.9493	0.4485	-	-
Free GSNO	Root dry mass	-	2.353	0.0825 ^{ns}	0.0959	0.1347	-	-
	Shoot dry mass	-	1.990	0.1288 ^{ns}	0.2594	0.0927	-	-
NP CS-GSNO	Fig. 8		96.401	0.0000*	0.0603	0.9835	$y = -0,1632x^2 + 4,5099x + 13,828$	0.99
NP CS-GSH			15.934	0.0000*	0.6763	0.2589	$y = -0,1692x^2 + 4,6093x + 12,179$	0.95
NP AI-GSH			188.698	0.0000*	0.0510	0.3765	$y = -0,177x^2 + 4,684x + 15,318$	0.96
NP AI-GSNO			74.361	0.0000*	0.557	0.2449	$y = -0,1657x^2 + 4,359x + 18,136$	0.99
Free GSNO			175.460	0.0000*	0.2551	0.9782	$y = -0,172x^2 + 4,6588x + 15,024$	0.99
Water			265.494	0.0000*	0.4818	0.5296	$y = -0,1439x^2 + 4,4097x + 15,249$	0.98
-	Fig. 9 A		13.024	0.0000**	0.3908	0.2153	-	-
-	Fig. 9 B		28.315	0.0000**	0.7245	0.8696	-	-
-	Fig. 10 A		4.890	0.0021**	0.6669	0.1522	-	-
-	Fig. 10 B		7.362	0.0001**	0.0993	0.1375	-	-
-	Fig. 10 C		5.633	0.0008**	0.1326	0.9164	-	-
-	Fig. 10 D		4.395	0.0040**	0.8581	0.7735	-	-

-	Fig. 11 A	3.255	0.0220**	0.3227	0.5514	-	-
-	Fig. 11 B	2.571	0.0500**	0.1414	0.5894	-	-
-	Shoot fresh weight	1.449	0.2428 ^{ns}	0.4501	0.5823	-	-
-	Root fresh weight	0.582	0.7565 ^{ns}	0.2522	0.2524	-	-
-	Nodule fresh weight	1.895	0.1325 ^{ns}	0.4177	0.6895	-	-
-	Fig. 11 D	1.925	0.1227 ^{ns}	0.1448	0.3726	-	-
-	Shoot lenght	1.408	0.2566 ^{ns}	0.6517	0.5044	-	-
-	Root lenght	1.207	0.3358	0.005	0.2962	-	-
-	Fig. 11 F	1.802	0.1503 ^{ns}	0.7252	0.2238	-	-

* represents that the data was significant ($p < 0.05$); ^{ns} represents non-significative ($p > 0.05$); + means were compared using the Scott-Knott test ($p < 0.05$)

4 ARTIGO B) Interação de doador de óxido nítrico livre e nanoencapsulado com as raízes de plantas de soja

RESUMO

O óxido nítrico (NO) é uma molécula que participa de diversos processos fisiológicos em plantas. A sua aplicação exógena em plantas exige o uso de doadores de NO, como a S-nitrosoglutationa (GSNO), que apresentam relativa instabilidade no ambiente. Assim, o uso de nanocarreadores surge como uma alternativa promissora para a aplicação de doadores de NO na agricultura, mas ainda existe uma lacuna relacionada aos mecanismos de interação entre os nanomateriais e plantas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o modo de ação de nanopartículas liberadoras de NO em resposta à aplicação via raiz e qual o impacto dessas nanopartículas na homeostase do NO. O experimento foi conduzido em hidroponia utilizando plantas de *Glycine max* (L.) Merr. Os tratamentos foram: controle (água destilada), nanopartículas de quitosana (NPs CS) com e sem NO e GSNO livre para cada intervalo de tempo (30 min e 24 h). As nanopartículas foram marcadas com rodamina B para permitir sua detecção nas raízes por microscopia espectral confocal. Os níveis de NO nas raízes foram medidos simultaneamente com o uso da sonda fluorescente DAF-2DA. O tratamento com NPs carregados com GSNO induziu os maiores níveis de NO nas raízes particularmente no tempo de 30 min. Essa fluorescência foi extinta pelo sequestrador de NO cPTIO. Foi possível detectar a fluorescência apenas da rodamina no interior das raízes tratadas com nanopartículas em ambos os tempos, embora tenha aumentado após 24 h. Houve uma alta porcentagem de co-localização entre a fluorescência de NO e de rodamina nas raízes. Com 30 min, foi possível observar na raiz maiores teores de H₂O₂ para NP CS-GSNO em relação ao demais tratamentos. Com 24 h, os níveis de H₂O₂ foram significativamente mais baixos para NP CS-GSH e NP CS-GSNO. O teor de S-nitrosotióis (RSNO) foi significativamente maior para NP CS-GSNO e NP CS-GSH nas raízes após 30 min. Com 24 horas, o conteúdo de RSNO foi, aproximadamente 30% maior em NP CS-GSNO do que o de plantas tratadas apenas com GSNO. Os resultados obtidos aqui indicam que as nanopartículas de quitosana com doadores de NO foram absorvidas pelas raízes, resultando em uma entrega mais eficiente do NO nesse órgão vegetal. Esses achados destacam o potencial da nanotecnologia na agricultura, oferecendo insights valiosos para futuras estratégias de manejo de culturas visando a otimização do crescimento e produtividade das plantas.

PALAVRA-CHAVE: Nanocarreadores; S-nitrosoglutationa; Óxido nítrico; Microscopia Confocal; Fluorescência

4 ARTICLE B) Interaction of free and nanoencapsulated nitric oxide-releasing with the roots of soybean plants grown in hydroponics

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is a molecule that participates in several physiological processes in plants. Its exogenous application in plants requires the use of NO donors, such as S-nitrosoglutathione (GSNO). However, these compounds present relative instability in the environment. Thus, the use of nanocarriers appears as a promising alternative for the application of NO donors in agriculture, but there is still a gap related to the interaction mechanisms between nanomaterials and plants. The goal of this study was to evaluate the mode of action of NO-releasing nanoparticles in response to root application and the impact of these nanoparticles on NO homeostasis. The experiment was conducted in hydroponics using *Glycine max* (L.) Merr. The treatments were: control (distilled water), chitosan nanoparticles (CS NPs) with and without NO and free GSNO for each time interval (30 min and 24 h). Nanoparticles were labeled with rhodamine B to enable their detection in roots by confocal spectral microscopy. NO levels in roots were measured simultaneously using the fluorescent probe DAF-2DA. Treatment with GSNO-loaded NPs induced the highest NO levels in roots particularly at 30 min. This fluorescence was quenched by the NO scavenger cPTIO. It was possible to detect the fluorescence of only rhodamine inside the roots treated with nanoparticles at both times, although it increased after 24 h. There was a high percentage of co-localization between NO and rhodamine fluorescence in roots. After 30 min, it was possible to observe higher levels of H₂O₂ in the roots for NP CS-GSNO in relation to the other treatments. At 24 h, H₂O₂ levels were significantly lower for NP CS-GSH and NP CS-GSNO. The content of S-nitrosothiols (RSNO) was significantly higher for NP CS-GSNO and NP CS-GSH in the roots after 30 min. At 24 hours, RSNO content was approximately 30% higher in NP CS-GSNO than that of plants treated with GSNO alone. The results obtained here indicate that chitosan nanoparticles with NO donors were absorbed by the roots, resulting in a more efficient delivery of NO to this plant organ. These findings highlight the potential of nanotechnology in agriculture, offering valuable insights for future crop management strategies aimed at optimizing plant growth and productivity.

KEYWORDS: Nanocarriers; S-nitrosoglutathione; Nitric oxide; Confocal Microscopy; Fluorescence

4.1 INTRODUÇÃO

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa sinalizadora que está envolvida no controle de diversos processos morfofisiológicos e bioquímicos em plantas (BESSION-BARD, PUGIN e WENDEHENNE, 2008; GUPTA et al., 2020). Os estudos relacionados ao NO em plantas vêm crescendo no decorrer dos anos, principalmente quanto a sua ação protetora contra estresses abióticos e a interação com os hormônios vegetais (GUPTA et al., 2020). Por apresentar efeitos benéficos em plantas, a aplicação exógena de NO é uma alternativa importante para agricultura, ocorrendo por meio de doadores específicos, como S-nitrosoglutathione (GSNO) livre.

Entretanto, esses doadores podem apresentar certa instabilidade no ambiente, degradando e liberando NO em altas concentrações de forma rápida, reduzindo assim os efeitos benéficos desta molécula. Nesse sentido, o uso da nanotecnologia, através da nanoencapsulação de doadores de NO com polímeros biodegradáveis e biocompatíveis (como quitosana e alginato) surge como uma estratégia que visa proteger a molécula da rápida decomposição, melhorando suas propriedades físico-químicas, aumentando a estabilidade no ambiente, possibilitando a entrega direcionada e eficaz, prolongando o período de ação do NO (SEABRA et al., 2022).

Trabalhos com nanopartículas de quitosana com NO mostraram efeitos positivos sob plantas de milho submetidas a salinidade, resultando na proteção da atividade do fotossistema II, teor de clorofila e crescimento das plantas, além de indicar liberação atenuada do NO (OLIVEIRA et al., 2016). Em cana-de-açúcar, nanopartículas de quitosana com GSNO foram mais eficientes em reduzir os efeitos do estresse hídrico (SILVEIRA et al., 2019).

No entanto, ainda existe uma lacuna relacionada aos mecanismos de interação entre os esses nanomateriais e plantas. Isso porque o sucesso de uma nanoformulação depende de fatores como tamanho, morfologia, química da superfície, carga, concentração e das espécies de plantas (FORINI et al., 2022), tornando o desenvolvimento de uma nanoformulação uma etapa altamente importante para determinar sua eficácia e comportamento. Estudos sobre nanocarreadores orgânicos (por exemplo, nanocarreadores poliméricos) para uso na agricultura é uma área de pesquisa em ascensão. Porém, seu progresso tem sido mais lento se comparado com os nanocarreadores inorgânicos, principalmente relacionadas a

encapsulação em partículas poliméricas, devido à maior complexidade das formulações orgânicas e à dificuldade em rastrear esses dispositivos dentro da estrutura orgânica dos tecidos vegetais (OLIVEIRA E RISTROPH, 2024).

Estudos recentes têm utilizado nanopartículas marcadas com sonda fluorescente e microscopia confocal como ferramenta para avaliar a interação delas com as plantas. Utilizando a sonda fluorescente FITC, LI et al. (2019) mostraram que a adsorção de nanopartículas de quitosana na superfície das sementes de trigo foi maior do que a de quitosana convencional (LI et al., 2019).

Preisler et al. (2022) mostraram que nanopartículas de PCL contendo atrazina foram rapidamente absorvidas pelas raízes de plantas de mostarda cultivadas em hidroponia e detectadas nos tecidos vasculares e nas folhas, indicando a translocação das nanopartículas para parte aérea via xilema. Trabalhos com nanopartículas de quitosana contendo NPK mostraram absorção via estômatos em plantas de trigo. Por microscopia eletrônica de varredura, foram observados a absorção foliar e o transporte através dos tecidos do floema (ABDEL-AZIZ et al., 2016).

A aplicação em tomate de nanopartículas poliméricas marcadas mostrou que a translocação para a folha dos nanocarreadores aniônicos foi maior do que para os catiônicos. Já em plantas de trigo, apenas nanocarreadores aniônicos foram transportados (ZHANG et al., 2023). O rastreamento das nanopartículas marcadas com FITC indicou que as nanopartículas de zeína foram absorvidas e acumuladas nas raízes de *Bidens pilosa* e *Zea mays*, mas apresentaram pouca translocação para a parte aérea (CARVALHO et al., 2023). Em todos esses cenários, o rastreamento de nanocarreadores em plantas é importante para demonstrar sua absorção, translocação ou associação com compartimentos celulares e intracelulares. É importante ressaltar, que até o momento, não existe na literatura, estudos que avaliem de forma sistemática o ativo e a partícula simultaneamente.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o modo de ação de nanopartículas liberadoras de NO em resposta a aplicação via raiz e qual o impacto dessas nanopartículas na homeostase do NO. Além disso, quantificaram-se os níveis endógenos de S-nitrosotióis (que atuam como reservatórios de NO) para melhor visualização da homeostase do NO.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Preparo Das Formulações

4.2.1.1 Nanopartículas de quitosana (NPs CS)

As nanopartículas de quitosana (NPs CS) foram preparadas por gelificação ionotrópica (SILVEIRA et al., 2019; SEABRA et al., 2017). Resumidamente quitosana ($2,6 \text{ mg mL}^{-1}$) e GSH (20 mM) foram misturados através de agitação magnética em solução aquosa de ácido acético (1%) durante 90 min. Tripolifosfato de sódio (TPP) ($0,6 \text{ mg mL}^{-1}$) aquoso foi adicionado em gotas à suspensão quitosana/GSH, obedecendo à proporção volumétrica de 3 CS/GSH:1 TPP. A mistura foi agitada durante 90 minutos à temperatura ambiente, levando à formação de suspensão aquosa de NPs CS contendo GSH (sem NO) na concentração de 20 mM. Para obter nanopartículas de quitosana contendo GSNO, foi realizada a S-nitrosilação adicionando quantidades equimolares de nitrito de sódio (NaNO_2) à suspensão de NPs CS-GSH. A solução final foi homogeneizada e mantida por 60 min protegida da luz, a 5°C (SILVEIRA et al., 2016). Também foram utilizados tratamentos com NPs CS contendo GSH não S-nitrosilada, para se avaliar o efeito da formulação sem o NO.

Para avaliar as interações nanopartícula-planta, as nanopartículas foram marcadas com a adição ao meio orgânico de 0,2 mg da sonda fluorescente 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(lisina rodamina B sulfonil), substituindo assim a CS pela CS-Rodamina (LIU, et al., 2016; PREISLER et al., 2022). As demais etapas foram realizadas seguindo o protocolo já detalhada anteriormente.

4.2.1.2 S-nitrosoglutationa livre (GSNO)

Para obter o doador S-nitrosoglutationa livre (GSNO), a glutatona reduzida (GSH) foi dissolvida em ácido clorídrico (1 mol/L). Para a S-nitrosilação, uma quantidade equimolar de nitrito de sódio (NaNO_2) foi adicionada à solução de GSH (20 mM) e mantida em banho de gelo por 40 min e agitação magnética. Acetona foi adicionada para precipitação da GSNO. O precipitado de GSNO foi lavado algumas vezes com água fria e o sólido então foi liofilizado por 24 h (PELEGRINO et al., 2021).

4.2.2 Material Vegetal e Condições de Cultivo

O experimento foi conduzido na Universidade Estadual de Londrina (UEL). As plantas de soja (*Glycine max* L. Merr.) de uma cultivar convencional (BRS 257) foram cultivadas em casa de vegetação em vasos plásticos de aproximadamente 1 L (10,5 cm de altura x 14,5 cm de diâmetro superior) com areia autoclavada. Ao atingirem o estágio V1/V2, elas foram transferidas para a hidroponia, utilizando vasos de 200 mL com a solução nutritiva (Tabela 1) sob aeração constante. As plantas foram mantidas com solução nutritiva por uma semana (7 dias) e posteriormente transferidas para recipientes contendo apenas água destilada (para evitar a precipitação das nanopartículas). Antes da transferência, as raízes foram lavadas em água corrente por aproximadamente 1 min. Os tratamentos foram: a) controle (água destilada); b) NP CS contendo GSNO; c) NP CS-GSH sem NO; d) GSNO livre. Foi utilizada a concentração de 100 µM de GSH/GSNO. Os intervalos para as análises fisiológicas e bioquímicas foram de 30 min e 24 h após a aplicação.

Tabela 1: Concentração final de sais na solução nutritiva.

Sal	Concentração
KH ₂ PO ₄	1 mM
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	4 mM
K ₂ SO ₄	2 mM
NH ₄ NO ₃	4 mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	2 mM
H ₃ BO ₃	92,5 µM
MnCl ₂ .4H ₂ O	18 µM
ZnCl ₂	1,5 µM
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,56 µM
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,66 µM
FeSO ₄	100 µM

Fonte: o próprio autor.

Foram realizados dois experimentos distintos para averiguar o efeito das nanopartículas doadoras de NO na biodisponibilidade do NO em raiz ao longo do tempo. O primeiro consiste na aplicação apenas na zona de maturação radicular, no qual foi medido de forma quantitativa a intensidade de fluorescência da amostra. Um segundo experimento foi realizado, agora, para investigar com mais detalhe a interação da partícula com a planta, a fim de identificar simultaneamente se tanto o

composto nanoencapsulado quanto a NP estão localizadas na mesma região do tecido vegetal. Para cada tratamento, foram realizadas 5 repetições, sendo cada planta uma unidade experimental.

4.2.3 Análises de Microscopia Confocal

Os níveis de NO nas raízes foram detectados com o uso da sonda fluorescente 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2DA), permitindo quantificar em intensidade de fluorescência e porcentagem de co-localização com as nanopartículas marcadas com rodamina.

O processamento das amostras foi realizado conforme descrito por Moro et al. (2017), com alterações (Fig. 1). As raízes foram coletadas e imediatamente incubadas em tampão fosfato de sódio (10 mM; pH 7.2) contendo DAF-2DA (10 μ M) por 30 minutos e protegida da luz. No controle negativo, foi utilizado o sequestrador de NO 2-4-carboxyphenil-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO, 10 μ M). Após o intervalo de incubação, as amostras foram lavadas durante 5 mi na solução tampão fosfato de sódio. As lâminas foram montadas imediatamente após a lavagem e analisadas em sequência por um microscópio confocal espectral (Leica TCS SP8 Leica, Wetzla, Alemanha) com excitação a 488 nm e emissão de 457 a 558 nm para o NO e com excitação a 552 nm e emissão de 572 a 607 nm (faixa de cores de amarelo a laranja) para rodamina B. As imagens foram processadas usando o software Leica LAS X LS (versão 3.5.7.23225, Leica Microsystems - Danaher Corporation, Washington, DC, USA).

A co-localização é baseada em mapas de correlação de imagens locais corrigindo o contraste e as variações locais na intensidade de fundo de cada canal de fluorescência. Para determinar essa porcentagem, foi realizada uma solução de GSNO, na mesma concentração utilizada e quantificado em placa e lâmina através do microscópio confocal.

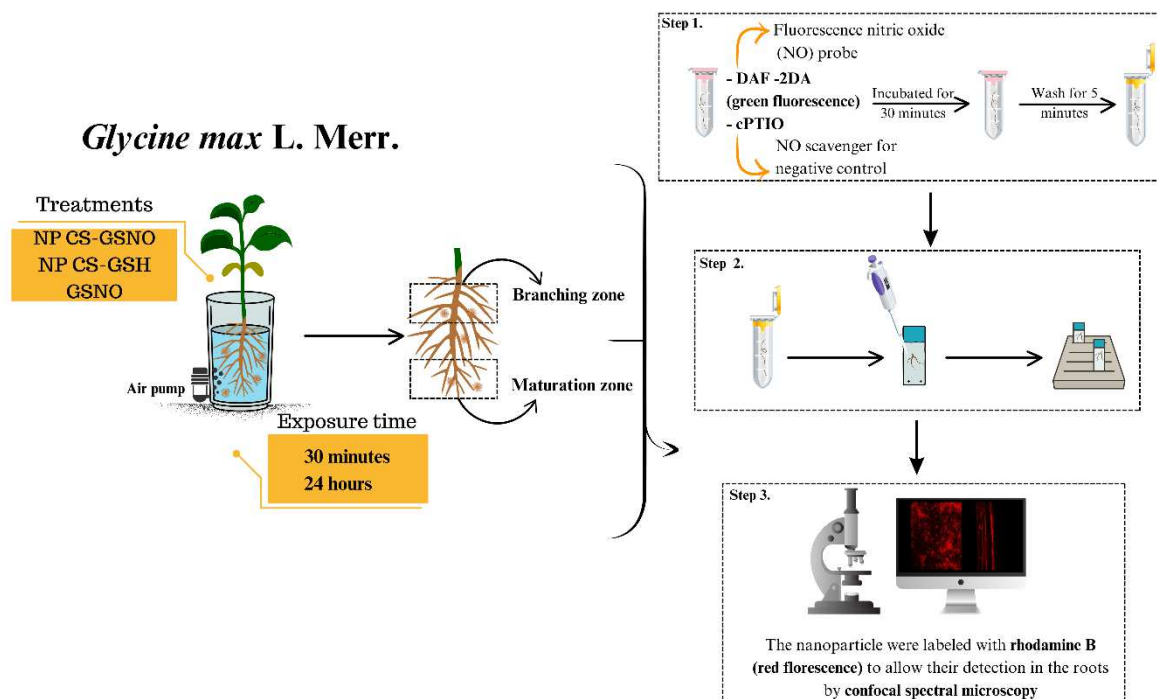


Fig 1. Esquema representativo do experimento de microscopia confocal. O passo 1 refere-se às etapas de coleta, incubação e lavagem das amostras a serem analisadas. O passo 2 abrange os procedimentos realizados durante a montagem das lamina. O passo 3 envolve a visualização e quantificação das amostras no microscópio confocal.

4.2.4 Análises Bioquímicas

Amostras da porção apical das raízes foram coletadas para cada intervalo de tempo. As amostras foram pulverizadas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C.

Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxidação lipídica foram analisados como indicadores de estresse oxidativo. Para o processamento, 100 mg foram homogeneizados em metanol + TCA (0,2 %) e centrifugados a $13.700 \times g$ (4 °C, 5 min). O sobrenadante foi usado para medir o teor de H_2O_2 pela reação com KI em tampão fosfato enquanto o teor de malondialdeído (MDA, produto da peroxidação lipídica) foi medido através da análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, conforme descrito em do CARMO et al. (2021) com adaptações.

O conteúdo de S-nitrosotiois (RSNO) nas raízes foi medido como indicador de biodisponibilidade de NO. Para isso, 100 mg de amostra foram misturados com 1 mL de solução de NEM (5 mmol L^{-1} preparado em PBS, pH 7,4), sonificados por 10 s (45 kHz) e centrifugados por 5 min a $15.645 \times g$. Foi preparada uma solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de $CuCl_2$ da qual 15 mL foram utilizados para estabilizar o

sensor. A coleta de dados foi realizada adicionando 20 μ L do extrato, utilizando um analisador de radicais livres WPI TBR4100/1025 (World Precision Instruments Inc., Sarasota FL, EUA) equipado com sensor específico de NO (ISO-NOP 2 mm). Os dados foram comparados com a curva padrão obtida para GSNO. Os ensaios de NO foram realizados em três réplicas técnicas para cada amostra (OLIVEIRA et al., 2016 , LOPES-OLIVEIRA et al., 2019 , SILVEIRA et al., 2019).

4.2.5 Análise Estatística

O delineamento foi inteiramente casualizado e os dados foram testados quanto a normalidade (Shapiro Wilk-W) e homogeneidade de variância (Bartlett) e submetidos a análise de variância (ANOVA) de uma via (Tabela S2). Quando significativos as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott 5% de probabilidade.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Microscopia Confocal

Através das imagens obtidas em microscopia confocal, foi possível verificar as regiões de absorção das nanopartículas pelas raízes (Figuras 2-3), bem como quantificar o NO *in situ* pela intensidade de fluorescência (IF) em unidades arbitrárias de fluorescência para cada região em função do intervalo de exposição (Figura 4).

Na Figura 2 é possível observar para NP CS-GSNO e GSNO um alto sinal de fluorescência principalmente na superfície da raiz, através dos tecidos da estrutura primária da epiderme e córtex de raízes de soja. Já com 24 h (Fig. 3), na mesma zona de maturação, os sinais de fluorescência tendem a estar mais internalizados e distribuídos através do córtex e cilindro vascular (Fig. 2-3) e serem mais detectáveis para NP CS-GSNO. As diferenças observadas entre as formulações nos diversos intervalos de exposição sugerem que ambas são eficazes em fornecer NO para a planta de forma inicial. Contudo, há uma distinção significativa na estabilidade e na liberação contínua do NO. O GSNO livre apresenta uma rápida degradação, resultando em uma liberação imediata, porém de curta duração. Em

contraste, as NP CS-GSNO mostram uma liberação mais gradativa e sustentada de NO ao longo do tempo, devido à sua maior estabilidade no sistema. Pelegriño et al. (2017) observaram esse efeito na cinética de liberação de GSNO livre em comparação com o nanoencapsulado. Essa liberação controlada e prolongada de NO pelas nanopartículas pode oferecer vantagens em aplicações agrícolas, garantindo um fornecimento contínuo e eficiente de NO às plantas além de proteção da molécula encapsulada.

Carvalho et al. (2023) alcançaram resultados semelhantes ao utilizarem nanopartículas de zeína marcadas com a sonda fluorescente FITC e exporem as raízes a essas nanopartículas por diversos intervalos de tempo. Li et al. (2019) demonstraram que, a adsorção de nanopartículas de quitosana na superfície das sementes de trigo foi superior à de quitosana em sua forma não-nano. Possivelmente, essas NPs foram transportadas lateralmente pelo córtex das células parenquimáticas (simplasto) ou entre os espaços intercelulares (apoplasto). É possível ainda que a absorção ocorra em contato direto com as células da superfície da epiderme da raiz (PREISLER et al., 2022).

Apesar da baixa fluorescência detectada na região dos pelos radiculares, esta região é importante para aumentar o contato com a nanoformulação e pode ser uma via de absorção. Entretanto, devido à liberação de compostos químicos, como muco ou ácidos orgânicos, através dos pelos radiculares, a superfície da raiz adquire cargas negativas. Isso aumenta a probabilidade de que nanopartículas com cargas positivas, como a quitosana, se acumulem e fiquem absorvidas pela superfície da raiz (WANG et al., 2023). Parkinson et al. (2022) demonstraram que nanopartículas com balanço de cargas positivas na superfície ficaram aderidas as raízes enquanto as com carga negativa foram absorvidas e transportadas via xilema. Estudos semelhantes em sistema hidropônico verificaram a presença de nanopartículas de zeína marcadas com fluorescência aderidas pelas raízes das plantas de soja (RISTROPH et al., 2017).

Tanto a carga da partícula quanto o tamanho são vistos como uma das principais restrições à internalização em tecidos vegetais. Aqui, as dimensões das NPs CS (com e sem NO) foram além das discutidas por alguns autores, que determinam um limite de exclusão na faixa de 50 nm para a internalização e translocação de nanopartículas dentro das células vegetais. No entanto, diversos estudos já demonstraram que nanopartículas a base de polímeros como PCL e zeína,

com dimensões de 100-300 nm foram absorvidas e transportadas a outras regiões da planta (BOMBO et al., 2019; PREISLER et al., 2022; CARVALHO et al., 2023). Além disso, alguns trabalhos demonstraram em protoplastos vegetais, o efeito da parede celular, e a internalização de partículas com tamanhos inferiores a 1 μm por meio de endocitose, assim, as nanopartículas absorvidas por essa via não possuem seletividade de tamanho de partícula (MA e YAN, 2018).

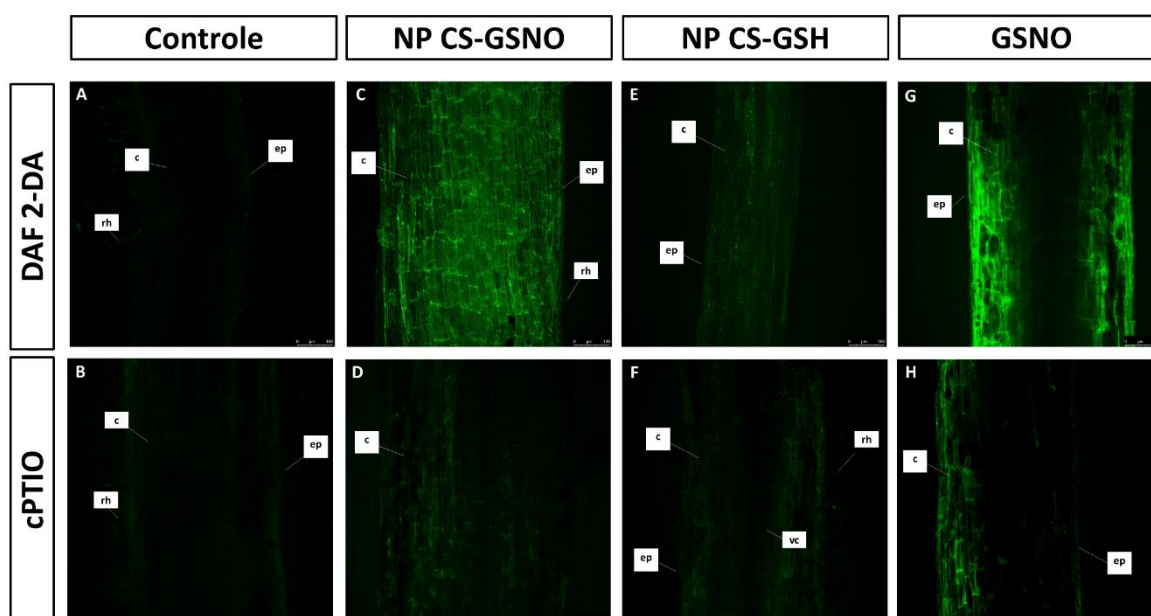


Fig 2. Imagens representativas ilustrando a localização confocal microscópica de NO em 20x da zona de maturação radicular de plantas de soja (*Glycine max* L. Merr.) 30 min após o tratamento com água destilada (CONTROLE), GSNO livre e nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSH e NP CS-GSNO). Para cada tratamento, foi realizada a incubação com cPTIO (10 μM) como controle negativo. Cilindro vascular (vc), região do córtex (c), epiderme (ep) e pelos absorventes (rh). Barras = 100 μm .

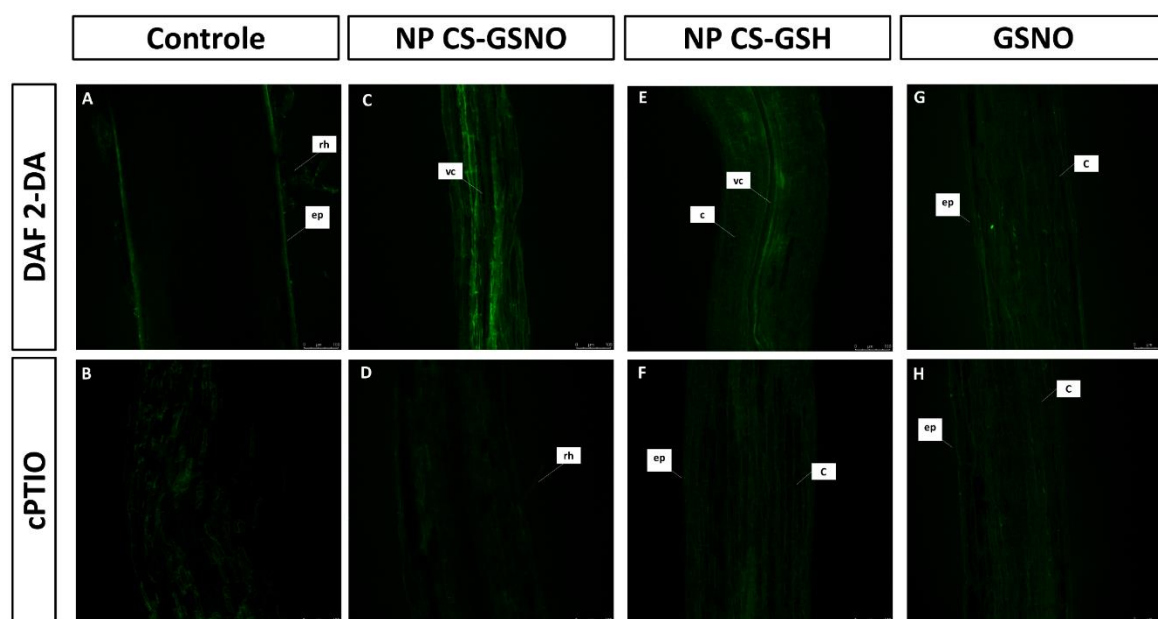


Fig 3. Imagens representativas ilustrando a localização confocal microscópica de NO em 20x da zona de maturação radicular de plantas de soja (*Glycine max* L. Merr.) 24 h após o tratamento com água destilada (CONTROLE), GSNO livre e nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSH e NP CS-GSNO). Para cada tratamento, foi realizada a incubação com cPTIO (10 μ M) como controle negativo. Região do córtex (c), epiderme (ep) e pelos absorventes (rh). Barras = 100 μ m.

Nossos resultados mostraram ainda, de forma quantitativa, que mesmo após um curto período de 30 min, foi detectado um aumento significativo dos níveis de NO para as NP CS-GSNO (DAF-2DA) e GSNO (DAF-2DA) em relação ao controle negativo (Figura 4A) na região próxima à zona de maturação radicular. A baixa IF detectada nas raízes incubadas com cPTIO confirma a especificidade da sonda DAF-2DA para o NO neste protocolo (Fig. 2 e 3 C-D, G-H). Posteriormente, com 24 h, não foi detectada diferença significativa nos níveis de NO entre os tratamentos. Entretanto é visível quantitativamente a redução acentuada na IF se comparada com a exposição de menor tempo. Os resultados sugerem ainda que NP CS-GSH não aumentou significativamente os níveis de NO nas células. Além disso, ambas as imagens mostram o controle basal com baixa IF. Isso é fundamental para garantir que qualquer aumento na fluorescência observado em nossas amostras expostas as nanoformulações é específico aos tratamentos e não devido a fatores de fundo ou artefatos não identificados, garantindo a precisão e confiabilidade das análises.

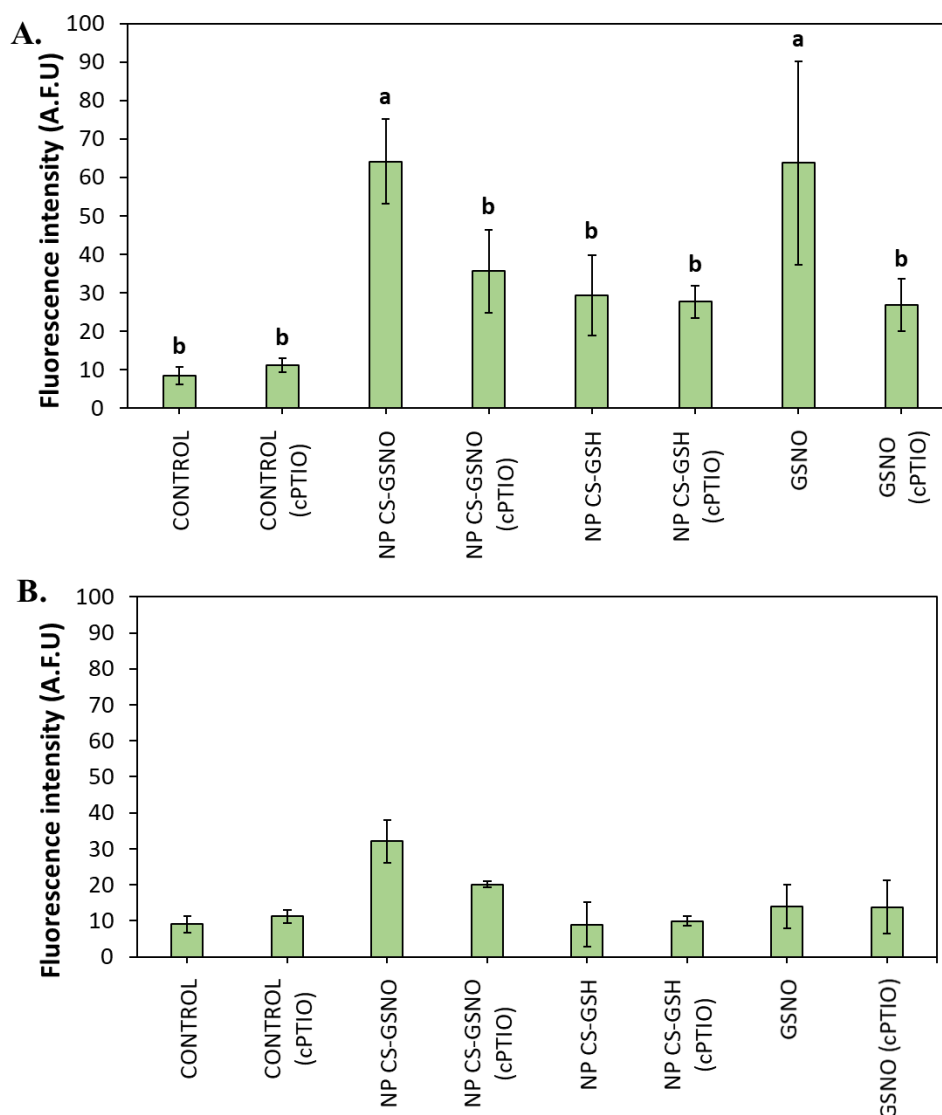


Fig 4. Intensidade de fluorescência medida como arbitrary fluorescence units (A.F.U.) por microscopia confocal com ampliação de 20 × na zona de maturação radicular de plantas de soja (*Glycine max* L. Merr.) (A) 30 min e (B) 24 h após o tratamento com água destilada (CONTROLE) GSNO livre e nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSH e NP CS-GSNO). Para cada tratamento, foi realizada a incubação com cPTIO (10 µM) como controle negativo. Os dados representam média ± erro padrão (n = 5). Letras diferentes acima das barras indicam médias diferentes com base na ANOVA seguida pelo teste Scott-Knott (p < 0,05).

Aqui nós avaliamos duas regiões da raiz, a zona de maturação e a zona de ramificação radicular. A porcentagem de co-localização em função da sonda utilizada para detectar o NO (DAF-2DA) e a sonda utilizada para marcar a nanopartícula (rodamina B) foi avaliada de forma qualitativa (Figuras 5, 6, 7 e 8). Com 30 min, foi possível detectar 46% de co-localização na zona de maturação radicular (Figura 5 I - F) e mais de 60% na zona de ramificação radicular (Figura 6 I - F) para o tratamento NP CS-GSNO. Essa co-localização também foi percebida para a GSNO na zona de maturação radicular (34%) (Figura 5 I L) e mais de 25% na zona de

ramificação radicular (Figura 6 I L). Isto porque, o GSNO emite uma certa porcentagem de fluorescência na mesma faixa de comprimento da rodamina (testado previamente por placa e lâmina). Com 24 h, a porcentagem de co-localização foi reduzida para 7% na zona de maturação (Figura 7 I - F) e 13% na zona de ramificação (Figura 8 I - F, I, L) para NP CS-GSNO. Novamente, a baixa IF detectada nas raízes incubadas com cPTIO confirmaram a especificidade da sonda DAF-2DA para o NO neste protocolo.

Uma vez liberado, o NO pode difundir-se rapidamente através das membranas celulares devido à sua pequena dimensão e apolaridade. Isso permite que a molécula atue em vários processos fisiológicos e bioquímicos na planta (KHAN et al., 2023). Por isso, a alta porcentagem de co-localização é identificada com 30 min na região de maturação, local de maior absorção das nanopartículas. Alguns pesquisadores defendem que as nanopartículas podem alcançar mais facilmente os vasos condutores através da via apoplástica, devido à penetração na região do ápice radicular (zona de maturação próxima a ponta da raiz) onde a endoderme ainda não está completamente diferenciada (LV et al., 2015; SCHYMURA et al., 2017).

Nesse curto intervalo de tempo, uma porcentagem considerável de nanopartículas já foi absorvida e o NO está sendo liberado gradativamente e difundido. No entanto, em períodos mais longos, observa-se um aumento da IF na nanopartícula marcada, principalmente na zona de ramificação, indicando que a partícula está sendo translocada. A redução na porcentagem de co-localização sugere que boa parte do NO já tenha sido liberada nas primeiras horas, embora algumas moléculas ainda permaneçam encapsuladas e sejam liberadas conforme a partícula é translocada.

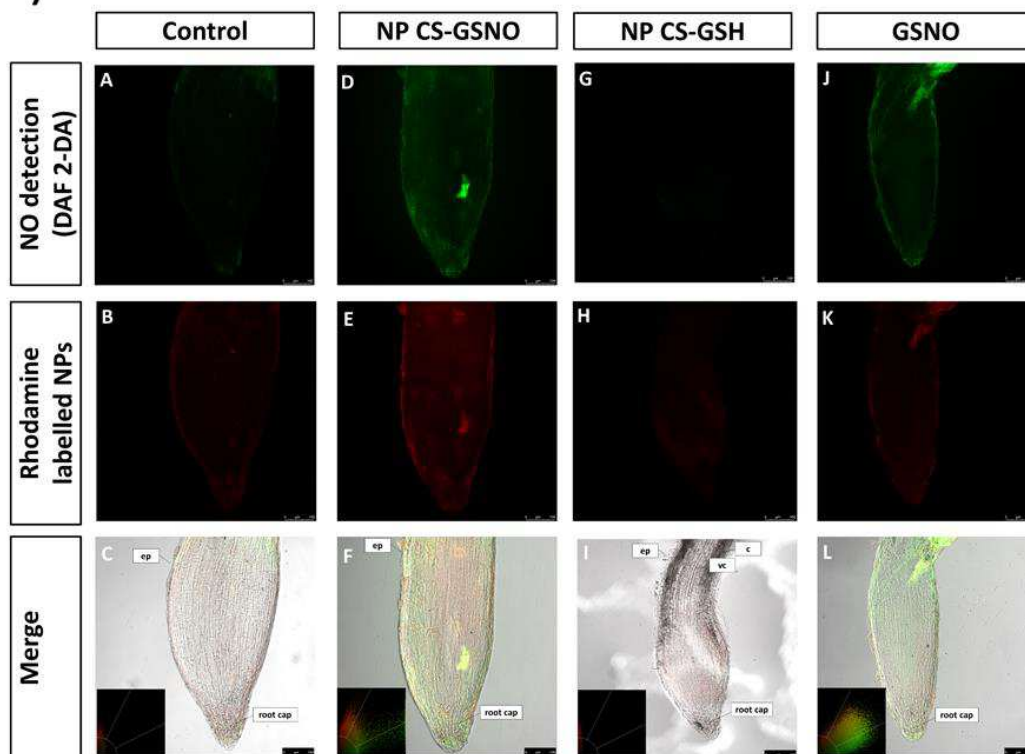
A capacidade das NPs CS de liberar NO de forma sustentada e controlada pode ter um impacto significativo na homeostase do NO nas plantas, ajudando a manter níveis adequados e estáveis de NO no ambiente celular (KOLBERT et al., 2021; SINGH et al., 2021). Além disso, a capacidade de os nanocarreadores de aderir à superfície da raiz e serem absorvidos e internalizados pode facilitar uma liberação localizada de NO, direcionando-a para os tecidos onde é mais necessário. Isso pode otimizar a eficácia da sinalização do NO em processos específicos, ajudando a regular a resposta a estresses ambientais e a promover o crescimento e desenvolvimento das plantas.

Assim como nas figuras 2 e 3, aqui também se observou em ambas

as zonas radiculares que, com 30 min, um alto sinal de fluorescência apareceu principalmente na superfície da raiz, através dos tecidos da estrutura primária da epiderme e córtex de raízes de soja. Enquanto que com 24 h apesar de menos intenso, foi possível identificar absorção e internalização em camadas mais internas e não apenas na superfície da lâmina foliar. A marcação fluorescente observada nos pêlos indicam que também pode haver uma via de absorção para NP CS-GSNO, como tem sido relatado anteriormente para a absorção de poli (ϵ -caprolactona) (PREISLER et al., 2022).

Alguns autores investigaram a absorção de nanopartículas poliméricas com diferentes tamanhos (20–100 nm) pelas raízes de *Arabidopsis thaliana*. Eles observaram que as nanopartículas com carga positiva se acumularam ao redor das superfícies das raízes, mas não foram absorvidas pelas raízes ou mesmo pelos protoplastos. Em estudo com plantas de milho foi possível visualizar NPs de ZnO aderidas à parede celular da epiderme e córtex radicular, indicando translocação via apoplasto. No entanto, a presença de NPs nos vasos do xilema sugeriu que os NPs cruzaram a membrana celular da endoderme (ZHAO et al., 2012).

I)



II)

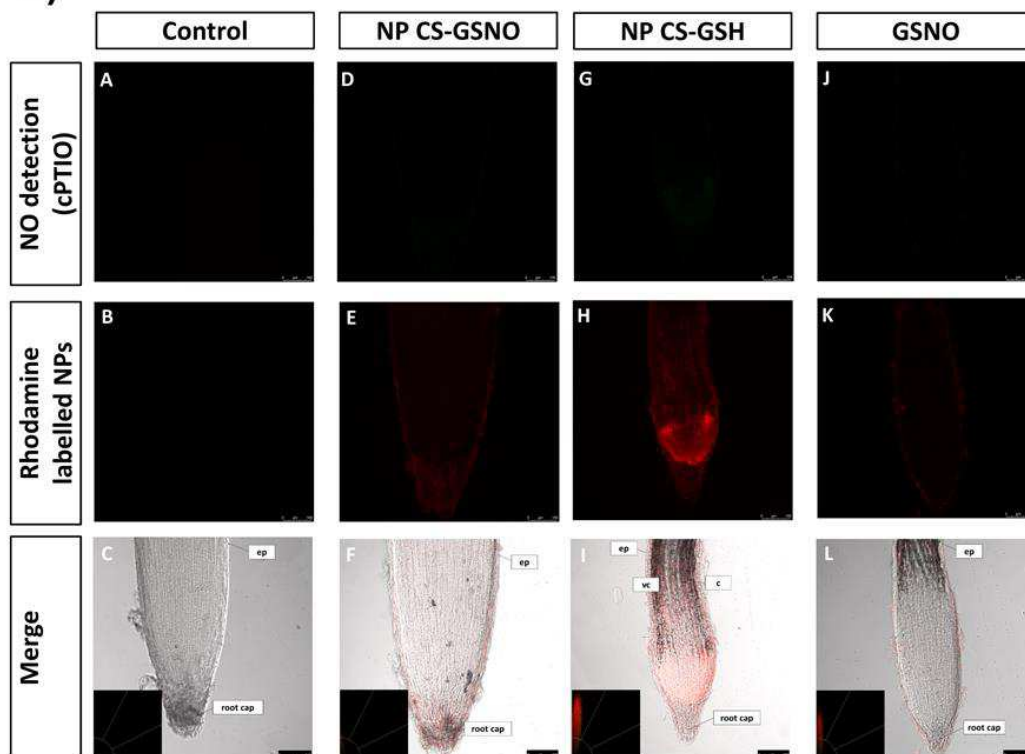
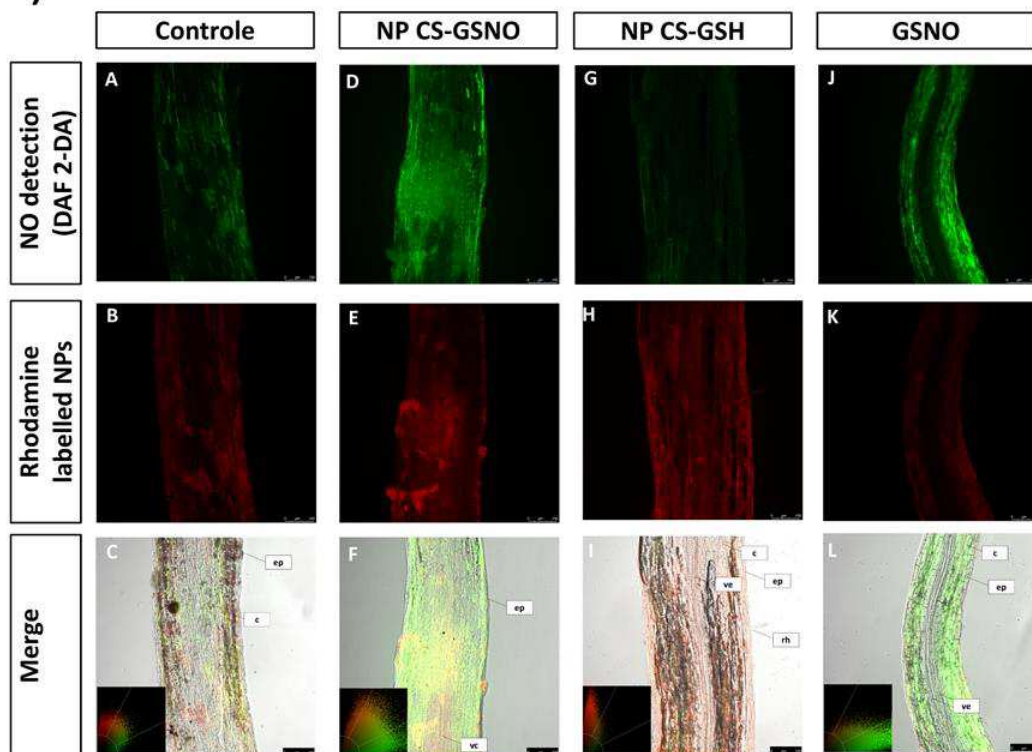


Fig 5. Imagens representativas ilustrando a co-localização confocal microscópica de NO e da rodamina em 20x da zona de maturação radicular de plantas de soja (*Glycine max* L. Merr.) após 30 minutos de

exposição a água destilada (CONTROLE), nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSH e NP CS-GSNO) e GSNO. I) Sonda fluorescente de NO (DAF-2DA), II) Sequestrador de NO (cPTIO). Região do córtex (c), epiderme (ep), cilindro vascular (vc). Barras = 100 μ m.

I)



II)

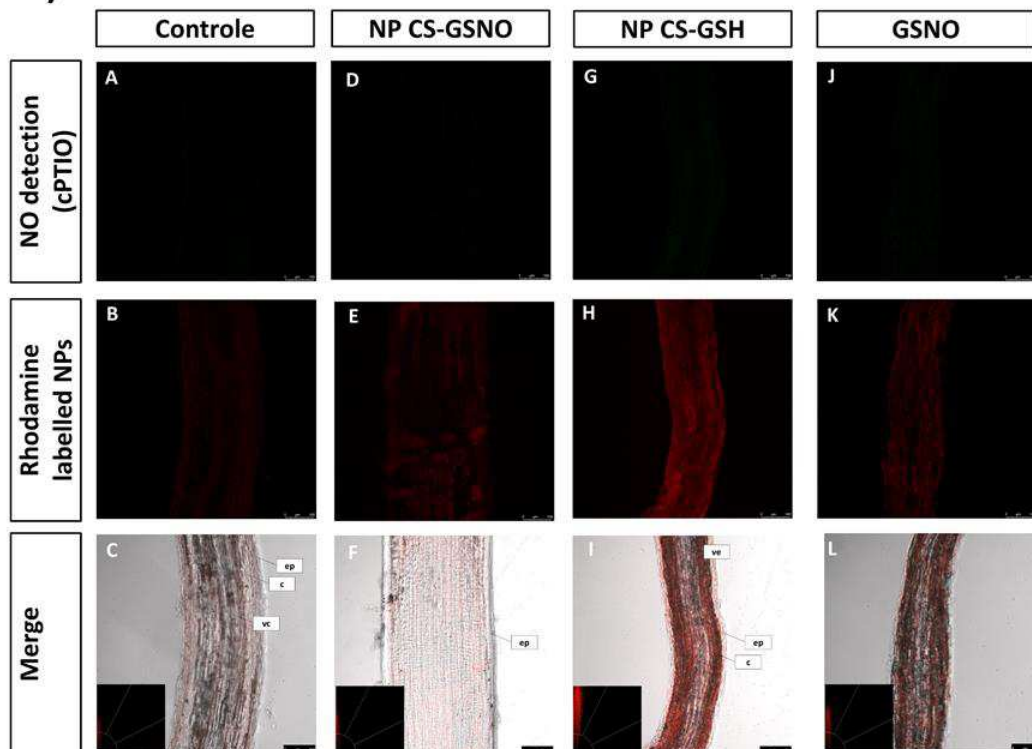
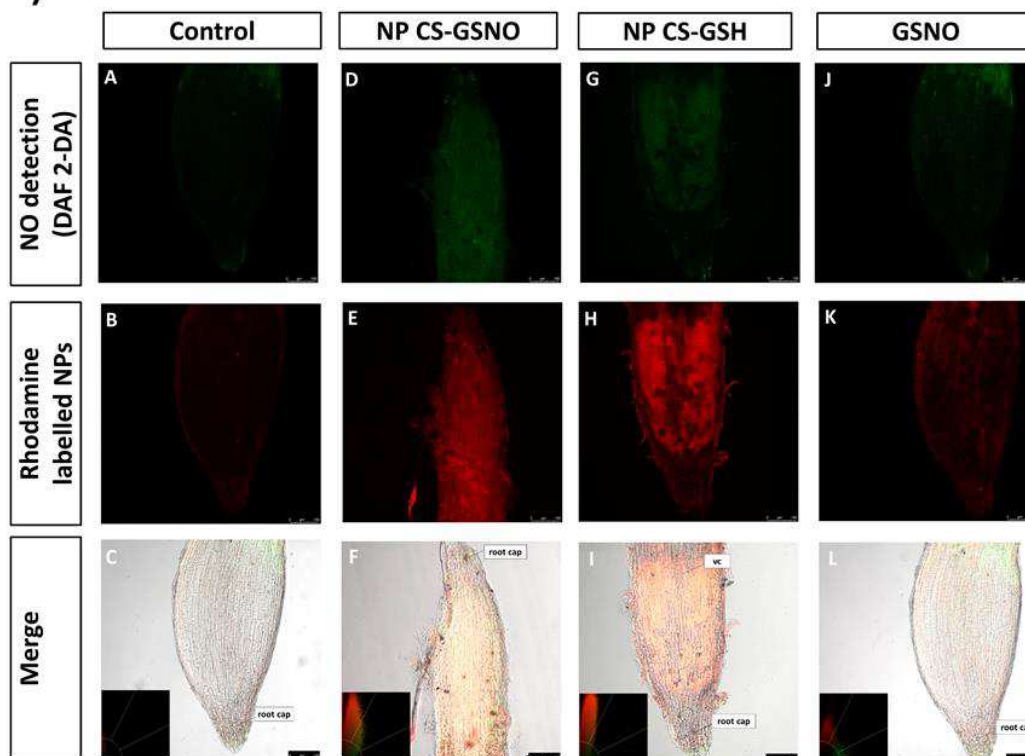


Fig 6. Imagens representativas ilustrando a co-localização confocal microscópica de NO e da rodamina em 20x da zona de ramificação radicular (zona perto do colo) de plantas de soja (*Glycine max* L. Merr.)

após 30 minutos de exposição a água destilada (CONTROLE), nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSH e NP CS-GSNO e GSNO. I) Sonda fluorescente de NO (DAF-2DA), II) Sequestrador de NO (cPTIO). Região do córtex (c), epiderme (ep), cilindro vascular (vc), elementos de vaso (ve). Barras = 100 μ m.

I)



II)

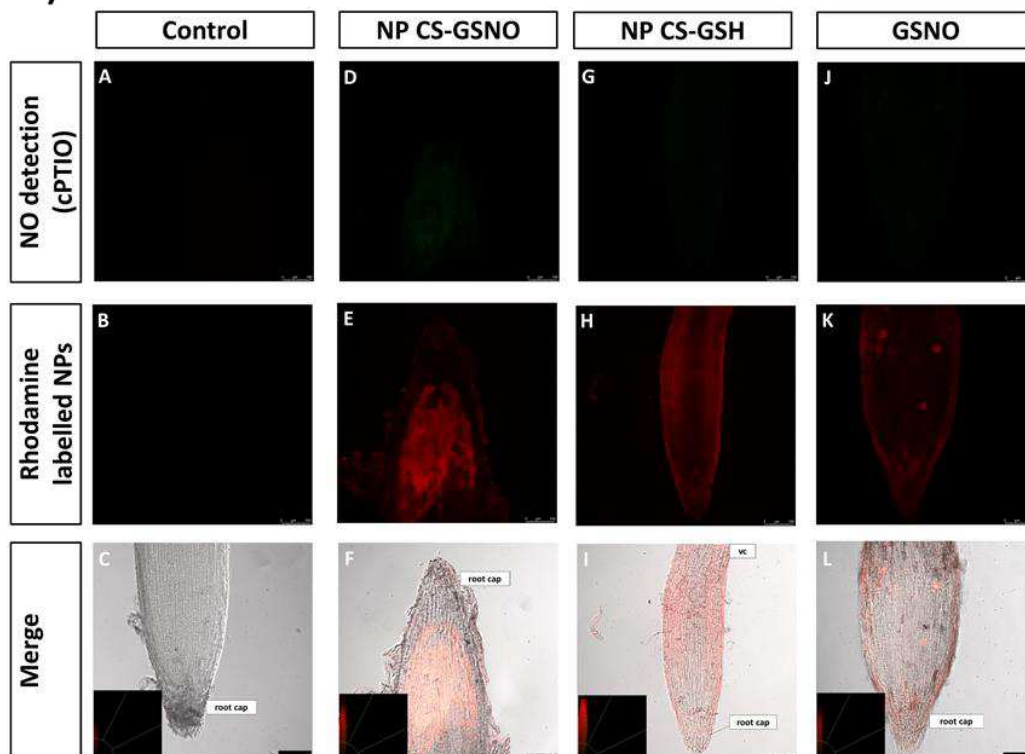
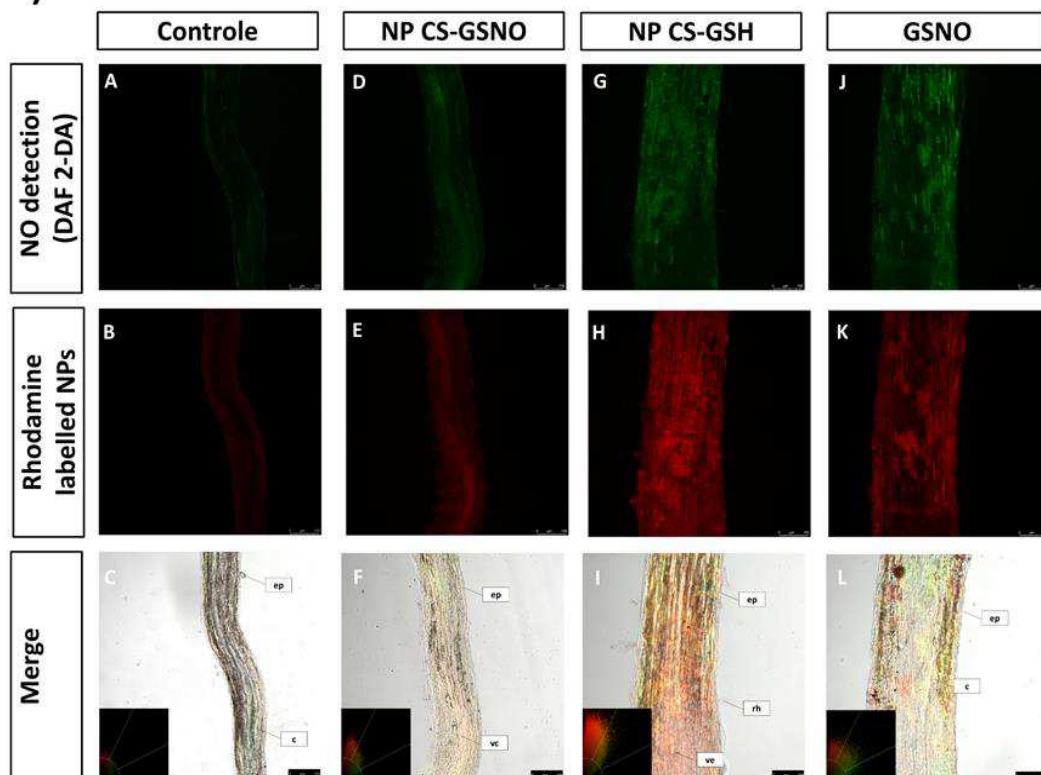


Fig 7. Imagens representativas ilustrando a co-localização confocal microscópica de NO e da rodamina em 20x da zona de maturação radicular de plantas de soja (*Glycine max* L. Merr.) após 24 horas de

exposição a água destilada (CONTROLE). nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSH e NP CS-GSNO) e GSNO. I) Sonda fluorescente de NO (DAF-2DA), II) Sequestrador de NO (cPTIO). Cilindro vascular (vc). Barras = 100 μm .

I)



II)

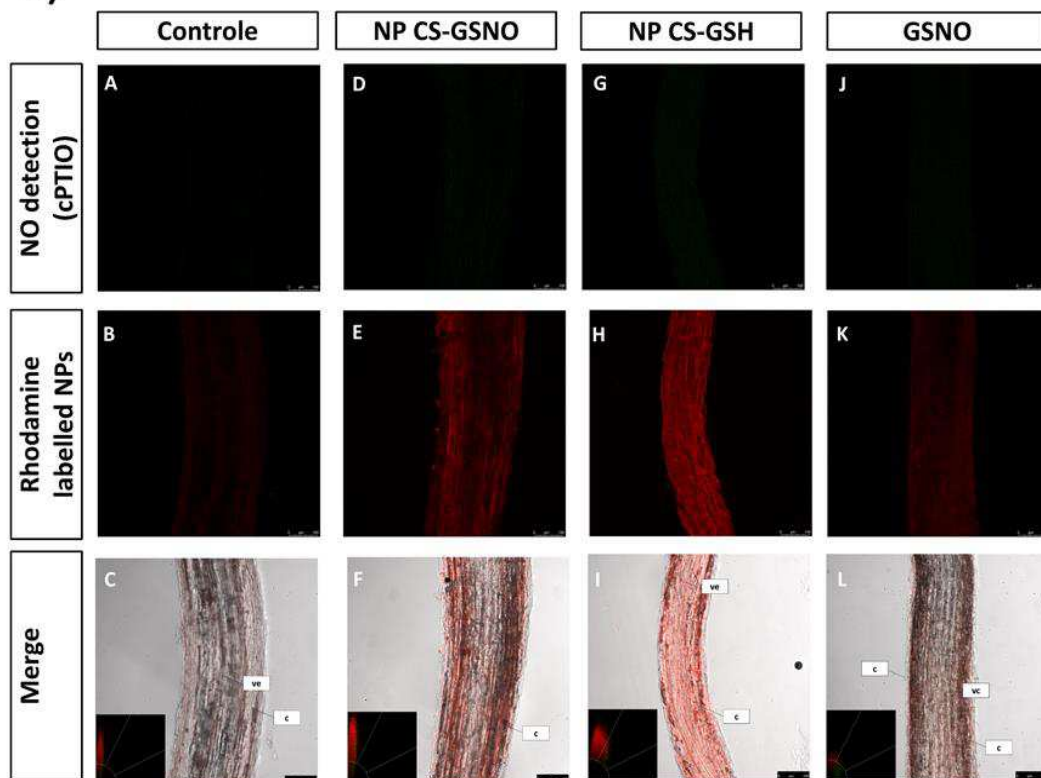


Fig 8. Imagens representativas ilustrando a co-localização confocal microscópica de NO e da rodamina

em 20x da zona de ramificação radicular (zona perto do colo) de plantas de soja (*Glycine max* L. Merr.) após 24 horas de exposição a água destilada (CONTROLE), nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSH e NP CS-GSNO) e GSNO. I) Sonda fluorescente de NO (DAF-2DA), II) Sequestrador de NO (cPTIO). Região do córtex (c), epiderme (ep), cilindro vascular (vc), elementos de vaso (ve). Barras = 100 μ m.

Entretanto, o movimento interno dos nanocarreadores nas plantas depende da permeabilidade vascular dessas partículas e, possivelmente, das taxas de transpiração e acompanhando do fluxo de água (SCHWABE et al., 2015; PÉREZ-DE-LUQUE, 2017; WU et al., 2022). Além disso, carga positiva das NP CS-GSNO pode influenciá-los a concentrar-se nas raízes, devido às interações maximizadas com as células da epiderme, o que justifica o acúmulo como uma função do tempo apenas nesta região.

No geral, esses resultados reforçam a capacidade das nanopartículas de quitosana de aderir mais fortemente à superfície da raiz, enquanto também demonstram sua capacidade de serem absorvidas e internalizadas, liberando NO de forma gradual e contínua, o que é crucial para aplicações agrícolas eficazes. No entanto, são necessários estudos futuros para investigar o potencial de outros polímeros e diferentes regiões da planta ao longo do tempo.

4.3.2 Análises Bioquímicas

NP CS-GSNO e NP CS-GSH aumentaram o teor de RSNO nas raízes após 30 min (Figura 9). Com 24 h, o teor de RSNO nas raízes foi maior para as NP CS-GSH com NO. Na raiz, com 24 h, o conteúdo de RSNO foi, aproximadamente 30% maior em NP CS-GSNO do que o de plantas tratadas apenas com GSNO. Os resultados possibilitam inferir que o tratamento com NP CS GSNO permitiu manter um aumento persistente do conteúdo endógeno de RSNO na raiz, considerando que independentemente do intervalo avaliado manteve um maior teor de RSNO.

do Carmo et al (2021) mostraram que o S-nitroso-MSA nanoencapsulado levou à proteção eficaz de mudas de *H. popayanensis* contra o estresse hídrico em comparação com o doador de NO livre. Além disso, foi possível observar um aumento no conteúdo de RSNO na raiz em comparação com o das plantas em déficit tratadas com doador livre ou NPs carregadas com MSA sem NO.

Em plantas de milho (*Zea mays*) expostas à salinidade, a aplicação de nanopartículas às raízes protegeu contra os efeitos deletérios do estresse,

aumentando os níveis de S-nitrosotióis da folha (OLIVEIRA et al. 2016). Em cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), os efeitos do estresse hídrico foram atenuados pela aplicação foliar das nanopartículas doadoras de NO, resultando no aumento da taxa fotossintética e da biomassa das raízes (SILVEIRA et al., 2019). Aqui, similar ao relatado pelos autores, nos observamos aumento no conteúdo de RSNO nas raízes de soja apenas para as nanopartículas contendo NO.

NP CS-GSNO, resultaram em aumentos significativos nos parâmetros morfológicos em plantas de soja. Os autores mostraram ainda uma redução nos níveis de MDA e H₂O₂ após o tratamento com 50 µM sob condições de estresse hídrico, atenuando os efeitos do estresse (METHELA et al., 2024).

Os níveis persistentes de RSNO sugere que o tratamento com NP CS-GSNO pode proporcionar uma liberação contínua de NO, contribuindo para a regulação de processos fisiológicos importantes na planta. Esses resultados podem indicar o potencial dessas nanopartículas como uma estratégia eficaz para aumentar os níveis de RSNO e modular a sinalização do NO nas plantas. O aumento da bioatividade está provavelmente associado à liberação sustentada desse NO e à proteção contra a degradação fornecida pelos nanocarreadores. É importante ressaltar que, embora o NO não tenha apresentado significância nos estudos utilizando microscopia confocal após 24 h, (dados quantitativos) os níveis de RSNO mostraram-se significantes. Este resultado era esperado, uma vez que os RSNOs funcionam como importantes reservatórios de NO nas plantas, desempenhando papéis cruciais em diversas vias metabólicas e processos fisiológicos. Assim, enquanto o NO livre pode não ter sido detectável pelo método de fluorescência utilizado, a presença de RSNOs sugere uma reserva eficaz em intervalos de exposição maiores desse importante sinalizador biológico nas células vegetais.

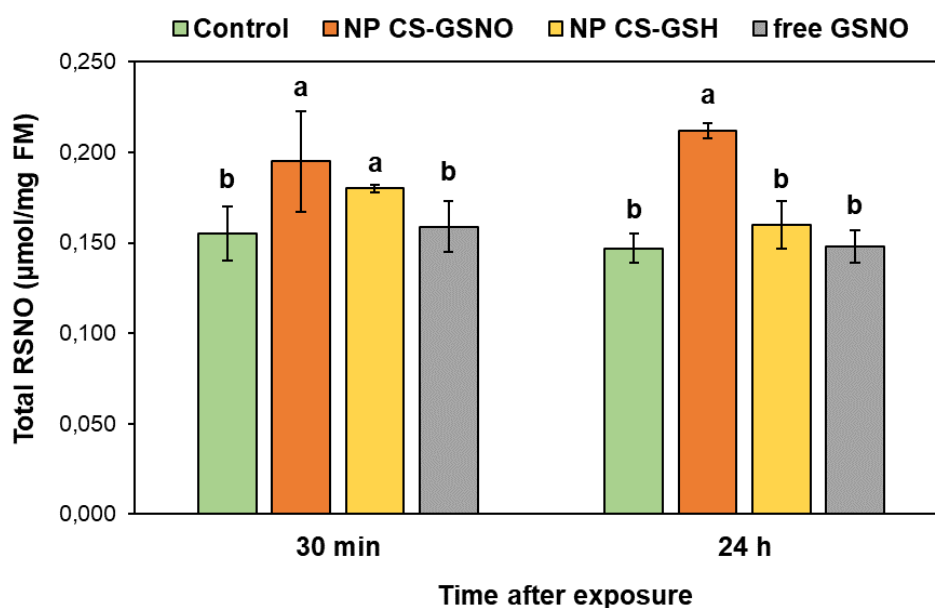


Fig 9. Conteúdo de S-nitrosotiois (RSNO) em raízes de *Glycine max* L. Merr coletadas com 30 min e 24 h após exposição das formulações: Controle (água destilada), nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSH e NP CS-GSNO) e GSNO livre. Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão ($n = 5$). Letras diferentes na coluna indicam médias diferentes com base na ANOVA seguida pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Com 30 min, os teores de H_2O_2 na raiz não diferiram significativamente entre os tratamentos, com exceção de NP CS-GSNO, que demonstrou níveis mais altos quando comparado às demais formulações (Figura 10). Na raiz, com 24 h, os níveis de H_2O_2 não diferiram significativamente entre os tratamentos controle e GSNO livre. Valores significativamente mais baixos foram observados para as NP CS-GSH com/sem NO. O conteúdo de MDA (Figura 10 B) na raiz não foi significativo na análise de variância em nenhum dos intervalos avaliados, sugerindo que os tratamentos não induziram estresse oxidativo na raiz, ou seja, que ausência de danos oxidativos aos lipídios celulares.

De forma geral, os resultados mostraram que o NP CS-GSNO levou a um aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) imediatamente após a exposição, em comparação com o doador de NO livre. Isso sugere que as nanopartículas de quitosana, quando carregadas com GSNO, podem ter um efeito mais pronunciado (nas primeiras horas) na ativação dos mecanismos de sinalização celular das plantas em comparação com a forma livre de GSNO. Este aumento transitório de H_2O_2 pode indicar uma resposta inicial a formulação em específico, sugerindo um papel sinalizador em processos celulares, e não necessariamente como estresse oxidativo prolongado. O fato de não ter sido observado um aumento

significativo nos níveis de malondialdeído (MDA), um biomarcador comumente usado para avaliar o estresse oxidativo devido à peroxidação lipídica, sugere que os tratamentos não causaram danos oxidativos extensivos aos lipídios celulares.

Alguns autores vêm demonstrando efeitos positivos quanto aos parâmetros de estresse oxidativo na soja após a exposição as nanopartículas. Methela et al. (2024) mostraram a redução nos teores de H_2O_2 e MDA após tratamento com 50 μM NP CS-GSNO sob condições de estresse hídrico. Já, do Carmo et al. (2021) mostraram que tanto as nanoformulações quando os doadores não encapsulados diminuíram o estresse oxidativo nas raízes de *H. popayanensis*. Em suma, esses dados sugerem que as NP CS-GSNO são eficazes na entrega controlada de NO, podendo contribuir para a modulação dos processos fisiológicos das plantas sem comprometer sua integridade celular.

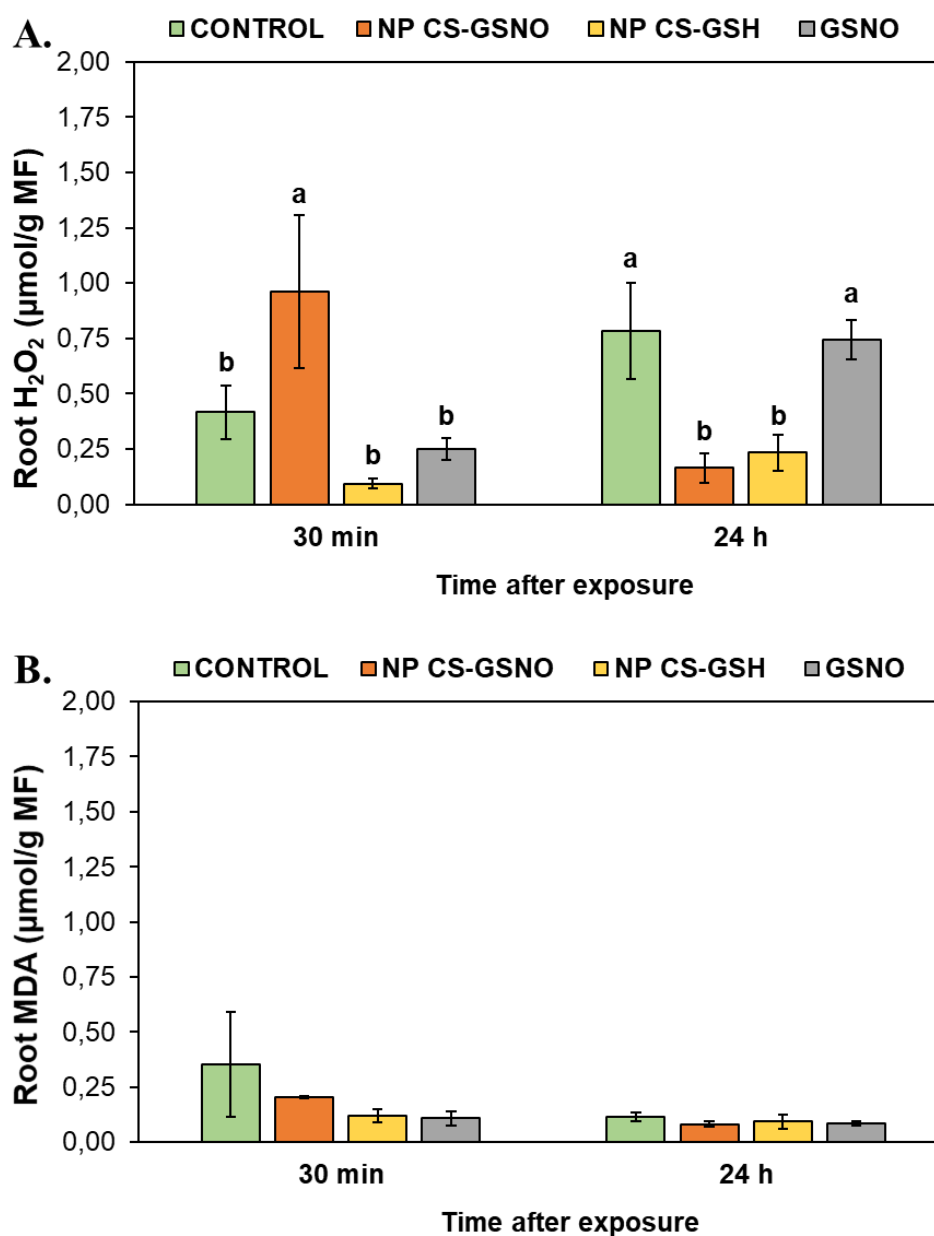


Fig 10. (A) Teores de H_2O_2 e (B) conteúdo de malondialdeído em raízes de *Glycine max* L. Merr coletadas com 30 min e 24 h após exposição das formulações: Control (água destilada), nanopartículas de quitosana com e sem NO (NP CS-GSH e NP CS-GSNO) e GSNO livre. Os valores representam as médias $\pm$ erro padrão ($n = 5$). Letras diferentes acima das barras indicam médias diferentes com base na ANOVA seguida pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$).

Em um contexto geral, estes resultados reforçam o efeito positivo da nanoencapsulação na bioatividade do NO. Além disso, os dados nos permitem inferir que essas nanopartículas podem liberar óxido nítrico de forma gradual e sustentada, proporcionando um estímulo para a ativação dos mecanismos sinalizadores da planta. Além disso, as NP CS-GSNO e as NP CS-GSH com NO aumentaram os níveis de RSNO nas raízes após 30 minutos e mantiveram níveis elevados após 24 horas,

indicando um aumento persistente do conteúdo endógeno de RSNO. Esses achados destacam o potencial das nanopartículas de quitosana como veículos eficazes para a entrega de NO.

Que estudos podem ser feitos em sequência para avançar o conhecimento na área?

4.4 CONCLUSÃO

A integração de múltiplas análises foi uma combinação viável para localizar NP CS-GSNO em plantas, ajudando a compreender as vias de absorção e transporte das nanopartículas bem como a nanoencapsulação afeta a biodisponibilidade do NO nas raízes de plantas de soja. As nanopartículas de quitosana com NO foram mais absorvidas pelas raízes, inicialmente, nas camadas mais superficiais, mas resultando em níveis mais elevados de NO e de RSNOs nessas estruturas vegetais. Esses achados destacam o potencial das nanotecnologias na agricultura, oferecendo insights valiosos para futuras estratégias de manejo de culturas agrícolas. Visando a otimização do crescimento e produtividade das plantas o uso de nanopartículas contendo doador de NO mostrou-se um sistema eficiente em termos de absorção, transporte e biodisponibilidade da molécula. Mas, enfatizamos a necessidade de uma abordagem técnica, analítica e prática para o desenvolvimento de nanossistemas mais eficientes, considerando fatores como propriedades físico-química dos nanocarreadores, espécies-alvo e vias de absorção.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-AZIZ; H. MM.; HASANEEN, M. NA.; OMER, A. M. Nano chitosan-NPK fertilizer enhances the growth and productivity of wheat plants grown in sandy soil. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 14, p. 17, 2016.
- BAI, T. ZHANG, P. GUO, Z. CHETWYND, A. J. ZHANG, M. ADEEL, M. LI, M. GUO, K. GAO, R. LI, J. HAO, Y. RUI, Y. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 25542-25551, 2021.
- BESSON-BARD, A.; PUGIN, A. AND WENDEHENNE, D. New insights into nitric oxide signaling in plants. **Annual Review of Plant Biology**.; v 59, p. 21-39, 2008.
- BOMBO, A. B.; PEREIRA, A. E. S.; LUSA, M. G.; DE MEDEIROS OLIVEIRA, E.; DE OLIVEIRA, J. L.; CAMPOS, E. V. R.; JESUS, M. B de.; OLIVEIRA, H.C.; de.; FRACETO, L. F.; MAYER, J. L. S. A mechanistic view of interactions of a nanoherbicide with target organism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, p. 4453-4462, 2019.
- CARVALHO, L. B.; GODOY, I. S.; PREISLER, A. C.; DE FREITAS PROENÇA, P. L.; SARAIVA-SANTOS, T.; VERRI, W. A.; OLIVEIRA, H. C; FRACETO, L. F. Pre-emergence herbicidal efficiency and uptake of atrazine-loaded zein nanoparticles: a sustainable alternative to weed control. **Environmental Science: Nano**, v.10, p. 1629-1643, 2023.
- do CARMO, G. C.; IASTRENSKI, L. F.; DEBIASI, T. V.; DA SILVA, R. C.; GOMES, D. G.; PELEGRINO, M. T.; OLIVEIRA, H. C. Nanoencapsulation improves the protective effects of a nitric oxide donor on drought-stressed *Heliocarpus popayanensis* seedlings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 225, p. 112713, 2021.
- FORINI MM, PONTES MS, ANTUNES DR, DE LIMA PH, SANTOS JS, SANTIAGO EF, GRILLO R. Nano-enabled weed management in agriculture: From strategic design to enhanced herbicidal activity. **Plant Nano Biology**. v.1, p. 100008, 2022.
- GUPTA KJ, MUR LA, WANY A, KUMARI A, FERNIE AR, RATCLIFFE RG. The role of nitrite and nitric oxide under low oxygen conditions in plants. **New Phytologist**, v. 225, p. 1143-51, 2020.
- KHAN, M.; ALI, S.; AL AZZAWI, T. N. I.; YUN, B. W. Nitric Oxide Acts as a Key Signaling Molecule in Plant Development under Stressful Conditions. **International journal of molecular sciences**, v. 24, p. 4782, 2023.

- KOLBERT, Z.; LINDERMAYR, C.; LOAKE, G. J. The role of nitric oxide in plant biology: current insights and future perspectives. **Journal of Experimental Botany**, v. 72, p. 777-780, 2021.
- LI, R.; HE, J.; XIE, H.; WANG, W.; BOSE, S. K.; SUN, Y.; HU, J.; YIN H. Effects of chitosan nanoparticles on seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 126, p. 91-100, 2019.
- LIU, J.; LIU, W.; XU, M.; WANG, B.; ZHOU, Z.; WANG, L. Sensitive detection of Au (III) using regenerative rhodamine B–functionalized chitosan nanoparticles. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 233, p. 361-368, 2016.
- LOPES-OLIVEIRA, P. J.; GOMES, D. G.; PELEGRINO, M. T.; BIANCHINI, E. PIMENTA, J. A.; STOLF-MOREIRA, R.; SEABRA, A.M.; OLIVEIRA, H. C. Effects of nitric oxide-releasing nanoparticles on neotropical tree seedlings submitted to acclimation under full sun in the nursery. **Scientific Reports**, v. 9, p. 1-10, 2019.
- MA, X.; YAN, J. Plant uptake and accumulation of engineered metallic nanoparticles from lab to field conditions. **Current Opinion In Environmental Science & Health**, v. 6, p. 16-20, 2018.
- LV, J.; ZHANG, S.; LUO, L.; ZHANG, J.; YANG, K.; CHRISTIE, P. Accumulation, speciation and uptake pathway of ZnO nanoparticles in maize. **Environmental Science: Nano**, v. 2, p. 68-77, 2015.
- METHELA, N. J. ISLAM, M. S. LEE, D. S. YUN, B. W.; MUN, B. G. S-nitrosoglutathione (GSNO)-mediated lead detoxification in soybean through the regulation of ROS and metal-related transcripts. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24(12), p. 9901, 2023.
- OLIVEIRA, H. C.; GOMES, B. C. R.; PELEGRINO, M. T.; SEABRA, A. B. Nitric oxide-releasing chitosan nanoparticles alleviate the effects of salt stress in maize plants. **Nitric Oxide**, v. 61. p. 10-19, 2016.
- OLIVEIRA, S. B. L.; RISTROPH, L. K. D. Critical Review: Uptake and Translocation of Organic Nanodelivery Vehicles in Plants. **Environmental Science & Technology**, v. 58, p. 5646-5669, 2024.
- PELEGRINO, M.T.; PIERETTI, J.C.; LANGE, C.N.; KOHATSU, M.Y.; FREIRE, B.M.; BATISTA, B.L.; FINCHEIRA, P.; TORTELLA, G.R.; RUBILAR, O.; SEABRA, A.B. Foliar spray application of CuO nanoparticles (NPs) and S-nitrosoglutathione enhances productivity, physiological and biochemical parameters of lettuce

plants. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 96, p. 2185-2196, 2021.

PELEGRINO M. T.; WELLER R. B, CHEN X.; BERNARDES J. S.; SEABRA A. B. Chitosan nanoparticles for nitric oxide delivery in human skin. **Medicinal Chemistry Communincations**, v. 8, p. 713-9, 2017.

PÉREZ-DE-LUQUE, A.; Interaction of nanomaterials with plants: what do we need for real applications in agriculture? **Frontiers in Environmental Science**, v. 5, p. 12, 2017.

PREISLER, A. C.; CARVALHO, L. B.; SARAIVA-SANTOS, T.; VERRI JR, W. A.; MAYER, J. L. S.; FRACETO, L. F.; DALAZEN, G.; OLIVEIRA, H. C. Interaction of nanoatrazine and target organism: evaluation of fate and photosystem II inhibition in hydroponically grown mustard (*Brassica juncea*) plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, p. 7644-7652, 2022.

RISTROPH, K. D.; ASTETE, C. E.; BODOKI, E.; SABLIOV, C. M. Zein nanoparticles uptake by hydroponically grown soybean plants. **Environmental Science Technology**, v. 51, p. 14065–14071, 2017.

SEABRA, A. B. FABBRI, G. K. PELEGRINO, M. T. SILVA, L. C. RODRIGUES, T. Synthesis, characterization and cytotoxicity of S-nitroso-mercaptosuccinic acid-containing alginate/chitosan nanoparticles. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 838, p. 012032, 2017.

SEABRA, A. B.; SILVEIRA, N. M. RIBEIRO, R. V. PIERETTI, J. C. BARROSO, J. B. CORPAS, F. J. OLIVEIRA, H. C. Nitric oxide-releasing nanomaterials: from basic research to potential biotechnological applications in agriculture. **New Phytologist**, v. 234, p. 1119-1125, 2022.

SCHWABE, F.; TANNER, S.; SCHULIN, R.; ROTZETTER, A.; STARK, W.; VON QUADT, A.; NOWACK, B. Dissolved cerium contributes to uptake of Ce in the presence of differently sized CeO₂-nanoparticles by three crop plants. **Metallomics**, v. 7, p. 466-477, 2015.

SCHYMURA, S.; FRICKE, T.; HILDEBRAND, H.; FRANKE, K. Elucidating the role of dissolution in CeO₂ nanoparticle plant uptakeby smart radiolabeling, **Angewandte Chemie International Edition**, v. 56, p. 7411-7414, 2017.

SILVEIRA, N. M. SEABRA, A. B. MARCOS, F. C. PELEGRINO, M. T. MACHADO, E. C. RIBEIRO, R. V. Encapsulation of S-nitrosogluthathione into chitosan nanoparticles improves drought tolerance of sugarcane plants. **Nitric Oxide**, v.84, p. 38-44, 2019.

- SINGH, R. P.; HANDA, R.; MANCHANDA, G. Nanoparticles in sustainable agriculture: An emerging opportunity. **Journal of Controlled Release**, v. 329, p. 1234-1248, 2021.
- WANG, S. Y.; HERRERA-BALANDRANO, D. D.; JIANG, Y. H.; SHI, X. C.; CHEN, X.; LIU, F. Q.; LABORDA, P. Application of chitosan nanoparticles in quality and preservation of postharvest fruits and vegetables: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 22, p. 1722-1762, 2023.
- WU, H.; LI, Z. Nano-enabled agriculture: How do nanoparticles cross barriers in plants? **Plant Commun**, v. 3, p. 100346, 2022.
- ZHANG, Y.; MARTINEZ, M. R.; SUN, H.; SUN, M.; YIN, R.; YAN, J.; LOWRY, G. V. Charge, Aspect Ratio, and Plant Species Affect Uptake Efficiency and Translocation of Polymeric Agrochemical Nanocarriers. **Environmental Science & Technology**, v. 133, p.107955, 2023.
- ZHAO, L.; PERALTA-VIDEA, J. R.; REN, M.; VARELA-RAMIREZ, A.; LI, C.; HERNANDEZ-VIEZCAS, J. A.; AGUILERA, R.J.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Transport of Zn in a sandy loam soil treated with ZnO NPs and uptake by corn plants: Electron microprobe and confocal microscopy studies. **Chemical Engineering Journal**, v. 184, p. 1-8, 2012.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

*Statistical Analyses***Supplementary Table 2** Analysis of variance and *p* values.

Time after exposure	Figure number	F value	ANOVA	Normality test	Homogeneity test
30 minutes	Fig. 2 A	3.500	0.0105*	0.0952	0.1154
24 hours	Fig. 2 B	2.373	0.0509*	0.1402	0.2482
30 minutes	Fig. 9	6.587	0.0009*	0.4313	0.2566
24 hours		7.616	0.0002*	0.5290	0.7342
30 minutes	Fig. 10 A	12.160	0.0000*	0.8160	0.7145
24 hours		6,350	0.0048*	0.2666	0.0629
30 minutes	Fig. 10 B	0.9623	0.4345 ^{ns}	0.1040	0.3166
24 hours		0.4583	0.7152 _{ns}	0.1566	0.4444

^{ns} represents non-significative ($p > 0.05$); * means were compared using the Scott-Knott test ($p < 0.05$)

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste estudo, exploramos o potencial das nanopartículas doadoras de NO como uma estratégia inovadora para otimizar o desempenho de cultivos comerciais, como a soja. Aqui, foi possível observar melhorias significativas na germinação, crescimento inicial, arquitetura radicular, nodulação e nos parâmetros bioquímicos, como o conteúdo de RSNO. Foi possível ainda identificar a influência da carga e da composição da nanopartícula durante todos esses processos. Além disso, investigamos mais detalhadamente através de imagens obtidas por microscopia confocal as vias absorção, distribuição, transporte e homeostase do NO. As imagens demonstraram que a absorção pela raiz em sistema hidropônico ocorre logo nos primeiros 30 minutos após exposição. Se considerarmos o fato de que a absorção da nanopartícula é maior que a da molécula não nanoencapsulada (GSNO livre), isso poderia reduzir a perda por rápida degradação ou a porção adsorvida, tornando as NPs mais disponível para a planta. Estes resultados destacam o potencial das nanopartículas de NO não apenas como uma ferramenta importante para a agricultura, mas também como um campo de pesquisa em expansão que requer investigações mais aprofundadas tais como:

- i. investigar os níveis de NO em outras regiões da planta, como por exemplo a parte aérea;
- ii. avaliar a influência das espécies na interação nanopartícula-planta considerando um ambiente sem estresse;
- iii. avaliar a interação nanopartícula-planta em condição de estresse ambiental visando compreender como as nanopartículas doadoras de NO ajudam a mitigar os efeitos negativos em plantas sob estresse;
- iv. investigar o comportamento em diferentes formas de aplicação.