



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

JEAN CARLO BAUDRAZ DE PAULA

**TRATAMENTO DE SEMENTES COM ÁCIDO GIBERÉLICO E
ÓXIDO NÍTRICO LIVRES E NANOENCAPSULADOS NA
GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE *DYCKIA* spp.
(BROMELIACEAE)**

JEAN CARLO BAUDRAZ DE PAULA

**TRATAMENTO DE SEMENTES COM ÁCIDO GIBERÉLICO E
ÓXIDO NÍTRICO LIVRES E NANOENCAPSULADOS NA
GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE *DYCKIA* spp.
(BROMELIACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Tadeu de Faria
Coorientador: Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira

Londrina
2022

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

de Paula, Jean Carlo Baudraz.

Tratamento de sementes com ácido giberélico e óxido nítrico livres e nanoencapsulados na germinação e crescimento inicial de *Dyckia* spp. (Bromeliaceae) / Jean Carlo Baudraz de Paula. - Londrina, 2022.
149 f. : il.

Orientador: Ricardo Tadeu de Faria.

Coorientador: Halley Caixeta de Oliveira.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Bromélia - Tese. 2. Nanotecnologia - Tese. 3. Reguladores do crescimento vegetal - Tese. I. Faria, Ricardo Tadeu de. II. de Oliveira, Halley Caixeta. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 63

JEAN CARLO BAUDRAZ DE PAULA

**TRATAMENTO DE SEMENTES COM ÁCIDO GIBERÉLICO E
ÓXIDO NÍTRICO LIVRES E NANOENCAPSULADOS NA
GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE *DYCKIA* spp.
(BROMELIACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Tadeu de Faria
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Cristiano Medri
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Lúcia Sadayo Assari Takahashi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Adriane Marinho de Assis
Universidade Federal de Pelotas - UFPel

Prof^a. Dr^a. Amedea Barozzi Seabra
Universidade Federal do ABC - UFABC

Londrina, 02 de Junho de 2022.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades, aos meus pais Denilson e Matilde, pois sem eles eu não chegaria até aqui, através de seus ensinamentos, amor, incentivo e apoio incondicional. Vocês foram essenciais para minha formação. Agradeço também as minhas irmãs Larissa e Letícia, e demais membros da família, em especial meus avôs, João (in memória), Iraci, Louis e Nair, por serem minha base e terem feito parte desta trajetória.

À minha noiva Ana Carolina, que me apoiou, soube compreender quando eu não podia estar presente, me incentivou e esteve comigo para superar todas as dificuldades. Obrigado por ter permitido que eu não desistisse dessa jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Tadeu de Faria, pelo empenho e parceria na elaboração deste trabalho. À Universidade Estadual de Londrina, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pelo acolhimento e interesse demonstrado na execução e conclusão deste trabalho. Também agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo suporte financeiro através da concessão da bolsa.

Aos meus amigos de laboratório Gianne, Gabriel, Rodrigo, Júnior, Hugo e Oswaldo, cujo apoio e amizade estiveram presentes em todos os momentos. E a todos os demais colegas de laboratório que se fizeram presentes nesta caminhada.

Ao Dr. Walter Miguel Kranz, talvez não existam palavras suficientes e significativas que me permitam agradecer com o devido merecimento, por uma demonstração de humildade ao transmitir seus conhecimentos e fornecimento dos principais materiais necessários para que este trabalho fosse realizado, sem você este não se tornaria possível.

E a todos aqueles que não foram citados, mas que direta ou indiretamente contribuíram e tornaram possível a conclusão deste trabalho, o meu muito obrigado.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

DE PAULA, Jean Carlo Baudraz. **Tratamento de sementes com ácido giberélico e óxido nítrico livres e nanoencapsulados na germinação e crescimento inicial de *Dyckia* spp. (Bromeliaceae)**. 2022. 151f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

As bromélias ocorrem quase exclusivamente no continente americano e *Dyckia* sp. é composto principalmente por espécies nativas do Brasil. A utilização de espécies nativas no mercado de plantas ornamentais é tendência, entretanto, mesmo o Brasil detendo a flora mais biodiversa do planeta, boa parte das espécies produzidas e comercializadas no mercado brasileiro é exótica. Uma mudança nesse cenário demanda informações que possibilitem a domesticação e produção em larga escala de espécies potencialmente ornamentais. Em *Dyckia*, é comum que as espécies exibam grande produção de sementes com viabilidade que decresce rapidamente. A aplicação exógena de reguladores, como o ácido giberélico (GA₃) e o óxido nítrico (NO), são alternativas rápidas e eficazes para melhorar o desempenho das sementes, no entanto, por serem sujeitos a degradação, a nanoencapsulação visa a proteção destes reguladores. Desse modo, o trabalho teve o objetivo de avaliar o efeito do GA₃ e NO na germinação de sementes de *Dyckia cabreriae*, *D. dusenii*, *D. pottiorum* e *D. walteriana*; e o efeito da nanoencapsulação do GA₃ e NO na germinação de *D. walteriana*. O trabalho foi realizado em três etapas, sendo que, no experimento A, foram avaliados o efeito do GA₃ livre na germinação das quatro espécies e a curva de embebição das sementes e para o GA₃ nanoencapsulado, somente utilizada *D. walteriana*. Em ambos os testes, as sementes foram submetidas às doses: controle (0 mg L⁻¹), 0,25 mg L⁻¹, 0,5 mg L⁻¹, 0,75 mg L⁻¹, 1,0 mg L⁻¹, 2,5 mg L⁻¹ e 5,0 mg L⁻¹. No experimento B, foram avaliadas doses do doador de NO S-nitrosoglutationa (GSNO), sendo: controle (0 mM), 1,25 mM, 2,5 mM, 5,0 mM, 10,0 mM, 15,0 mM e 20,0 mM na germinação das quatro espécies. Para o experimento C foram utilizadas as mesmas doses de GSNO citadas anteriormente, avaliando-se o GSNO livre e nanoencapsulado para a espécie *D. walteriana*. Também foi realizado o teste de envelhecimento acelerado (E.A) e avaliados os teores de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malondialdeído (MDA). Em todos os experimentos, foram avaliados diferentes parâmetros de germinação. No experimento A, somente *D. dusenii* e *D. walteriana* apresentaram diferença na germinação em resposta ao GA₃. Para *D. dusenii* a melhor resposta foi para dose de 5,0 mg L⁻¹, enquanto para *D. walteriana* variou entre 4,4 e 5,0 mg L⁻¹. A nanoencapsulação de GA₃ resultou em respostas nas menores doses, entre 0,75 e 1,0 mg L⁻¹ para *D. walteriana*. As sementes das quatro espécies apresentaram comportamento trifásico de embebição de água. No experimento B, *D. dusenii* e *D. walteriana* responderam aos tratamentos com GSNO, com germinação de 35-36% para 58-63% nas doses estimadas de 3,7 e 6,7 mM, respectivamente. No experimento C, o E.A reduziu a germinação (26%) e com GSNO variou de 53-61%. O GSNO estimulou a produção de clorofilas e carotenoides. O E.A aumentou os teores de H₂O₂ e MDA, no entanto, o GSNO atenuou este efeito negativo. A aplicação de GA₃ e NO se mostrou eficaz e a nanoencapsulação uma estratégia para a melhoria da germinação de espécies do gênero *Dyckia*.

Palavras-chave: Bromélia. Nanotecnologia. Reguladores de crescimento vegetal.

DE PAULA, Jean Carlo Baudraz. **Seed treatment with free and nanoencapsulated gibberellic acid and nitric oxide on germination and initial growth of *Dyckia* spp. (Bromeliaceae).** 2022. 151f. Tese (Doutorado em Agronomia) - State University of Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Bromeliads occur almost exclusively on the American continent and *Dyckia* sp. is composed mainly of species native to Brazil. The use of native species in the ornamental plant market is a trend, however, even though Brazil has the most biodiverse flora on the planet, most of the species produced and sold in the Brazilian market are exotic. A change in this scenario demands information that allows the domestication and large-scale production of potentially ornamental species. In *Dyckia*, it is common for species to exhibit large seed production with rapidly decreasing viability. The exogenous application of regulators, such as gibberellic acid (GA₃) and nitric oxide (NO), are fast and effective alternatives to improve seed performance, however, as they are subject to degradation, nanoencapsulation aims to protect these regulators. Thus, the objective of this work was to evaluate the effect of GA₃ and NO on the germination of seeds of *Dyckia cabreræ*, *D. dusenii*, *D. pottiorum* and *D. walteriana*; and the effect of GA₃ and NO nanoencapsulation on *D. walteriana* germination. The work was carried out in three stages. In experiment A, the effect of free GA₃ on the germination of the four species and the seed imbibition curve were evaluated, and for the nanoencapsulated GA₃, only *D. walteriana* was used. In both tests, the seeds were submitted to doses: control (0 mg L⁻¹), 0.25 mg L⁻¹, 0.5 mg L⁻¹, 0.75 mg L⁻¹, 1.0 mg L⁻¹, 2.5 mg L⁻¹ and 5.0 mg L⁻¹. In experiment B, doses of the NO S-nitrosoglutathione (GSNO) donor were evaluated: control (0 mM), 1.25 mM, 2.5 mM, 5.0 mM, 10.0 mM, 15.0 mM and 20.0 mM in the germination of the four species. For experiment C, the same doses of GSNO mentioned above were used, evaluating the free and nanoencapsulated GSNO for the species *D. walteriana*. The accelerated aging test (E.A) was also performed and the levels of hydrogen peroxide (H₂O₂) and malondialdehyde (MDA) were evaluated. In all experiments, different germination parameters were evaluated. In experiment A, only *D. dusenii* and *D. walteriana* showed differences in germination in response to GA₃. For *D. dusenii* the best response was for a dose of 5.0 mg L⁻¹, while for *D. walteriana* it varied between 4.4 and 5.0 mg L⁻¹. GA₃ nanoencapsulation resulted in responses at the lowest doses, between 0.75 and 1.0 mg L⁻¹ for *D. walteriana*. The seeds of the four species showed a triphasic behavior of water imbibition. In experiment B, *D. dusenii* and *D. walteriana* responded to GSNO treatments, with germination from 35-36% to 58-63% at estimated doses of 3.7 and 6.7 mM, respectively. In experiment C, E.A reduced germination (26%) and with GSNO it ranged from 53-61%. GSNO stimulated the production of chlorophylls and carotenoids. The E.A increased the levels of H₂O₂ and MDA, however, the GSNO attenuated this negative effect. The application of GA₃ and NO proved to be effective and nanoencapsulation a strategy to improve the germination of species of the genus *Dyckia*.

Key words: Bromeliad. Nanotechnology. Plant growth regulator.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1.1 - Distribuição geográfica de espécies da família Bromeliaceae.....	16
Figura 2.2.1 – Distribuição geográfica do gênero <i>Dyckia</i> Schult. & Schult.f.....	20
Figura 2.2.2 - Cápsulas abertas expondo sementes de <i>Dyckia</i> spp.....	21
Figura 2.2.3 - Sementes de <i>Dyckia</i> spp. coletadas na propriedade do colecionador em Londrina/PR.....	21
Figura 2.2.1.1 - <i>Dyckia cabrerae</i> L.B.Smith & Reitz na coleção particular do Dr. Walter Kranz, Londrina, PR.....	22
Figura 2.2.2.1 - <i>Dyckia dusenii</i> L.B.Smith na coleção particular do Dr. Walter Kranz, Londrina, PR.....	23
Figura 2.2.3.1 - <i>Dyckia pottiorum</i> Leme. na coleção particular do Dr. Walter Kranz, Londrina, PR.....	24
Figura 2.2.4.1 - <i>Dyckia walteriana</i> Leme na coleção particular do Dr. Walter Kranz, Londrina, PR.....	24
Figura 2.4.1. - Plantas de <i>Dyckia</i> sp em suas variadas formas e colorações.....	28
Figura 2.5.1 - Fases da germinação de sementes.....	30
Figura 2.6.1.1 - Estrutura química do ácido giberélico (GA ₃).....	33
Figura 3.1.1 - Sementes das espécies em estudo colhidas em campo.....	48
Figura 3.2.1.1 - Representação do complexo alginato-quitosana e íons cálcio.....	50
Figura 3.2.2.1 - Estrutura das nanopartículas (NPs) contendo a S-nitrosoglutationa (GSNO).....	51
Figura 3.3.1 - Representação de semente de <i>Dyckia</i> sp. viável (A), inviável (B) e vazia (C).....	52

Figura 4.4.1 - Massa seca de plântulas (MSP) de <i>D. cabreræ</i> em função de doses de ácido giberélico (GA ₃).....	63
Figura 4.4.2 - Germinação (GER) (A), índice de velocidade de germinação (IVG) (B), tempo médio de germinação (TMG) (C), primeira contagem de germinação (PCG) (D), comprimento (CP) (E) e massa seca de plântulas (MSP) (F) de <i>D. dusenii</i> em função de doses de ácido giberélico (GA ₃).....	64
Figura 4.4.3 - Tempo médio de germinação (TMG) (A), primeira contagem de germinação (PCG) (B), comprimento (CP) (C) e massa seca de plântulas (MSP) (D) de <i>D. pottiorum</i> em função de doses de ácido giberélico (GA ₃).....	65
Figura 4.4.4 - Germinação (GER) (A), índice de velocidade de germinação (IVG) (B), tempo médio de germinação (TMG) (C), primeira contagem de germinação (PCG) (D), comprimento (CP) (E) e massa seca de plântulas (MSP) (F) de <i>D. walteriana</i> em função de doses de ácido giberélico (GA ₃).....	66
Figura 4.4.5 - Curva de absorção de água pelas sementes de <i>Dyckia cabreræ</i> sem (A) e com GA ₃ (B) e <i>Dyckia pottiorum</i> sem (C) e com GA ₃ (D) na dose de 0,75 mg L ⁻¹	67
Figura 4.4.6 - Curva de absorção de água pelas sementes de <i>Dyckia dusenii</i> sem (A) e com GA ₃ (B) e <i>Dyckia walteriana</i> sem (C) e com GA ₃ (D) na dose de 5 mg L ⁻¹	68
Figura 4.4.7 - Germinação (GER) (A) e primeira contagem de germinação (PCG) (B) de sementes de <i>Dyckia walteriana</i> em função de diferentes doses e tipos de formulação de ácido giberélico (GA ₃).....	70
Figura 4.4.8 - Índice de velocidade de germinação (IVG) (A) e tempo médio de germinação (TMG) (B) de sementes de <i>Dyckia walteriana</i> em função de diferentes doses e tipos de formulação de ácido giberélico (GA ₃).....	70
Figura 4.4.9 - Comprimento (CP) (A) e massa seca (MSP) (B) de plântulas de <i>Dyckia walteriana</i> em função de diferentes doses e tipos de formulação de ácido giberélico (GA ₃).....	71
Figura 5.4.1 - Comprimento (CP) (A) e massa seca de plântulas (MSP) (B) de <i>D. cabreræ</i> em função de doses do doador de óxido nítrico S-nitrosoglutaciona (GSNO).....	90
Figura 5.4.2 - Índice de velocidade de germinação (IVG) (A), comprimento (CP) (B) e massa seca de plântulas (MSP) (C) de <i>D. pottiorum</i> em função de doses do doador de óxido nítrico S-nitrosoglutaciona (GSNO).....	91
Figura 5.4.3 - Germinação (GER) (A), índice de velocidade de germinação (IVG) (B), comprimento (CP) (C) e massa seca de plântula (MSP) (D) de <i>D. dusenii</i> em função de doses do doador de óxido nítrico S-nitrosoglutaciona (GSNO).....	91

Figura 5.4.4 - Germinação (GER) (A), índice de velocidade de germinação (IVG) (B), tempo médio de germinação (TMG) (C), primeira contagem de germinação (PCG) (D), comprimento (CP) (E) e massa seca de plântula (MSP) (F) de *D. walteriana* em função de doses do doador de óxido nítrico S-nitrosoglutationa (GSNO).....92

Figura 6.4.1 - Germinação (GER) (A), índice de velocidade de germinação (IVG) (B) tempo médio de germinação (TMG) (C) primeira contagem de germinação (PCG) (D), comprimento (CP) (E) e massa seca (MSP) (F) de plântulas de *D. walteriana* nos diferentes tratamentos110

Figura 6.4.2 - Teores de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em plântulas de *Dyckia walteriana*, sob diferentes tratamentos sob condições a 25°C e envelhecimento acelerado (E.A) (41°C).....113

Figura 6.4.3 - Teores de malondialdeído (MDA) em plântulas de *Dyckia walteriana*, sob diferentes tratamentos sob condições a 25°C e envelhecimento acelerado (E.A)(41°C).....114

LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.4.1-** Viabilidade pelo teste de tetrazólio (%), germinação (%) e teor de água (%) de sementes de *Dyckia* spp. após a colheita (10 dias) e depois de armazenadas (270 dias).....61
- Tabela 4.4.2 -** *p*-valor do teste F da análise de variância e coeficiente de variação (CV%) para as variáveis: primeira contagem de germinação (PCG) (%), germinação (GER) (%), plântulas anormais (PA) (%), índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG) (dias), comprimento (mm) (CP) e massa seca (MSP) (mg) de plântulas para as espécies *D. cabreræ*, *D. dusenii*, *D. pottiorum* e *D. walteriana* em função de doses de ácido giberélico (GA₃).....62
- Tabela 4.4.3 -** *p*-valor do teste F da análise de variância e coeficiente de variação (CV%) para as variáveis: primeira contagem de germinação (PCG) (%), germinação (GER) (%), plântulas anormais (PA) (%), índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG) (dias), comprimento (mm) (CP) e massa seca (MSP) (mg) de plântulas para os tratamentos NP ALG/CS-GA₃, NP CS/TPP-GA₃, NP ALG/CS e NP CS/TPP em diferentes doses.....69
- Tabela 5.4.1 -** *p*-valor do teste F da análise de variância, coeficiente de variação (CV%) e média para as variáveis: primeira contagem de germinação (PCG) (%), germinação (GER) (%), plântulas anormais (PA) (%), índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG) (dias), comprimento (CP) (mm) e massa seca (MSP) (mg) de plântulas para as espécies *D. cabreræ*, *D. dusenii*, *D. pottiorum* e *D. walteriana* em função de doses de doador de óxido nítrico S-nitrosoglutathione (GSNO).....89
- Tabela 6.4.1 -** *p*-valor do teste F da análise de variância e coeficiente de variação (CV%) para as variáveis: primeira contagem de germinação (PCG) (%), germinação (GER) (%), plântulas anormais (PA) (%), índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG) (dias), comprimento (mm) (CP) e massa seca (MSP) (mg) de plântulas de *D. walteriana* para os tratamentos GSNO, NP CS/TPP GSNO e NP CS/TPP em diferentes doses.....109
- Tabela 6.4.2 -** Porcentagem de germinação (GER) (%), primeira contagem de germinação (PCG) (%), índice de velocidade (IVG) e tempo médio de germinação (TMG) (dias), comprimento (CP) e massa seca de plântulas (MSP) (mg) após o teste de envelhecimento acelerado durante 48 horas a 41°C.....111
- Tabela 6.4.3 -** Teores dos pigmentos clorofila *a* e *b*, clorofila total, carotenoides, razão clorofila *a/b* e clorofila total/carotenoides em plântulas de *Dyckia walteriana* submetidas a diferentes condições de germinação normal (25°C) e envelhecimento acelerado (E.A) (41°C).....116

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 A FAMÍLIA BROMELIACEAE	16
2.2 GÊNERO DYCKIA	19
2.2.1 <i>Dyckia cabreræ</i>	22
2.2.2 <i>Dyckia dusenii</i>	22
2.2.3 <i>Dyckia pottiorum</i>	23
2.2.4 <i>Dyckia walteriana</i>	24
2.3 IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA E ECONÔMICA	25
2.4 POTENCIAL ORNAMENTAL DA FLORA BRASILEIRA	27
2.5 GERMINAÇÃO	29
2.6 REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL	31
2.6.1 GIBERELINAS (GAs)	32
2.6.2 ÓXIDO NÍTRICO (NO)	35
2.7 NANOTECNOLOGIA	41
2.7.1 NANOTECNOLOGIA EM PLANTAS	42
3 MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1 MATERIAL VEGETAL	48
3.2 PREPARO DAS FORMULAÇÕES	49
3.2.1 NANOPARTÍCULAS (NPs) CONTENDO ÁCIDO GIBERÉLICO (GA ₃)	49
3.2.2 NANOPARTÍCULAS (NPs) CONTENDO DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)	50
3.3 CARACTERIZAÇÃO DO LOTE DE SEMENTES	51
3.4 TESTES EM SEMENTES	52
4 ARTIGO A: ÁCIDO GIBERÉLICO LIVRE E NANOENCAPSULADO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE <i>DYCKIA</i> SPP. (BROMELIACEAE) NATIVAS DO BRASIL	54
4.1 RESUMO	54
4.2 INTRODUÇÃO	55
4.3 MATERIAL E MÉTODOS	57
4.4 RESULTADOS	61
4.5 DISCUSSÃO	71
4.6 CONCLUSÕES	78
4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
5 ARTIGO B: DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ESPÉCIES BRASILEIRAS DE <i>DYCKIA</i> SPP. (BROMELIACEAE)	84
5.1 RESUMO	84
5.2 INTRODUÇÃO	85
5.3 MATERIAL E MÉTODOS	86
5.4 RESULTADOS	89
5.5 DISCUSSÃO	93
5.6 CONCLUSÕES	96
5.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
6 ARTIGO C: ÓXIDO NÍTRICO LIVRE E NANOENCAPSULADO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DA BROMÉLIA BRASILEIRA <i>DYCKIA WALTERIANA</i> LEME.	101

6.1 RESUMO.....	101
6.2 INTRODUÇÃO.....	102
6.3 MATERIAL E MÉTODOS	103
6.4 RESULTADOS	108
6.5 DISCUSSÃO	119
6.6 CONCLUSÕES	125
6.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126
7 CONCLUSÕES GERAIS.....	133
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134

1 INTRODUÇÃO

A família Bromeliaceae compreende 3702 espécies distribuídas em 79 gêneros, ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina e Chile central, com exceção de uma única espécie de ocorrência africana. É composta por espécies epífitas, rupícolas, saxícolas ou terrestres, que podem ser encontradas nos mais diversos ambientes. No Brasil, ocorrem 1774 espécies, distribuídas em todos os biomas, com maior ocorrência na Mata Atlântica (GIVNISH *et al.*, 2011; GOUDA; BUTCHER, 2022).

Do ponto de vista ambiental, as bromélias desempenham papel relevante na biodiversidade dos ecossistemas, servindo de abrigo, alimentação e reprodução para uma enorme quantidade de organismos. Além disso, muitas espécies são fundamentais para vertebrados e invertebrados, como beija-flores e morcegos, que encontram nas bromélias sua fonte de alimentação (DELCLARO, 2012). Entretanto, mudanças em seu *habitat*, causadas pelo desmatamento, queimadas e extrativismo, colocam diversas espécies em ameaça de extinção. No Brasil, 246 espécies de bromélias constam na Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (BRASIL, 2022).

No aspecto econômico, as bromélias apresentam potencial ornamental e algumas espécies possuem propriedades medicinais ou utilização no setor têxtil. Com o objetivo de utilizar os recursos fornecidos pela flora brasileira sem agredir o meio ambiente, o uso de espécies nativas no setor de ornamentação torna-se alternativa para valorizar e conservar a biodiversidade.

A inserção de espécies nativas no mercado é tendência e torna-se mais importante visto que o Brasil, apesar de possuir a flora mais biodiversa do mundo, tem em sua grande maioria, a comercialização de plantas exóticas. Assim, a utilização de plantas ornamentais nativas representa potencial para produção, comercialização e geração de renda, principalmente, para pequenos produtores.

O gênero *Dyckia* apresenta sua maior concentração no Brasil, responsável por abrigar cerca de 70% das espécies deste grupo (GOUDA; BUTCHER, 2022; REFLORA, 2022). Entre estas, *D. cabreræ*, *D. dusenii*, *D. pottiorum* e *D. waltheriana* são nativas e, devido sua rusticidade e beleza, apresentam potencial para a inserção no mercado de plantas ornamentais. Entretanto, esta utilização envolve a obtenção de informações para sua domesticação, cultivo e reprodução em larga escala.

A produção de sementes no gênero é abundante, contudo, as condições ambientais nos locais em que estas plantas ocorrem não permitem que elas germinem e

sobrevivam (KRANZ, 2013). Poucos são os estudos dedicados à germinação e viabilidade de sementes de Bromeliaceae e, sendo uma família com apelo comercial e interesse de conservação, trabalhos voltados para esta área são essenciais.

Dentre os fatores que podem interferir na propagação sexuada, a aplicação exógena de reguladores do crescimento vegetal é uma alternativa rápida e eficaz para melhorar as diferentes fases do desenvolvimento das plantas. As giberelinas, por exemplo, regulam diversos processos ao longo do ciclo de vida, desde a germinação até o desenvolvimento dos frutos e sementes, possuindo ampla gama de aplicações que podem acarretar em mudanças bioquímicas, fisiológicas e morfológicas. Ressalta-se, porém, que o ácido giberélico (GA_3), assim como outros reguladores, quando expostos a fatores ambientais, como a luz e temperatura, sofre degradação, perdendo sua atividade.

Além do ácido giberélico, o óxido nítrico (NO) atua como regulador no crescimento e desenvolvimento das plantas, e também no estímulo da germinação e na indução de respostas aos estresses abióticos e bióticos. Entretanto, devido sua natureza gasosa e por se tratar de um radical livre, é aplicado concomitantemente com substâncias doadoras, que são compostos armazenadores do NO; contudo, alguns destes são relativamente instáveis, o que torna menos eficaz a aplicação de forma exógena.

Dependendo da dose, tanto o NO quanto o GA_3 causam danos nas plantas, por esse motivo são importantes mecanismos que permitam a liberação gradual destes compostos. Neste sentido, o uso da nanotecnologia é uma estratégia viável para essa liberação controlada onde, através da nanoencapsulação, o ativo químico fica protegido, garantindo estabilidade e maximizando sua eficiência química e biológica na planta.

A utilização de polímeros naturais e biodegradáveis, como a quitosana e alginato para a encapsulação, trazem segurança ambiental, visto que os efeitos de nanocápsulas no meio ambiente ainda precisam ser elucidados. Nesse contexto, a adoção desta tecnologia garante o a maximização do composto utilizado e beneficia no desenvolvimento e crescimento de plantas.

Em função das poucas informações científicas a respeito das espécies citadas e a associação destes reguladores de crescimento vegetal com as nanocápsulas, o trabalho teve dois objetivos principais; avaliar o efeito do GA_3 e NO na germinação de sementes de *Dyckia cabreræ*, *D. dusenii*, *D. pottiorum* e *D. walteriana*.; e avaliar o efeito da nanoencapsulação do GA_3 e NO na germinação de *D. walteriana*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

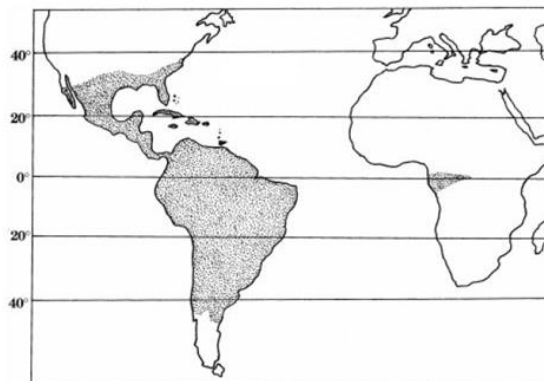
2.1 A FAMÍLIA BROMELIACEAE

Givnish *et al.* (2011) concluíram, através de estudos moleculares, que os ancestrais de Bromeliaceae surgiram há 100 milhões de anos na região do escudo das Guianas, província geológica localizada ao norte da América do Sul, abrangendo parte do Brasil, Colômbia, Guiana, Guiana Francesa, Suriname e Venezuela. Entre 16 e 13 milhões de anos atrás, as bromélias sofreram irradiação adaptativa pelas Américas, ocupando diferentes habitats, desde lugares ensolarados e secos até locais úmidos e sombreados.

A história taxonômica das bromélias teve início em 1493 com a segunda viagem de Cristóvão Colombo ao Novo Mundo. Colombo teria avistado na ilha de Guadalupe a planta que viria a ser a mais difundida da família Bromeliaceae, o *Ananas comosus* (L.) Merrill., popularmente conhecido por abacaxi. As plantas eram conhecidas pelos nativos como “Karatas”, sofrendo alteração somente no final do século XVII, quando foi adotada a denominação de *Bromelia*, proposta pelo explorador e botânico francês Charles Plumier (1646-1704), em homenagem a Olaf Bromel (1639-1705), devido às diversas coletas que havia realizado (ENGLERT, 2000; PAULA, 2000; LUTHER, 2014).

Em 1753, Lineu, o pai da taxonomia, valida *Bromelia* como gênero na obra “Species Plantarum”. O aceite de Bromeliaceae Juss. como família ocorreu em 1798 por Antonie Laurent de Jussieu (1748-1836). A família Bromeliaceae é atualmente constituída por 79 gêneros e 3702 espécies. Estas plantas são distribuídas exclusivamente no continente americano (Figura 2.1.1), exceto por *Pitcairnia feliciana* (A.Chevalier) Harms e Mildbrad., encontrada no continente africano (BENZING, 2000; GOUDA; BUTCHER, 2022).

Figura 2.1.1 - Distribuição geográfica de espécies da família Bromeliaceae.



Fonte: Benzing (2000)

Tem-se o conhecimento de três importantes centros de diversidade genética e dispersão de bromélias: 1) região andina (com prolongamentos em direção ao México e Antilhas); 2) costa leste do Brasil (Mata Atlântica); e 3) Escudo das Guianas (SMITH; DOWNS, 1974).

Atualmente, a família Bromeliaceae divide-se em oito subfamílias: Brochinioideae (20 spp.), Bromelioideae (691 spp.), Hechtioideae (62 spp.), Lindmanioideae (15 spp.), Navioideae (107 spp.), Pitcairnioideae (623 spp.), Puyoideae (218 spp.) e Tillandsioideae (1337 spp.), classificação esta baseada em caracteres florais, hábito e morfologia de frutos e sementes (PAULA, 2000; GIVNISH *et al.*, 2011; LUTHER, 2014; BSI, 2022).

A subfamília Pitcairnioideae Harms. possui 6 gêneros distribuídas em 675 espécies, sendo: *Pitcairnia* L'Heritier (409 spp.), *Dyckia* Schult. & Schult.f. (178 spp.), *Encholirium* Mart. ex Schult. & Schult.f. (38 spp.) *Fosterella* L.B.Smith. (34 spp.) e *Deuterocohnia* Mez (16 spp.). Geralmente são plantas terrícolas ou rupícolas, apresentando frequentemente folhas com espinhos. O ovário é semissúpero ou súpero, no qual desenvolve um fruto tipo capsular deiscente. As sementes são aladas, porém, podem apresentar integrantes com sementes nuas (KUBITZKI, 1998; LUTHER, 2014; GOUDA; BUTCHER, 2022).

O Brasil é um dos principais centros de diversidade genética e de dispersão das bromélias, representando 48% das bromélias já catalogadas, distribuindo-se pelo território 1774 espécies, sendo 1179 endêmicas. Entre os estados com a maior presença de espécies tem-se a Bahia (358), Espírito Santo (331), Rio de Janeiro (330), Minas Gerais (327) e São Paulo (177). Nos biomas, as bromélias são encontradas em todos com distribuição variada sendo: Mata Atlântica (934), Cerrado (252), Amazônia (156), Caatinga (138), Pampa (43) e Pantanal (14) (GOUDA; BUTCHER, 2022; REFLORA, 2022).

As bromélias podem ser encontradas a partir do nível do mar até altitudes de 4000 metros e desde desertos até regiões propensas às inundações (PAULA, 2000). São plantas terrícolas, epífitas, saxícolas ou rupícolas (JUDD *et al.*, 2009), podendo apresentar pequeno porte, como *Tillandsia recurvata* (L.) L., com alguns centímetros de comprimento, até espécies como *Puya raimondii* Harms, com até 10 metros de altura, quando florida (REITZ, 1983).

A maioria das bromélias apresenta folhas alternas espiraladas, crescendo a partir de um caule achatado com entrenós extremamente curtos. Estas características permitem formar, em diversas espécies, uma roseta basal em forma de “cisterna” ou “tanque”, denominado fitotelmo. Estes tanques acumulam água e restos orgânicos, sendo absorvidos pela planta através de tricomas peltados, formados por um escudo central de células, exercendo

importante função na absorção de água e auxiliando na reflexão da luz e proteção contra a transpiração excessiva (WANDERLEY; MARTINS, 2007).

Além disso, a epiderme e a cutícula retardam a perda de água, atuando como filtro de densidade neutra, reduzindo a intensidade da luz que atinge as células internas. A maioria das espécies de bromélias apresenta metabolismo CAM (Metabolismo Ácido das Crassuláceas), que promove a economia de água com a captação de CO₂ apenas a noite, proporcionando maior eficiência no uso da água e permitindo ocupar ambientes áridos (LÜTTGE, 2011).

Quanto às inflorescências, podem ser terminais ou laterais, dispostas em capítulo, panícula ou racemo. As flores, geralmente, são hermafroditas e comumente brilhantes e coloridas. Os frutos são do tipo cápsula ou baga, produzindo sementes que são compactas, aladas ou plumosas (SOUZA; LORENZI, 2008; JUDD *et al.*, 2009).

Em relação à polinização, de acordo com Barbosa-Filho e Araújo (2007), as bromélias são uma das poucas famílias onde a presença de agentes polinizadores vertebrados predomina sobre a entomofilia. Grande parte do sucesso dessa família deve-se às características particulares e especializadas de suas flores, com as mais variadas formas, cores e aromas, assim como elevadas concentrações de açúcares no néctar (BENZING, 2000; KRÖMER *et al.*, 2008).

Para Fischer (1994) e Varassin (2002), a maioria das espécies é polinizada por beija-flores, devido à atração causada pelas brácteas vistosas e coloridas, além da presença de néctar abundante. De acordo com esses autores, 61% das espécies de bromélias nos Andes bolivianos são polinizadas pelos beija-flores, chegando a 85% no bioma Floresta Atlântica. Por outro lado, na Mata Atlântica, 30% das espécies utilizadas como forrageio pelos beija-flores são de bromélias (BUZATO; SAZIMA; SAZIMA, 2000). Outros polinizadores identificados são abelhas e borboletas (WOLOWSKI; FREITAS, 2015).

As bromélias podem se reproduzir de forma assexuada (vegetativa) ou sexuada (semente). A reprodução vegetativa é considerada uma estratégia vantajosa na obtenção de mudas idênticas a planta matriz, além disso, na ocupação de novos ambientes, favorecem a formação de grandes colônias. Essa propagação ocorre por brotos axiais procedentes das folhas da roseta e por rizomas, formando touceiras. A ocorrência simultânea de reprodução sexuada e assexuada é considerada uma vantagem adaptativa, pois juntas conferem altos valores adaptativos em situações muito adversas e competitivas (REITZ, 1983; BENZING, 2000; LENZI; ORTH, 2012).

A reprodução sexuada ocorre por meio da formação de sementes mediante a polinização e, apesar de apresentarem flores hermafroditas, o processo de autofecundação é

incomum nas bromélias, em função de processos que impedem estes mecanismos como a protandria, sendo necessária a polinização cruzada através de agentes polinizadores (REITZ, 1983; BENZING, 2000).

Em estudo com *Dyckia excelsa* Leme., Lenzi e Paggi (2020) observaram uma parcial autoincompatibilidade, onde as maiores taxas de vingamento de frutos e sementes foram obtidas por meio de polinização cruzada natural e manual, e as flores exibiram mecanismos para prevenir a autopolinização, exigindo a presença de agentes polinizadores. A diversidade genética registrada nas populações das diferentes espécies de *Dyckia* sp. é considerada alta devido às características florais encontradas no grupo, tais como a hercogamia e a dicogamia. Estes mecanismos contribuem para a manutenção da alta diversidade genética nas populações naturais (LENZI; ORTH, 2012).

Em relação à dispersão das sementes, espécies com frutos do tipo cápsula produzem sementes aladas ou dotadas de apêndices plumosos, dispersas pelo vento (anemocoria); enquanto frutos do tipo baga são envoltas por mucilagem e dispersas por animais (zoocoria) (BUZATO; SAZIMA; SAZIMA, 2000).

2.2 GÊNERO *Dyckia*

O gênero *Dyckia* Schult. & Schult. f. é o segundo maior representante da subfamília Pitcairnioideae, composto por 178 espécies, superada somente pelo gênero *Pitcairnia*, com 409 espécies. Estas plantas são distribuídas de forma exclusiva na América do Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai) (Figura 2.2.1) (GIVNISH *et al.*, 2011; GOUDA; BUTCHER, 2022). Segundo Martinelli *et al.* (2008), o gênero *Dyckia* possui ainda um grande número de espécies indeterminadas ou com identificação imprecisa, sugerindo a realização de uma revisão urgente.

Figura 2.2.1 - Distribuição geográfica do gênero *Dyckia* Schult. & Schult.f.



Fonte: Krapp et al. (2014)

No Brasil são registradas 129 espécies, das quais 120 são endêmicas, com centro de diversidade no cerrado, com 80 espécies, seguido da Mata Atlântica (39), Pampa (15), Caatinga (7), Pantanal (5) e Amazônia (4). A maior ocorrência do gênero é no estado de Minas Gerais com 39 espécies, seguido de Goiás (27) e Rio Grande do Sul (26). Para o Paraná, são registradas 10 espécies (REFLORA, 2022).

As espécies de *Dyckia* sp. podem ser terrícolas, rupícolas, saxícolas ou reófitas, vivendo em ambientes heliófilos e xéricos de grande amplitudes térmicas, em camadas finas ou ausentes de solo, do nível do mar às montanhas em altitudes acima de 1000 metros (MUSEGANTE *et al.*, 2020).

Morfológicamente, as espécies do gênero apresentam ampla diversidade fenotípica, sendo caracterizadas pela ausência do “tanque central”, formando uma roseta com folhas geralmente coriáceas e suculentas, com espinhos marginais bem desenvolvidos. As bainhas são, em sua maioria, carnosas, com lâminas triangulares, geralmente espinhosas-serradas e rígidas. As plantas se multiplicam pela produção de estolões e por sementes (PAULA; SILVA, 2004; KRANZ, 2013; PINANGÉ, 2013).

As inflorescências, sempre laterais, apresentam flores que podem apresentar, principalmente, coloração amarela, laranja ou vermelha, sendo outras cores também relatadas (LEME; RIBEIRO; MIRANDA, 2012). Sua estrutura reprodutiva e pigmentação floral indicam

os beija-flores como os principais polinizadores, embora abelhas e borboletas também tenham sido documentadas (VOSGUERITCHIAN; BUZATO, 2006; ROGALSKI, 2007).

A produção de sementes férteis (Figuras 2.2.2 e 2.2.3) é abundante para a maioria das espécies. As condições climáticas, no entanto, muito áridas nos ambientes em que ocorrem, não permitem que as sementes germinem ou, quando germinam, morrem antes de se fixarem no substrato e terem condições de sobreviver durante o período de uma pequena estiagem. Com isso, plantas jovens raramente são observadas nas populações e, muitas vezes estão presentes em poucos metros quadrados (KRANZ, 2013).

Figura 2.2.2 - Cápsulas abertas expondo sementes de *Dyckia* spp.



Fonte: Teresia Strehl e Rodrigo Crespo Pont Beheregaray (2006)

Figura 2.2.3 - Sementes de *Dyckia* sp. coletadas na propriedade do colecionador em Londrina/PR.



Fonte: Próprio autor (2020)

2.2.1 *Dyckia cabreræ*

Dyckia cabreræ L.B.Smith. & Reitz (Figura 2.2.1.1) é uma espécie nativa e endêmica do Brasil com ocorrência no bioma Mata Atlântica, nos estados de Santa Catarina e Paraná (REFLORA, 2022). A espécie é considerada xerófila e heliófila, crescendo em afloramentos e campos rochosos em altitudes entre 900 e 1000 m. *D. cabreræ* está sujeita ao declínio do número de indivíduos devido ameaças em seu *habitat*. Assim, a espécie foi avaliada como "Em perigo" (EN) (CNCFLORA, 2012), classificação esta também atribuída segundo a lista do Ministério do Meio Ambiente (BRASIL, 2014).

Figura 2.2.1.1 - *Dyckia cabreræ* L.B.Smith. & Reitz. na coleção particular do Dr. Walter Kranz, Londrina, PR.



Fonte: Próprio autor (2020)

2.2.2 *Dyckia dusenii*

Dyckia dusenii L.B.Smith (Figura 2.2.2.1) é uma espécie nativa e endêmica do Brasil. Sua ocorrência se dá quase exclusivamente nos três estados do sul do país. A espécie ocorre nos biomas Mata Atlântica e Pampa (CNCFLORA, 2012; REFLORA, 2022). Trata-se de uma planta terrícola com ocorrência em solos rasos e rochosos, podendo ser encontrada em campos, campos de altitude e afloramentos rochosos, sendo considerada heliófila e xerófila. Com relação ao seu status de conservação, é avaliada como "Deficiente de dados" (DD) (CNCFLORA, 2012).

Figura 2.2.2.1 - *Dyckia dusenii* L.B.Smith. na coleção particular do Dr. Walter Kranz, Londrina, PR.



Fonte: Próprio autor (2021)

2.2.3 *Dyckia pottiorum*

Dyckia pottiorum Leme. (Figura 2.2.3.1) é uma espécie heliófila, rupícola ou saxícola, endêmica do cerrado ruprestre no estado do Mato Grosso do Sul e, recentemente, descrita. É uma planta levemente prostada, com filotaxia dística, apresentando folhas coriáceas e margem serreada, com coloração de suas flores variando do laranja ao amarelo. Não há informações sobre o grau de ameaça da espécie (CNCFLORA, 2012; LEME; RIBEIRO; MIRANDA, 2012).

Figura 2.2.3.1 - *Dyckia pottiorum* Leme.



Fonte: Dyckia Brazil (2009)

2.2.4 *Dyckia walteriana*

Dyckia walteriana Leme. (Figura 2.2.4.1) é uma espécie recentemente descrita, nativa e endêmica do norte do estado do Paraná. Trata-se de planta heliófila e rupícola, ocorrendo exclusivamente, em afloramentos rochosos basálticos da formação Serra Geral. O epíteto específico “walteriana” presta homenagem ao pesquisador e colecionador de espécies de *Dyckia*, Walter Miguel Kranz. A espécie se enquadra na categoria “criticamente em perigo”, exigindo medidas urgentes para a conservação das populações (MUSEGANTE *et al.*, 2020).

Figura 2.2.4.1 - *Dyckia walteriana* Leme. na coleção particular do Dr. Walter Kranz, Londrina, PR.



Fonte: Próprio autor (2020)

2.3 IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA E ECONÔMICA

O fascínio e popularidade das bromélias vêm fazendo com que sejam amplamente procuradas para uso em projetos paisagísticos e também cultivadas em vasos. A comercialização e uso dessas plantas em projetos de jardinagem e paisagismo ganhou valorização devido suas belas cores, formas exóticas, baixa manutenção e fácil cultivo em jardins (NEGRELLE; ANACLETO, 2012).

As bromélias são apreciadas como plantas ornamentais há muito tempo, especialmente na Austrália, Estados Unidos e Europa. No Brasil, seu uso no paisagismo teve início na década de 70, com trabalhos do renomado paisagista Roberto Burle Marx, que as tornou populares ao inseri-las em seus projetos (PAULA; SILVA, 2004; CARVALHO; MERCIER, 2005). Burle Marx também foi responsável pela fundação da “Bromeliad Society” e da Sociedade Brasileira de Bromélias (ENGLERT, 2000).

Além do potencial ornamental, as bromélias apresentam importância econômica como alimentos, remédios e produção de fibras. Entre as bromélias, o abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merr.) é a espécie de maior importância econômica, apreciada na alimentação humana. A presença de enzimas no abacaxi, denominadas de bromelinas, um conjunto de enzimas proteolíticas, tem expandido sua utilização em outros setores. Na indústria farmacêutica, faz-se seu uso para tratar distúrbios digestivos, além de feridas e inflamações. Na indústria de alimentos, tem-se sua utilização como amaciadora de carnes, clarificação de cervejas, fabricação de queijos, pães e biscoitos, entre outras (MURARO, 2006; VIEIRA *et al.*, 2020).

Outra espécie de importância é a *Neoglaziovia variegata* [(Arruda) Mez] conhecida como “caroá-verdadeiro”, utilizada como fonte de fibras. Na medicina natural, destaca-se a *Bromelia antiacantha* Bertol. na fabricação de xaropes caseiros. Em épocas de escassez de alimentos, uma bromélia conhecida popularmente como macambira (*Bromelia laciniosa* Mart. ex Schult. f.), após a queima dos espinhos, é utilizada como alternativa na alimentação do gado (RIBEIRO, 2007; ZANELLA *et al.*, 2011; SOUZA; SOUZA, 2016; VIEIRA *et al.*, 2020).

O estado de São Paulo se destaca como o maior produtor e consumidor de plantas ornamentais do país, seguido de Minas Gerais, Santa Catarina, Pernambuco e Alagoas. As bromélias, em especial, tiveram sua comercialização intensificada a partir da década de 90, no Rio de Janeiro, onde eram utilizadas juntamente com orquídeas como itens de coleção e passaram a ser vinculadas a atividades de paisagismo com o uso em jardins. A produção de

bromélias em escala comercial tem se desenvolvido no Brasil, seguindo os passos de outros países como a Índia, China, Holanda, Estados Unidos, Japão e México, que são os maiores produtores mundiais (BARBIERI; STUMPF, 2008; FRANÇA; MAIA, 2008; IBRAFLOR, 2021).

Segundo Junqueira e Peetz (2017), as bromélias atingem 6% do total das espécies de plantas ornamentais cultivadas em vasos. Para produtores do sul e sudeste do Brasil, os gêneros mais cultivados e comercializados são *Aechmea*, *Neoregelia* e *Vriesea*; e para as espécies, destaque para *Aechmea fasciata* (Lindl.) Baker. e *Guzmania ligulata* Mez “Cherry”. O aumento na produção comercial traz vantagens tanto para o produtor, com maior de renda; quanto para o meio ambiente, pois reduz o extrativismo predatório das espécies, principalmente as que se encontram em perigo de extinção (ANACLETO; BORNANCIN, 2018).

As bromélias têm importância no cenário nacional da conservação da biodiversidade, desenvolvendo complexas interações com outros vegetais e animais (MARTINELLI *et al.*, 2008). Os microambientes formados pelo acúmulo de água e restos orgânicos nos tanques das bromélias são muito procurados por diversas espécies, que utilizam este ambiente como fonte de alimento, abrigo e também para reprodução (OLIVEIRA, 2004; SILVA, 2009; DELCLARO, 2012). Segundo Romero (2005), esses microambientes abrigam vários tipos de organismos como os aracnídeos, crustáceos, insetos e pequenos vertebrados como anfíbios e répteis.

Em virtude do aumento do uso de bromélias no paisagismo brasileiro, grandes quantidades de plantas são sendo retiradas da natureza pela comunidade local, sendo caracterizado como extrativismo predatório, colocando em risco a diversidade e contribuindo assim para o aumento do número de plantas vulneráveis, ameaçadas ou até mesmo em extinção (BARBOSA, 2007; FERREIRA *et al.*, 2007; BERED *et al.*, 2008).

Apesar da importância em diversos segmentos já citados e o viés ecológico e de preservação que envolve as bromeliáceas, estudos a respeito das espécies pertencentes a esta família ainda precisam avançar na questão de domesticação e comercialização vista a enorme quantidade de plantas não estudadas, o que demonstra a necessidade de pesquisas científicas a serem realizadas.

2.4 POTENCIAL ORNAMENTAL DA FLORA BRASILEIRA

O Brasil é considerado um dos países de maior riqueza em biodiversidade do planeta, concentrando de 15 a 20% de todas as espécies vegetais. Também possui alguns dos biomas mais ricos em número de espécies como a Amazônia, Cerrado e a Mata Atlântica. Além da vasta quantidade de espécies, o Brasil detém grande quantidade de espécies endêmicas. Entre as plantas ornamentais destacam-se as orquídeas e as bromélias, plantas estas que apresentam relevância devido ao florescimento, formato ou colorido das folhas, bem como o aspecto geral da planta, facilidade de cultivo e manutenção, entre outras (MMA, 2011; MMA, 2018).

Apesar da relevância riqueza da flora no Brasil, a mesma ainda é pouco conhecida, negligenciada e subutilizada. Assim, o país tem o uso de apenas uma parte bem pequena da sua biodiversidade. Infelizmente, em razão de padrões culturais impostos, na preferência da utilização de espécies exóticas, muitas das quais são invasoras, não benéficas ou até prejudiciais a nossa flora. Desse modo, são as espécies exóticas que dominam o mercado brasileiro de plantas ornamentais e a presença destas espécies podem causar consequências nos ambientes de cultivo, causando desequilíbrio ambiental (HEIDEN; BARBIERI; STUMPF, 2006; VALE *et al.*, 2011).

Um dos pontos relacionados a preferência por estas espécies vai desde a história do Paisagismo no Brasil, realizada por homens europeus, acostumados a trabalhar com determinadas espécies exóticas. Com isso, as espécies nativas eram deixadas de lado e esquecidas. Além do mais, devido à adaptabilidade das espécies nativas ao nosso clima, as mesmas possuem um desenvolvimento fácil, o que acabavam as tornando pragas.

Este cenário começou a ser modificado entre as décadas de 1930 e 1940 quando Roberto Burle Marx inovou na forma de criar projetos, aproximando-os da flora tropical nativa, revolucionando a história do Paisagismo e se tornando referência mundial. Outro importante ponto hoje é de que muitas espécies nativas não são utilizadas pelo temor dos produtores em investir em espécies pouco conhecidas do público e terem prejuízo por não conseguirem comercializá-las (MALUHY, 2020).

Outro problema relacionado ao uso de espécies nativas é que muitas destas têm ocorrência em áreas que vem sofrendo com o desmatamento, fazendo com que algumas plantas possam se extinguir antes de se tornarem conhecidas e terem seu potencial utilizado. Outro ponto é de que, muitas vezes, o valor das plantas nativas ornamentais só é reconhecido quando elas são estudadas e melhoradas por outros países (HEIDEN; BARBIERI; STUMPF, 2006; VALE *et al.*, 2011).

Devido a grande biodiversidade, têm-se inúmeras espécies com características de uso no paisagismo, no entanto, vê-se uma exaustiva repetição de espécies que se tornaram consagradas e aceitas pela população (LEAL; BIONDI, 2006). Assim, a introdução de uma planta nativa em cultivo pode ser um instrumento de conservação e de inserção de espécies nativas, como é o caso das *Dyckias*, onde os estudos são escassos, impedindo o melhor conhecimento destas espécies. Estas bromélias diferem das comuns por não possuírem o famoso “tanque” que acumula água, além de um formato diferenciado das plantas, trazendo rusticidade (LORENZI, 2009; MMA, 2011) (Figura 2.4.1).

Figura 2.4.1. - Plantas de *Dyckia* sp em suas variadas formas e colorações.



Fonte: Getty Images/iStockphoto (2015)

Com isso, é fundamental que o país intensifique investimentos e implemente programas de pesquisa na busca de um melhor aproveitamento desse imenso patrimônio natural. Assim, a domesticação de plantas nativas é uma grande oportunidade aos países ricos em recursos genéticos, como o Brasil (MARTINI *et al.*, 2010; KABASHIMA *et al.*, 2011; MMA, 2011).

2.5 GERMINAÇÃO

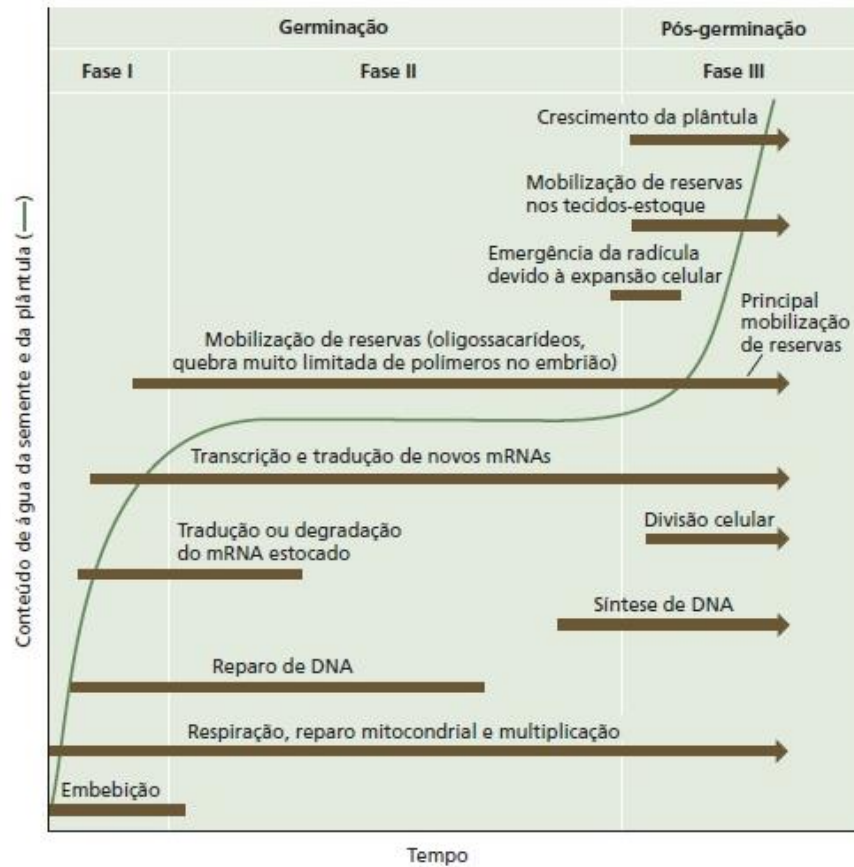
O conceito de germinação varia de acordo com a área de estudo. Para a bioquímica, a germinação envolve a diferenciação sequencial dos caminhos oxidativos e a continuação dos processos bioquímicos característicos do crescimento vegetativo e do desenvolvimento. Para a morfologia, a germinação é o processo de transformação do embrião em plântula. Já a fisiologia considera germinação como a retomada do metabolismo e do crescimento e o reinício da multiplicação celular (AGUIAR, 2017).

Conforme as Regras para Análise de Sementes (RAS), germinação é a capacidade da semente de produzir uma plântula que apresente suas estruturas essenciais e que esteja apta, em condições ambientais favoráveis, a desenvolver-se em uma planta normal (BRASIL, 2009).

A germinação da semente é considerada o primeiro passo da vida de uma planta, sendo um dos processos fisiológicos mais sensíveis, afetada por interações hormonais e também fatores ambientais. Entre os fatores que afetam a germinação estão a umidade, temperatura, substrato, luz e o oxigênio (MADEJÓN *et al.*, 2015; PEREIRA, 2016).

Segundo Taiz *et al.* (2017) a germinação se inicia com a absorção de água pela semente desidratada e termina com a emergência do eixo embrionário, em geral, a radícula, transpondo seus tecidos circundantes. A absorção de água é necessária para gerar pressão de turgor, que potencializa a expansão das células, representando o início do crescimento e desenvolvimento vegetativo (TAIZ *et al.*, 2017; KERBAUY, 2019). A embebição, ou seja, a hidratação dos tecidos é um processo físico que ocorre entre as diferenças de potencial hídrico entre a semente e o meio externo (KERBAUY, 2019). Assim, com base na cinética de absorção de água, pode-se dividir a germinação em três fases conforme a figura 2.5.1.

Figura 2.5.1- Fases da germinação de sementes.



Fonte: Taiz *et al.* (2017)

Na fase I, denominada de embebição, as sementes absorvem água rapidamente. Esta fase marca o início da transformação das substâncias de reserva mais simples, de modo a garantir energia e nutrientes necessários à retomada do crescimento do embrião (MARCOS FILHO, 2015; TAIZ *et al.*, 2017).

Na Fase II, ocorre a estabilização na velocidade de absorção de água e os processos metabólicos de transcrição e tradução são reiniciados. Nesta fase ocorre uma expansão do embrião e o aumento da produção de enzimas como as amilases e fitases, necessárias para a metabolização das reservas e o desenvolvimento do embrião (MARCOS FILHO, 2015; IBRAHIM, 2016; TAIZ *et al.*, 2017).

Na fase III, ocorre a reorganização das substâncias para formar o citoplasma, o protoplasma e as paredes celulares, resultando em rápida absorção de água e a protusão da radícula, a chamada germinação visível (MARCOS FILHO, 2015; TAIZ *et al.*, 2017).

A capacidade de uma semente em reter seu potencial germinativo é denominada viabilidade, e o tempo em que a semente é conservada determina sua longevidade (CARDOSO, 2004). O período de sobrevivência ou longevidade das sementes é muito variável

entre as espécies e também pode variar dentro de uma mesma devido a diferenças no genótipo e procedência da semente, além das condições de armazenamento (HONG; ELLIS, 1996).

Segundo Marcos Filho (2015), as sementes são responsáveis pela perpetuação e dispersão das espécies e capazes de manter a viabilidade até que as condições ambientais sejam favoráveis para o início de uma nova geração, entretanto, não conseguem preservar suas condições vitais por tempo indeterminado, sofrendo deterioração. A deterioração é um processo inevitável, contínuo e irreversível, que inicia na maturidade fisiológica e culmina com a morte da semente. Este processo é determinado por uma série de alterações fisiológicas, bioquímicas, físicas e citológicas, que ocorrem progressivamente, reduzindo a potencial fisiológico das mesmas.

2.6 REGULADORES DE CRESCIMENTO VEGETAL

Hormônios vegetais ou fitohormônios são substâncias orgânicas produzidas naturalmente em plantas atuando como mensageiros químicos que modulam processos bioquímicos e fisiológicos, de modo a promover, inibir ou modificar o crescimento e desenvolvimento (DE JONG; BORM, 2013). O desenvolvimento vegetal é regulado por nove principais classes de hormônios: ácido abscísico, ácido salicílico, auxinas, brassinosteróides, citocininas, estrigolactonas, etileno, giberelinas e jasmonatos. No entanto, esta lista tende a aumentar com novos estudos (TAIZ *et al.*, 2017).

Esses hormônios estão relacionados a todas as fases de desenvolvimento vegetal, que vão desde a germinação, formação de raízes, caule, folhas, flores e frutos (PERILLI; DI MAMBRO; SABATINI, 2012; SHABALA *et al.*, 2016), como também processos fisiológicos em resposta ao estresse abiótico (RYU; CHO, 2015) e biótico (YANG; YANG; HE, 2013).

Por outro lado, reguladores do crescimento vegetal são todas substâncias naturais ou artificiais, que apresentam atividade semelhante aos hormônios vegetais endógenos encontrados nas plantas, sendo capazes, quando aplicadas exógenamente, de modificar processos fisiológicos e morfológicos nos vegetais, afetando o crescimento e o desenvolvimento. Entre estes compostos encontram-se o ácido naftalenoacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB), ácido giberélico (GA₃), entre outros (TAIZ *et al.*, 2017).

Raven, Evert e Eichhorn (2014) destacam que uma única molécula de regulador de crescimento vegetal induz o aumento na concentração de outros hormônios, que

podem levar a mudanças de desenvolvimento na célula dos vegetais, além de atuar como mensageiros químicos entre as células. A ação de cada um destes compostos é determinada por sua disponibilidade, atuando diretamente ou desencadeando uma rede de diferentes hormônios nos diferentes estágios de desenvolvimento dos vegetais (VANSTRAELEN; BENKOVÁ, 2012).

Para que ocorra o efeito desejado na aplicação do regulador, é necessário estimar uma faixa ideal de concentração, sendo importante considerar que a planta já possui níveis endógenos de hormônios, evitando assim uma fitotoxicidade (BOTIN; CARVALHO, 2015). Deve-se considerar também que os resultados obtidos dependem do estágio fisiológico da planta, das condições ambientais, da espécie, do cultivar e da época de aplicação (PETRI *et al.*, 2016).

2.6.1 GIBERELINAS (GAs)

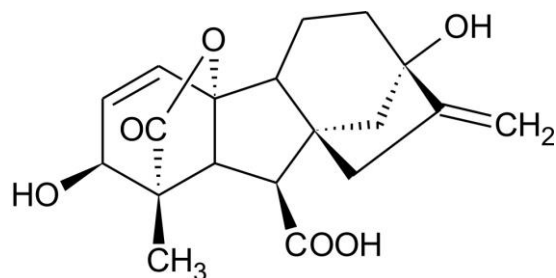
Uma importante classe de hormônios vegetais compreende as GAs, que são numeradas em sequência cronológica de acordo com sua descoberta. Esse grupo compreende todos os ácidos tetracíclicos diterpenoides, mas apenas alguns deles têm atividade biológica intrínseca (TAIZ *et al.*, 2017).

As pesquisas com GAs ocorreram no começo da década de 1920, quando agricultores japoneses observaram uma doença que causava o crescimento anormal em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.). Plantas infectadas com *Fusarium fujikuroi* tornavam-se anormalmente altas, o que as deixavam suscetíveis à queda e com produção reduzida, daí o nome *bakanae* ou “doença da planta-boba”. A partir daí, as giberelinas foram identificadas pela primeira vez por Eiichi Kurosawa em 1926 e isoladas por Teijiro Yabuta e Yusuke Sumuki na década de 1930, como produtos naturais do fungo *Gibberella fujikuroi* (chamado atualmente de *F. fujikuroi*). Entretanto, ainda não haviam conseguido determinar a estrutura química da forma ativa das GAs, devido à presença de impurezas nas amostras (TAIZ *et al.*, 2017; KERBAUY, 2019).

Na década de 1950, estudos com GAs ganharam relevância e pesquisadores reconheceram a oportunidade de exploração dessas substâncias. Neste período, na Universidade de Tóquio, foram isolados a partir da giberelina A, três novas giberelinas: A₁, A₂ e A₃, sendo esta última denominada de ácido giberélico (Figura 2.6.1.1). A descoberta de que as GAs

ocorriam de forma natural em plantas também ocorreram nesta época (HEDDEN; SPONSELL, 2015; KERBAUY, 2019).

Figura 2.6.1.1 - Estrutura química do ácido giberélico (GA₃).



Fonte: redalyc.org (2006)

Em 1958, foi identificada a primeira giberelina vegetal, denominada de GA₁, encontrada em extratos de sementes de feijão-escarlate (*Phaseolus coccineus* L.). Nota-se que a maioria das espécies, até agora, contém GA₁ e/ou GA₄. Além destas, as plantas contêm muitas GAs inativas que representam os precursores ou os produtos da desativação das GAs bioativas (TAIZ *et al.*, 2017).

A continuação de pesquisas levou a novas descobertas e confirmações que contribuíram para complementar o conhecimento dessas substâncias. Dados recentes quantificam 136 diferentes GAs, das quais poucas são as bioativas (HEDDEN; SPONSELL, 2015; TAIZ *et al.*, 2017; KERBAUY, 2019).

Para Hedden e Sponsel (2015), o incremento das pesquisas sobre hormônios vegetais como as GAs vem avançando constantemente, no entanto, há necessidade de estudos para entender e esclarecer os processos bioquímicos envolvidos, as interações ambientais e a regulação exercida em plantas. Desde a sua descoberta, as GAs vem sendo produzidas industrialmente, sendo de grande importância econômica para agricultura devido a seus efeitos em vegetais (RODRIGUES *et al.*, 2012; RANGASWAMY, 2012; GÖKDERE; ATES, 2014).

As GAs são sintetizadas em diversas partes da planta, principalmente em regiões de rápido crescimento, como sementes em germinação, frutos, folhas jovens, ápices de caules e, em alguns casos, nas raízes (LAVAGNINI *et al.*, 2014; TAIZ *et al.*, 2017). As GAs estão presentes em tecidos com a presença mínima de auxina, sendo que os efeitos no crescimento dependem da acidificação da parede celular induzida por auxina (TAIZ *et al.*, 2017).

Entre os diversos efeitos morfológicos e bioquímicos durante o ciclo de vida da planta, as GAs promovem o alongamento de entrenós, germinação de sementes, indução do florescimento, aumento do número de flores, desenvolvimento do pólen e o crescimento do tubo polínico, além da formação do fruto, elevação dos teores de clorofila *a* e *b*, carboidratos e proteínas, entre outros (IQBAL; ASHRAF, 2013; HAN *et al.*, 2014; ZANG *et al.*, 2016; TAIZ *et al.*, 2017). Alguns estudos já trazem, com grande evidência, que as GAs estão envolvidas na indução de respostas ao estresse abiótico (COLEBROOK *et al.*, 2014).

Um dos efeitos mais estudados das GAs é na germinação das sementes. O endosperma das sementes fornece, no início do processo de germinação, energia necessária para as reações e processos nesta etapa. Para que esta reserva nutritiva possa ser disponibilizada para as sementes, é necessária a metabolização de enzimas hidrolíticas que irão gerar açúcares, aminoácidos e outros produtos que nutrirão o embrião (TAIZ *et al.*, 2017; KERBAUY, 2019).

Neste ponto, as GAs funcionam como um sinalizador para a produção de α e β -amilases, enzimas estas que atuam na clivagem dos componentes do endosperma, gerando energia para o embrião, estimulando o processo de germinação (KONDHARE *et al.*, 2015; MEDEIROS *et al.*, 2015; KERBAUY, 2019). Na década de 60, se confirmou a observação do botânico austríaco Gottlieb Haberland (1854-1945), feita em 1890, de que existia no embrião uma substância difusível que estimularia a produção de α -amilase. Passado mais de um século, foi comprovado a síntese de GAs no embrião das sementes, que posteriormente eram transportadas ao endosperma durante a germinação (TAIZ *et al.*, 2017; KERBAUY, 2019).

As GAs atuam no enfraquecimento do tecido ao redor da radícula, ou seja, auxiliam na superação da barreira mecânica imposta pelos tegumentos da semente. Isso ocorre pela indução da expressão de genes promotores do alongamento celular. Estudos também sugerem que as GAs promovam a extrusão da radícula por meio da interação com outros hormônios (TAIZ *et al.*, 2017; KERBAUY, 2019).

Outro efeito relevante das GAs é na superação da dormência das sementes. Este processo envolve uma mudança de estado metabólico na semente que permite ao embrião reiniciar o crescimento. Como a germinação é um processo irreversível que leva a formação de uma plântula, muitas espécies desenvolveram mecanismos sofisticados para perceber as melhores condições para que isso ocorra (TAIZ *et al.*, 2017; KERBAUY, 2019).

De acordo com um recente modelo, o equilíbrio das atividades de ácido abscísico (ABA) e GAs nas sementes está sob controle ambiental e do desenvolvimento. Durante os primeiros estágios do desenvolvimento da semente, a sensibilidade ao ABA é alta e a sensibilidade à GA é baixa, o que favorece a dormência e/ou quiescência sobre a germinação.

Mais tarde, a sensibilidade ao ABA declina e à GA aumenta, favorecendo a germinação. Ao mesmo tempo, a semente torna-se progressivamente mais sensível aos estímulos ambientais, como temperatura e luz, que podem tanto estimular quanto inibir a germinação (TAIZ *et al.*, 2017).

Assim, o tratamento de sementes com GAs pode, em geral, substituir um sinal positivo na superação da dormência fisiológica. As GAs, em associação com as citocininas, substituem a necessidade de diversos sinais ambientais para promover a germinação, minimizando os efeitos do ABA (TAIZ *et al.*, 2017; KERBAUY, 2019). Diante do exposto, as giberelinas possuem diversas aplicações na agricultura devido suas propriedades que modificam processos bioquímicos, fisiológicos e a morfologia do vegetal (RODRIGUES *et al.*, 2012; GUPTA; CHAKRABARTY, 2013).

Souza *et al.* (2018) testaram GA₃ em sementes de beton (*Rhaphiodon echinus* Shauer.), nativa da Caatinga e, obtiveram 67% de germinação na dose de 5000 mg L⁻¹, enquanto sementes não tratadas tiveram 18% de germinação. Já Abdulhalem (2020) teve germinação de 100% após 7 dias do tratamento de sementes de anis (*Pimpinella anisum* L.) na dose de 1 e 2 mg L⁻¹ de GA₃, enquanto o controle demorou 14 dias para atingir esse percentual. A porcentagem de germinação aumentou para 78% com a aplicação de 2 mg L⁻¹ de GA₃ em sementes de moréia-bicolor (*Dietes bicolor* (Steud.) Sweet ex Klat) após 40 dias de cultivo *in vitro*, enquanto o controle teve 50% e também foram observadas folhas maiores nas plântulas cujas sementes foram tratadas com GA₃ (SILVA *et al.*, 2020). Bonin *et al.* (2010) ao tratarem sementes de *Alcantarea imperialis* (Vell.) Harms. observaram aumento da germinabilidade (73%) quando tratadas com solução de GA₃ a 5 mg L⁻¹ enquanto o tratamento somente com água apresentou 47%.

Vale lembrar, que devido a degradação rápida das GAs aplicadas exógenamente, devido a fatores como o excesso de luminosidade e alta temperatura, sua atividade biológica é reduzida, sendo uma das soluções encontrar sistemas que protejam o composto (LIU *et al.*, 2013).

2.6.2 ÓXIDO NÍTRICO (NO)

O NO foi descoberto pelo inglês Joseph Priestly em meados de 1770, constituído-se em uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas (PODEROSO; HELFENBERGER; PODEROSO, 2019). Por um longo período, o NO e o dióxido de

nitrogênio (NO_2) foram considerados como sendo oriundos de descargas elétricas na atmosfera. Cerca de 30 a 40 anos atrás, o NO passou a ser reconhecido como poluente atmosférico dos complexos NO_x (NO_2 e NO), produzidos por motores de carros e usinas de energia. Entre o final dos anos 80 e início da década de 90, houve uma aceleração nas pesquisas com NO, devido a sua descoberta na sinalização em células de mamíferos e na regulação de diversos processos fisiológicos (TOMAZINI; ANDRADE; MÁXIMO, 2019).

Em mamíferos, o NO atua como sinalizador desempenhando funções como vasodilatação, neurotransmissão, contração e relaxamento do músculo liso, além de resposta imunológica. Em 1992, o NO foi reconhecido pela Revista Science como a "molécula do ano". Em 1998, Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro e Ferid Murad receberam o prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina pela descoberta do papel do NO como molécula sinalizadora no sistema cardiovascular (IGNARRO *et al.*, 1987) TOMAZINI; ANDRADE; MÁXIMO, 2019).

Além da ação em humanos, estudos identificaram a produção desta molécula em vegetais. O fato de que as plantas produzem NO foi publicado pela primeira vez há 40 anos por Lowell Klepper. Ele baseou seus estudos na observação de que os herbicidas inibidores da fotossíntese bloqueiam a redução de nitrito (NO_2^-), levando ao seu acúmulo nas partes tratadas da planta. A liberação de NO foi detectada imediatamente após o tratamento e foram diretamente proporcionais às concentrações de herbicidas aplicadas. Além disso, as emissões de NO estavam intimamente relacionadas ao teor de nitrito na folha (KOLBERT *et al.*, 2019).

Existem diversas vias propostas para a síntese de NO endógeno em plantas, sendo dependente da espécie, fase de desenvolvimento e do ambiente nos quais as plantas são cultivadas. Tem-se o conhecimento de que a principal via de biossíntese de NO faz parte do metabolismo do nitrogênio e inclui a participação da enzima nitrato redutase que catalisa a oxidação do nitrato (NO_3^-) em nitrito (NO_2^-), além da redutase do nitrito, responsável pela oxidação do nitrito em NO. A redução de NO_2^- em NO também pode ocorrer pelo transporte de elétrons mitocondrial e por meio de reações não enzimáticas (baixo pH e ambiente ácido redutor) (MOREAU *et al.*, 2010; SUN *et al.*, 2021).

Muitas das rotas de NO ainda estão em estudo, mostrando a complexidade em entender os mecanismos deste composto na planta (BESSON-BARD *et al.*, 2009). Com isso, fica evidente que os mecanismos de síntese do NO em plantas ainda são assunto de debate (ASTIER; GROSS; DURNER, 2018).

Diversos trabalhos apontam para a importância do NO em processos como a floração (KHURANA; KHURANA; BABBAR, 2011), movimento estomático (CHEN *et al.*, 2013), regulação da formação da raiz lateral (CORREA-ARAGUNDE; LOMBARDO;

LAMATTINA, 2008), crescimento da raiz primária (FERNÁNDEZ-MARCOS *et al.*, 2011) e desenvolvimento de pelos radiciais (LOMBARDO *et al.*, 2006). O NO afeta também o nível de clorofila (LIU; GUO, 2013), o crescimento vegetativo (LOZANO-JUSTE; COLOM-MORENO; LEÓN, 2011), a lignificação da parede celular (BOHM *et al.*, 2010) e atua na defesa contra patógenos (POPOVA; TUAN, 2010).

Em sementes, estudos mostram que o NO promove a superação da dormência de forma eficiente e/ou promove a germinação de várias espécies, podendo desempenhar papel fundamental na detecção das condições ambientais adequadas para a germinação (ARC *et al.*, 2013; KRASUSKA *et al.*, 2015).

Alguns estudos apontam o papel do NO no estímulo de enzimas hidrolíticas que mobilizam as reservas das sementes. Zhang *et al.* (2005) notaram aumento da atividade de β -amilase na presença de solução doadora de NO (nitroprussiato de sódio-SNP) em trigo (*Triticum L.*), soja (*Glycine max L.*), cevada (*Hordeum vulgare L.*), milho (*Zea mays L.*) e melancia (*Citrullus lanatus*.Thunb.Matsum. & Nakai).

Gniazdowska, Krasuska e Bogatek (2010), observaram inicialmente a porcentagem de germinação de embriões de maçã (*Malus domestica* Borkh.), em 5% sem aplicação do tratamento com SNP, e que após a imersão na solução por 3 h, na dose de 5 mM, atingiu 64%. Pereira *et al.* (2010) avaliando a influência do NO na germinação de sementes de *Plathymenia reticulata* Benth. com baixo vigor, constataram que a embebição das sementes em soluções de KNO₃ ou SNP, na dose de 100 μ M por 24 horas reduziu a inibição da germinação de sementes envelhecidas e aumentou a atividade antioxidante de superóxido dismutase (SOD).

De acordo com Seabra e Oliveira (2016), a aplicação exógena de NO melhora a tolerância à salinidade, toxicidade por metais, temperaturas extremas e estresse hídrico. Desta forma, o NO surge como uma molécula de grande importância na resposta dos vegetais contra diversos estresses (FARNESE *et al.*, 2016).

Muitos dos processos deletérios sofridos pelas plantas submetidas a condições adversas são mediados por espécies reativas de oxigênio (EROs). Sob estresse, ocorre a alteração do balanço energético do oxigênio, conduzindo este para formas reduzidas e reativas como o ânion superóxido (O⁻), oxigênio singleto (1O₂^{*}), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila (OH^{*}). Esses produtos causam reações em cadeia prejudiciais para as plantas, atingindo qualquer macromolécula e alterando sua funcionalidade. A produção em excesso das EROs causam a destruição de clorofilas, fragmentação de DNA, danos em proteínas, peroxidação de lipídios e extravasamento de íons, provocando a morte celular

(CARVALHO; NETO, 2016; KOHLI *et al.*, 2019).

No entanto, vale ressaltar que, em baixas concentrações, as EROs, especialmente o H_2O_2 , atuam como sinalizadores para a ativação do sistema de defesa contra o estresse. Devido à produção de EROs fazer parte da rotina celular, os vegetais desenvolveram ao longo da evolução, diferentes estratégias de proteção ao dano oxidativo (BARBOSA *et al.*, 2014; KOHLI *et al.*, 2019).

O mecanismo de defesa vegetal inclui a atividade enzimática como ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), guaiacol peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD). Além dessas, existe a via não enzimática, como por exemplo, pela α -tocoferol, ácido ascórbico e carotenóides (BARBOSA *et al.*, 2014; KOHLI *et al.*, 2019). Uma série de trabalhos relatam a atividade do NO sobre o complexo de defesa antioxidante, devido sua habilidade em conter os danos celulares causado pelas EROs, auxiliando na detoxificação das mesmas (KOHLI *et al.*, 2019).

O NO também interage com fitohormônios como o ácido salicílico e, jasmonatos; e moléculas sinalizadoras, como o Ca^{2+} e glutatona reduzida (GSH), afetando eventos de desenvolvimento e tolerância ao estresse, ativando várias cascatas de sinalização (FARNESE *et al.*, 2016; FANCY; BAHLANN; LOAKE, 2017; DEL CASTELLO *et al.*, 2019).

Os efeitos do NO nas plantas são dependentes de sua concentração e do tecido onde ele está localizado. Por exemplo, quando em baixa quantidade, atuam como molécula sinalizadora e contribuir para a ação de agentes oxidantes (SIDDIQUI; AL-WHAIBI; BASALAH, 2011). No entanto, o excesso de NO leva a um processo chamado de nitração, que é uma modificação irreversível e trata-se da introdução de um ou mais grupo nitro (NO_2) em uma molécula orgânica (RADI, 2013).

O termo estresse nitrosativo refere-se a uma condição de estresse caracterizada por um aumento de NO e também de EROs. Essas moléculas reagem entre si para formar moléculas adicionais como o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), formada pela interação do NO e o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Coletivamente, essas moléculas desencadeiam danos irreversíveis as diferentes biomoléculas como proteínas, lipídios e ácidos nucléicos (GRUPTA *et al.*, 2019).

O tratamento em plantas diretamente com NO é quase que inviável e ineficiente, visto sua natureza gasosa e curta meia-vida ($t_{1/2}$ 1-5 s), principalmente devido a alta reatividade (principalmente com O_2), oxidando rapidamente, formando nitrito e nitrato. Em

decorrência disto, moléculas doadoras são amplamente utilizadas como estoques de NO (FAROOQ *et al.*, 2009; FARNESE *et al.*, 2016). Há uma ampla gama de moléculas doadoras que podem apresentar mecanismos diferentes de liberação de NO. Os doadores frequentemente utilizados são: nitrato de potássio (KNO₃), nitroprussiato de sódio (SNP), S-nitrosoglutathiona (GSNO), S-nitroso-*N*-acetil-D-penicilamina (SNAP), ácido S-nitroso-mercaptopuccínico (S-nitroso-MSA), NONOatos (WANG *et al.*, 2015; BASUDHAR *et al.*, 2015; FARNESE *et al.*, 2016). Além desses compostos, existem outros doadores, como os nitritos e nitratos orgânicos, complexos rutênio-nitrosila, ferro-nitrosila e derivados floxanos (MÜNDEL; DAIBER; GORI, 2013).

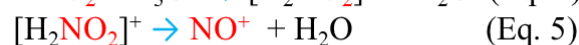
Entre os doadores, os S-nitrosotióis (RSNOs) são uma classe de doadores de NO oriundos da nitroação de tióis (R'SH) de baixa massa molecular. Os RSNOs são metabólitos endógenos do NO que podem ser encontrados no meio extra e intracelular (OLIVEIRA, 2016). Estes compostos estão envolvidos nas reações de S-transnitroação (Equação 1), que é um mecanismo de modificação pós-traducional de proteínas com grupos tióis, reconhecida como importante meio de regulação da atividade celular (FEELISCH; OLSON, 2013).



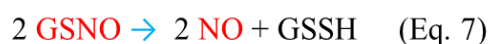
A reação de nitroação de R'SH formando RSNOs pode ser realizada de diversas maneiras. Para os experimentos realizados neste trabalho, o processo de nitroação aconteceu pela reação equimolar de R'SH (GSH) e nitrito de sódio (NaNO₂). O NaNO₂, em ambiente aquoso sob pH fisiológico não irá facilmente reagir, entretanto, em pH baixo (<3), ocorre a protonação do NO₂⁻ gerando o ácido nitroso (HNO₂), que resulta na formação de íons NO⁺. Tais íons são capazes de reagir rapidamente com tióis e formar os RSNOs (GSNO).

A S-nitrosoglutathiona (GSNO) é um S-nitrosotiol de baixa massa molecular e um importante reservatório de NO e origina-se da reação espontânea do NO com o grupamento tiol (-SH) da glutathiona reduzida (GSH), por um processo denominado de S-nitroação (Equações 2 a 6) (CORTESE-KROTT *et al.*, 2014).

A GSH é um tripeptídeo composto pelos aminoácidos, glutamato, cisteína e glicina, sendo também um antioxidante presente de forma abundante nos tecidos vegetais, estando envolvida em diversos processos fisiológicos, como a divisão celular e a defesa contra radicais livres (GAMCSIK *et al.*, 2012; FANCY; BAHLMANN; LOAKE, 2017).



O processo de liberação de NO pela GSNO ocorre de maneira espontânea, por meio da clivagem homolítica da ligação covalente S-N (Equação 7). Essa decomposição pode ser catalisada pela temperatura, luz e a presença de íons de cobre (CORTESE-KROTT *et al.*, 2014; MEYER *et al.*, 2016; OLIVEIRA, 2016).



A degradação da GSNO a glutatona oxidada (GSSG) e amônia (NH₃) é catalisada pela enzima S-nitrosoglutationa redutase (GSNOR), a qual tem importante papel na regulação dos níveis intracelulares de NO. A GSNOR catalisa a reação de GSNO e glutatona (GSH) formando o dímero disulfeto de glutatona (GSSG) e amônio (NH₄⁺) com o cofator NADH. A enzima glutatona redutase (GSHR) pode reduzir o GSSG formando duas moléculas de GSH com o cofator NADH (JAHNOVÁ; LUHOVÁ; PETŘIVALSKÝ, 2019).

A GSNO também interage com grupos específicos de proteínas sulfidrilas (-SH) para produzir proteínas S-nitrosadas (P-SNO) em um processo denominado de S-transnitroação. Essa modificação pós-traducional modifica a função de uma ampla variedade de proteínas (TICHA *et al.*, 2017)

Entretanto, alguns doadores de NO, como a GSNO, são instáveis, e as taxas de decomposição são aumentadas na presença de elevadas temperaturas e exposição à luz. Em contrapartida, a nanoencapsulação de doadores de moléculas de NO em nanopartículas (NPs) tendem a reduzir significativamente as taxas de decomposição dos mesmos. A associação de doadores de NO a NPs permite a liberação de quantidades controláveis de NO, evitando assim seus potenciais efeitos tóxicos sobre as plantas, além de evitar a perda de NO pela fotodegradação (SEABRA *et al.*, 2022ab).

Além disso, a nanoencapsulação permite melhorar a estabilidade dos RSNOs além de poder alterar as propriedades de biodistribuição e a cinética de liberação, contribuindo para a viabilização da aplicação do NO (DUONG *et al.*, 2013; SEABRA; JUSTO; HADDAD, 2015).

Por ser uma abordagem nova e ainda pouco relatada em plantas, a aplicação dessa tecnologia na agricultura é uma estratégia promissora e tem impactos importantes na fisiologia, particularmente na germinação das sementes, proteção contra patógenos e estresses

abióticos.

2.7 NANOTECNOLOGIA

Em 1965, o físico americano Richard Feynman recebeu o prêmio Nobel de Física, em uma conferência na Reunião da Sociedade Americana de Física, onde sugeriu a construção e a manipulação, átomo a átomo, de objetos em escala nanométrica. Intitulada "Há mais espaços lá embaixo", a conferência de Feynman sugeriu que um dia a humanidade conseguiria manipular objetos de dimensões atômicas e assim construir estruturas de dimensões nanométricas. Esta palestra é considerada por muitos o ponto inicial da nanotecnologia (FERREIRA; RANGEL, 2009; RIBOLDI, 2009; FURLANETO, 2011).

O termo nanotecnologia foi estabelecido em 1974 pelo professor japonês Norio Taniguchi (1912-1999) e seu uso se intensificou nos anos 80, com a invenção do microscópio de tunelamento e de força atômica, que garantiu a análise de estruturas nanométricas (FERREIRA; RANGEL, 2009; RIBOLDI, 2009; FURLANETO, 2011).

O prefixo “Nano” é derivado da palavra grega *nanos*, que significa anão, originando sua unidade de medida, o nanômetro (nm), que equivale a bilionésima parte de 1 metro ($1 \text{ nm} = 1/1\,000\,000\,000 \text{ m}$). A nanotecnologia engloba áreas como Engenharia de materiais, Energia, Biotecnologia, Eletrônica, Computação, Farmácia, Medicina, Agronomia, entre outras (EALIA; SARAVANAKUMAR, 2017; VEGA-VÁSQUEZ; MOSIER; IRUDAYARAJ, 2020).

Apesar do conceito de nanopartículas ainda ser alvo de discussões, pode ser definida como uma estrutura supramolecular sólida ultra dispersa, geralmente, mas não necessariamente, apresentando tamanho sub micrométrico, preferencialmente menor do que 500 nm em pelo menos uma dimensão (COUVREUR, 2013). O fundamento da nanotecnologia está no fato de que as propriedades de um material mudam significativamente quando reduzido à escala nanométrica (RALIYA; TARAFDAR, 2012; SCOTT; CHEN, 2012).

As NPs possuem grande área superficial o que tipicamente resulta em maior reatividade química e atividade biológica (LEE; YUN; PARK, 2015). Assim, a nanotecnologia pode intervir em quase todos os tipos de materiais, sejam eles naturais ou sintéticos, de modo a formar NPs, nanoesferas, nanotubos ou nanofibras (DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006).

Sistemas nanoparticulados são, em geral, constituídos por materiais metálicos, no entanto, vem sendo muito utilizadas matrizes poliméricas. Esses nanomateriais apresentam origem maleável, como os polímeros, sendo incorporados em vários produtos

(KAH *et al.*, 2018).

Vários destes vêm sendo utilizados no preparo de NPs, dentre os quais existem os polímeros naturais ou sintéticos, sendo hidrofílicos, hidrofóbicos, biodegradáveis ou não (KOLLARIGOWDA, 2017). A liberação do composto desejado depende de diversos fatores como do material produzido, das propriedades físico-química das partículas e dos mecanismos de liberação (PEREIRA, 2017). Essa liberação do ativo químico ocorre através da degradação por processos de relaxamento da matriz ou difusão da partícula, sendo liberado lentamente para o meio externo (ABDI, 2010). Isto gera um sistema que prolonga o tempo de ação de um ativo químico e resulta no aumento da sua atividade química e biológica (AQIL *et al.*, 2013; TING *et al.*, 2014).

De forma geral, o uso de NPs fornece diversas vantagens na sua utilização, dado que, permite um sistema de liberação controlada da formulação, melhora sua solubilidade e protege os compostos bioativos contra uma rápida degradação. Elas ainda potencializam a eficiência desses produtos, oferecendo melhores resultados com menores doses e número de aplicações, reduzindo o risco de contaminação ambiental e a toxicidade para organismos não-alvo (PASCOLI *et al.*, 2018).

Esta tecnologia tem difundindo-se em diversas áreas como eletrônicos, medicamentos, cosméticos, têxteis, ciência alimentar, setor de energia e agricultura (SASTRY; RASHMI; RAO, 2011). Para a agricultura, a nanotecnologia favorece o desenvolvimento de práticas limpas, onde a utilização de nanocápsulas e polímeros biodegradáveis possibilitam o desenvolvimento de formulações de liberação controlada, sendo então aplicadas em diversas áreas do setor (SOUZA *et al.*, 2012).

2.7.1 NANOTECNOLOGIA EM PLANTAS

Diversos sistemas de NPs tem sido utilizados na área agrícola, o que resulta na exposição destes materiais a diferentes organismos vivos, sendo necessário avaliar estes nanomateriais de forma a não causarem impacto ao meio ambiente (KAH; HOFMANN, 2014; FRACETO *et al.*, 2016).

No ecossistema, as NPs podem estar presentes na base da cadeia alimentar (vegetais) e resultar em efeitos bioacumulativos (HUSEN; SIDDIQI, 2014). As características das NPs como a morfologia, tamanho, carga de superfície e a concentração do material, determinam a interação destas com o vegetal, resultando em diferentes respostas biológicas (

ZHU *et al.*, 2012).

As NPs podem ser incorporadas pelos vegetais, onde geralmente são absorvidos, resultando em efeitos capazes de aumentar ou inibir o desenvolvimento vegetal (MA *et al.*, 2010; HUSEN; SIDDIQI, 2014). Cada material tem uma rota de entrada no vegetal, sendo apoplástico (através da parede celular ou espaços intracelulares) ou simplástico (célula a célula). Vale lembrar que estudos da associação de nanotecnologia e plantas ainda necessitam de avaliações, como a compreensão dos mecanismos de aceitação destas partículas, a translocação e sua acumulação, além de análises de potenciais efeitos adversos no crescimento e desenvolvimento das plantas (LARUE *et al.*, 2014).

A absorção de NPs pelas plantas não é tão previsível, dependendo de vários fatores, sejam eles relacionados à própria nanopartícula (tamanho, composição, carga superficial), as interações com o ambiente e seus componentes (textura do solo, disponibilidade de água, microbiota), e fatores do próprio vegetal, já que a fisiologia e a anatomia varia entre cada espécie (SANZARI; LEONE; AMBROSE, 2019).

Para Zhu *et al.* (2012), os mecanismos de entrada de NPs ainda não são claros, porém, a carga da partícula influencia em como são capitadas pelas plantas. Cerca de 70 - 90 % que promovem carga negativa na parede celular são devido à presença de pectinas, proteínas e ligninas que atraem as partículas com carga positiva. O restante é atribuído a epiderme das raízes, que possuem carga negativa devido a grande quantidade de polissacarídeos.

Pela região apical das sementes, elas podem entrar por endocitose. Para NPs negativas, quando estas penetram o sistema vascular, são transportadas rapidamente por efeitos da pressão osmótica, forças capilares ou transpiração para a parte aérea (CHEN *et al.*, 2010; ZHU *et al.*, 2012).

Entre as NPs, as metálicas tem sido muito utilizadas, principalmente as que utilizam ferro, manganês, prata e zinco. Estes metais apresentam atividade biológica e afetam processos bioquímicos e assim o metabolismo da planta. A aplicação de NPs contendo estes metais apresenta resultados positivos na agricultura, no entanto, alguns podem resultar em efeitos tóxicos (KANNAUJIA *et al.*, 2019; PEREIRA *et al.*, 2021).

Como alternativa econômica e sustentável, NPs provenientes de materiais com menor agressão ao meio ambiente tem sido exploradas, como compostos biopoliméricos, geralmente resultante de proteínas, polissacarídeos ou lipídios, sendo estes biodegradáveis e biocompatíveis (CAMARA *et al.*, 2019; SHAKIBA *et al.*, 2020). Estas NPs podem ser carregadas com substâncias variáveis como fungicidas, fertilizantes, óleos essenciais e reguladores do crescimento vegetal. Este sistema permite uma liberação lenta dos compostos

ativos e tem potencial agrícola em diversas fases de desenvolvimento das plantas (KUMAR *et al.*, 2020; MALUIN *et al.*, 2020).

Sistemas de liberação poliméricos agem como compartimentos transportadores de substâncias e apresentam vantagens como a estabilidade biológica, física e química, ser de fácil preparo, além de serem aplicáveis em uma grande quantidade de substâncias visando melhorar suas propriedades químicas (SINHA *et al.*, 2004). Outro ponto importante é de que o material que compõe as partículas produzam metabólitos não-tóxicos e sejam degradados facilmente, daí a opção pelo uso de polímeros biodegradáveis naturais, como quitosana e alginato (LEE; MOONEY, 2012; MINCEA; NEGRULESCU; OSTAFE, 2012).

A quitosana é produzida pela desacetilação da quitina (NAGPAL; SINGH; MISHRA, 2010; RIDOLFI *et al.*, 2012), elemento encontrado principalmente no exoesqueleto de crustáceos (camarões, lagostas e caranguejos) (YOUNES; RINAUDO, 2015). Esse material tem várias vantagens como a não toxicidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade, o que favorece o transporte de compostos polares ativos em diversas aplicações biológicas, sendo considerado um excelente biopolímero para preparação de micro e NPs (SUNDAR; KUNDU; KUNDU, 2010; PIRES; BIERHALZ; MORAES, 2015).

Entre os diversos métodos desenvolvidos para preparar NPs de quitosana, a gelificação iônica usando tripolifosfato de sódio (TPP) é prática, porque o processo é relativamente fácil de controlar e não requer o uso de solventes orgânicos (FAN *et al.*, 2012).

Outro composto utilizado é o alginato, um polissacarídeo natural, constituído por dois tipos de ácido poliurônico (β -D-manurônico e α -L-gulurônico), sendo extraído de algas marrons pardas e algumas bactérias. É um composto biodegradável com custo relativamente baixo, além de possuir propriedades de bioadesão e baixa toxicidade (LEE; MOONEY, 2012).

Vários estudos associando a nanotecnologia com plantas trouxeram diferentes resultados. Para NPs de prata, estudos em arroz (*Oriza sativa* L.), mostraram que a exposição a estas causaram danos celulares e levaram a redução da massa vegetal (MIRZAJANI *et al.*, 2013). A aplicação de NPs de dióxido de titânio (TiO₂) e nitroprussiato de sódio (SNP) isoladamente ou combinados aliviaram os efeitos adversos de estresse hídrico induzido por polietilenoglicol (PEG) na germinação de sementes e no crescimento inicial de plântulas de trigo (FARAJI; SEPEHRI, 2019).

Pereira *et al.* (2017) desenvolveram nanocarreadores compostos de alginato/quitosana e quitosana /trifosfato para o GA₃. Os resultados, usando feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), mostraram a eficácia do nanocarregador com alginato/quitosana quando avaliado a área foliar, carotenoides e clorofilas, além da eficiência desse hormônio vegetal em aplicações

agrícolas, quando associado a nanotecnologia.

Pereira, Oliveira e Fraceto (2019) em estudo com produção de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), verificaram que o uso de nanocápsulas com alginato/quitosana associado a GA₃ proporcionaram uma melhoria na produção, com a produtividade aumentando quase quatro vezes quando comparado ao controle.

A nanoencapsulação dos doadores de NO surgiu como uma estratégia que poderia proteger essas moléculas da decomposição/degradação e permitir uma liberação de NO controlada, estendendo assim seu período de ação. Essa estratégia é muito explorada em aplicações biomédicas, evidenciando o efeito benéfico da associação do doador de NO com nanomateriais (SEABRA et al., 2022ab).

Oliveira *et al.* (2016) em estudo com estresse salino em plantas de milho comparou o efeito de NPs de quitosana com o doador MSA (ácido S-nitroso mercaptossuccínico) com a do doador de NO não encapsulado. A incorporação de S-nitroso-MSA nas NPs permitiu uma liberação controlada de NO e resultou em um maior teor de S-nitrosotióis foliares em comparação com o de S-nitroso-MSA livre. Houve também, com NO nanoencapsulado, melhoria dos efeitos deletérios da salinidade na atividade do fotossistema II, no conteúdo de clorofila e no crescimento de plantas de milho.

Do Carmo *et al.* (2021) ao avaliar o efeito da aplicação de NPs de quitosana contendo o doador de NO ácido S-nitroso-mercaptossuccínico (MSA) sobre a fisiologia foliar de mudas da espécie arbórea *Heliocarpus popayanensis* Kunth. em déficit hídrico, observaram efeitos positivos na fotossíntese, condutância estomática e eficiência instantânea de carboxilação, principalmente quando a formulação foi aplicada no solo.

Estudos apontam o potencial da utilização desta técnica em sementes, denominado *priming*. O tratamento de sementes advindo da nanotecnologia tem o intuito de promover a germinação e o estabelecimento das plantas através do tratamento das sementes antes da semeadura (BOURIOUG *et al.*, 2020; ABBASI KHALAKI *et al.*, 2021). O intuito deste processo é tornar a germinação mais rápida e homogênea, evitando com que a semente passe longos períodos mais suscetíveis a estresses ambientais ou ataque de patógenos (ACHARYA *et al.*, 2019).

Em um dos primeiros estudos no uso da nanotecnologia em sementes,

Khodakovskaya *et al.* (2013), ao utilizarem nanotubos de carbono, observaram maior absorção de água pela semente, promovendo melhora na germinação. Além disso, os nanotubos resultaram em tomateiros com um número de flores duas vezes maior do que plantas não tratadas. Em outro trabalho, NPs de quitosana promoveram melhora na germinação, aumento da biomassa e atividade antimicrobiana em sementes de arroz (*Oryza sativa L.*) (SATHIYABAMA; MUTHUKUMAR, 2020).

De modo geral, o tratamento das sementes tem o potencial de estimular o crescimento vegetal e processos metabólicos, resultando em alterações morfológicas. O tratamento das sementes provoca alterações na expressão de genes e afetam a atividade de fitohormônios, além de sinalizarem o sistema de defesa, proporcionando aumento dos níveis de antioxidantes e outras enzimas tornando as plantas mais resistentes aos diferentes tipos de estresse (DURAN *et al.*, 2017; KASOTE *et al.*, 2019; ACHARYA *et al.*, 2020).

Para Neto (2013), a expectativa é de que a nanotecnologia possa contribuir em uma produção sustentável e eficiente, atenuando os danos ao meio ambiente. Entretanto, para a concretização dessa ideia, são necessárias pesquisas. O custo para a fabricação de nanomateriais é fundamental e, estudos utilizando polímeros naturais indicam que os mesmos podem ser obtidos em grandes quantidades em um baixo valor (PÉREZ-DE-LUQUE, 2017). Porém, os estudos dos efeitos de sistemas nanocarreadores poliméricos em vegetais ainda são insuficientes, sendo necessárias mais avaliações sobre seus efeitos (PEREIRA, 2017).

Em relação aos estudos, os Estados Unidos destacam-se por apresentarem maior número de patentes depositadas, principalmente nas indústrias farmacêutica e alimentícia (BEZERRA *et al.*, 2017). Já o Brasil detém patentes depositadas no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) a respeito das NPs, a maioria para a indústria farmacêutica e de alimentos. Somente em 2020 obteve-se uma patente em relação à aplicação agrícola de doadores de NO (INPI, 2021).

Este cenário de poucos estudos em relação à nanotecnologia em todas suas áreas de aplicação é justificado pelo baixo investimento e pouca articulação entre governos, empresas e universidades, capazes de promover um melhor sistema de pesquisa e desenvolvimento (BEZERRA *et al.*, 2017).

Estas informações comprovam que o uso dessa tecnologia torna-se uma oportunidade de geração de patentes e trabalhos científicos, principalmente por suas inúmeras possibilidades de aplicação e vantagens para os diferentes setores da economia (BEZERRA *et*

al., 2017). Além da tecnologia estar ganhando mais espaço no país, o uso de nanotecnologia é inovador na agricultura e ainda mais singular quando envolve moléculas como o GA₃ e NO.

Concomitantemente, trabalhos com espécies nativas de bromélias são escassos e a associação desta recente tecnologia com GA₃ e NO em *Dyckia*, por exemplo, podem trazer avanços não somente no conhecimento e aplicabilidade da nanotecnologia, mas também nos efeitos fisiológicos e morfológicos em espécies cujos estudos nesta área são praticamente desconhecidos. Além disso, os estudos podem favorecer a domesticação e propagação em larga escala destas espécies, contribuindo para a sua inserção no mercado de plantas ornamentais.

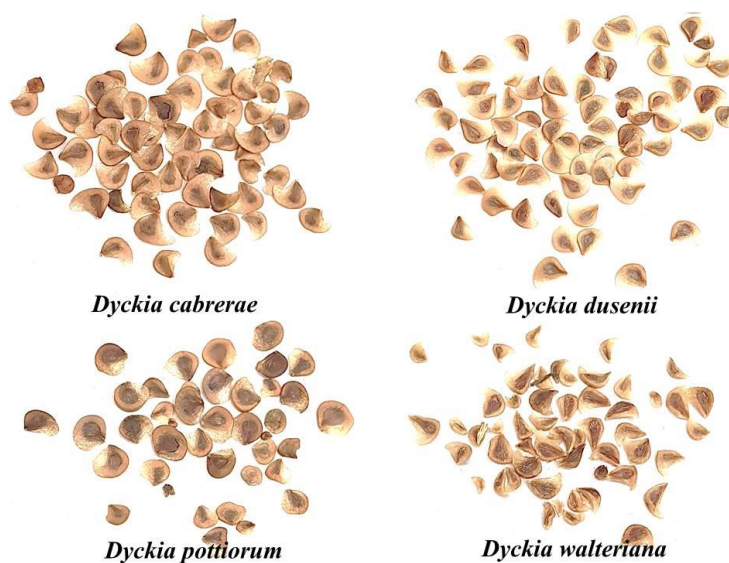
3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Sementes da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Frutos de *Dyckia cabrerae* L.B.Smith. & Reitz (Matriz de 22 anos), *Dyckia dusenii* L.B.Smith (Matriz de 22 anos), *Dyckia pottiorum* Leme. (Matriz de 8 anos) e *Dyckia walteriana* Leme. (Matriz de 23 anos) foram coletados de plantas matrizes, aproximadamente, 90 dias após o florescimento, entre os meses de outubro e novembro de 2020, na propriedade do colecionador Dr. Walter Miguel Kranz, localizada no município de Londrina, PR (23° 22' S e 51° 11' O). Segundo a classificação de Koppën, o clima na região é tipo Cfa (subtropical úmido), com temperatura média no mês mais frio de 17,0°C; 24,0°C, no mês mais quente; e temperatura média anual de 21,2°C. A precipitação anual média é de 1632 mm (IAPAR, 2019).

Os frutos foram embalados em sacos de papel tipo Kraft®, identificados e transportados para o laboratório e depois secos em bandejas plásticas, em local sombreado e ventilado (25±2°C e umidade relativa - UR de 50±10%), por três dias, para completarem a deiscência e facilitar a extração das sementes e, armazenadas em geladeira, em sacos de papel Kraft® a 7,5±1,0°C e UR 26±7%, até a instalação dos experimentos (270 dias).

Figura 3.1.1 - Sementes das espécies colhidas em campo.



Fonte: próprio autor (2021)

3.2 PREPARO DAS FORMULAÇÕES

3.2.1 NANOPARTÍCULAS (NPs) CONTENDO ÁCIDO GIBERÉLICO (GA₃)

As formulações de NPs foram fornecidas pelo Professor Dr. Leonardo Fernandes Fraceto, da UNESP/Sorocaba-SP, sendo preparadas com concentração de 50 mg L⁻¹.

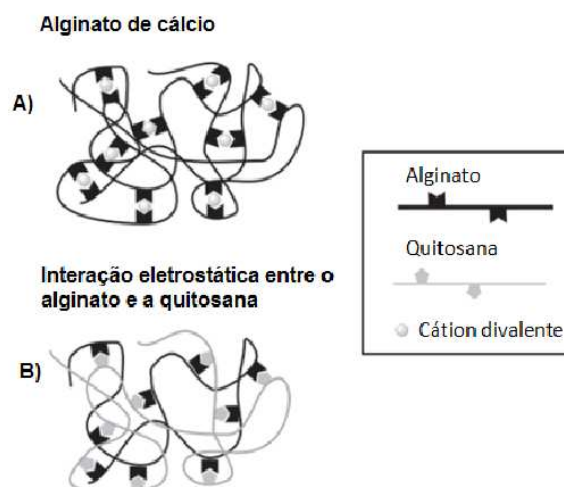
As NPs ALG/CS foram preparadas pelo método de gelificação ionotrópica (Figura 3.2.1.1). Inicialmente, com auxílio de uma bomba peristáltica (Miniplus 3, Gilson), foi adicionado, pelo período de 60 minutos, 3,75 mL de solução de CaCl₂ (18 mM) à 59 mL de uma solução de ALG (0,063% m/v e pH de 4,9) que se manteve sob forte agitação magnética (500 rpm). Durante esta etapa do processo, ocorre a reticulação do CaCl₂ sobre o ALG através de interações iônicas formando uma estrutura denominada “eggbox” (PEREIRA *et al.*, 2017).

Subsequentemente, o GA₃ foi adicionado sob agitação até a dissolução completa e atingimento da concentração desejada. A solução ALG/CaCl₂/GA₃ foi mantida sob agitação, sendo adicionada 12,5 mL de solução aquosa de quitosana (0,07% m/v e pH 4,6) preparada em uma solução aquosa contendo 5,7% de ácido acético. A solução de quitosana foi adicionada ao longo de um período de 90 minutos, formando uma dispersão coloidal (PEREIRA *et al.*, 2017). O mesmo processo foi realizado sem a presença do GA₃. As suspensões obtidas foram diluídas em água destilada para obtenção das doses a serem utilizadas.

As NPs de CS/TPP foram preparadas pelo método de gelificação, com modificações. Primeiramente, 10 mL de uma solução de CS (0,2%, pH 4,5), preparada em uma solução aquosa de ácido acético 0,6%, foi mantida sob agitação vigorosa (500 rpm) e o GA₃ foi adicionado na concentração final de 50 mg L⁻¹. Após a dissolução do GA₃, foram adicionados 6 mL de solução TPP (0,1%, pH 4,5 a 4°C). As (NP CS/TPP) também foram preparadas sem a presença do regulador.

As formulações foram caracterizadas por tamanho, potencial zeta, eficiência de encapsulamento (quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC), índice de polidispersividade (PDI) e pH. As NP ALG/CS com e sem GA₃ apresentaram tamanho médio de 450±10nm, índice de polidispersividade (PDI) de 0,3, potencial zeta de -29±0,5 Mv, pH de 4,9 e 100% de eficiência de encapsulamento. As NP CS/TPP com e sem GA₃ apresentaram tamanho médio de 195±1 nm, índice de polidispersividade (PDI) de 0,3, potencial zeta de +27±3 Mv, pH de 4,7 e 90% de eficiência de encapsulamento. Ambas NPs permaneceram estáveis durante 60 dias a temperatura ambiente (PEREIRA *et al.*, 2017).

Figura 3.2.1.1 - Representação do complexo alginato-quitosana e íons cálcio.



Fonte: Melina Vasconcelos Leite (2014)

3.2.2 NANOPARTÍCULAS (NPs) CONTENDO DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

As suspensões de NPs contendo a S-nitrosoglutationa (GSNO) como doadora de NO foram disponibilizadas pela Prof^a. Dr^a. Amedea Barozzi Seabra da Universidade Federal do ABC.

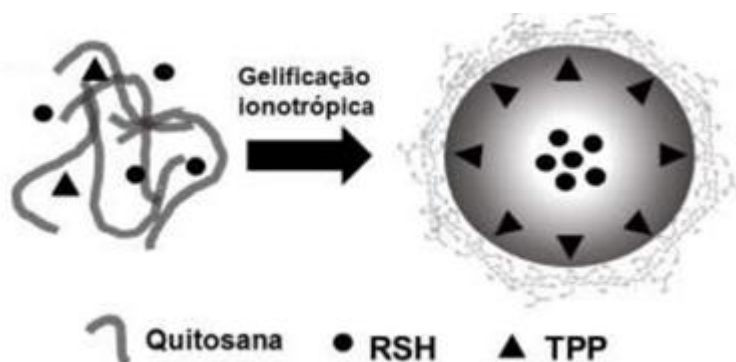
A GSNO foi sintetizada e caracterizada segundo a metodologia de Silveira *et al.* (2016). A glutathione reduzida (GSH) foi dissolvida em ácido clorídrico (1 mol L^{-1}) a $1,2 \text{ mol L}^{-1}$. Uma quantidade equimolar de nitrito de sódio (NaNO_2) foi adicionado à solução de GSH em banho de gelo por 30 minutos e agitação magnética a fim de nitrosar o GSH. Posteriormente, foi feita a adição de acetona e esta solução filtrada e lavada várias vezes com água fria obtendo no final o GSNO precipitado. O sólido obtido foi liofilizado durante 24 horas e a formação de GSNO foi confirmada em 336 e 545 nm usando espectrometria UV-VIS. A concentração final de GSNO obtida foi de 20 mM.

Para a obtenção de NPs de GSNO (Figura 3.2.2.1) as mesmas foram preparadas usando o método de gelificação iônica (MARCATO *et al.*, 2013; PELEGRINO *et al.*, 2017). Resumidamente, a quitosana (CS) foi dissolvida em ácido acético (1%) e 26 mmol L^{-1} de GSH foram adicionados à solução. Após 90 minutos de agitação magnética à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), uma solução de tripolifosfato de sódio (TPP) a $0,6 \text{ mg mL}^{-1}$ foi adicionada gota a gota à solução CS/GSH. A mistura final foi magneticamente agitada por pelo menos 90 minutos. A concentração final de GSH foi igual a 20 mmol L^{-1} . Para obter NPs de quitosana

contendo GSNO (uma quantidade equimolar de nitrito de sódio (NaNO₂) relacionada ao GSH foi adicionado à dispersão de NP-CS/TPP-GSH. A suspensão final foi homogeneizada por 60 minutos no escuro. A concentração final de NP-CS/GSNO foi de 20 mM. O mesmo procedimento foi realizado sem a presença de GSH, para obter as NPs contendo apenas CS/TPP.

As formulações foram caracterizadas por tamanho, dispersão dinâmica de luz, análises de rastreamento de NPs, potencial zeta, eficiência de encapsulamento, índice de polidispersividade (PDI) e pH.

Figura 3.2.2.1 - Estrutura das nanopartículas (NPs) contendo a S-nitrosoglutationa (GSNO).



Fonte: Milena Trevisan Pelegrino (2020)

3.3 CARACTERIZAÇÃO DO LOTE DE SEMENTES

Para a caracterização do lote de sementes, logo após a coleta, foi determinado o teor de água e a viabilidade pelo teste de tetrazólio, ambos seguindo as especificações das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Na obtenção do teor de água, 0,2 g de sementes de cada espécie foram colocadas em estufa a 105±3°C durante 24 horas, com cálculo obtido através da diferença de peso inicial e final das amostras. Para tanto, foram utilizadas 4 repetições, com a obtenção de uma média.

$$\text{Teor de água (\%)} = \frac{100(P-p)}{P-t}$$

Onde:

P = peso inicial, peso do recipiente e sua tampa mais o peso das sementes úmidas;

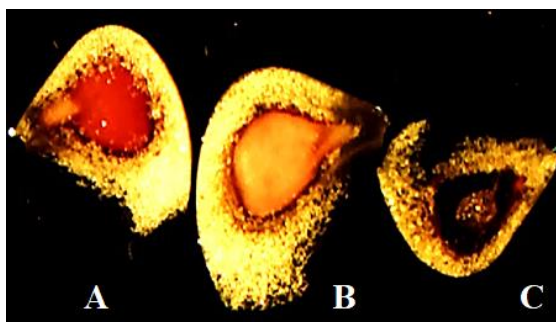
p = peso final, peso do recipiente e sua tampa mais o peso das sementes secas;

t = tara, peso do recipiente com sua tampa.

Para a realização do teste de tetrazólio, as sementes foram colocadas em criotubos com capacidade de 2 mL, com adição de água destilada até completar o volume. Os criotubos foram mantidos por 24 horas a 25°C em câmara de germinação. Em seguida, foi

retirada a água e adicionada solução de sal de tetrazólio a 1%, e as sementes mantidas novamente em câmara de germinação por 24 horas a 30°C, na ausência de luz (criotubos recobertos com papel alumínio). Na sequência, as sementes foram avaliadas quanto a sua viabilidade (Figura 3.3.1) com o auxílio de uma lupa. Para o cálculo da porcentagem de sementes viáveis não foram consideradas as sementes vazias, ou seja, que não apresentavam embrião.

Figura 3.3.1 - Representação de semente de *Dyckia* sp. viável (A), inviável (B) e vazia (C).



Fonte: Próprio autor (2021)

3.4 TESTES EM SEMENTES

Germinação: Para o teste de germinação, as sementes foram colocadas sobre papel mata-borrão (10,5 cm x 10,5 cm) umedecido com água destilada na quantidade de 2,5 vezes a massa do papel não hidratado, e colocadas em caixas de poliestireno cristal (Gerbox[®]) (11 cm x 11 cm x 3 cm). Os gerbox[®] foram mantidos em câmara de crescimento (tipo B.O.D.) à temperatura de 25°C, conforme recomendações das Regras de Análise de Sementes. A porcentagem total de germinação foi determinada considerando-se somente as plântulas normais, ou seja, as que mostraram potencial para continuar seu desenvolvimento e dar origem a plantas normais quando desenvolvidas sob condições favoráveis. Foi considerada normal uma plântula com proporção de 1:2, sendo uma de parte aérea para duas de raiz (BRASIL, 2009). A porcentagem de germinação foi realizada ao 10º dia.

Plântulas anormais: Foram avaliadas as plântulas que não apresentaram um desenvolvimento normal, ou seja, aquelas que não mostram potencial para continuar seu desenvolvimento mesmo crescendo em condições favoráveis (BRASIL, 2009).

Primeira Contagem de Germinação: Foi conduzida juntamente ao teste de germinação, sendo realizada a contagem no momento da protrusão da raiz primária da primeira

plântula. Os resultados foram apresentados em porcentagem e realizada no 4º dia do teste de germinação (NAKAGAWA, 1999).

Índice de Velocidade de Germinação: Concomitantemente ao teste de germinação, foi realizada a contagem de sementes germinadas diariamente, através da fórmula descrita por Maguire (1962): $IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$, em que:

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

N1, N2, Nn = número de dias de semeadura à primeira, segunda e última contagem.

Tempo Médio de Germinação: O Tempo médio de germinação (TMG) foi obtido através da metodologia descrita por Labouriau (1983), e realizado simultaneamente ao teste de germinação, sendo diariamente contabilizado o número de sementes germinadas, este índice é calculado pela equação:

$$TM = \frac{G1T1 + G2T2 + \dots + GnTn}{G1 + G2 + \dots + Gn}$$

Em que:

TM = é o tempo médio, em dias, necessário para atingir a germinação máxima;

G1, G2 e Gn = é o número de sementes germinadas e nos tempos T1, T2 e Tn, respectivamente.

Comprimento e massa seca de plântulas: Para o comprimento das plântulas (mm), as mesmas foram medidas com o auxílio de um paquímetro. Para determinação da massa seca, as plântulas foram alocadas em sacos de papel e mantidas em estufa com circulação forçada de ar a 65 °C até atingirem massa constante e pesadas em balança analítica (precisão $\pm 0,0001g$) e o resultado expresso em mg.

ARTIGO A: ÁCIDO GIBERÉLICO LIVRE E NANOENCAPSULADO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Dyckia* spp. (BROMELIACEAE) NATIVAS DO BRASIL

4.1 RESUMO

O Brasil apresenta a maior riqueza de espécies do gênero *Dyckia*, entretanto, muitas correm risco devido a destruição dos habitats e extrativismo predatório, sendo alternativa a propagação sexuada em larga escala. Neste sentido, reguladores vegetais têm sido utilizados para estimular processos germinativos. Dentre os reguladores, o ácido giberélico (GA₃) se destaca atuando diretamente nos processos germinativos, no entanto, trata-se de uma molécula instável e de fácil degradação. Desta maneira, sua nanoencapsulação visa proteger e promover a liberação controlada. O trabalho avaliou os efeitos de doses de GA₃ na germinação de *D. cabreræ*, *D. dusenii*, *D. pottiorum* e *D. walteriana*. Em seguida, o efeito do GA₃ nanoencapsulado foi avaliado em sementes de *D. walteriana* que respondeu melhor ao regulador. Na primeira etapa, as sementes foram embebidas durante cinco minutos em 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,5 e 5,0 mg L⁻¹ de GA₃. Na segunda, sementes de *D. walteriana* foram tratadas com nanopartículas de alginato/quitosana (NP ALG/CS) e quitosana/tripolifosfato (NP CS/TPP) contendo GA₃, comparando-se com o GA₃ livre e com NP de ALG/CS e CS/TPP sem GA₃. Em ambos os casos, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições de cinquenta sementes e avaliados diversos parâmetros germinativos. As sementes das quatro espécies apresentaram comportamento trifásico de absorção de água após a embebição. As espécies *D. dusenii* e *D. walteriana* tiveram respostas significativas ao GA₃ para a maioria das variáveis, com destaque para a germinação, que aumentou de 35% para mais de 60% na dose de 5,0 mg L⁻¹ de GA₃. Já as espécies *D. cabreræ* e *D. pottiorum* apresentaram respostas positivas ao GA₃ apenas em parâmetros do crescimento vegetativo. No segundo experimento, observou-se que o uso de GA₃ nanoencapsulado resultou em respostas da germinação de sementes de *D. walteriana* em doses menores que o regulador livre (entre 0,75 e 1,0 mg L⁻¹), com maior eficiência das NPs de ALG/CS. Em suma, são recomendadas para *D. dusenii* a dose de 5,0 mg L⁻¹ e para *D. walteriana* entre 4,4 e 5,0 mg L⁻¹ de GA₃, não sendo recomendado GA₃ para a germinação de *D. cabreræ* e *D. pottiorum*. A forma nanoencapsulada contendo ALG/CS-GA₃ entre 0,75 e 1,0 mg L⁻¹ são recomendados para germinação de *D. walteriana*.

Palavras-chave: Bromélias. Domesticação. Giberelinas. Nanotecnologia. Reguladores do crescimento vegetal.

4.2 INTRODUÇÃO

O Brasil é detentor de grande diversidade florística, em especial em Bromeliaceae, sendo catalogadas 1774 espécies (GOUDA; BUTCHER; GOUDA, 2022). Entre os estados com maior concentração de espécies, destacam-se a Bahia (358), Minas Gerais (327), Espírito Santo (331) e Rio de Janeiro (330), ocorrendo principalmente nos biomas da Mata Atlântica (934) e Cerrado (252) (REFLORA *et al.*, 2022).

A produção de bromélias em escala comercial apresenta-se como uma atividade viável e bem explorada no Brasil, destacando-se seu uso em projetos paisagísticos e na decoração de ambientes internos devido a fácil manutenção, rusticidade e aclimação dessas plantas em diversos ambientes (ANACLETO; NEGRELLE, 2013). As espécies apresentam diferentes cores e conformações de folhas, o que faz aumentar seu valor agregado. Nesse sentido, as bromélias do gênero *Dyckia* sp. destacam-se pela ausência do tanque, comumente presente nessas plantas e por sua morfologia esteticamente original.

Entretanto, em virtude do aumento do uso de bromélias no paisagismo brasileiro, grandes quantidades de plantas acabam sendo retiradas da natureza, sendo um dos fatores que contribuem para o aumento de espécies ameaçadas de extinção (PEREIRA; CUQUEL; PANABIANCO, 2010). Entre as espécies de *Dyckia*, por exemplo, *D. walteriana* Leme. se enquadra na categoria “criticamente em perigo”, exigindo medidas urgentes para a conservação das populações (MUSEGANTE *et al.*, 2020; REFLORA, 2022).

Tem-se intensificado o interesse na propagação de espécies nativas devido ao destaque atual nos problemas ambientais, no entanto, é restrito o conhecimento disponível para o manejo e análise das sementes da maioria das espécies, de modo a caracterizar seus atributos físicos e fisiológicos. O entendimento sobre o comportamento dos fatores de crescimento e desenvolvimento de espécies nativas permite a criação de protocolos de cultivo, possibilitando a introdução de novas espécies de valor econômico e ornamental no mercado e ainda, a recomposição de áreas já degradadas (RIBEIRO *et al.*, 2012; BORGES *et al.*, 2018).

Para que o processo de germinação ocorra de forma uniforme e com maior percentual possível, alguns procedimentos podem ser adotados nas sementes, como a aplicação de reguladores do crescimento vegetal, como o ácido giberélico (GA₃). As giberelinas promovem a germinação através de diversas mudanças de estado metabólico na semente que permitem ao embrião restabelecer sua atividade (HOSSEL *et al.*, 2018).

Uma das formas do estímulo da germinação proporcionada pelo GA₃ é através da indução da produção de enzimas hidrolíticas (como as amilases) no endosperma, as quais rompem o amido e outras substâncias de reserva, gerando dessa forma compostos orgânicos solúveis que fornecem energia para o embrião em germinação (HOSSEL *et al.*, 2018). Há relatos de melhoria na germinação e da superação da dormência de sementes de diversas espécies pelo uso de GA₃ (HOSSEL *et al.*, 2018).

Apesar disso, um dos obstáculos da aplicação de reguladores do crescimento vegetal é que os mesmos se degradam facilmente quando expostos a fatores ambientais como a luz e temperatura, resultando na perda de sua atividade. Nesse contexto, a utilização da nanotecnologia visa fornecer materiais em nanoescala capazes de melhorar a estabilidade e atividade, além de reduzir possíveis impactos ambientais (ASHRAF *et al.*, 2021).

Desse modo, a nanoencapsulação proporciona vantagens como o maior tempo de ação, aumento da atividade biológica e redução da concentração necessária para o efeito desejado. Outro ponto importante é de que o material que compõe as partículas produza metabólitos não tóxicos e que seja degradado facilmente, daí a opção pelo uso de polímeros biodegradáveis naturais, como o alginato e a quitosana (FRANCISCO; GARCÍA-ESTEPA, 2018; PASCOLI *et al.*, 2018).

Estudos associando as nanopartículas (NPs) contendo reguladores vegetais como o GA₃ ainda são recentes e principalmente destinados a grandes culturas como em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (PEREIRA *et al.*, 2017), pepino (*Cucumis sativus* L.) (YANG *et al.*, 2018) e tomate (*Solanum lycopersicum* var. Cerasiforme) (PEREIRA; OLIVEIRA; FRACETO, 2019). Desse modo, torna-se inovador a aplicação desta tecnologia com o intuito de melhorar a germinação de sementes com baixo vigor e a utilização de espécies ornamentais, como as do gênero *Dyckia*.

Assim, o trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de GA₃ em quatro espécies de *Dyckia*. Além disso, avaliou-se o potencial do GA₃ nanoencapsulado em estimular a germinação de sementes de uma das espécies responsivas ao regulador de crescimento.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e caracterização do lote

O experimento foi conduzido no Laboratório de Sementes da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Frutos maduros de *Dyckia cabrerae* L.B.Smith & Reitz, *Dyckia dusenii* L.B.Smith, *Dyckia pottiorum* Leme. e *Dyckia walteriana* Leme. foram coletados de plantas matrizes, cerca de 90 dias após o florescimento, em outubro de 2020, na propriedade do colecionador Dr. Walter Miguel Kranz, localizada no município de Londrina/PR (23° 22'S e 51° 11'O).

Os frutos foram alocados em sacos de papel Kraft®, identificados e transportados para o laboratório. Em local sombreado, os mesmos foram secos ao ar livre por três dias para facilitar a extração das sementes, que ficaram armazenadas em sacos de papel Kraft®, na geladeira a $7,5 \pm 1,0^\circ\text{C}$ e umidade relativa (UR) $26 \pm 7\%$, durante 270 dias. Para a caracterização do lote, foram determinados o teor de água e a viabilidade das sementes pelo teste de tetrazólio, ambos seguindo as especificações das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Esta caracterização ocorreu após a colheita (10 dias) e antes da instalação do experimento (270 dias).

Para a determinação do teor de água, 0,2 g de sementes de cada espécie foi colocado em estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Na realização do teste de tetrazólio, utilizou-se 4 repetições de 25 sementes cada. Para cada espécie, as sementes foram colocadas em criotubos com capacidade de 2 mL e na sequência completados com água destilada. Após 24 horas a 25°C em câmara de germinação, a água foi retirada e adicionada solução de sal de tetrazólio a 1%. Na sequência, as sementes permaneceram em câmara de germinação na ausência de luz por 24 horas a 30°C . Após este período, foi avaliada a porcentagem de sementes viáveis com o auxílio de uma lupa. Para o cálculo da porcentagem de sementes viáveis, não foram consideradas as sementes vazias, ou seja, aquelas que não apresentavam embrião.

Preparo das formulações

O ácido giberélico (GA_3 - 90%), alginato de sódio (ALG), quitosana (CS) e tripolifosfato (TPP) foram obtidos a partir da empresa Sigma-Aldrich®. As NPs foram fornecidas pelo Professor Dr. Leonardo Fernandes Fraceto da Universidade Estadual Paulista (UNESP/Sorocaba) seguindo a metodologia de Pereira *et al.* (2017).

Para o preparo das soluções de GA_3 livre, o mesmo foi pesado e diluído em álcool (70%), sendo, posteriormente, acrescentada água destilada, obtendo concentração inicial

de 50 mg L⁻¹. Na sequência, esta solução foi diluída também em água destilada para a obtenção das doses desejadas (0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 2,5 e 5,0 mg L⁻¹).

As nanoformulações foram preparadas na concentração inicial de 50 mg L⁻¹. As NPs de alginato/quitosana (ALG/CS) foram preparadas pelo método de pré-gelificação ionotrópica. Inicialmente, com auxílio de uma bomba peristáltica (Miniplus 3, Gilson), foram adicionados, por 60 minutos, 3,75 mL de solução de cloreto de cálcio - CaCl₂ (18 mM) a 59 mL de uma solução de ALG (0,063%, pH de 4,9) sob forte agitação magnética (500 rpm). Durante esta etapa, ocorre a reticulação do CaCl₂ sobre o ALG através de interações iônicas formando uma estrutura denominada “egg box”.

Posteriormente, o GA₃ foi adicionado sob agitação até a dissolução completa para atingir a concentração desejada (50 mg L⁻¹). A solução ALG/CaCl₂/GA₃ foi mantida sob agitação e 12,5 mL de uma solução aquosa de quitosana (0,07% pH 4,6), preparada em uma solução aquosa contendo 5,7% de ácido acético, foram adicionados ao longo de 90 minutos, formando um complexo polieletrólítico entre os polímeros. O mesmo processo ocorreu sem a presença do regulador GA₃ para a obtenção das NPs de ALG/CS sem o regulador de crescimento.

As NPs de quitosana/tripolifosfato (CS/TPP) foram preparadas pelo método de gelificação, com modificações. Primeiramente, 10 mL de uma solução de CS (0,2%, pH 4,5), preparada em uma solução aquosa de ácido acético 0,6%, foram mantidos sob agitação vigorosa (500 rpm) e o GA₃ foi adicionado até a concentração final de 50 mg L⁻¹. Após a dissolução do GA₃, foram adicionados 6 mL de solução TPP (0,1%, pH 4,5 a 4°C). As NPs de CS/TPP também foram preparadas sem a presença do regulador.

As formulações foram caracterizadas por tamanho, potencial zeta, eficiência de encapsulamento (quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC), índice de polidispersividade (PDI) e pH. As NPs ALG/CS com e sem GA₃ apresentaram tamanho médio de 450 ± 10nm, PDI de 0,3, potencial zeta de -29 ± 0,5 mV, pH de 4,9 e 100% de eficiência de encapsulamento. As NPs CS/TPP com e sem GA₃ apresentaram tamanho médio de 195 ± 1 nm, PDI de 0,3, potencial zeta de +27 ± 3 mV, pH de 4,7 e 90% de eficiência de encapsulamento. Ambas as NPs permaneceram estáveis durante 60 dias sob temperatura ambiente (PEREIRA *et al.*, 2017).

Tratamentos

Em todos os experimentos, as sementes foram esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio 1% (1 minuto), seguida da imersão em álcool 70% (1 minuto) e, posteriormente, lavadas com água destilada. Em seguida, embebidas em seus respectivos tratamentos em frascos Erlenmeyer (50 mL), contendo 5 mL da formulação, agitando-os durante 5 minutos à temperatura ambiente. No tratamento controle (0 mg L⁻¹), as sementes foram pré-embebidas em água destilada.

No trabalho com o GA₃ livre, sementes de *D. cabreræ*, *D. dusenii*, *D. pottiorum* e *D. walteriana* foram submetidas às doses de 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,5 e 5 mg L⁻¹ de GA₃. No experimento com as NPs, as sementes de *D. walteriana* foram submetidas aos seguintes tratamentos: NPs de ALG/CS e CS/TPP contendo GA₃ e NPs de ALG/CS e CS/TPP sem GA₃. Foram utilizadas as doses 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,5 e 5,0 mg L⁻¹ de GA₃ e as diluições correspondentes das NPs sem o regulador. Os dados de GA₃ livre neste experimento foram baseados no experimento anterior.

Avaliações

Para cada espécie, foram realizados testes para a primeira e contagem final de germinação, visto que não há recomendação nas Regras para Análise de Sementes para as espécies estudadas. Foi considerado o 4º dia para a primeira contagem e o 10º dia para o encerramento do teste. Foram avaliadas em ambos os experimentos a porcentagem de germinação (GER) e de plântulas anormais (PA), primeira contagem de germinação (PCG), índice de velocidade de germinação (IVG), o tempo médio de germinação (TMG) e o comprimento (CP) e massa seca das plântulas (MSP).

As sementes foram colocadas para germinar sobre papel mata-borrão umedecido com água destilada na quantidade de 2,5 vezes a massa do papel não hidratado, e acondicionadas em caixas de poliestireno cristal (Gerbox[®]) de dimensão (11 cm x 11 cm x 3 cm). Os gerbox[®] foram mantidos em câmara de crescimento (tipo B.O.D.) à 25°C, sob fotoperíodo de 8 horas (BRASIL, 2009).

A GER foi determinada considerando-se as plântulas normais e também avaliadas as plântulas anormais (BRASIL, 2009), sendo consideradas normais as que mostraram potencial para continuar seu desenvolvimento e dar origem a plantas normais quando desenvolvidas sob condições favoráveis. A PCG foi realizada no momento da protrusão da raiz primária, o que ocorreu ao 4º dia (NAKAGAWA, 1999). O resultado foi expresso em porcentagem.

Concomitantemente ao teste de germinação, foi realizada a contagem de sementes germinadas a fim de estabelecer o IVG obtido através da fórmula descrita por Maguire (1962). $IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$, em que: G1, G2 e Gn = número de plântulas normais, computadas na primeira, segunda e última contagem; N1, N2, Nn = número de dias de semeadura à primeira, segunda e última contagem.

O TMG foi obtido através da metodologia descrita por Labouriau (1983), e realizado simultaneamente ao teste de germinação, sendo diariamente contabilizado o número de sementes germinadas. Este índice é calculado pela equação:

$$TM = \frac{G1T1 + G2T2 + \dots + GnTn}{G1 + G2 + \dots + Gn}$$

Em que:

TM = é o tempo médio, em dias, necessário para atingir a germinação máxima;

G1, G2 e Gn = é o número de sementes germinadas e nos tempos T1, T2 e Tn, respectivamente.

Ao final de 10 dias, foram determinados a GER e PA e o resultado expresso em porcentagem, além do CP (mm) através da medição das plântulas normais e obtido com o auxílio de um paquímetro. Na sequência, foi determinada a MSP (mg) em balança analítica (precisão $\pm 0,0001g$), após manter as plântulas em sacos de papel e estufas com circulação forçada de ar a 65 °C até atingirem massa constante.

Curva de embebição

Objetivando identificar as fases do processo germinativo, as sementes foram pesadas em intervalos de 1 hora (nas primeiras 8 horas) e posteriormente a cada 2 horas até decorrer 100 horas do início das pesagens.

As sementes foram dispostas em papel mata borrão umedecido com água destilada, no volume 2,5 vezes o peso seco do papel e colocadas em caixas tipo gerbox[®]. No tratamento das sementes com GA₃, as mesmas ficaram embebidas por 5 minutos nas doses de 0,75 mg L⁻¹ para espécies *D. cabreræ* e *D. pottiorum* e 5,0 mg L⁻¹ para *D. dusenii* e *D. walteriana*. As sementes sem tratamento com GA₃ foram embebidas em água destilada pelos mesmos 5 minutos. Na sequência, as sementes foram dispostas em papel mata borrão. Antes da obtenção da massa das sementes (g), as mesmas foram secas superficialmente com auxílio de papel de germinação, e a massa obtida em balança semi analítica.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado nas duas etapas. Na primeira, foi constituído de sete tratamentos (doses) (0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,5 e 5,0 mg L⁻¹) e, na segunda etapa, composto de 5 tratamentos (GA₃ livre, NP ALG/CS/GA₃, NP ALG/CS, NP CS/TPP/GA₃ e NP CS/TPP) e em cada foram utilizadas 7 doses (0; 0,25;0,5;0,75;1,0;2,5 e 5,0 mg L⁻¹).

Para o teste de germinação das duas etapas e curva de embebição, em cada dose, foram utilizadas 4 repetições de 50 sementes. Para as medições de comprimento e massa seca, foram selecionadas aleatoriamente 16 plântulas por repetição, e o resultado expresso pela média das quatro plântulas.

Os pressupostos de normalidade dos erros e homogeneidade de variâncias foram testados através do Shapiro-Wilk e Bartlett ($p \geq 0,05$), respectivamente. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância a 5% de significância. Quando observado efeito significativo das doses, foi realizado a análise de regressão linear ou não-linear (quadrático, logístico de 3 ou 4 parâmetros, segmentado, modelo de Brain-Cousens). Para a obtenção das curvas de embebição, os dados foram ajustados por meio de modelos cúbicos. Para a realização das análises, foi utilizado o pacote AgroR (SHIMIZU; MARUBAYASHI; GONÇALVES, 2021) do *software* R (R CORE TEAM, 2022).

4.4 RESULTADOS

Caracterização do lote

Na caracterização do lote das sementes, os valores de viabilidade e teor de água das sementes são apresentados na Tabela 4.4.1.

Tabela 4.4.1- Viabilidade pelo teste de tetrazólio (%), germinação (%) e teor de água (%) de sementes de *Dyckia* spp. após a colheita (10 dias) e depois de armazenadas (270 dias).

Espécie	Viabilidade		Germinação		Teor de água	
	10 dias	270 dias	10 dias	270 dias	10 dias	270 dias
<i>Dyckia cabreræ</i>	79	68	71	38	9,2	8,5
<i>Dyckia dusenii</i>	81	71	75	36	9,5	8,9
<i>Dyckia pottiorum</i>	88	69	84	45	8,7	8,1
<i>Dyckia waltheriana</i>	78	73	75	37	8,4	7,7

As quatro espécies estudadas possuíam alta viabilidade logo após a colheita, variando de 78 a 88% e germinação de 71 a 84%. Após o armazenamento durante 270 dias em local seco e frio, houve redução da viabilidade para valores entre 68 e 73% e germinação para 36 a 45%. Além disso, o teor de água se manteve baixo após o armazenamento, variando de 8,4 a 9,5% após a colheita para 7,7 a 8,9% após o armazenamento.

No entanto, destaca-se que foi observada uma redução da viabilidade e significativa diminuição da germinação ao longo do tempo, indicando uma possível indução de dormência provocada pelo período de armazenamento. Também não foram identificados patógenos/fungos nas sementes durante o período de conservação e no teste de germinação.

Efeito do GA₃ nas espécies de Dyckia

A Tabela 4.4.2 apresenta os valores de *p*-valor da análise de variância das variáveis avaliadas de sementes de bromélias (*D. cabreræ*, *D. dusenii*, *D. pottiorum* e *D. walteriana*) em função das diferentes doses de GA₃.

Tabela 4.4.2 - *p*-valor do teste F da análise de variância e coeficiente de variação (CV%) para as variáveis: primeira contagem de germinação (PCG) (%), germinação (GER) (%), plântulas anormais (PA) (%), índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG) (dias), comprimento (mm) (CP) e massa seca (MSP) (mg) de plântulas para as espécies *D. cabreræ*, *D. dusenii*, *D. pottiorum* e *D. walteriana* em função de doses de ácido giberélico (GA₃).

<i>D. cabreræ</i>							
	PCG	GER	PA	IVG	TMG	CP	MSP
<i>p</i> -valor	0,8012	0,8558	0,9081 ^t	0,8954	0,7463	0,8915	<0,001
CV (%)	41,14	16,33	50,42	7,35	4,86	5,49	10,10
<i>D. dusenii</i>							
<i>p</i> -valor	0,0037	<0,001	0,9844 ^t	<0,001	0,0211	0,0011	<0,001
CV (%)	26,34	11,45	40,2	13,00	5,40	8,65	11,08
<i>D. pottiorum</i>							
<i>p</i> -valor	0,0102	0,3135	0,8692 ^t	0,9646	0,0166	0,0403	<0,001
CV (%)	23,44	14,95	37,86	17,23	7,81	16,02	14,80
<i>D. walteriana</i>							
<i>p</i> -valor	<0,001	<0,001	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CV (%)	15,80	6,00	-	5,18	3,16	2,89	5,78

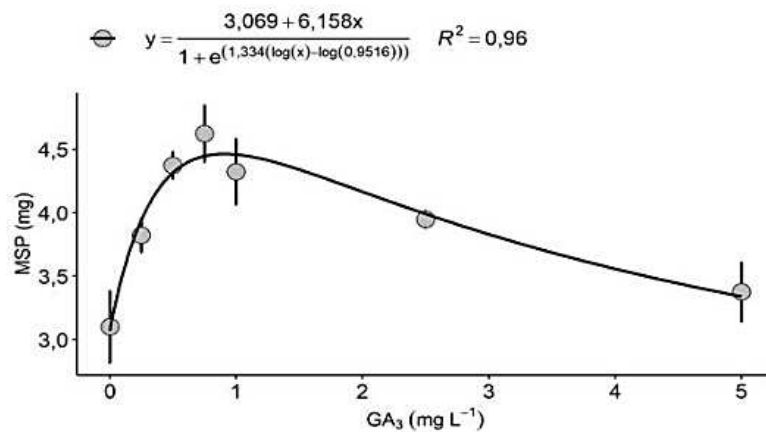
^tDados transformados para $x^{0.5}$.

Houve resposta às doses de GA₃ para todas as espécies. PA não respondeu ao GA₃ em nenhuma das espécies, variando de 2 a 4%. Para *D. cabreræ*, somente a variável MSP

diferiu entre as doses de GA₃. Para *D. pottiorum*, houve resposta para GER, TMG, CP e MSP, enquanto *D. walteriana* e *D. dusenii* responderam para todas as variáveis (exceto PA).

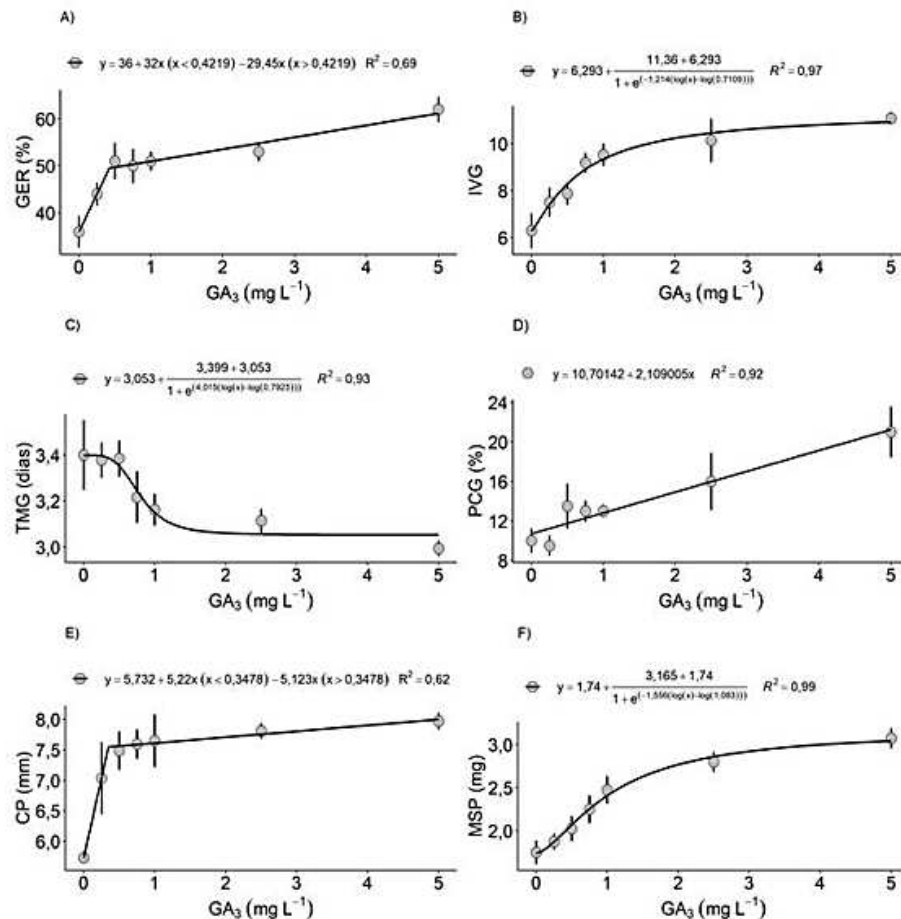
D. cabreræ apresentou aumento de MSP até a dose estimada de 1,2 mg L⁻¹, obtendo massa de 4,5 mg nesta dose e, a partir deste ponto, houve redução. No controle, por exemplo, a MSP foi de 3,1 mg (Figura 4.4.1).

Figura 4.4.1 - Massa seca de plântulas (MSP) de *D. cabreræ* em função de doses de ácido giberélico (GA₃).



Para *D. dusenii* todas variáveis, exceto PA, apresentaram respostas sob as doses de GA₃ (Figura 4.4.2).

Figura 4.4.2 - Germinação (GER) (A), índice de velocidade de germinação (IVG) (B), tempo médio de germinação (TMG) (C), primeira contagem de germinação (PCG) (D), comprimento (CP) (E) e massa seca de plântulas (MSP) (F) de *D. dusenii* em função de doses de ácido giberélico (GA₃).

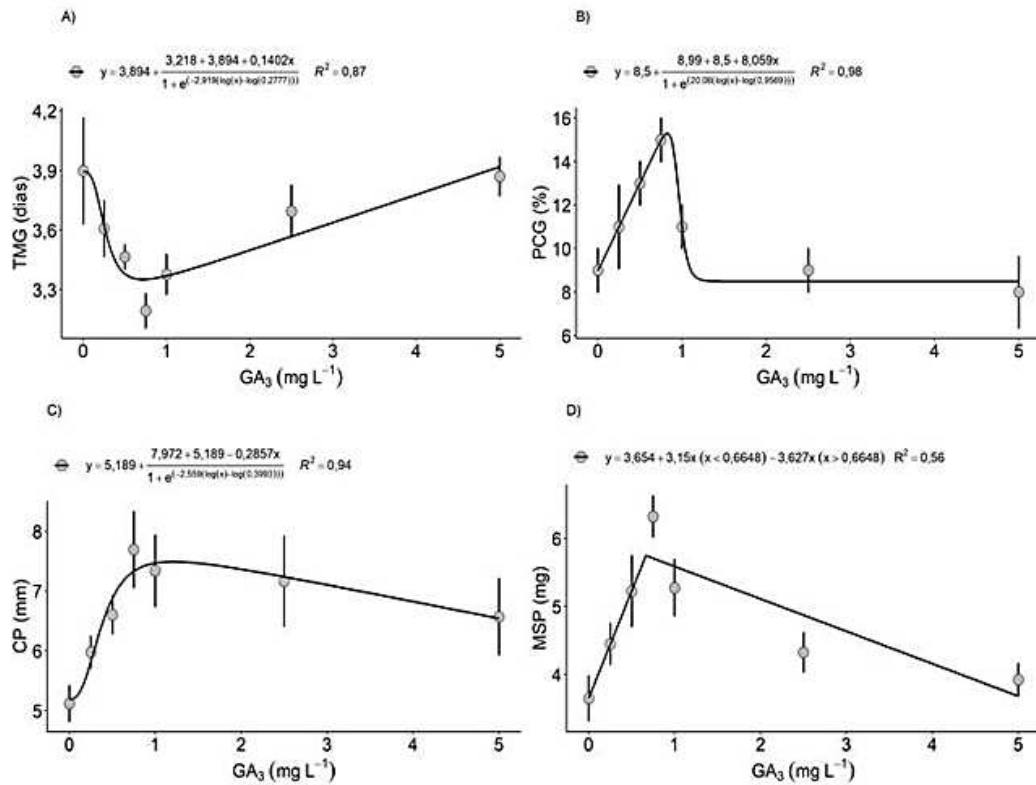


Para PCG, GER e MSP, os maiores valores encontrados se deram na dose de 5,0 mg L⁻¹ (21%, 62% e 3,1 g, respectivamente). Em comparativo, no tratamento controle, os valores para as mesmas variáveis foram de 10%, 36% e 1,8 g, respectivamente. O TMG foi menor na dose de 5,0 mg L⁻¹, ou seja, nesta dose as sementes levaram 3,00 dias para germinação.

Houve aumento do IVG conforme aumento da dose de GA₃; no entanto, este índice apresentou estabilização nas maiores doses, variando de 9,53 a 11,08 entre as doses de 1,0 e 5,0 mg L⁻¹. Resposta semelhante foi obtida para CP, de forma que nas doses entre 1,0 e 5,0 mg L⁻¹, obtiveram-se plântulas com 7,65 e 7,97 mm.

As respostas de *D. pottiorum* para as variáveis TMG, PCG, CP e MSP em relação às doses de GA₃ estão descritas na Figura 4.4.3.

Figura 4.4.3 - Tempo médio de germinação (TMG) (A), primeira contagem de germinação (PCG) (B), comprimento (CP) (C) e massa seca de plântulas (MSP) (D) de *D. pottiorum* em função de doses de ácido giberélico (GA₃).

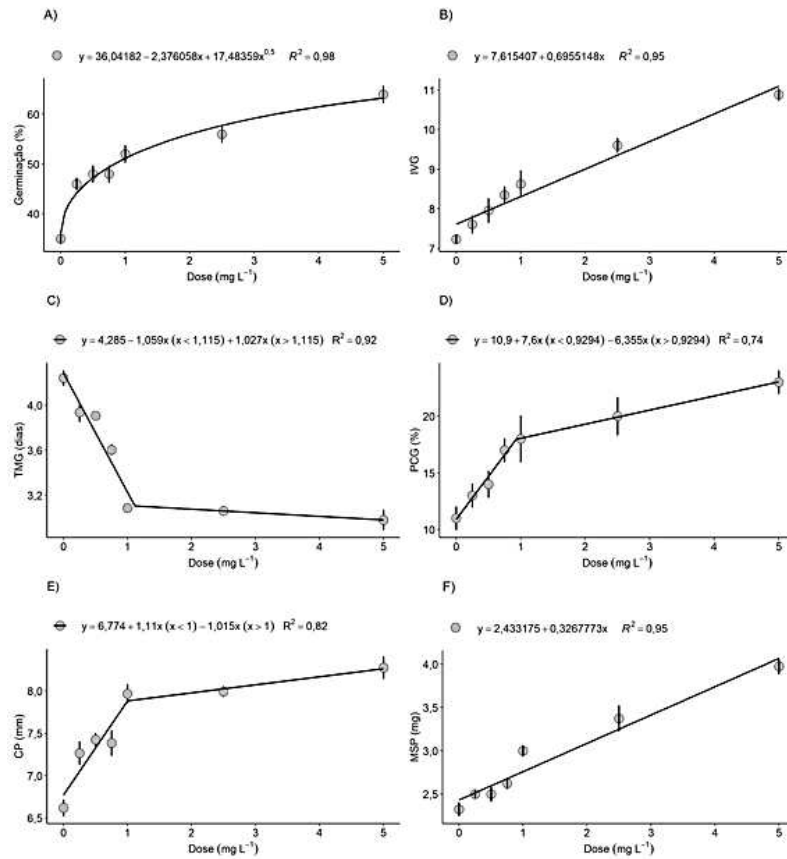


Para a PCG, houve incremento de germinação até a dose de 0,8 mg L⁻¹ com 15% de sementes germinadas. Acima dessa dose, houve redução da germinação e estabilização a partir da dose de 1,0 mg L⁻¹, com variação de 9 a 11%. Para o TMG as doses de 0,75 e 1,0 mg L⁻¹ proporcionaram um menor tempo para germinação das sementes com 3,20 e 3,38 dias, respectivamente.

No CP, houve incremento até a dose de 1,2 mg L⁻¹, atingindo 7,49 mm, com posterior redução do comprimento. Para a MSP a dose estimada de 0,7 mg L⁻¹ apresentou maior massa com 5,7 mg, com redução da massa após doses acima deste valor. Para estas variáveis, em relação ao ponto máximo obtido, houve aumento de 46% de CP e 56% de MSP comparado ao controle.

D. walteriana apresentou resposta para todas as variáveis nas diferentes doses de GA₃ (exceto PA) (Figura 4.4.4).

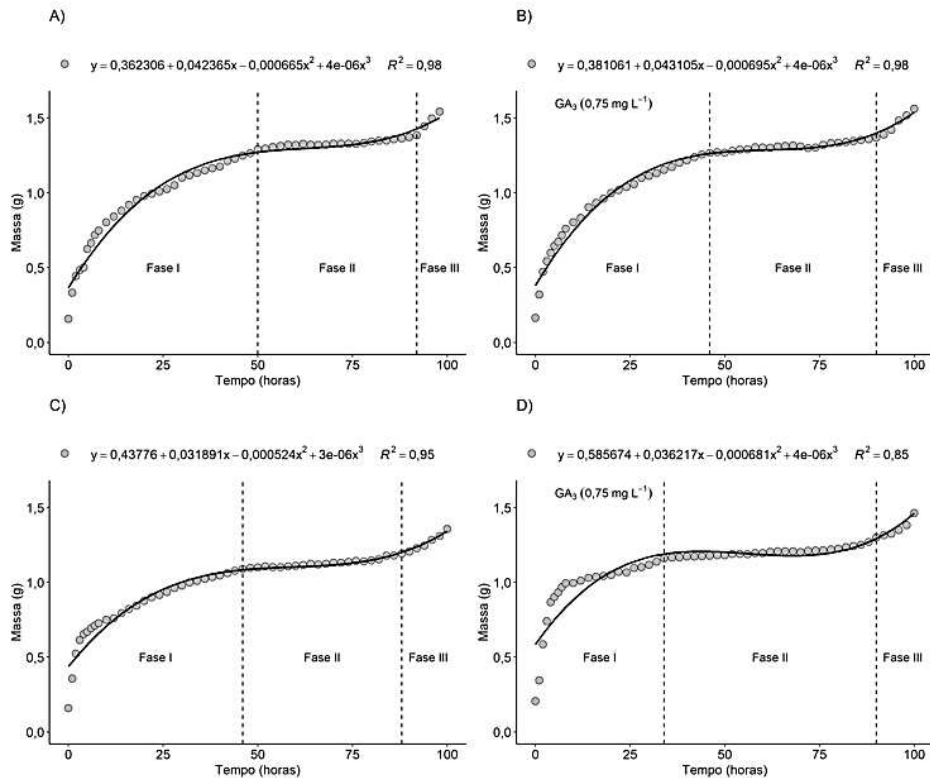
Figura 4.4.4 - Germinação (GER) (A), índice de velocidade de germinação (IVG) (B), tempo médio de germinação (TMG) (C), primeira contagem de germinação (PCG) (D), comprimento (CP) (E) e massa seca de plântulas (MSP) (F) de *D. walteriana* em função de doses de ácido giberélico (GA₃).



Para PCG e GER, o ponto máximo obtido foi na dose de 5,0 mg L⁻¹, com 23 e 64%, respectivamente. Em comparativo, o controle teve 35% de GER e PCG de 10%. Na variável IVG, o maior valor também foi observado para dose de 5,0 mg L⁻¹ (com 10,88), da mesma forma que o menor valor de TMG (2,98). O mesmo também foi observado para as variáveis de crescimento, com maior resposta em CP (8,28 mm) e MSP (3,98 mg) na dose de 5,0 mg L⁻¹.

Em relação às curvas de embebição, todas as espécies estudadas tiveram comportamento trifásico de absorção de água, com rápido aumento de massa inicial, posterior estabilização e depois novo aumento. De acordo com a Figura 4.4.5, para *D. cabreræ*, a fase I durou 50 horas e a fase III, ou seja, a germinação propriamente dita iniciou às 92 horas. Por outro lado, quando tratadas com GA₃, a fase I durou 46 horas e a germinação se iniciou após 90 horas. Em relação a fase II, a mesma durou 42 horas sem o tratamento com o regulador e 44 horas com a utilização do GA₃.

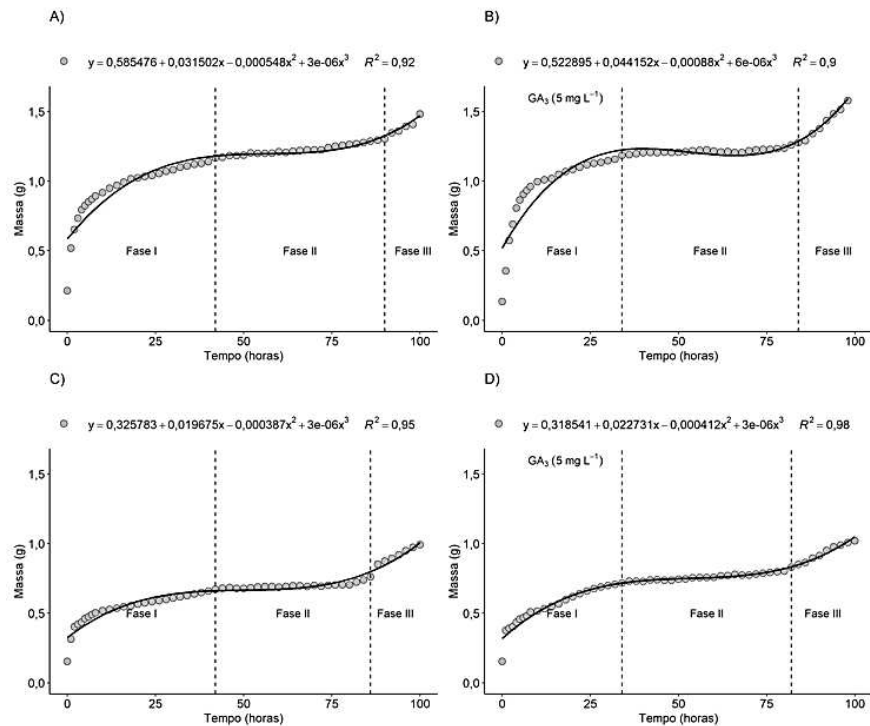
Figura 4.4.5 - Curva de absorção de água pelas sementes de *Dyckia cabreriae* sem (A) e com GA₃ (B) e *Dyckia pottiorum* sem (C) e com GA₃ (D) na dose de 0,75 mg L⁻¹.



Para *D. pottiorum*, a fase I durou 46 horas e a fase III se iniciou às 88 horas, enquanto para as sementes tratadas com GA₃ a fase I foi mais curta, durando 34 horas, e a germinação começou com 90 horas. A fase II durou 56 horas nas sementes tratadas e 42 horas nas sementes não tratadas com GA₃. Para ambas as espécies, foi possível observar que, mesmo com o tratamento de GA₃, não houve grande variação para o início da germinação.

As curvas de embebição para *D. dusenii* e *D. walteriana* tiveram comportamento similar às espécies citadas. No entanto, elas se mostraram responsivas ao pré-tratamento com GA₃, que reduziu o tempo para o início da germinação, como demonstrado na figura 4.4.6.

Figura 4.4.6 - Curva de absorção de água pelas sementes de *Dyckia dusenii* sem (A) e com GA₃ (B) e *Dyckia walteriana* sem (C) e com GA₃ (D) na dose de 5,0 mg L⁻¹.



Para *D. dusenii*, a fase I durou 42 horas, enquanto com GA₃ teve tempo reduzido para 34 horas. A fase II durou 50 nas sementes tratadas enquanto para as não tratadas houve duração de 48 horas. A germinação (Fase III) se iniciou com 90 horas sem GA₃, enquanto com GA₃ a mesma ocorreu com 84 horas.

A espécie *D. walteriana* teve a fase I com duração de 42 horas que foi reduzida para 34 horas nas sementes tratadas com GA₃. Já a fase III se iniciou com 86 horas no tratamento somente com água, reduzindo para 82 horas nas sementes tratadas.

Efeito do GA₃ nanoencapsulado em D. walteriana

Após constatado efeito positivo do GA₃ livre na germinação e crescimento vegetativo, principalmente, em relação a *D. dusenii* e *D. walteriana*, apenas a segunda foi escolhida para os testes do GA₃ nanoencapsulado. A opção por *D. walteriana* se deu pelo efeito benéfico do GA₃ sobre ela, pela ocorrência na região na qual o estudo foi realizado e devido ao maior grau de ameaça de extinção em que a espécie se encontra.

Através da análise de variância, foi possível observar diferença significativa para as diversas variáveis conforme o tratamento. A única exceção foi a PA, que teve variação de 2 a 3% em todos os tratamentos. Também foi possível observar que os tratamentos somente

com as NPs (NP ALG/CS e NP CS/TPP) não tiveram efeito sobre GER, PCG, TMG, CP e MSP (Tabela 4.4.3).

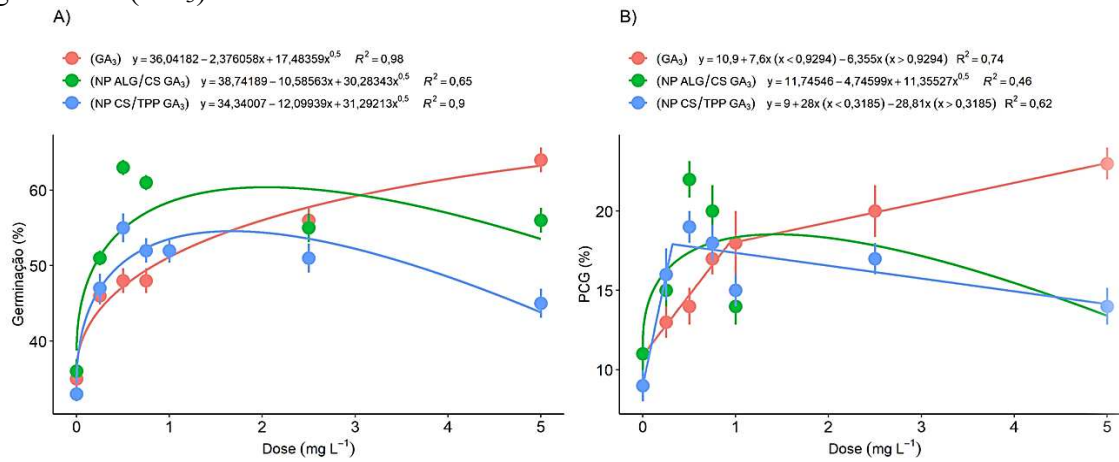
Tabela 4.4.3 - *p*-valor do teste F da análise de variância e coeficiente de variação (CV%) para as variáveis: primeira contagem de germinação (PCG) (%), germinação (GER) (%), plântulas anormais (PA) (%), índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG) (dias), comprimento (mm) (CP) e massa seca (MSP) (mg) de plântulas para os tratamentos NP ALG/CS-GA₃, NP CS/TPP-GA₃, NP ALG/CS e NP CS/TPP em diferentes doses.

	PCG	GER	PA	IVG	TMG	CP	MSP
NP ALG/CS-GA ₃							
<i>p</i> -valor	<0,001	<0,001	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CV (%)	14,56	5,41	-	3,41	3,65	2,35	7,09
Média	-	-	3,14	-	-	-	-
NP CS/TPP-GA ₃							
<i>p</i> -valor	<0,001	<0,001	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CV (%)	14,97	7,24	-	4,23	3,27	1,97	6,44
Média	-	-	2,29	-	-	-	-
NP ALG/CS							
<i>p</i> -valor	0,414	0,064	-	<0,001	0,024	0,053	0,474
CV (%)	22,68	10,74	-	6,08	3,20	4,70	11,18
Média	11,0	42,0	2,71	7,45	-	7,06	7,09
NP CS/TPP							
<i>p</i> -valor	0,669	0,057	-	<0,001	0,006	0,003	0,406
CV (%)	22,09	11,18	-	3,49	2,56	2,72	8,28
Média	11,0	38,0	3,14	7,06	-	-	2,24

*GA₃ (ácido giberélico), NP (nanopartícula), CS (quitosana), TPP (tripolifosfato de sódio), ALG (alginato de sódio).

Para PCG, o ponto máximo obtido para GA₃ livre foi na dose de 5 mg L⁻¹ com 23% enquanto nos tratamentos com GA₃ nanoencapsulado foi de 19 e 18%, nas doses estimadas de 1,4 e 0,3 mg L⁻¹ para NP ALG/CS-GA₃ e CS/TPP-GA₃, respectivamente. Na GER a maior resposta foi obtida para a GA₃ livre com 64% na dose de 5 mg L⁻¹ e quando encapsulada, a resposta máxima foi de 60% para NP ALG/CS-GA₃ na dose estimada de 2,1 mg L⁻¹ e 55% para NP CS/TPP-GA₃ na dose estimada de 1,7 mg L⁻¹. O tratamento controle teve 35% de GER e PCG de 10% (Figura 4.4.7).

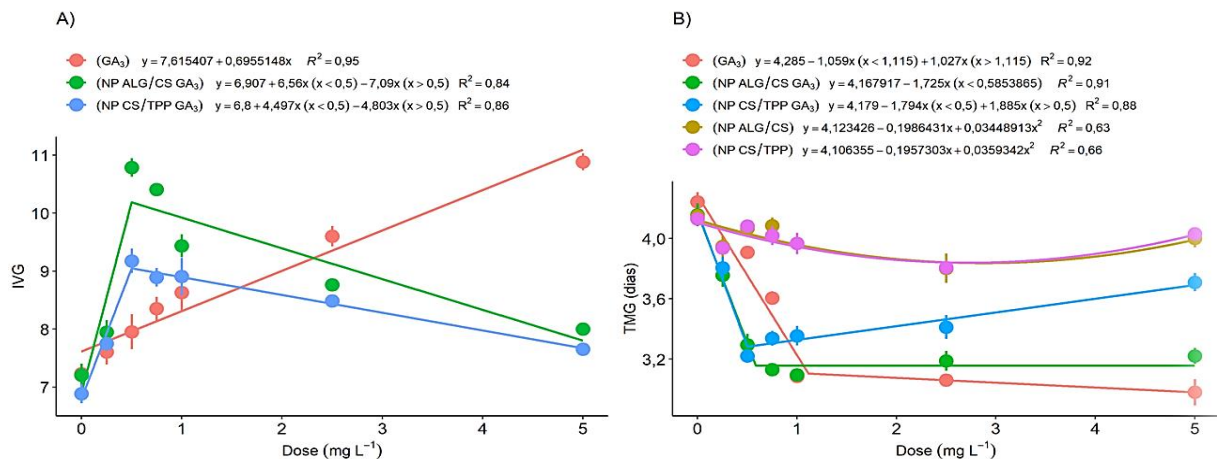
Figura 4.4.7 - Germinação (GER) (A) e primeira contagem de germinação (PCG) (B) de sementes de *Dyckia walteriana* em função de diferentes doses e tipos de formulação de ácido giberélico (GA₃).



*GA₃ (ácido giberélico), NP (nanopartícula), CS (quitosana), TPP (tripolifosfato de sódio), ALG (alginato de sódio).

Nas variáveis IVG e TMG, o maior valor também foi observado para GA₃ livre na dose de 5 mg L⁻¹, com 10,88 e 2,98, respectivamente. Para os tratamentos com GA₃ nanoencapsulado, a dose estimada de 0,5 mg L⁻¹ apresentou maiores valores de IVG e TMG, respectivamente, de 10,19 e 3,16 para NP ALG/CS-GA₃ e de 9,05 e 3,28 para NP CS/TPP-GA₃. O tratamento controle apresentou IVG e TMG, respectivamente, de 7,05 e 4,16 dias. Para o TMG, também foi possível observar resposta das NP vazias (NP ALG/CS e CS/TPP), com máxima resposta na dose equivalente a 2,9 mg L⁻¹ para NP ALG/CS com 3,8 dias e 2,7 mg L⁻¹ para NP CS/TPP com 3,8 dias (Figura 4.4.8).

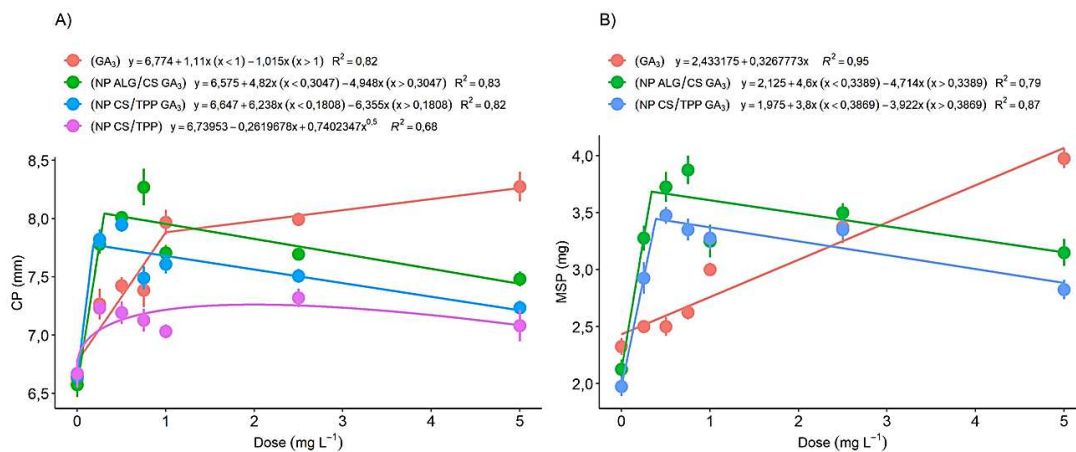
Figura 4.4.8 - Índice de velocidade de germinação (IVG) (A) e tempo médio de germinação (TMG) (B) de sementes de *Dyckia walteriana* em função de diferentes doses e tipos de formulação de ácido giberélico (GA₃).



*GA₃ (ácido giberélico), NP (nanopartícula), CS (quitosana), TPP (tripolifosfato de sódio), ALG (alginato de sódio).

Para o CP, quando as sementes foram tratadas com GA₃ livre, a dose de 5 mg L⁻¹ apresentou melhor resposta, obtendo plântulas médias de 8,28 mm. O mesmo foi observado para MSP, com 3,98 mg para a mesma dose. Para NP ALG/CS-GA₃, a dose ótima estimada foi 0,3 mg L⁻¹ com 8,04 mm de CP e 3,68 mg de MSP. Para NP CS/TPP-GA₃, a dose estimada de 0,2 mg L⁻¹ teve melhor resposta para CP com 7,78 mm e a dose estimada de 0,4 mg L⁻¹ apresentou maior MSP com 3,45 mg. Também foi possível observar resposta para NP CS/TPP vazia para CP, com 7,26 mm na dose equivalente de 2,0 mg L⁻¹. O tratamento controle teve média de CP de 6,61 mm e MSP de 2,15 mg (Figura 4.4.9).

Figura 4.4.9 - Comprimento (CP) (A) e massa seca (MSP) (B) de plântulas de *Dyckia walteriana* em função de diferentes doses e tipos de formulação de ácido giberélico (GA₃).



*GA₃ (ácido giberélico), NP (nanopartícula), CS (quitosana), TPP (tripolifosfato de sódio), ALG (alginato de sódio).

4.5 DISCUSSÃO

Caracterização do lote

Sementes de *Dyckia* apresentam comportamento ortodoxo, ou seja, são caracterizadas por tolerarem níveis reduzidos de umidade e armazenamento em baixas temperaturas. Assim, é importante que as condições sejam adequadas à manutenção da viabilidade durante maior período (ZUCCHI *et al.*, 2018).

Além disso, o potencial máximo germinativo é determinado pela procedência das sementes, que é, por exemplo, influenciada pelo efeito cumulativo das condições ambientais durante a maturação, colheita e a secagem das mesmas. Sendo assim, é fundamental o conhecimento sobre o comportamento fisiológico e as condições ideais de armazenamento para

a conservação da viabilidade das sementes (ZUCCHI *et al.*, 2018; FIOR; CAMPOS; SCHWARZ, 2020).

Além das condições de armazenamento para as sementes das espécies em estudo serem as recomendadas para sementes com o comportamento ortodoxo (frio e seco), o período ideal para armazenar e manter a viabilidade das sementes está diretamente relacionado com o teor de água em que as sementes são conservadas. Nesse sentido, o teor de água, apesar de estar em um nível adequado para as espécies estudadas (7 a 9%), não é aplicável a todas com a mesma eficácia, pois cada uma possui um limite tolerável quanto à dessecação (RAJANAIDU; AINUL, 2013).

Mesmo sob condições ideais de armazenamento, houve perda da viabilidade dessas sementes, uma vez que, com o envelhecimento, acontecem danos às membranas e as enzimas perdem a atividade catalítica (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Além disso, pelos resultados observados, as sementes podem ter entrado em estado de dormência após o armazenamento. Isso pode ser explicado também pelo teste de tetrazólio, onde apesar da baixa germinação após a armazenagem, as sementes apresentam alta viabilidade (71 a 84%). Um ponto favorável do teste de tetrazólio é que seus resultados não sofrem interferência de condições que geralmente interferem em análises de germinação, como a incidência de microrganismos, além disso, serve também para esclarecer fatores não explicados pelo teste de germinação, neste caso, relacionando com a dormência (CARVALHO *et al.*, 2013).

Outro fator associado é de que a maioria das espécies de *Dyckia* apresentam alta germinação sob temperaturas mais altas, reduzindo significativamente a germinação em temperaturas mais baixas, assim, poderia ter ocorrido à indução de dormência nestas condições de armazenamento (frio).

A dormência pode ser caracterizada como uma falha da germinação mesmo sob condições aparentemente favoráveis à germinação. Neste caso, a dormência pode ser dividida como primária ou secundária. A dormência primária ocorre ainda durante a fase de maturação da semente, ou seja, ela é dispersa já em estado dormente (SILVA; OLIVEIRA; PEREIRA, 2018).

No caso das sementes em estudo, não foi observado esta dormência primária, podendo então se enquadrar como uma dormência secundária. Ainda não são bem elucidados na literatura todos os processos envolvidos neste tipo de dormência, sendo reconhecido que sementes com dormência secundária germinam normalmente, mas quando expostas a fatores ambientes desfavoráveis, são induzidas ao estado de dormência (SILVA; OLIVEIRA; PEREIRA, 2018).

Entre as possibilidades de dormência, a fisiológica se dá por meio da interação entre inibidores e promotores de germinação, sendo geralmente superada por meio da adição de reguladores do crescimento vegetal como o GA₃, o que foi observado neste estudo (REGO *et al.*, 2018).

Efeito do GA₃ nas espécies de Dyckia

D. dusenii e *D. walteriana* apresentaram estímulo no processo germinativo. Neste sentido, as giberelinas (GAs) tem a capacidade de promover a germinação de sementes. Assim, um alto nível de GAs e baixo nível de ABA é uma condição favorável para a germinação das sementes (TUAN *et al.*, 2018; ZHONG *et al.*, 2021). À medida que a germinação progride, as reservas de sementes são degradadas gradualmente, fornecendo energia e metabólitos para germinação e estabelecimento de plântulas (XIONG *et al.*, 2021).

Esta degradação das reservas das sementes induzidas pelas GAs ocorre através da produção de hidrolases, as quais são responsáveis por enfraquecer o tecido ao redor do embrião (BOCATTO; FORTI, 2019). As hidrolases como, por exemplo, as amilases, reagem com as reservas armazenadas no embrião, quebrando o amido e outras substâncias, permitindo a retomada do crescimento do eixo embrionário. Com isso, são formados açúcares simples, aminoácidos e ácidos nucleicos que estimulam o alongamento celular, fazendo com que a radícula rompa o tegumento da semente, acelerando e uniformizando a germinação (PAIXÃO *et al.*, 2021).

Foi observado em *D. cabreræ* e *D. pottiorum* que o GA₃ não melhorou parâmetros da germinação, assim como observado por Pompeli (2006) em estudos com sementes de *Dyckia encholirioides* (Gaudichaud) Mez., verificando que a aplicação de GA₃ não resultou em estímulo germinativo. O fato de responderem no crescimento, mas não na germinação é um indício de que o GA₃ não esteja atuando no embrião, seja porque não consiga entrar em contato com ele ou porque ele é inativado, no entanto, após a protusão da radícula, há o contato com o regulador e começa a ter o efeito esperado.

Deve-se, ainda, levar em conta que parâmetros abióticos ambientais como luz e temperatura podem afetar aspectos do desenvolvimento da planta, neste caso, podendo alterar as concentrações de giberelinas (GAs) e/ou alterar a capacidade da planta em responder a este regulador de crescimento vegetal (KASHIWAQUI *et al.*, 2019).

A regulação dos níveis endógenos das GAs nas sementes, assim como na planta, ocorre através de diversos processos. Internamente, as chamadas GAs ativas sofrem o

processo de conjugação, ou seja, açúcares como a glicose se unem as GAs, tornando-as glicosiladas e assim inativas de forma reversível. As GAs também podem se tornar inativas de modo irreversível por meio de enzimas. Estes mecanismos fazem o controle e contribuem para o equilíbrio nos níveis de GAs, além disso, estudos demonstram vários inibidores que atuam no processo de biossíntese das GAs (KASHIWAQUI *et al.*, 2019).

Em relação à melhoria nas variáveis de crescimento vegetal, ou seja, comprimento (CP) e massa (MSP), todas as espécies foram estimuladas pelo GA₃. As giberelinas promovem estas respostas por diversos fatores, como na orientação dos microtúbulos em direção ao eixo de crescimento celular, assim, as células aumentam apenas para o eixo de crescimento (CHAUDHARY; ADHIKARI; SHRESTHA, 2019; PURBA *et al.*, 2021).

As GAs promovem o estímulo da divisão celular, especialmente as células meristemáticas e, afeta a plasticidade da parede celular, favorecendo o crescimento. Além do mais, as GAs têm potencial de estimular o crescimento ativo das plantas, como o alongamento de hastes e folhas. As GAs também interagem com outros hormônios, como as citocininas e auxinas, potencializando estes efeitos (GUPTA; CHAKRABARTY, 2013; CHAUDHARY; ADHIKARI; SHRESTHA, 2019; PURBA *et al.*, 2021).

Pesquisas demonstram que o uso do GA₃ tem efeito em diferentes momentos do desenvolvimento de plantas. O tratamento com 100 µM de GA₃ promoveu maior altura e maior quantidade de botões florais de beijo-pintado (*Impatiens hawkeri* W. Bull. (VERDOLIN; MARIZ; DIAS, 2021). Lakshmaiah *et al.* (2019) obtiveram maior qualidade de floração e retardo no amarelecimento das folhas de lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinners) com a aplicação de 150 ppm de GA₃.

O tratamento pré-germinativo de sementes de beton (*Rhaphiodon echinus* Shauer.) com GA₃ nas concentrações de 0,5 e 1,0% aumentou o processo germinativo e diminuiu o tempo médio de germinação (SOUZA *et al.*, 2018). Já o tratamento de sementes de bromélia-imperial *Alcantarea imperialis* (Carriere) Harms (Bromeliaceae) com 5,0 mg L⁻¹ GA₃ promoveu maior germinabilidade em relação aos demais tratamentos (BONIN *et al.*, 2010).

Os dados da curva de embebição indicam um padrão trifásico de absorção de água pelas sementes. Sabe-se que a velocidade de ocorrência desse processo depende das características das sementes de cada espécie, como a composição química e permeabilidade do tegumento (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009). A fase I resulta em uma rápida absorção de água e caracteriza-se pelo início da modificação das reservas presentes nas sementes com intuito de

garantir energia e nutrientes fundamentais para o crescimento do embrião (ARAÚJO *et al.*, 2018).

Na Fase II, a absorção de água diminui, ocorrendo estabilização, sendo uma fase também conhecida como estacionária. Outra característica desta fase é a reativação e iniciação dos processos metabólicos celulares, ocorrendo a expansão do embrião e aumento da atividade de enzimas utilizadas para o desenvolvimento do embrião. Por último, na fase III, volta a ocorrer aumento da absorção de água pela semente devido ao crescimento da plântula e a reorganização celular. A característica marcante desta fase é que se torna visível a germinação, ou seja, ocorre a protrusão da radícula (ARAÚJO *et al.*, 2018).

Estudos morfológicos realizados por Duarte, Carneiro e Rezende (2009) em *D. goehrinii* Gross & Rauh sugerem a formação da calaza, que se apresenta como uma mancha escura sobre o tegumento das sementes, permitindo que a nucela se torne altamente vascularizada. Esta característica observada para esta espécie pode auxiliar na explicação do porquê a absorção de água ocorre tão rapidamente em espécies de *Dyckia*, no entanto, estudos são necessários para essa confirmação.

Pela curva de embebição, nenhuma das espécies de *Dyckia* (*D. cabreræ*, *D. dusenii*, *D. pottiorum* e *D. walteriana*) apresentou sementes com dormência, pelo menos a tegumentar. A dormência tegumentar, considerada uma restrição mecânica, é descartada devido ao fato de que não houve resistência ao fluxo de água para o interior das sementes, ou seja, as sementes conseguiram absorver água. Assim, a possibilidade é de que as sementes tenham entrado em dormência secundária ou fisiológica (REGO *et al.*, 2018), o que também é evidenciado pela resposta positiva gerada pelo GA₃.

Também se nota que o GA₃ agiu sobre o embrião das espécies mais responsivas (*D. dusenii* e *D. walteriana*) por ter acelerado o processo germinativo ao reduzir as fases de embebição. Por outro lado, em sementes de *D. cabreræ* e *D. pottiorum*, o GA₃ apenas reduziu a fase I e alongou a fase II, sem efeito na velocidade e no percentual de germinação. Estas espécies foram responsivas ao GA₃ em parâmetros relacionados às plântulas, sugerindo que algum mecanismo interno do embrião inativou o GA₃ e, depois de germinadas, as radículas das plântulas, ao terem contato direto com o GA₃, sofreram modificações com aumento do crescimento e massa, respondendo assim ao regulador (KASHIWAQUI *et al.*, 2019).

Efeito do GA₃ nanoencapsulado em D. walteriana

O intuito da aplicação através das NPs é fornecer uma liberação lenta e sustentada do ativo, além protegê-lo contra a degradação (PEREIRA *et al.*, 2017). Uma das vantagens da utilização de sistemas poliméricos biodegradáveis é que eles podem ser utilizados no metabolismo de organismos vivos. Além disso, neste estudo, nenhum dos sistemas utilizados de NPs mostrou efeitos fitotóxicos durante as fases de germinação, corroborando com os resultados encontrados na literatura (PEREIRA; OLIVEIRA; FRACETO, 2019).

Foi observado que as respostas para o GA₃ aplicado livremente e o nanoencapsulado tiveram pontos de máxima resposta diferentes, demonstrando que a forma de aplicação proporcionou efeitos biológicos distintos. Os maiores efeitos nas variáveis com utilização das NPs foram observados em doses mais baixas (0,75 e 1,0 mg L⁻¹), enquanto os maiores efeitos do GA₃ na forma livre ocorreram nas maiores doses (2,5 e 5,0 mg L⁻¹).

O que pode explicar este fato é que o GA₃ livre teve contato direto com as sementes, sendo liberado mais rapidamente quando comparado ao GA₃ nanoencapsulado, que proporcionou uma liberação mais lenta. Somado a isso, algumas NPs permanecem aderidas à superfície da semente, mantendo o fornecimento de GA₃ mesmo após o processo de embebição das mesmas. Ainda, as NPs, principalmente as de CS/ALG pela carga negativa, tem maior facilidade de entrarem nas sementes, não sendo possível ficarem adsorvidas à parede celular (PEREIRA; OLIVEIRA; FRACETO, 2019).

A quitosana presente nas NPs é facilmente absorvida, prolongando o tempo de contato e facilitando a absorção das moléculas bioativas, no caso GA₃. Também se relata a boa aceitabilidade e absorção das NPs devido à associação com a superfície da planta, ou semente, no caso, devido à presença de grupos carboxila, hidroxila, amida e fosfatos que fornecem potenciais locais para a ligação com a quitosana, que com suas propriedades catiônicas, consegue adsorver a superfície, prolongando este contato da nanopartícula com a planta (LI *et al.*, 2019).

No estudo em questão não houve melhor resposta com a utilização do GA₃ fornecido nanoencapsulado, com destaque para a redução de dose quando fornecido desta forma, provavelmente devido a uma melhor entrega do GA₃ às plantas. O fato de não ter ocorrido diferença nas duas formas de liberação pode ser explicado pelo experimento estudo ser desenvolvido em ambiente totalmente controlado (temperatura e umidade), não afetando assim a degradação e biodisponibilidade do GA₃.

Em estudos utilizando diferentes sistemas nanocarreadores contendo GA₃ através de alginato/quitosana (ALG/CS) e quitosana/tripolifosfato (CS/TPP), foi demonstrado que o tratamento de sementes com ALG/CS-GA₃ foi mais efetivo e proporcionou aumento no desenvolvimento radicular, área foliar e pigmentos fotossintéticos (clorofilas e carotenoides) de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (PEREIRA *et al.*, 2017).

Este resultado também foi encontrado no estudo em questão, onde as NPs contendo ALG/CS apresentaram melhor resposta quando comparado as de CS/TPP, o que também foi observado por Pereira, Oliveira e Fraceto (2019), onde sementes de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Cerasiforme) tratadas com os diferentes sistemas, apresentaram melhores respostas para as NPs de ALG/CS-GA₃, que proporcionou aumento das massas secas da parte aérea e da raiz e de pigmentos fotossintéticos, enquanto a formulação CS/TPP-GA₃ apresentou atividade biológica relativamente baixa durante o crescimento inicial das plantas.

Os dois sistemas de NPs possuem mecanismos diferentes de liberação do GA₃, ocasionando respostas distintas. Entre as características das NP, os potenciais zeta das formulações estudadas diferem, sendo negativo para ALG/CS e positivo para CS/TPP. Estudos mostram que o potencial zeta tem participação na interação planta-NPs. As NPs com potencial zeta positivo como o caso da CS/TPP têm forte interação com os grupos negativos da parede celular vegetal, com baixa internalização nas células e uma tendência ao acúmulo na superfície celular. Por outro lado, as NPs com potencial zeta negativo, como nas de ALG/CS, conseguem ser rapidamente distribuídas e internalizadas nas células (ZHU *et al.*, 2012).

Foi observado para algumas variáveis o efeito das NPs contendo somente ALG/CS ou CS/TPP. Dos compostos utilizados na formulação das NPs, a quitosana já demonstrou em diversos estudos a capacidade de aumentar a resposta nas plantas dependendo da espécie e a concentração, sendo associada principalmente nas respostas de defesa da planta a diferentes estresses bióticos e abióticos (MALERBA; CERANA, 2016; ODAT *et al.*, 2021).

A quitosana mostrou-se capaz de melhorar a germinação de sementes e crescimento inicial de plântulas de trigo (*Triticum aestivum* L.) (PEYKANI; SEPEHR, 2018). Foi observado que diferentes concentrações de quitosana resultaram em aumento no comprimento do hipocótilo e da radícula e na massa seca em relação ao controle de sementes de ervilhaca *Vicia sativa* L. (ODAT *et al.*, 2021).

O estudo em questão mostra a importância do conhecimento fisiológico das sementes após a maturação e durante o armazenamento e que, sementes de espécies de *Dyckia*, com auxílio de reguladores de crescimento vegetal, voltem a ter boa germinabilidade mesmo após longo armazenamento e redução do potencial germinativo. Além disso, serve como base

de informações para estudos mais detalhados quanto à aceitação das NPs pela semente e a utilização da nanotecnologia em diversas áreas. Estes resultados são promissores no sentido de trazerem informações e possibilidades para o cultivo deste grupo de plantas predominantemente nativas e de inseri-las no mercado de plantas ornamentais.

4.6. CONCLUSÕES

São recomendadas para *D. dusenii* a dose de 5,0 mg L⁻¹ e para *D. walteriana* entre 4,4 e 5,0 mg L⁻¹ de GA₃. As espécies *D. cabreræ* e *D. pottiorum* responderam somente para o crescimento vegetativo, não sendo recomendado GA₃ para a germinação.

Quando nanoencapsulado, o GA₃ resultou em maiores respostas nas menores doses, comprovando a liberação controlada do regulador, com maiores respostas para as NP contendo ALG/CS. A dose de 5,0 mg L⁻¹ de GA₃ livre e nanoencapsulada contendo ALG/CS-GA₃ entre 0,75 e 1,0 mg L⁻¹ são recomendados para germinação de *D. walteriana*.

4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, K.S.; GUIMARÃES, R.M.; ALMEIDA, I.F.; CLEMENTE, A.C.S. Alterações fisiológicas e bioquímicas durante a embebição de sementes de sucupira-preta. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 12-19, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-31222009000100028>

ANACLETO, A.; NEGRELLE, R.R.B. Produção de bromélias no Estado do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.19, n.2, p.121-136, 2013. <https://doi.org/10.14295/rbho.v19i2.421>

ARAÚJO, R.F.; ABUD, H.F.; PINTO, C.M.F.; ARAÚJO, E.F.; LEAL, C.A.M. Curva de embebição de sementes de pimentas biquinho e malagueta sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v.8, n.3, p.51-56, 2018.

ASHARAF, S.A.; SIDDIQUI, A.J.; ELKHALIFA, A.E.O.; KHAN, M.I.; PATEL, M.; ALRESHIDI, M.; MOIN, A.; SINGH, R.; SNOUSSI, M.; ADNAN, M. Innovations in nanoscience for the sustainable development of food and agriculture with implications on health and environment. **Science of The Total Environment**, v.768, n.10, 144990, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.144990>

BOCATTO, S.J.; FORTI, V.A. Métodos para promover a superação de dormência em sementes de Urucum. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.18, n.3, p.226-231, 2019. <http://dx.doi.org/10.18188/sap.v18i3.21546>

BONIN, M.P.; MORAES, C.P.; MARTINI, G.A.; BENEDITO, P.V.; SOUZA-LEAL, T. Avaliação dos tratamentos pré-germinativos em diferentes concentrações de GA₃ na germinação de *Alcantarea imperialis* (Vell.) Harms. **Scientia Plena**, v.6, n.5, p. 1-4, 2010.

BORGES, R.P.; NOGUEIRA, L.T.; CECCHIN, D.; PEREIRA, C.R.; HUNTER, C.M. Germinação de sementes de tomate submetidas a diferentes concentrações de cloreto de sódio e substratos. **Enciclopédia Biosfera**, v. 15, n. 28, p. 571-577, 2018. <http://dx.doi.org/10.18677/EnciBio2018B49>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Instrução Normativa MMA - Portaria 443/2014 - Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção**. 2014. Acesso em: 12. Mai. 2021.

CARVALHO, T.C.; KRZYZANOWSKI, F.C.; OHLSON, O.C.; PANOBIANCO, M. Tetrazolium test adjustment for wheat seeds. **Journal of Seed Science**, v.35, n.3, p.361-367, 2013.

CHAUDHARY, A.; ADHIKARI, B.B.; SHRESTHA, J. Effect of weed species on drought tolerant rice genotypes at Sundarbazar, Lamjung, Nepal. **Open Agriculture**, v.4, n.1, p.65-78, 2019. <https://doi.org/10.1515/opag-2019-0006>

DAL VESCO, L. L. D.; STEFENON, V. M.; WELTER, L. J.; SCHERER, R. F.; GUERRA, M. P. Induction and scale-up of *Billbergia zebrina* nodule cluster cultures: implications for mass propagation, improvement and conservation. **Scientia Horticulturae**, v. 128, n. 4, p.515-522, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.02.018>

DUARTE, E.F.; CARNEIRO, I.F.; REZENDE, M.H. Morfologia de frutos e sementes e desenvolvimento pós-seminal de *Dyckia goehringii* Gross & Rauh (Bromeliaceae). **Journal of Neotropical Biology**, v.6, n.1, p.1-12, 2009. <https://doi.org/10.5216/rbn.v6i1.12626>

FIOR, C.S.; CAMPOS, S.S.; SCHWARZ, S.F. Tolerância à dessecação e armazenamento em temperatura sub-zero de sementes de *Butia odorata* (Barb. Rodr.) Noblick. **Iheringia, Série Botânica**, Porto Alegre, 75: e2020019, 2020. <https://doi.org/10.21826/2446-82312020v75e2020019>

FRANCISCO, E.V.; GARCÍA-ESTEPA, R.M. Nanotechnology in the agrofood industry. **Journal of Food Engineering**, v.238, n.1, p.1-11, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.05.024>

GOUDA, E.J.; BUTCHER, D.; GOUDA, K. **Encyclopaedia of Bromeliads Version 4**. Disponível em: <http://bromeliad.nl/encyclopedia/>. Acesso em: 02.jan. 2022.

GUPTA, R.; CHAKRABARTY, S.K. Gibberellic acid in plant. **Plant Signaling & Behavior**, v.8, n.9, e25504, 2013. <https://doi.org/10.4161/psb.25504>

HOSSEL, C.; HOSSEL, J.S.A.O.; WAGNER JÚNIOR, A.; ALEGRETTI, A.L.; DALLAGO, A. Temperaturas e giberelina na germinação de sementes de *Passiflora caerulea*. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v.11, n.1, p.93-98, 2018. <http://dx.doi.org/10.5935/PAeT.V11.N1.11>

KASHIWAQUI, M.M.; COSTA, B.P.; REGO, C.A.R.M.; CAETANO, J.H.S.; SAMPAIO, M.C.; GUIMARÃES, V.F.; DA COSTA, A.C.T. Regulators Plant: A brief review on gibberellin. **Revista Sodebras**, v.14, n.166, p.11-16, 2019. <https://doi.org/10.29367/issn.1809-3957.14.2019.166.11>

LABOURIAU, L.G. **A germinação das sementes**. Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, Washington, Estados Unidos. 1983.173p.

LAKSHMAIAH, K.; SUBRAMANIAN, S.; GANGA, M.; JEYAKUMAR, P. Optimization of pinching and GA₃ application to improve growth and flowering of *Lisianthus (Eustoma grandiflorum)*. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.8, n.6, p. 614-616, 2019.

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, n.1, p.91-100, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.118>

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop science**, v. 2, p. 176-177, 1962. <https://doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>

MALERBA, M.; CERANA, R. Chitosan effects on plant systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, n.7, p.1-15, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijms17070996>.

MARTINELLI, G.; MORAES, M.A. **Livro Vermelho da Flora do Brasil**. 1. ed. - Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.1110p.

MUSEGANTE, J.V.R.; RIBEIRO, J.E.L.S.; FERRAZ, J.R.; OLIVEIRA, P.O.; BIANCHINI, E.; MEDRI, C. Geographical distribution of *Dyckia walteriana* (Bromeliaceae), a recently described and endangered species endemic to the Serra Geral formation, southern Brazil. **Phytotaxa**, v.438, n.4, p.263-275, 2020. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.438.4.5>

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap.2, p.1-24.

ODAT, N.A.; TAWAHA, A.R.M.A.; HASAN, M.; IMRAN, K.; AMANULLAH, D.; TAWAHA, A.R.M.; THANGADURAI, D.; SANGEETHA, J.; RAUF, A.; KHALID, S.; SARANRAJ, P.; AL-TAEY, D.K.; SAFARI, Z.S.; ZAHID, N.A.; QAZIZADAH, A.Z.; SIRAIUDDIN, S.N.; TAWAHA, M.A.R.A. Seed priming with chitosan alleviates salinity stress by improving germination and early growth parameters in common vetch (*Vicia sativa*). **Conference Series Earth and Environmental Science**, v.788, n.1, p.012059, 2021. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/788/1/012059>

OLIVEIRA, J.A.; SILVA, T.T.A.; PINHO, E.V.R.V.; ABREU, L.A.S. Secagem e armazenamento de sementes de sorgo com alto e baixo teor de tanino. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.4, p.699-710, 2011. <https://doi.org/10.1590/s0101-31222011000400012>

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: a minireview. **Energy, Ecology and Environment**, v. 3, n. 3, p. 137-148, 2018. <http://dx.doi.org/10.1007/s40974-018-0090-2>

PAIXÃO, M.V.S.; GROBÉRIO, R.B.C.; HOFFAY, A.C.N.; CORREA, A.C.; CREMONINI, G.M. Ácido giberélico na germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de mamoeiro. **Agrotropica**, v.33, n.2, p.143-148, 2021. <https://doi.org/10.21757/0103-3816.2021v33n2p143-148>

PEREIRA, A.E.S.; OLIVEIRA, H.C.; FRACETO, L.F. Polymeric nanoparticles as an alternative for application of gibberellic acid in sustainable agriculture: a field study. **Scientific Reports**, v.9, n.7135, p.1-10, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43494-y>

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 Surf Biointerfaces**, v.1, n.150, p.141-152, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.11.027>.

PEREIRA, C.; CUQUEL, F.L.; PANOBIANCO, M. Germination and storage of seeds of the bromeliad *Nidularium innocentii* (Lem.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.2, p. 36-41, 2010. <https://doi.org/10.1590/s0101-31222010000200004>

PEYKANI, L.S.; SEPEHR, M.F. Effect of chitosan on antioxidant enzyme activity, proline, and malondialdehyde content in *Triticum aestivum* L. and *Zea mays* L. under salt stress condition. **Iranian Journal of Plant Physiology**, v.9, n.1, p. 2661-2670, 2018. <https://doi.org/10.22034/ijpp.2018.545906>

POMPELLI, M.F. Germinação de *Dyckia encholirioides* var *encholirioides* (Bromeliaceae, Pitcairnioideae). **Floresta e Ambiente**, v.13, p.1-9, 2006.

PURBA, J.H.; SRILABA, N.; WAHYUNI, P.S.; WAHYUDA, P.B. Response of papaya (*Carica papaya* L.) seeds growth to the gibberellin (GA₃) and cow biourine. **Jurnal Agronomi Tanaman Tropika**, v.3, n.2, p.148-158, 2021. <https://doi.org/10.36378/juatika.v3i2.1386>

R CORE TEAM. **R. A language and environment for statistical computing**. Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <http://www.r-project.org>. Acesso em: 07.jan. 2022.

RAJANAIDU, N.; AINUL, M.M. **Conservation of Oil Palm and Coconut Genetic Resources**. In Conservation of Tropical Plant Species (M.N. Normah, H.F. Chin, M.R. Barbara, eds.). Springer, Nova Iorque. p.189-212. 2013.

REFLORA. **Bromeliaceae in Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB66>. Acesso em: 07 fev. 2022.

REGO, C.H.Q.; CARDOSO, F.B.; COTRIM, M.F.; CÂNDIDO, A.C.S.; ALVES, C.Z. Ácido giberélico auxilia na superação da dormência fisiológica e expressão de vigor das sementes de graviola. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 5, n. 3, p.83-86, 2018. <https://doi.org/10.32404/rean.v5i3.2354>

RIBEIRO, E.S.; OLIVEIRA, D.P.; SOUZA, R.S.; PASA, M.C.; DE SOUZA, A.T.M. Efeito da temperatura na germinação de sementes *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong- (Mimosoidae) e *Guazuma ulmifolia*-(Sterculiaceae). **Biodiversidade**, v.11, n.1, p.23-30, 2012.

SHIMIZU, G.D.; MARUBAYASHI, R.Y.P.; GONÇAVES, L.S.A. **AgroR: Experimental Statistics and Graphics for Agricultural Sciences**. R package version 1.2.1. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/AgroR/index.html>. Acesso em: 07.dez. 2022.

SILVA, E.A.A.; OLIVEIRA, J.M.; PEREIRA, W.V.S. **Sementes do Brasil - Produção e Tecnologia para Especies da Flora Brasileira**. Cap1. Fisiologia das sementes. 2018.

SOUZA, G.C.S.; ARAÚJO, L.K.G.; SILVA, R.C.S.; COELHO, W.S.S.; KIILL, L.H.P. Avaliação de diferentes concentrações de ácido giberélico na germinação de sementes de *Rhaphiodon echinus* Shauer (Lamiaceae). **Informativo Abrates**, v.28, n.1, p.1-5, 2018.

TUAN, P.A.; KUMAR, R.; REHAL, P.K.; TOORA, P.K.; AYELE, B.T. Molecular mechanisms underlying abscisic acid/gibberellin balance in the control of seed dormancy and germination in cereals. **Frontiers in Plant Science**, v.9, n.668, p.1-14, 2018. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00668>

VERDOLIN, L.G.; MARIZ, B.L.; DIAS, L.L.C.D. Gibberellin and polyamines effects in growth and flowering of New Guinea impatiens. **Ornamental Horticulturae**, v.27, n.2, p.247-254, 2021. <https://doi.org/10.1590/2447-536x.v27i2.2255>

XIONG, M.; CHU, L.; LI, Q.; YU, J.; YANG, Y.; ZHOU, P.; ZHANG, C.; FAN, X.; ZHAO, D.; YAN, C.; LIU, Q. Brassinosteroid and gibberellin coordinate rice seed germination and embryo growth by regulating glutelin mobilization. **The Crop Journal**, v.9, n.5, p.1039-1048, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2020.11.006>

YANG, R.; XIAO, C.F.; GUO, Y.F.; YE, M.; LIN, J. Inclusion complexes of GA₃ and the plant growth regulation activities. **Materials Science and Engineering C**, v.91, n.1, p.475-485, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.05.043>

ZHONG, C.; PATRA, B.; TANG, Y.; LI, X.; YUAN, L.; WANG, X. A transcriptional hub integrating gibberellin–brassinosteroid signals to promote seed germination in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, v.72, n.13, p.4708-4720, 2021. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab192A>

ZHU, Z.J.; WANG, H.; YAN, B.; ZHENG, H.; JIANG, Y.; MIRANDA, O.R. ; ROTELLO, V.M. ; XING, B.; VACHET, R.W. Effect of surface charge on the uptake and distribution of gold nanoparticles in four plant species. **Environmental Science & Technology**, v.22, p.12391-12398, 2012. <https://doi.org/10.1021/es301977w>

ZUCCHI, M.R.; SANTOS, F.R.; ROCHA, E.C.; TEIXEIRA, I.R.; PIRES, L.L. Water absorption and desiccation tolerance in *Bromelia reversacantha* Mez seeds. **Revista de Ciências Agrárias**, v.41, p.151-160, 2018. <https://doi.org/10.19084/RCA18143>

5 ARTIGO B: DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ESPÉCIES BRASILEIRAS DE *Dyckia* spp. (BROMELIACEAE)

5.1 RESUMO

As bromélias têm despertado interesse no setor ornamental, mas a coleta ilegal e a destruição de seus *habitats* colocam muitas espécies em ameaça de extinção, sendo fundamentais estudos que colaborem para a propagação em larga escala, como os de germinação. O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora envolvida na germinação de sementes e pode ser fornecido às plantas através de moléculas doadoras, como a S-nitrosoglutationa (GSNO). O objetivo do trabalho foi avaliar doses de GSNO na germinação de sementes de quatro espécies de bromélias do gênero *Dyckia* spp. Os tratamentos consistiram da embebição de sementes das espécies *D. cabreræ*, *D. dusenii*, *D. pottiorum* e *D. walteriana* durante 5 minutos nas doses de 0; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 mM de GSNO. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições de cinquenta sementes, sendo avaliados diversos parâmetros germinativos. *D. dusenii* e *D. walteriana* tiveram melhor resposta aos tratamentos com GSNO, especialmente para germinação, que passou de 35-36% no controle, para 58-63% nas doses estimadas de 3,7 e 6,7 mM, respectivamente. Foi observado aumento do índice de velocidade de germinação e redução do tempo médio de germinação nas doses ótimas. *D. cabreræ* e *D. pottiorum* apresentaram resposta somente para variáveis de crescimento. Para *D. dusenii* e *D. walteriana*, recomenda-se a aplicação de 3,3 a 7,2 mM e 5,0 e 10,1 mM, respectivamente, por outro lado, *D. cabreræ* e *D. pottiorum* não foram responsivas à germinação. Doses acima de 10 mM de GSNO leva a redução do processo germinativo, o que indica efeito fitotóxico da molécula.

Palavras-chave: Bromélias. Domesticação. Plantas nativas. Regulador do crescimento vegetal. S-nitrosoglutationa.

5.2 INTRODUÇÃO

O Brasil possui ampla diversidade de espécies potencialmente ornamentais, desde as já cultivadas, até aquelas com características rústicas e ainda pouco exploradas pelo mercado de flores. Plantas da família Bromeliácea possuem importância econômica, sendo cultivadas desde vasos até em decoração de interiores, sendo apreciadas em projetos paisagísticos (ANACLETO; BORNANCIN, 2018).

As bromélias são distribuídas em 79 gêneros e 3702 espécies, sendo plantas presentes predominantemente no continente americano (GOUDA; BUTCHER, 2022). No Brasil são encontradas 1774 espécies catalogadas, dentre as quais, plantas do gênero *Dyckia* sp. destacam-se pela originalidade de suas formas, potencial ornamental e por possuírem grande quantidade de espécies endêmicas e nativas (REFLORA *et al.*, 2022).

Nas últimas décadas, houve aumento da procura de bromélias como plantas ornamentais, seja por suas belas cores e formas, como também pela facilidade dos tratamentos culturais, contudo, ainda há um vasto número de espécies em potencial de serem utilizadas na ornamentação (ANACLETO; BORNANCIN, 2018).

Por outro lado, devido ao potencial ornamental, tem-se intensificado a retirada destas plantas de seus ambientes naturais; além disso, estas sofrem ameaça contínua da destruição de seu *habitat* (ANACLETO; BORNANCIN, 2018). Com o objetivo de conter a exploração ilegal, diversas pesquisas tem buscado a produção de mudas em larga escala sem causar danos ao meio ambiente (PEREIRA; CUQUEL; PANOBIANCO, 2010).

Assim, estudos envolvendo o processo germinativo, bem como de substâncias capazes de favorecê-lo são relevantes. O conhecimento dos aspectos capazes de influenciar a germinação das sementes contribui para aperfeiçoar o manejo das espécies nativas, sendo esta influenciada por condições ambientais como luz, temperatura e substrato, além de fatores fisiológicos como a concentração de hormônios vegetais. Estas variáveis podem ser manipuladas de modo a obter resultados satisfatórios de acordo com a característica desejada (BOUCELHA; DJEBBAR, 2015).

Entre os reguladores de crescimento vegetal, o óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso que atua como uma das principais espécies de nitrogênio (RNS) com efeito sinalizador em células vegetais. O NO vem conquistando interesse da comunidade científica devido ao seu envolvimento em complexa rede de sinalização celular, afetando a germinação, crescimento, florescimento, regulando respostas contra estresses abióticos, entre outros (CORPAS; PALMA, 2018; NABI *et al.*, 2019).

O tratamento das plantas diretamente com NO é inviável visto sua natureza gasosa e curta meia-vida, em virtude disto, moléculas doadoras são utilizadas como reservatórios de NO. Entre doadores de NO, a S-nitrosoglutationa (GSNO) é considerado um reservatório natural de NO nas células, liberando NO espontaneamente (SILVEIRA *et al.*, 2016; SEABRA *et al.*, 2022).

Embora diversos estudos destaquem os diversos efeitos do NO nas plantas, o seu uso na agricultura ainda é limitado. Sabe-se, no entanto, que a aplicação do NO em plantas resulta em vantagens para a agricultura (SEABRA *et al.*, 2014). Diante da necessidade de estudos para a germinação de sementes de espécies nativas e dos efeitos do NO em plantas, o trabalho teve como objetivo avaliar diferentes doses de GSNO na germinação de sementes de quatro espécies brasileiras de bromélias do gênero *Dyckia* spp.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e caracterização do lote

O trabalho foi realizado no Laboratório de Sementes da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Em Outubro de 2020, frutos maduros de *Dyckia cabreræ* L.B.Smith. & Reitz, *Dyckia dusenii* L.B.Smith, *Dyckia pottiorum* Leme. e *Dyckia walteriana* Leme. foram coletados de plantas matrizes, por volta de 90 dias após o florescimento, na propriedade do colecionador Dr. Walter Miguel Kranz, localizada no município de Londrina/PR (23° 22'S e 51° 11'O).

Os frutos foram colocados em sacos de papel Kraft[®], identificados e transportados para o laboratório. Foram secos ao ar livre, em local sombreado, por três dias, para completarem a deiscência e facilitar a extração das sementes, que foram armazenadas em geladeira (7,5±1,0°C e UR 26±7%), em sacos de papel Kraft[®] por um período de nove meses (270 dias). Antes e após o armazenamento, foi realizada a caracterização do lote de sementes, com obtenção de informações sobre teor de água e viabilidade das sementes (resultados estão disponíveis no artigo A).

Montagem dos tratamentos

A S-nitrosoglutationa (GSNO) foi sintetizada e caracterizada segundo a metodologia de Silveira *et al.* (2016). Glutationa reduzida (GSH) foi dissolvida em ácido clorídrico (1 mol L⁻¹) a 1,2 mol L⁻¹. Uma quantidade equimolar de nitrito de sódio (NaNO₂) foi adicionado à solução de GSH de modo a nitrosar GSH em banho de gelo por 30 minutos e

agitação magnética. Posteriormente, foi feita a adição de acetona e esta solução filtrada e lavada vários vezes com água fria obtendo no final a GSNO precipitado. O sólido obtido foi liofilizado durante 24 horas e mantido em -20°C .

Sementes das quatro espécies foram separadamente embebidas em diferentes doses de GSNO a partir da diluição da concentração inicial de 20 mM. Os tratamentos utilizados foram: 0 mM (controle), 1,25 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM e 20 mM. As sementes ficaram alocadas em frascos Erlenmeyer (50 mL), contendo 5 mL da solução nas diferentes doses durante 5 minutos, à temperatura ambiente. No tratamento controle, as sementes permaneceram embebidas em água destilada. Para cada dose de GSNO, utilizaram-se 200 sementes que, após a embebição, foram subdivididas em 4 repetições de 50 sementes.

Antes da montagem dos tratamentos, as sementes foram esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio 1%, durante 1 minuto, seguida da imersão em álcool 70% durante 1 minuto e, posteriormente, lavadas com água destilada.

Avaliações

Para cada espécie, foram realizados testes para a primeira e contagem final de germinação, visto que não há recomendação nas Regras para Análise de Sementes para as espécies estudadas. Foi considerado o 4º dia para a primeira contagem e o 10º dia para o encerramento do teste. Foram avaliadas a porcentagem de germinação (GER) e de plântulas anormais (PA), primeira contagem de germinação (PCG), índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG) além do comprimento (CP) e massa seca das plântulas (MSP).

As sementes foram colocadas para germinar sobre papel mata-borrão umedecido com água destilada na quantidade de 2,5 vezes o peso do papel não hidratado, e acondicionadas em caixas de poliestireno cristal (Gerbox[®]) de dimensão (11 cm x 11 cm x 3 cm). Os gerbox[®] foram mantidos em câmara de crescimento (tipo B.O.D.) à 25°C , sob fotoperíodo de 8 horas (BRASIL, 2009).

A GER foi determinada computando-se todas as plântulas normais (BRASIL, 2009) sendo consideradas as plântulas que mostraram potencial para continuar seu desenvolvimento e dar origem a plantas normais quando desenvolvidas sob condições favoráveis. A PCG foi contabilizada ao 4º dia, no momento da protrusão da raiz primária da primeira plântula e o resultado expresso em porcentagem de plântulas normais (NAKAGAWA, 1999).

Junto ao teste de germinação, foi realizada a contagem do número de sementes germinadas, para estabelecer o IVG, obtido através da fórmula descrita por Maguire (1962). $IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$, em que: G1, G2 e Gn = número de plântulas normais, computadas na primeira, segunda e última contagem; N1, N2, Nn = número de dias de semeadura à primeira, segunda e última contagem.

O TMG foi determinado pelo critério estabelecido por Labouriau (1983) e realizado simultaneamente ao teste de germinação, contabilizando diariamente o número de sementes germinadas após a instalação do teste. Esse índice representa a média do tempo necessário para a germinação, tendo como fator de ponderação a germinação diária, calculado pela equação:

$$TM = \frac{G1T1 + G2T2 + \dots + GnTn}{G1 + G2 + \dots + Gn}$$

Em que:

TM = é o tempo médio, em dias, necessário para atingir a germinação máxima;

G1, G2 e Gn = é o número de sementes germinadas e nos tempos T1, T2 e Tn, respectivamente.

Ao final de 10 dias, foram determinados a GER e PA e o resultado expresso em porcentagem, além do CP (mm) através da medição das plântulas normais e obtido com o auxílio de um paquímetro. Em seguida, foi determinada a MSP (mg) em balança analítica (precisão $\pm 0,0001g$), onde as plântulas foram colocadas em sacos de papel e mantidas em estufa com circulação forçada de ar a 65 °C, até atingirem massa constante.

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 7 tratamentos (doses) (0,0; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 e 20 mM). Para o teste de germinação, em cada dose, utilizaram-se 4 repetições de 50 sementes. Para o comprimento e massa seca, foram selecionadas 16 plântulas por repetição, e o resultado expresso pela média de quatro plântulas.

Os pressupostos de normalidade dos erros e homogeneidade de variâncias foram testados por Shapiro-Wilk e Bartlett ($p \geq 0,05$), respectivamente. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância a 5% de significância. Quando observado efeito significativo das doses de GSNO, foi realizado a análise de regressão linear ou não-linear (quadrático, logístico de 3 ou 4 parâmetros, segmentado, modelo de Brain-Cousens). Para a

realização das análises, utilizaram-se os pacotes AgroR e seedreg (SHIMIZU; MARUBAYASHI; GONÇALVES, 2021) do *software* R (R CORE TEAM, 2021).

5.4 RESULTADOS

A aplicação de GSNO proporcionou resposta nas sementes das espécies estudadas conforme as doses aplicadas. Os valores de *p*-valor da análise de variância mostram comportamento variável para cada espécie conforme Tabela 5.4.1.

Tabela 5.4.1 - *p*-valor do teste F da análise de variância, coeficiente de variação (CV%) e média para as variáveis: primeira contagem de germinação (PCG) (%), germinação (GER) (%), plântulas anormais (PA) (%), índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG) (dias), comprimento (CP) (mm) e massa seca (MSP) (mg) de plântulas para as espécies *D. cabreræ*, *D. dusenii*, *D. pottiorum* e *D. walteriana* em função de doses de doador de óxido nítrico S-nitrosoglutationa (GSNO).

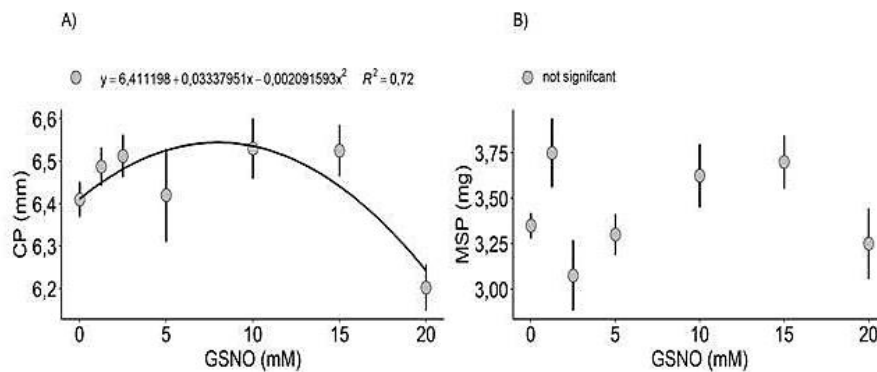
<i>D. cabreræ</i>							
	PCG	GER	PA	IVG	TMG	CP	MSP
<i>p</i> -valor	0,213	0,1667	0,9950 ^t	0,2333	0,7794	0,0181	<0,001
CV (%)	43,7	12,9	45,6	15,6	8,7	2,0	8,5
Média	15,0	39,0	2,0	5,54	3,67	-	-
<i>D. dusenii</i>							
<i>p</i> -valor	0,2069	<0,001	0,9959 ^t	<0,001	0,4677	<0,001	<0,001
CV (%)	35,3	11,9	46,6	14,5	10,7	2,7	14,7
Média	12,0	-	2,0	-	3,21	-	-
<i>D. pottiorum</i>							
<i>p</i> -valor	0,244	0,1401	0,5577 ^t	0,0448	0,7389	0,0371	0,0016
CV (%)	36,2	15,2	62,4	13,6	8,0	9,6	20,3
Média	7,0	46,0	3,0	-	4,05	-	-
<i>D. walteriana</i>							
<i>p</i> -valor	<0,001	<0,001	0,8012 ^t	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CV (%)	20,3	16,8	68,3	16,6	10,9	11,1	16,3
Média	-	-	3,0	-	-	-	-

^tDados transformados para $x^{0.5}$.

Todas as espécies responderam em função da dose do doador GSNO ao menos para uma variável. Para PA, nenhuma espécie apresentou diferença estatística conforme os tratamentos, com valores que variaram de 2 a 3%. *D. cabreræ* teve diferença somente para CP e MSP, enquanto *D. dusenii* diferiu para GER, IVG, CP e MSP. Por outro lado, *D. pottiorum* apresentou diferença para IVG, CP e MSP, enquanto, *D. walteriana* diferiu para todos os parâmetros avaliados (exceto PA).

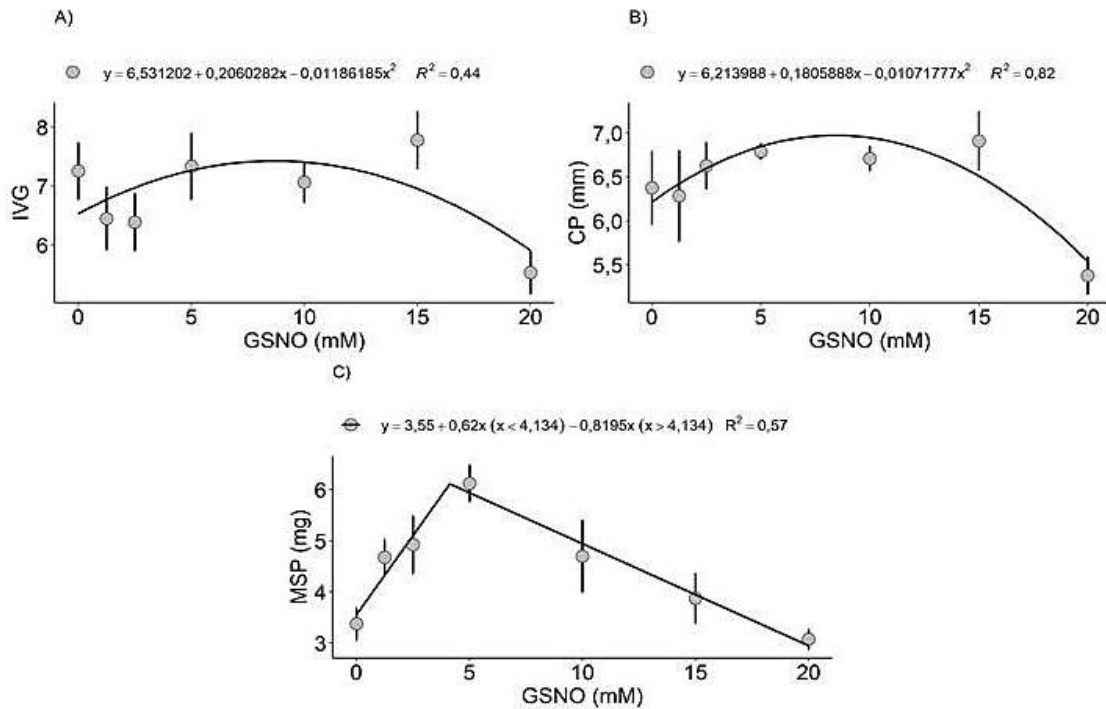
D. cabreræ apresentou comportamento quadrático para a variável CP, com ponto máximo estimado em 7,9 mM obtendo plântulas com comprimento médio de 6,54 mm (no controle foi de 6,41 mm). Para a variável MSP, apesar de apresentar resposta, não foi possível obter um modelo de regressão que explique tal comportamento (Figura 5.4.1).

Figura 5.4.1 - Comprimento (CP) (A) e massa seca de plântulas (MSP) (B) de *D. cabreræ* em função de doses do doador de óxido nítrico S-nitrosoglutathiona (GSNO).



D. pottiorum apresentou diferença significativa somente para IVG, CP e MSP (Figura 5.4.2). Para IVG e CP, houve ajuste quadrático em função de doses de GSNO, com ponto máximo estimado em 8,7 e 8,4 mM, respectivamente, atingindo nestes pontos valores máximos de 7,43 e 6,97 mm, respectivamente. A variável MSP apresentou crescimento máximo na dose estimada de 4,1 mM obtendo 6,1 mg, a partir deste ponto, houve redução da massa. No controle, os valores obtidos para estas variáveis foram IVG (7,35), CP (6,28 mm) e MSP (3,4 mg).

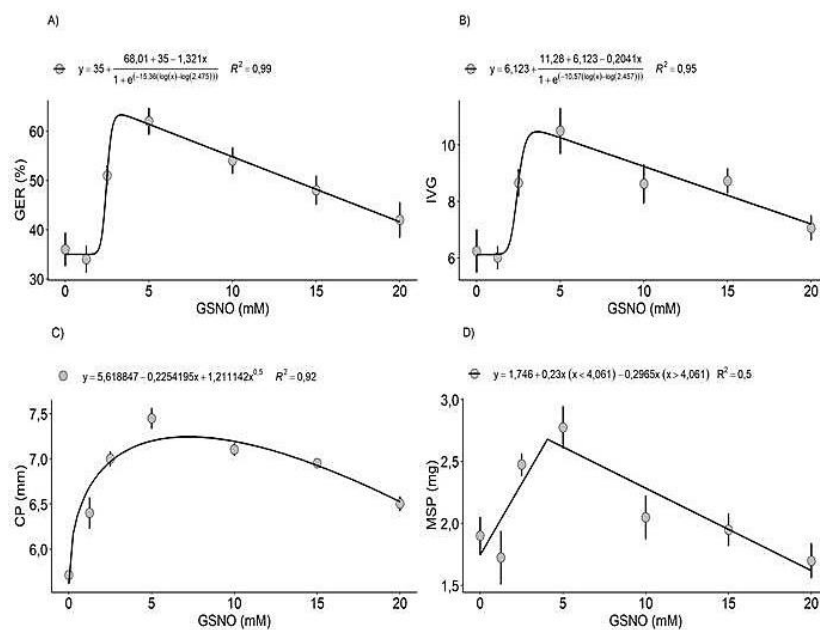
Figura 5.4.2 - Índice de velocidade de germinação (IVG) (A), comprimento (CP) (B) e massa seca de plântulas (MSP) (C) de *D. pottiorum* em função de doses do doador de óxido nítrico S-nitrosoglutationa (GSNO).



Tanto *D.cabrerae* quanto *D.pottiorum* tiveram respostas no crescimento vegetativo das plântulas à GSNO, sem estímulo ao processo germinativo.

Para *D. dusenii*, houve resposta de GER, IVG, CP e MSP às doses de GSNO (Figura 5.4.3).

Figura 5.4.3 - Germinação (GER) (A), índice de velocidade de germinação (IVG) (B), comprimento (CP) (C) e massa seca de plântula (MSP) (D) de *D. dusenii* em função de doses do doador de óxido nítrico S-nitrosoglutationa (GSNO).

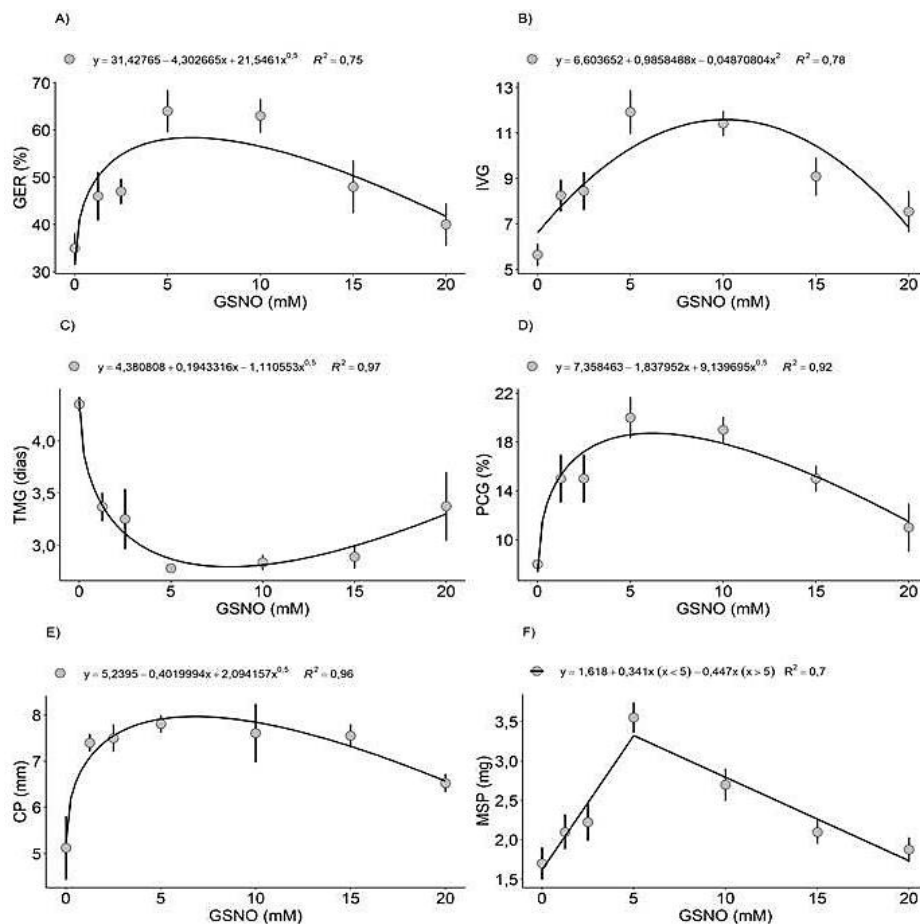


A maior GER (63%) foi obtida na dose estimada de 3,3 mM. Após essa dose, o aumento de GSNO proporcionou redução da germinação. No tratamento controle a germinação foi de 36%. Para o IVG, o comportamento foi semelhante, com maior valor (10,47) para a dose estimada de 3,7 mM e posterior redução com aumento da dose de GSNO.

Para CP, a dose estimada de 7,2 mM proporcionou plântulas maiores (7,25 mm). A dose estimada de 4,1 mM induziu maior valor de MSP (2,7 mg), com redução em doses maiores. Para estas variáveis houve incremento de 27% em CP e 42% de MSP relação ao controle.

Para *D. walteriana* houve resposta para todas variáveis, exceto PA, nas diferentes doses de GSNO (Figura 5.4.4).

Figura 5.4.4 - Germinação (GER) (A), índice de velocidade de germinação (IVG) (B), tempo médio de germinação (TMG) (C), primeira contagem de germinação (PCG) (D), comprimento (CP) (E) e massa seca de plântula (MSP) (F) de *D. walteriana* em função de doses do doador de óxido nítrico S-nitrosoglutationa (GSNO).



Para PCG, o ponto máximo foi obtido na dose estimada de 6,2 mM, com 19% e, logo após esta dose, houve decréscimo na germinação. Para GER, o máximo obtido foi de 58% na dose estimada de 6,7 mM. Com relação ao tratamento controle a PCG foi de 8% e a GER em 35%.

Para IVG, o ajuste foi quadrático com máximo de germinação (11,59) na dose estimada de 10,1 mM. O TMG foi menor na dose estimada de 8,2 mM, com 2,79 dias. Os resultados demonstram que sementes tratadas com GSNO apresentaram maior IVG e menor TMG quando comparado ao controle, no qual, estas variáveis apresentaram valores de 5,64 e 4,35 dias, respectivamente.

Para o CP, houve incremento conforme a dose de GSNO, com ponto máximo estimado em 7,97 mm para a dose de 6,8 mM. Já para MSP, a dose de 5,0 mM representou em maior incremento de massa, com 3,3 mg. Para estas variáveis, nos pontos de máximo, houve um aumento de 56% em relação ao CP e 94% a MSP.

Foi observado que, para as espécies *D.dusenii* e *D.walteriana*, o processo germinativo foi influenciado positivamente pela GSNO, aumentando o IVG e reduzindo o TMG.

5.5 DISCUSSÃO

Por observação de estudos anteriores, as sementes das espécies estudadas não apresentaram impedimento de embebição no processo germinativo. Entre os tipos de controle que facilitam o movimento da água através de seus tecidos, estão às proteínas como aquaporinas e polissacarídeos como os xiloglucanos que facilitam a passagem de água pela formação de um poro durante a embebição e o crescimento do embrião (PARK *et al.*, 2010; KIBINZA *et al.*, 2011).

Acredita-se então que os mecanismos de movimento de água através dos tecidos não foram impedidos, ou seja, eliminando-se a possibilidade de dormência por impermeabilidade do tegumento (PARK *et al.*, 2010; KIBINZA *et al.*, 2011), no entanto, a queda de viabilidade das sementes e a dificuldade da germinação pode estar associada a uma dormência secundária. Assim, a aplicação de NO trouxe efeitos positivos para parte das espécies.

D. dusenii e *D. walteriana* apresentaram estímulo da germinação e variáveis como o IVG e TMG. Esta resposta ao processo germinativo estimulado pela GSNO é relatada na literatura e, entre os efeitos em sementes estão a quebra da dormência através da redução da

sensibilidade ao ácido abscísico (ABA) e estímulo de giberelina (GA), proporcionando melhoria na germinação de diversas espécies (GNIAZDOWSKA *et al.*, 2010; ARC *et al.*, 2013).

O estímulo da germinação ocorre devido ao aumento da atividade de enzimas específicas (hidrolases) na quebra das substâncias de reserva do endosperma das sementes, disponibilizando energia para o embrião. Zhang *et al.* (2005) notaram aumento da atividade de β -amilase na presença de solução doadora de NO (nitroprussiato de sódio-SNP) em algumas espécies como soja e milho, o que indica aumento da atividade destas enzimas com associação ao NO.

Vidal *et al.* (2018) avaliaram o efeito do nitrato de potássio (KNO₃) e do SNP sobre o processo de germinação e crescimento inicial de plântulas de ervilha (*Pisum sativum* L.) e observaram aumento do crescimento de plântulas e da atividade de antioxidantes. Além destes, diversos estudos relatam o NO como estimulador da germinação como em *Arabidopsis* sp. (ALBERTOS *et al.*, 2015), mostarda (*Brassica juncea* L.) (RATHER *et al.*, 2020), quinoa (*Chenopodium quinoa*. Willd) (HAJIHASHEMI *et al.*, 2020) e Brachiaria (*Urochloa brizantha*) (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Sabe-se também do papel de sinalização do NO em conjunto com as espécies reativas de oxigênio (EROs) e sua complexidade de respostas geradas a nível celular. As EROs, dependendo de sua concentração possuem efeitos de sinalização positivos, incluindo a promoção da liberação de dormência e o estímulo da germinação (ARC *et al.*, 2013; SIMONTACCHI *et al.*, 2013).

Estudos propoem que a quantidade de EROs gerada na embebição das sementes deva cair dentro de uma “janela oxidativa” para que a germinação ocorra. Abaixo desta janela, os níveis de ROS seriam muito baixos para promover o a germinação, enquanto acima, os danos oxidativos seriam predominantes. Entre as EROs, por exemplo, o peróxido de hidrogênio exógeno (H₂O₂) mostrou aumentar o catabolismo de ABA e a biossíntese de GA durante a embebição das sementes, estimulando o processo germinativo (ARC *et al.*, 2013; SIMONTACCHI *et al.*, 2013).

Foi observado que apesar do estímulo do GSNO nas espécies já citadas, existe o efeito dual do regulador, ou seja, até determinada dose o efeito foi benéfico, no entanto, assim como outros reguladores do crescimento vegetal, tem seu efeito dependente da dose, portanto, doses elevadas podem levar a inibição de um determinado processo (NOCTOR *et al.*, 2018).

O excesso de NO nas plantas pode levar a um processo de estresse oxidativo, ou seja, quando a semente perde a capacidade em manter os EROs em níveis controláveis pelo sistema antioxidante. Neste caso, o NO leva a um processo denominado de estresse nitrosativo, que nada mais é que o aumento de NO e de EROs a nível celular (NOCTOR *et al.*, 2018).

Juntas, essas moléculas reagem entre si formando o ânion peroxinitrito (ONOO⁻), que juntamente com o excesso de EROs, desencadeiam danos irreversíveis à proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (GRUPTA *et al.*, 2019). Nas plântulas, por exemplo, o NO em altas concentrações induz a redução do crescimento radicular e altera o conteúdo de lignina (BOMH *et al.*, 2010).

Em relação às espécies *D. cabreræ* e *D. pottiorum*, foi observado aumento no comprimento e massa das plântulas, fato também observado nas outras espécies, sugerindo que o doador GSNO tenha um efeito promotor de crescimento, amplamente relatado na literatura (SANZ *et al.*, 2015).

Um dos fatores relacionados ao efeito do NO ao crescimento das plântulas está relacionado ao fato desta molécula estar associada à sinalização de auxina, que em níveis adequados desempenha papel relevante no desenvolvimento do meristema apical. Acredita-se que haja diversas maneiras pelas quais a indução de NO modulam a sinalização de auxina e, assim, influenciar o crescimento vegetal (SALMI; CLARK; ROUX, 2013; SIMONTACCHI *et al.*, 2013).

Assim, a aplicação de GSNO é vantajoso no processo de produção de mudas, favorecendo o crescimento das plântulas nos estádios iniciais, promovendo o crescimento radicular e da parte aérea, o que favorece maior taxa de sobrevivência em ambientes extremos de temperatura e disponibilidade de água. Além disso, promove o estabelecimento de plantas de forma rápida e uniforme que melhora a absorção de nutrientes (GONÇALVES *et al.*, 2018).

Em relação a não haver uma melhora da germinação mesmo na aplicação de GSNO para as espécies *D. cabreræ* e *D. pottiorum*, uma explicação é pelo fato do controle intracelular dos níveis de NO (SEABRA *et al.*, 2022). Acredita-se que estas espécies possuam uma sensibilidade menor as doses utilizadas de NO e os mecanismos endógenos de degradação possam ter influenciado nos resultados. Os mecanismos de degradação de NO são fundamentais para controlar a homeostase desta molécula de sinalização nas células vegetais (LOPES-OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Outro fator associado pode ser a inibição da ação do NO devido a moléculas que inibem direta ou indiretamente o NO endógeno nas células vegetais. Um dos motivos relacionados à dormência fisiológica é a presença destes inibidores, que podem estar presentes

no tegumento ou nas partes internas da semente e até mesmo no embrião. Estes inibidores bloqueiam o metabolismo para que a germinação ocorra ou impedir as trocas gasosas, ou ainda inibir a atividade dos reguladores e afetar o alongamento celular (DALANHOL *et al.*, 2013).

Diversos compostos que inibem a germinação das sementes como das espécies estudadas são oriundos do metabolismo secundário da planta, que apresentam importância no mecanismo de defesa das plantas, principalmente, contra a herbivoria e outras defesas interespecies (BOORA; CHIRISA; MUKANGANYAMA, 2014; BITENCOURT *et al.*, 2021). Entre eles estão taninos, alcaloides, flavonoides, que são encontrados em diversas partes das plantas, incluindo as sementes. Das propriedades destes compostos, destaca-se seu potencial antioxidante, e como agentes redutores, exercem papel na neutralização de radicais livres. Salienta-se que o NO trata-se de um radical livre devido ao seu elétron desemparelhado podendo ter seu efeito inibido em sementes com a presença destes compostos (BOORA; CHIRISA; MUKANGANYAMA, 2014; BITENCOURT *et al.*, 2021).

Com base nos resultados apresentados, observa-se que a aplicação de reguladores do crescimento vegetal como o NO pode ser uma estratégia de superar a dormência de espécies armazenadas de *Dyckia* sp., aumentando a germinação, sendo uma estratégia para utilização destas espécies para fins de produção de mudas, o que torna um mecanismo importante para propagação e incentiva novas pesquisas com o intuito de se utilizar as *Dyckias* no mercado de plantas ornamentais.

5.6. CONCLUSÕES

Para as espécies *D. dusenni* e *D. walteriana* recomenda-se a aplicação de 3,3 a 7,2 mM e 5,0 e 10,1 mM de GSNO, respectivamente. Por outro lado, *D. cabreræ* e *D. pottiorum* não foram responsivas.

Doses acima de 10,0 mM de S-nitrosoglutathiona ocasionaram a redução do processo germinativo, indicando efeito fitotóxico da molécula.

5.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTOS, P.; ROMERO-PUERTAS, M.C.; TATEMATSU, K.; MATEOS, I.; SÁNCHEZ-VICENTE, I.; NAMBARA, E.; LORENZO, O. S-nitrosylation triggers ABI5 degradation to promote seed germination and seedling growth. **Nature Communications**, v.6, n.8669, p.1-10, 2015. <https://doi.org/10.1038/ncomms9669>
- ANACLETO, A.; BORNANCIN, A.P.A. Perfil e comportamento do consumidor de bromélias: orientação a produção rural. **Revista Brasileira de Planejamento e Desenvolvimento**, v.7, n.1, p.51-66, 2018.
- Bromeliads production and trade in Paraná, Brazil. **Revista Ceres**, v.60, n.2, p.85-88, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2013000200006>
- ARC, E.; GALLAND, M.; GODIN, B.; CUEFF, G.; RAJJOU, L. Nitric oxide implication in the control of seed dormancy and germination. **Plant Science**, v.4, p.1-13, 2013. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00346>.
- BITENCOURT, G.A.; GONÇALVES, C.C.M.; ROSA, A.G.; ZANELLA, D.F.P.; MATIAS, R. Phytochemistry and Allelopathy of Aroeira Vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi) in Seed Germination. **Ensaios e Ciência**, v.25, n1, p.2-8, 2021. <https://doi.org/10.17921/1415-6938.2021v25n1p02-08>
- BOMH, F.M.L.Z.; FERRARESE, M.; ZANARDO, D.I.L.; MAGALHAES, J.R.; FERRARESE-FILHO, O. Nitric oxide affecting root growth, lignification and related enzymes in soybean seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.32, n.6. p.1039-1046, 2010. [10.1007/s11738-010-0494-x](https://doi.org/10.1007/s11738-010-0494-x)
- BOORA, F.; CHIRISA, E.; MUKANGANYAMA, S. Evaluation of Nitrite Radical Scavenging Properties of Selected Zimbabwean Plant Extracts and Their Phytoconstituents. **Journal of Food Processing**, v.2014, p.1-7, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/918018>
- BOUCELHA, L.; DJEBBAR R. Influence de différents traitements de prégermination des graines de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. sur les performances germinatives et la tolérance au stress hydrique. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v. 19, n.2, p.160-172, 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399p.
- CORPAS, F.J.; PALMA, J.M. Assessing Nitric Oxide (NO) in Higher Plants: An Outline. **Nitrogen**, v.1, p.12-20, 2018. <https://doi.org/10.3390/nitrogen1010003>
- DALANHOL, S.J.; MOMBACH, T.C.; TODERKE, M.L.; NOGUEIRA, A.V.; BORTOLINI, M.F. Dormancy in seeds of *Annona cacans* Warm. (Annonaceae). **Revista Acadêmica de Ciências Agrária e Ambiental**, v. 11, p. S183-S189, 2013. <https://doi.org/10.7213/academica.10.S01.A>

GNIAZDOWSKA, A.; KRASUSKA, U.; DEBSKA, K.; ANDRYKA, P.; BOGATEK, R. The beneficial effect of small toxic molecules on dormancy alleviation and germination of apple embryos is due to NO formation. **Planta**, v.232, n.4, p.999-1005, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1214-x>

GONÇALVES, B.H.L.; SOUZA, J.M.A.; FERRAZ, R.A.; TECCHIO, M.A.; LEONEL, S. Efeito do bioestimulante Stimulate® no desenvolvimento de mudas de maracujazeiro cv. BRS Rubi do Cerrado. **Revista de Ciências Agrárias**, v.41, n.1, p.147-155, 2018. <http://doi.org/10.19084/RCA16077>

GOUDA, E.J; BUTCHER, D. (cont. updated) **A List of Accepted Bromeliaceae Names**. Disponível em: <http://bromeliad.nl/bromNames/>. University Botanic Gardens, Utrecht. Acesso em: 30 de mar. 2022.

GRUPTA, K.J.; HANCOCK, J.T.; PETRIVALSKY, M.; KOLBERT, Z.; LINDERMAYR, C.; DURNER, J.; BARROSO, J.B.; PALMA, J.M.; BROUQUISSE, R.; WENDEHENNE, D.; CORPAS, F.J.; LOAKE, G.J. Recommendations on terminology and experimental best practice associated with plant nitric oxide research. **New Phytologist**, v.225, p.1828-1834, 2019. <https://doi.org/10.1111/nph.16157>

HAJIHASHEMI, S.; SKALICKY, M.; BRESTIC, M.; PAVLA, V. Cross-talk between nitric oxide, hydrogen peroxide and calcium in salt-stressed *Chenopodium quinoa* Willd. At seed germination stage. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.154, p.657-664, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.07.022>

KIBINZA, S. Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. **Plant Science**, v. 181, n. 3, p. 309-315, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.06.003>

LABOURIAU, L.G. **A germinação das sementes**. Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, Washington, Estados Unidos. 1983.173p.

LOPES-OLIVEIRA, P.J.; OLIVEIRA, H.C.; KOLBERT, Z.; FRESCHI, L. The light and dark sides of nitric oxide: multifaceted roles of nitric oxide in plant responses to light. **Journal of Experimental Botany**, v.72, n.3, p.885-903, 2021. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa504>

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop science**, v. 2, p. 176-177, 1962. <https://doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>

NABI, R.B.S.; TAYADE, R.; HUSSAIN, A.; KULKARNI, K.P.; IMRAN, Q.M.; MUN, B.G.; YUN, B.W. Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. **Environmental and Experimental Botany**, v.161, p.120-133, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.02.003>

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap.2, p.1-24.

NOCTOR, G.; REICHHELD, J.-P.; FOYER, C. H. ROS-related redox regulation and signaling in plants. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.80, p.3-12, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.semedb.2017.07.013>

OLIVEIRA, T.F.; SANTOS, H.O.D.; VAZ-TOSTES, D.P.; CAVASIN, P.Y.; ROCHA, D. K.; TIRELLI, G.V. Protective action of priming agents on *Urochloa brizantha* seeds under water restriction and salinity conditions. **Journal of Seed Science**, v. 43, e202143010, 2021. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v43237830>

PARK, W.; SCHEFFLER, B.E.; BAUER, P.J.; CAMPBELL, B.T. Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **BMC Plant Biology**, v.10, n.142, p.1-17, 2010. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-142>.

PEREIRA, C.; CUQUEL, F.L.; PANOBIANCO, M. Germination and storage of seeds of the bromeliad *Nidularium innocentii* (Lem.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.2, p. 36-41, 2010. <https://doi.org/10.1590/s0101-31222010000200004>

RATHER, B.A.; MIR, I.R.; MASOOD, A.; ANJUM, N.A.; KHAN, N.A. Nitric Oxide Pre-Treatment Advances Seed Germination and Alleviates Copper-Induced Photosynthetic Inhibition in Indian Mustard. **Plants**, v.9, n.6, p.776, 2020. <https://doi.org/10.3390/plants9060776>.

R CORE TEAM. R. **A language and environment for statistical computing**. Foundation for Statistical Computing. Disponível em :<http://www.r-project.org>. Acesso em: 16.dez.2021.

REFLORA. **Bromeliácea in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br>. Acesso em: 01 abr. 2022.

SEABRA, A.B.; RAI, M.; DURÁN, N. Nano carriers for nitric oxide delivery and its potential applications in plant physiological process: A mini review. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 23, n.10, p.1-10, 2014. <https://doi.org/10.1007/s13562-013-0204-z>

SALMI, M.L.; CLARK, G.; ROUX, S.J. Current status and proposed roles for nitric oxide as a key mediator of the effects of extracellular nucleotides on plant growth. **Frontiers in Plant Science**, v.4, n.427, p. 1-7, 2013. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00427>

SANZ, L.; ALBERTOS, P.; MATEOS, I.; SÁNCHEZ-VICENT, I.; LECHÓN, T.; FERNÁNDEZ-MARCOS, M.; LORENZO, O. Nitric oxide (NO) and phytohormones crosstalk during early plant development. **Journal of Experimental Botany**, v.66, n.10, p.2857-2868, 2015. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv213>

SEABRA, A.B.; PELEGRINO, M.T.; LOPES-OLIVEIRA, P.J.; GOMES, D.G.; OLIVEIRA, H.C. Overview of nitric oxide homeostasis: strategies for altering the levels of this signaling molecule in plants. **Nitric Oxide in Plant Biology**, p.3-41, 2022. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818797-5.00012-1>

SHIMIZU, G.D.; MARUBAYASHI, R.Y.P.; GONÇAVES, L.S.A. **AgroR: Experimental Statistics and Graphics for Agricultural Sciences**. R package version 1.2.1. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/AgroR/index.html>. Acesso em: 16.dez.2021.

SILVEIRA, N.M.; FRUNGILLO, L.; MARCOS, F.C.C; PELEGRINO, M.T.; MIRANDA, M.T.; SEABRA, A.B.; SALGADO, I.; MACHADO, E.C.; RIBEIRO, R.V. Exogenous nitric oxide improves sugarcane growth and photosynthesis under water deficit. **Planta**, v.244, p.181-190, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2501-y>

SIMONTACCHI, M., GARCIA-MATA, C., BARTOLI, C. G., SANTA-MARIA, G. E., AND LAMATTINA, L. Nitric oxide as a key component in hormone-regulated processes. **Plant Cell Reports**, v.32, n.6, p.853-866, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1434-1>
VIDAL, A.; CANTABELLA, D.; BERNAL-VICENTE, A.; DÍAZ-VIVANCOS, P.; HERNÁNDEZ, J. A. Nitrate- and nitric oxide-induced plant growth in pea seedlings is linked to antioxidative metabolism and the ABA/GA balance. **Journal of Plant Physiology**, v.230, p.13-20, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.08.003>

ZHANG, H.; SHEN, W.B.; ZHANG, W.; XU, L.L. A rapid response of β -amylase to nitric oxide but not gibberellin in wheat seeds during the early stage of germination. **Planta**, v. 220, n.5, p. 708-716, 2005. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1390-7>

6 ARTIGO C: ÓXIDO NÍTRICO LIVRE E NANOENCAPSULADO NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DA BROMÉLIA BRASILEIRA *Dyckia walteriana* Leme.

6.1 RESUMO

As bromélias são utilizadas no setor de ornamentação, mas, estudos de germinação de sementes são escassos. A utilização de reguladores do crescimento vegetal, como moléculas doadoras de óxido nítrico (NO), pode auxiliar na germinação e contribuir para a manutenção do vigor das sementes ao longo do tempo. Entretanto, a aplicação de doadores de NO é prejudicada devido sua instabilidade, sendo a nanoencapsulação uma alternativa para a proteção do composto. O trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da S-nitrosoglutationa (GSNO) livre e nanoencapsulada na germinação de sementes de *Dyckia walteriana* Leme., bromélia potencialmente ornamental, nativa do Brasil e criticamente ameaçada de extinção. Os tratamentos foram constituídos da embebição por cinco minutos das sementes nas seguintes formulações: nanopartículas de quitosana/tripolifosfato com GSNO (NP CS/TPP-GSNO), nanopartículas de quitosana/tripolifosfato vazias (NP- CS/TPP) e doador livre (GSNO) nas doses 0,0; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 mM. Em uma segunda etapa, para as doses de 2,5 e 5,0 mM, as sementes foram submetidas ao teste de envelhecimento acelerado (E.A). O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e utilizadas quatro repetições de 50 sementes por tratamento. Foram avaliados diferentes parâmetros relacionados à germinação e, no experimento de E.A., marcadores de estresse e pigmentos fotossintéticos. A aplicação de GSNO tanto na forma livre como nanoencapsulada estimularam germinação (de 36% no controle para 61-69%). No entanto, a nanoencapsulação permitiu uma redução da dose ótima de GSNO (de 3,7-5,7 para 2,3-2,5 mM). No E.A, houve redução do vigor das sementes, com 26% de germinação no controle e 53-61% com GSNO. O GSNO estimulou a produção de clorofilas e carotenoides. O E.A levou a um aumento do teor de H₂O₂ e malondialdeído, o que foi atenuado pela GSNO. Os resultados indicam que o doador de NO estimulou o processo de germinação de sementes de *D. walteriana*, tanto em condições normais quanto sob E.A. Além disto, a GSNO protegeu as sementes de danos induzidos pela E.A. Em ambas as condições, o doador na forma nanoencapsulada induziu melhores respostas. Doses entre 3,7 e 5,7 mM de GSNO livre e 2,3 a 2,9 mM do GSNO nanoencapsulado são recomendadas em condição de 25°C e, sob condições de E.A, são indicadas as doses de 2,5 e 5,0 mM do GSNO nanoencapsulado.

Palavras-chave: Bromeliaceae. *Dyckia* sp. Nanotecnologia. Propagação.

6.2 INTRODUÇÃO

As bromélias se distribuem em 79 gêneros e 3684 espécies, sendo o Brasil grande centro de diversidade, com 1774 espécies. Entre elas, o gênero *Dyckia* Schult. & Schult. f. é representado por 178 espécies, muitas endêmicas do Brasil (GOUDA; BUTCHER; GOUDA, 2022).

Muitas espécies do gênero *Dyckia* apresentam potencial ornamental, mas não tem sido produzidas comercialmente com este fim, apesar do mercado estar sempre ávido por novidades. Por outro lado, as bromélias têm sofrido constantemente extração ilegal no *habitat*, fator preocupante, visto que várias espécies têm populações pequenas, endêmicas e ameaçadas (VERSIEUX, 2011; ANACLETO; NEGRELLE, 2015). Entre estas, *Dyckia walteriana* Leme. é uma espécie endêmica e nativa do Brasil, enquadrando-se na categoria “criticamente em perigo”, exigindo medidas urgentes de conservação (MUSEGANTE *et al.*, 2020; REFLORA, 2022).

Segundo Oliveira Júnior *et al.* (2013), o conhecimento dos fatores de crescimento e desenvolvimento de espécies nativas permite auxiliar na conservação, como também introduzir novas espécies de valor ornamental no mercado, visto que muitas espécies são exóticas e acabam por desvalorizar a flora local e empobrecem o ecossistema. Com o intuito de favorecer o processo germinativo, algumas pesquisas vêm utilizando reguladores de crescimento vegetal que, quando aplicados exogenamente, podem modificar os processos fisiológicos e morfológicos das plantas influenciando no crescimento e desenvolvimento (ROCHA *et al.*, 2021).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso de grande importância na regulação de diversas vias de sinalização celular, sendo capaz de atravessar facilmente as biomembranas e reagir com macromoléculas nas células vegetais. Assim, desempenha papéis fundamentais na regulação de vários processos fisiológicos e bioquímicos cruciais em plantas, como na germinação, que é essencial para garantir a sobrevivência e o crescimento saudável das mudas. Neste sentido, o NO serve como estratégia para reduzir a dormência de sementes, além de melhorar o processo germinativo de sementes de baixo vigor (KHAN *et al.*, 2021).

No entanto, o tratamento direto com NO é inviável visto sua natureza gasosa e curta meia-vida, reagindo rapidamente com oxigênio (TOMAZINI; ANDRADE; MÁXIMO, 2019). Em virtude disto, moléculas doadoras de baixo peso molecular são utilizadas como reservatórios de NO. Entre elas, encontra-se a S-nitrosoglutationa (GSNO), que é um S-

nitrosotiol (RSNO) considerado um reservatório natural de NO nas células (SEABRA *et al.*, 2022ab).

Todavia, alguns doadores de NO são relativamente instáveis e possuem alta taxa de decomposição em temperaturas elevadas e exposição à luz, levando a uma rápida liberação de NO, o que, além de reduzir sua eficácia, resulta em efeitos tóxicos (SEABRA *et al.*, 2022ab). Assim, a nanoencapsulação permite a obtenção de um sistema de liberação controlada, protegendo a molécula bioativa contra a degradação e reduzindo o risco de contaminação ambiental e toxicidade para organismos não-alvo (PASCOLI *et al.*, 2018).

As nanopartículas (NPs), visando a questão ambiental, vem sendo produzidas através de polímeros biodegradáveis. A quitosana é um composto encontrado de forma natural em animais artrópodes, tratando-se de um polímero biodegradável e de baixa toxicidade, cujo objetivo é a proteção do material nanoencapsulado, evitando sua degradação e aumentando significativamente sua meia-vida (KAH *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2020).

Os estudos da aplicação da nanotecnologia em conjunto com doadores de NO vem se expandindo nos últimos anos, com diversas aplicações em diferentes finalidades como salinidade em milho (*Zea mays* L.) utilizando MSA (ácido nitroso-mercaptopuccínico) (OLIVEIRA *et al.*, 2016), estresse hídrico em *Heliocarpus popayanensis* Kunth. também com MSA (DO CARMO *et al.*, 2021), armazenamento de frutas de Cereja (*Prunus avium* L. cv. Hongdeng) com GSNO (MA *et al.*, 2019), entre outros.

Devido a relevância e necessidade de estudos para a germinação de sementes das espécies citadas e a escassez de estudos com a nanoencapsulação de NO com enfoque na germinação, o trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de GSNO livre e nanoencapsulado na germinação, sob condições normais e envelhecimento acelerado (E.A) de sementes de *Dyckia walteriana*.

6.3 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal e caracterização do lote

O trabalho foi realizado no Laboratório de Sementes da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Após 90 dias do florescimento, frutos maduros de *Dyckia walteriana* Leme. foram coletados de plantas matrizes, em Outubro de 2020, na propriedade de um colecionador, localizada no município de Londrina/PR (23°22'S e 51° 11'O).

Após a coleta, os mesmos frutos foram armazenados em sacos de papel Kraft®, identificados e transportados para o laboratório. Em seguida, os frutos foram secos ao ar livre, em local sombreado por três dias, para completarem a deiscência e facilitar a retirada das sementes, que foram armazenadas em geladeira ($7,5\pm 1,0^\circ\text{C}$ e umidade relativa em $26\pm 7\%$), em sacos de papel tipo Kraft® até a instalação do experimento. Antes da realização do experimento, para caracterização do lote, foi determinado o teor de água, bem como a viabilidade das sementes. Os resultados são apresentados no artigo A.

Preparação das nanopartículas e dos tratamentos

A GSNO livre e as suspensões de NPs de quitosana contendo a S-nitrosoglutationa (GSNO) como molécula doadora de NO foram disponibilizadas pela Prof^a. Dr^a. Amedea Barozzi Seabra da Universidade Federal do ABC. A GSNO foi sintetizada e caracterizada segundo a metodologia de Silveira *et al.* (2016). Glutathione reduzida (GSH) foi dissolvida em ácido clorídrico (1 mol L^{-1}) a $1,2\text{ mol L}^{-1}$. Uma quantidade equimolar de nitrito de sódio (NaNO_2) foi adicionado à solução de GSH a fim de nitrosar GSH, em banho de gelo por 30 minutos e agitação magnética. Posteriormente realizou-se a adição de acetona e esta solução filtrada e lavada várias vezes com água fria obtendo o GSNO precipitado. O sólido obtido foi liofilizado durante 24 horas e armazenado a -20°C .

Para a obtenção de NPs, as mesmas foram preparadas usando o método de gelificação iônica (MARCATO *et al.*, 2013; PELEGRINO *et al.*, 2017). Resumidamente, a quitosana (CS) foi dissolvida em ácido acético (1%) e 26 mmol L^{-1} de GSH foram adicionados à solução. Após 90 minutos de agitação magnética à temperatura ambiente ($25\pm 2^\circ\text{C}$), uma solução de tripolifosfato de sódio (TPP) a $0,6\text{ mg mL}^{-1}$ foi adicionada gota a gota a a solução CS/GSH. A mistura final foi magneticamente agitada por pelo menos 90 minutos e obtendo concentração final de GSH igual a 20 mmol L^{-1} .

Para obter NPs de quitosana contendo GSNO, uma quantidade equimolar de nitrito de sódio (NaNO_2) foi adicionada à suspensão de NP- CS/TPP-GSH, seguido por manutenção por 60 minutos no escuro. A concentração final de NP-CS/TPP-GSNO foi de 20 mM. O mesmo procedimento foi realizado sem a presença de GSH, para obter as NPs contendo apenas CS/TPP. As formulações foram caracterizadas por tamanho, dispersão dinâmica de luz, análises de rastreamento de NPs, potencial zeta, eficiência de encapsulamento, índice de polidispersividade (PDI) e pH.

Tratamentos

Em ambos os experimentos (condição normal e E.A), as sementes foram esterilizadas em solução de hipoclorito de sódio 1% (1 minuto), seguida da imersão em álcool 70% (1 minuto) e, posteriormente, lavadas com água destilada.

Na sequência, as sementes das espécies foram embebidas em seus respectivos tratamentos em frascos Erlenmeyer (50 mL), contendo 5 mL da formulação, agitando-os durante 5 minutos à temperatura ambiente. No tratamento controle (0 mg L^{-1}), as sementes foram pré-embebidas em água destilada.

Sob condições normais (25°C), as sementes de *D. walteriana* foram expostas a diferentes doses de NP-CS/TPP-GSNO, sendo: 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 mM. As mesmas doses foram utilizadas somente para as NPs (NP-CS/TPP) e para o GSNO livre.

Para o envelhecimento acelerado (E.A), foram estabelecidos os mesmos tratamentos citados, utilizando somente as doses de 2,5 e 5,0 mM. Neste experimento, as sementes foram conduzidas utilizando-se caixas de poliestireno cristal (Gerbox[®]) de dimensão (11 cm x 11 cm x 3 cm) possuindo no seu interior suportes para apoio de uma tela metálica. Na superfície de cada uma destas, adicionou-se um tecido voal, que auxilia na absorção mais lenta de água. Na sequência, as sementes foram distribuídas de maneira a formar uma camada uniforme. No fundo de cada gerbox[®] foram adicionados 40 mL de água destilada e as caixas foram mantidas a 41°C durante 72 horas (BARBOSA *et al.*, 2011). Após este período realizou-se o teste de germinação.

Parâmetros avaliados

Foram realizados testes para estabelecer a primeira e a contagem final de germinação, visto que não há recomendação nas Regras para Análise de Sementes para as espécies estudadas. Foi considerado o 4º dia para a primeira contagem e o 10º dia para o encerramento do teste. Foram avaliadas a porcentagem de germinação (GER) e de plântulas anormais (PA) primeira contagem de germinação (PCG), índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG), comprimento (CP) e massa seca das plântulas (MSP).

As sementes foram colocadas para germinar sobre papel mata-borrão umedecido com água destilada na quantidade de 2,5 vezes o peso do papel não hidratado, e acondicionadas em caixas de poliestireno cristal (Gerbox[®]) de dimensão (11 cm x 11 cm x 3 cm). Os gerbox[®] foram mantidos em câmara de crescimento (tipo B.O.D.) à temperatura de 25°C , sob fotoperíodo de 8 horas de luz. A GER foi determinada computando-se todas as

plântulas normais e consideradas como normais, as plântulas que mostraram potencial para continuar seu desenvolvimento e dar origem a plantas normais quando desenvolvidas sob condições favoráveis (BRASIL, 2009).

A PCG foi conduzida junto ao teste de germinação, sendo contabilizado no momento da protrusão da raiz primária da primeira plântula e os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais (NAKAGAWA, 1999).

Junto ao teste de GER foi realizada a contagem diária do número de sementes germinadas, para estabelecer o IVG obtido através da fórmula descrita por Maguire (1962). $IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$, em que: G1, G2 e Gn = número de plântulas normais, computadas na primeira, segunda e última contagem; N1, N2, Nn = número de dias de semeadura à primeira, segunda e última contagem.

O TMG foi determinado segundo Labouriau (1983) e realizado simultaneamente ao teste de germinação, contabilizando diariamente o número de sementes germinadas após a instalação do teste. Esse índice representa a média do tempo necessário para a germinação, tendo como fator de ponderação a germinação diária, calculado pela equação:

$$TM = \frac{G1T1 + G2T2 + \dots + GnTn}{G1 + G2 + \dots + Gn}$$

Sendo:

TM = é o tempo médio, em dias, necessário para atingir a germinação máxima;

G1, G2 e Gn = é o número de sementes germinadas e nos tempos T1, T2 e Tn, respectivamente.

Ao final de 10 dias, foram determinados a GER e PA e o resultado expresso em porcentagem, além do CP (mm) através da medição das plântulas normais e obtido com o auxílio de um paquímetro. Para MSP, as plântulas foram colocadas em sacos de papel e mantidas em estufa com circulação forçada de ar a 65°C, até atingirem massa constante e pesadas em balança analítica (precisão $\pm 0,0001g$) sendo o resultado expresso em mg.

Malondialdeído (MDA) e Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

O malondialdeído (MDA) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foram estimados como marcadores de estresse oxidativo. Eófilos recém-colhidos (0,1 g ou 100 mg) passaram pelo processo de moagem utilizando nitrogênio líquido e homogeneizado com ácido tricloroacético frio (TCA) (0,2%) diluído em metanol. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 10.000 x g por 5 minutos e o sobrenadante utilizado para a determinação do teor de MDA pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) com medidas de

fluorescência (ex/em: 535/590 nm) (CAMEJO; WALLIN; ENOJARVI, 1998) utilizando o leitor de microplacas Victor TM 3 (Perkin Elmer, Turku, Finlândia).

Com o mesmo extrato utilizado para o ensaio TBARS, após centrifugação a 10.000 x g por 5 minutos a 4°C foi determinado o conteúdo de H₂O₂ após reação em gelo com tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,5) e KI 1 M. A determinação se deu a 390 nm utilizando o leitor de microplacas Victor TM 3 (Perkin Elmer, Turku, Finlândia) (VITOR *et al.*, 2013).

Clorofilas e carotenoides

A determinação do teor de clorofila foi baseada na metodologia proposta por Wellburn (1994) o qual se fundamenta na extração das clorofilas *a* e *b* a partir da mistura da solução contendo acetona (80%) e tampão fosfato de sódio (2,5 mM; pH 7,8). Para a realização da extração de clorofila, coletou-se 0,05 g de tecido (eófilos), que foram pulverizados em nitrogênio líquido e colocados em tubos falcon (envolvido em papel alumínio). Em seguida, 5 mL da solução foi adicionada e homogeneizada, mantendo-a sempre no gelo. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 400 rpm por 10 minutos e a absorbância dos sobrenadantes lida nos seguintes comprimentos de onda: 663,2 nm, 646,8 nm e 470 nm. Para o cálculo das concentrações de clorofilas e carotenóides (µg/mL) foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\text{Clorofila } a = 12,25 \times A_{663,2} - 2,79 \times A_{646,8}$$

$$\text{Clorofila } b = 21,5 \times A_{646,8} - 5,1 \times A_{663,2}$$

$$\text{Clorofila Total} = \text{Clorofila } a + \text{Clorofila } b$$

$$\text{Carotenoides totais} = (1000 \times A_{470} - 1,82 \times C_{\text{clorofila } a} - 85,02 \times C_{\text{clorofila } b})/198$$

Delineamento experimental e análise estatística

Os pressupostos de normalidade dos resíduos e homogeneidade de variâncias foram testados por Shapiro-Wilk e Bartlett ($p \geq 0,05$) respectivamente. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância a 5% de significância e processados utilizando o *software* R (R CORE TEAM, 2022) e utilizado os pacotes AgroR (SHIMIZU; MARUBAYASHI; GONÇAVES, 2022).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com os tratamentos (GSNO livre, NP CS/TPP-GSNO, NP CS/TPP) e em todas foram utilizadas seis doses (1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 e 20 mM), além do tratamento controle. Quando constatado

efeito significativo das doses de GSNO, foi realizado a análise de regressão linear ou não-linear (quadrático, logístico de 3 ou 4 parâmetros, segmentado, modelo de Brain-Cousens).

Para o teste de E.A foram utilizadas somente as doses 2,5 e 5,0 mM dos tratamentos e os resultados comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Na condução do teste de E.A e a GER à 25°C, em cada dose, foram utilizadas 4 repetições de 50 sementes. Para o CP e MSP, foram selecionadas 16 plântulas por repetição, e o resultado expresso pela média de quatro plântulas.

Para as análises de marcadores de estresse oxidativo (MDA e H₂O₂) e pigmentos fotossintéticos, foram utilizadas somente as doses 2,5 e 5,0 mM dos tratamentos e as sementes colocadas a 25°C ou sob envelhecimento acelerado. Nestas variáveis a análise foi em esquema fatorial 2x7, sendo os fatores condições de temperatura (25°C e envelhecimento acelerado a 41°C) e os tratamentos (GSNO, NP CS/TPP-GSNO e NP CS/TPP nas doses 2,5 e 5,0 mM).

6.4 RESULTADOS

Parâmetros germinativos

Verificou-se resposta significativa para todas as variáveis, exceto plântulas anormais (PA), que apresentou em todos os tratamentos média de 2%. O tratamento somente com NPs (NP CS/TPP) apresentou diferença apenas para GER. As diferenças observadas nos tratamentos são confirmadas conforme a análise de variância apresentada pela Tabela 6.4.1.

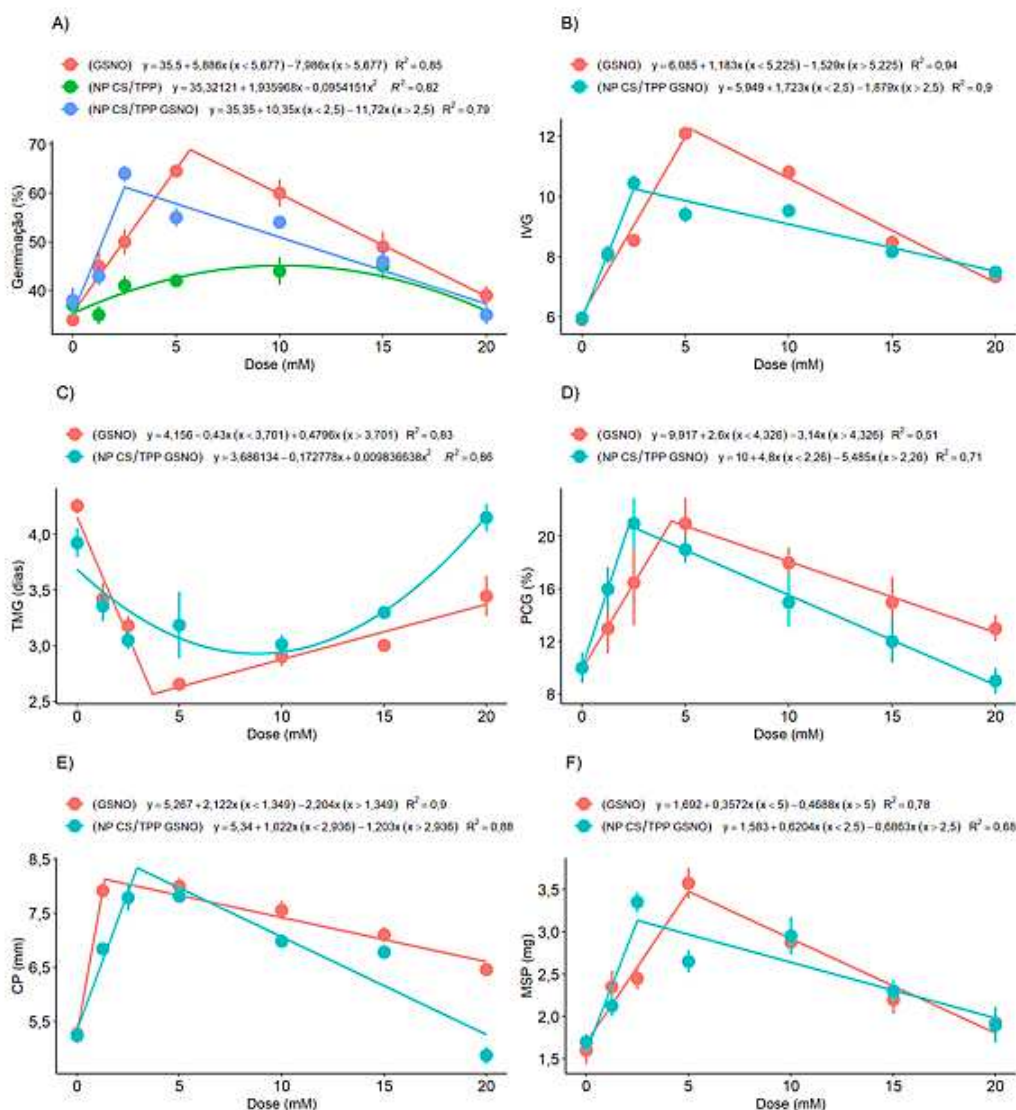
Tabela 6.4.1 - *p*-valor do teste F da análise de variância e coeficiente de variação (CV%) para as variáveis: primeira contagem de germinação (PCG) (%), germinação (GER) (%), plântulas anormais (PA) (%), índice de velocidade de germinação (IVG), tempo médio de germinação (TMG) (dias), comprimento (mm) (CP) e massa seca (MSP) (mg) de plântulas de *D. walteriana* para os tratamentos GSNO, NP CS/TPP GSNO e NP CS/TPP em diferentes doses.

GSNO							
Variável	PCG	GER	PA	IVG	TMG	CP	MSP
<i>p</i> -valor	<0,001	<0,001	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CV (%)	25,13	9,71	-	4,66	6,52	4,24	13,35
Média	-	-	2,43	-	-	-	-
NP CS/TPP GSNO							
<i>p</i> -valor	<0,001	<0,001	-	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
CV (%)	20,75	8,41	-	5,31	8,71	4,19	12,72
Média	-	-	2,43	-	-	-	-
NP CS/TPP							
<i>p</i> -valor	0,8348	<0,001	-	0,8017	0,5636	0,8696	0,1741
CV (%)	40,44	10,45	-	4,68	7,65	6,29	14,26
Média	7,86	-	2,57	5,78	3,58	5,57	2,26

*GSNO (S-nitrosoglutationa), NP (nanopartícula), CS (quitosana), TPP (tripolifosfato de sódio).

A aplicação de GSNO, tanto na forma livre como nanoencapsulada, estimulou a germinação das sementes de *D. walteriana*. A GSNO livre na dose estimada de 5,7 mM proporcionou germinação de 69%. Na forma nanoencapsulada (NP CS/TPP-GSNO), a germinação foi de 61% na dose estimada de 2,5 mM. Também ocorreu estímulo nas NPs sem a presença de NO (NP CS/TPP), com germinação de 45% na dose equivalente de 10,1 mM. Já o tratamento controle apresentou 36% de germinação (Figura 6.4.1).

Figura 6.4.1 - Germinação (GER) (%) (A), índice de velocidade de germinação (IVG) (B) tempo médio de germinação (TMG) (dias) (C) primeira contagem de germinação (PCG) (%) (D), comprimento (CP) (E) e massa seca (MSP) (mg) (F) de plântulas de *D. walteriana* nos diferentes tratamentos.



*GSNO (S-nitrosoglutationa), NP (nanopartícula), CS (quitosana), TPP (tripolifosfato de sódio).

Para PCG, a germinação atingiu 21%, nas doses estimadas de 4,3 mM e 2,3 mM para GSNO livre e NP CS/TPP-GSNO, respectivamente. O tratamento controle teve PCG de 9%. Para IVG e TMG, o controle apresentou 5,85 e 3,97 dias, respectivamente. A aplicação de GSNO reduziu o TMG e aumentou o IVG. A GSNO livre nas doses estimadas de 5,2 mM e 3,7 mM resultaram em IVG de 12,26 e TMG de 2,6 dias, respectivamente. Já a GSNO nanoencapsulada (NP CS/TPP-GSNO) apresentou IVG de 10,26 e TMG de 2,9 dias nas doses estimadas de 2,5 e 8,8 mM, respectivamente.

Em relação ao CP, a resposta foi semelhante, com plântulas de comprimento médio de 8,13 mm e 8,34 mm nas doses estimadas de 1,3 mM para GSNO livre e 2,9 mM para

NP CS/TPP-GSNO, respectivamente. Para MSP a maior resposta de 3,48 mg ocorreu na dose estimada de 5,0 mM para GSNO livre e para NP CS/TPP-GSNO foi de 3,13 mg para dose estimada de 2,5 mM. No tratamento controle, os valores de CP e MSP foram, respectivamente, de 5,37 mm e 1,70 mg.

Os parâmetros avaliados indicam que o GSNO estimulou a germinação e o crescimento das plântulas e, as NPs contendo GSNO proporcionaram redução da dose para atingir o ponto de maior resposta, mesmo que, em algumas variáveis, esta resposta foi significativamente menor quando comparado ao doador livre.

Envelhecimento acelerado (E.A)

O teste de E.A das sementes mostrou de maneira significativa a redução do vigor das mesmas. Para GER, o E.A reduziu a germinação para 26% (controle), e as NPs sem o doador (NP CS-TPP) não diferiram entre si (37%). Por outro lado, a presença do GSNO possibilitou maior germinação, mostrando o efeito protetor deste regulador sob condições de estresse.

O tratamento com NP CS-TPP/GSNO 2,5 mM apresentou maior resposta com 61%, por outro lado, o tratamento com GSNO livre 2,5 mM teve 53% de germinação e não diferiu de NP CS-TPP/GSNO 5,0 mM (55%). Em relação à PCG, a maior resposta foi de 18% no tratamento NP CS-TPP/GSNO 2,5 mM, que não diferiu do mesmo tratamento de dose 5,0 mM (14%). Os demais tratamentos não diferiram entre si para PCG, variando de 8 a 12% (Tabela 6.4.2).

Tabela 6.4.2 - Germinação (GERM) (%), primeira contagem de germinação (PCG) (%), índice de velocidade (IVG) e tempo médio de germinação (TMG) (dias), comprimento (CP) e massa seca de plântulas (MSP) (mg) após o teste de envelhecimento acelerado durante 48 horas a 41°C.

	GERM	PCG	IVG	TMG	CP	MSP
CONTROLE	26 e*	8 c	6,15 e	4,05 a	4,44 e	1,78 c
GSNO 2,5 mM	53 b	11 bc	7,52 c	3,49 b	7,22 b	3,58 ab
GSNO 5,0 mM	46 c	10 bc	7,22 c	3,67 b	6,79 c	3,00 b
NP CS-TPP/GSNO 2,5 mM	61 a	18 a	11,51 a	2,88 c	8,06 a	4,05 a
NP CS-TPP/GSNO 5,0 mM	55 b	14 ab	9,83 b	3,08 c	7,81 a	3,53 ab
NP CS-TPP 2,5 mM	37 d	12 bc	6,53 d	3,63 b	5,69 d	2,35 c
NP CS-TPP 5,0 mM	37 d	9 c	6,21 de	3,92 a	5,58 d	2,13 c

Coeficiente de Variação (%)	4,65	15,81	2,04	2,91	2,69	8,76
GSNO (S-nitrosoglutationa), NP (nanopartícula), CS (quitosana), TPP (tripolifosfato de sódio).						

*Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os mesmos efeitos positivos do GSNO apareceram nas demais variáveis. O tratamento controle apresentou IVG de 6,15 e TMG de 4,05 dias. Os maiores valores de IVG foram observados no tratamento NP CS-TPP/GSNO 2,5 mM (11,51), seguido de NP CS-TPP/GSNO 5,0 mM (9,83). Os tratamentos com NPs sem o GSNO (6,21 a 6,53) não diferiram entre si e o mesmo foi observado para as duas doses de GSNO livre (7,22 a 7,52). Os tratamentos com menor TMG foram NP CS-TPP/GSNO 2,5 e 5,0 mM, com 2,88 e 3,08 dias, respectivamente, sendo superior aos tratamentos com GSNO livre, que não diferiram entre si, variando de 3,49 a 3,67.

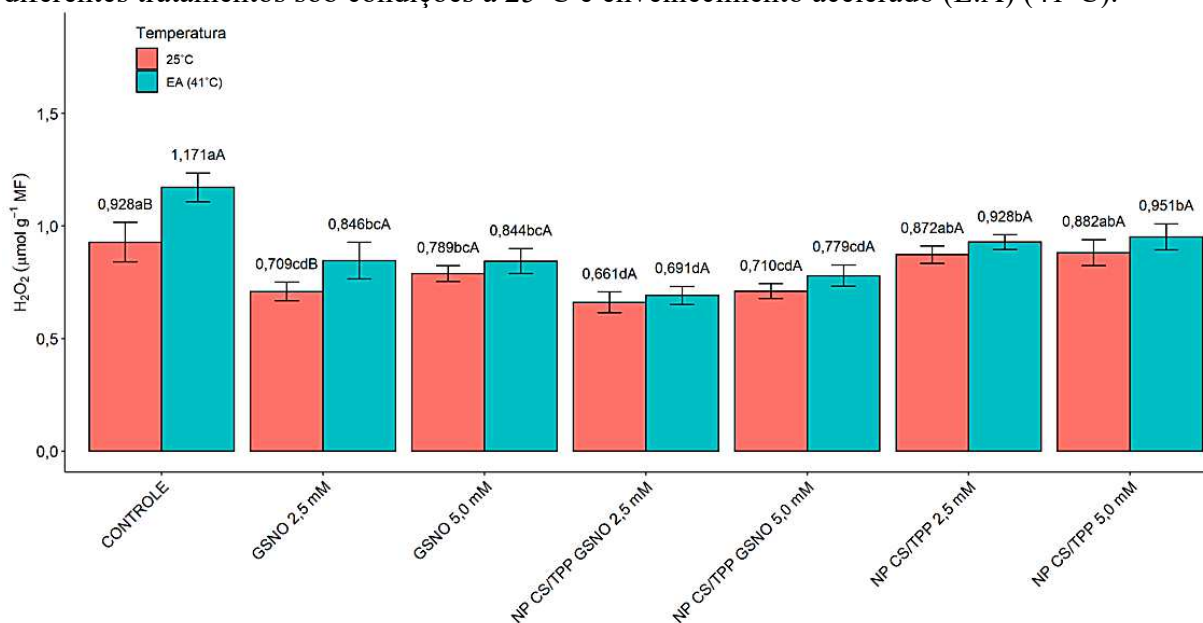
As maiores médias de CP foram obtidas nos tratamentos NP CS-TPP/GSNO 2,5 e 5,0 mM, com 8,06 e 7,81 mm, respectivamente. Para MSP, as maiores respostas aconteceram para NP CS-TPP/GSNO 2,5 e 5,0 mM e GSNO 2,5 mM, com 4,05, 3,53 e 3,58 mg, respectivamente. O controle apresentou CP médio de 4,44 mm e MSP de 1,78 mg e não houve diferença entre os tratamentos somente com NPs (CS/TPP) tanto para CP (5,58 a 5,69 mm) quanto para MSP (2,13 a 2,35 mg).

Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malondialdeído (MDA)

Houve efeito isolado entre os diferentes tratamentos, como das condições de temperatura, assim como a interação dos fatores (tratamentos x temperaturas) para H₂O₂ e MDA.

Para o H₂O₂, o tratamento controle e o GSNO livre 2,5 mM apresentaram diferença nos teores entre as condições de germinação e, em ambos os casos, os maiores valores são encontrados na condição de E.A (Figura 6.4.2).

Figura 6.4.2 - Teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em folhas de *Dyckia walteriana*, sob diferentes tratamentos sob condições a 25°C e envelhecimento acelerado (E.A) (41°C).



GSNO (S-nitrosoglutationa), NP (nanopartícula), CS (quitosana), TPP (tripolifosfato de sódio).
 p_{F1} (Tratamento) <0,001; p_{F2} (Temperatura) <0,001; $p_{F1 \times F2}$ = 0,005; CV = 6,40%.

*Letras minúsculas iguais entre os tratamentos de uma mesma condição e maiúscula entre condições de um mesmo tratamento não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

No entanto, foi possível observar diferenças entre os tratamentos nas diferentes condições de germinação. Nas sementes germinadas a 25°C, o teor de H_2O_2 foi maior no tratamento controle (0,928 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF), não diferindo dos tratamentos com as NPs sem GSNO que variaram entre 0,872 e 0,882 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF.

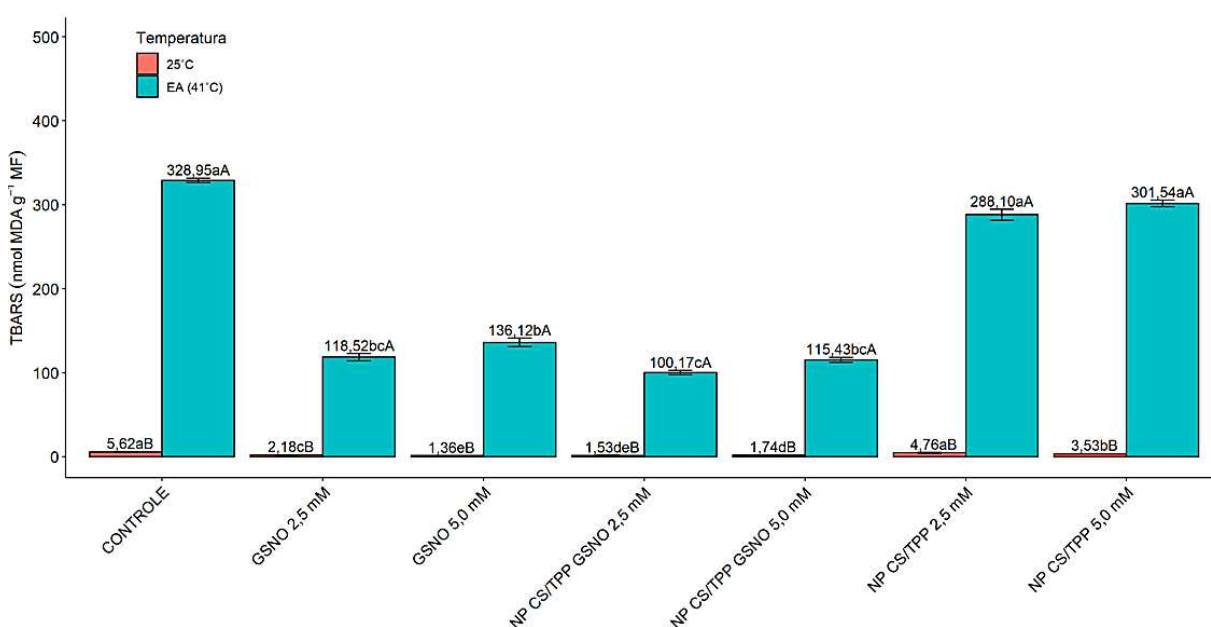
Os tratamentos com GSNO reduziram os teores de H_2O_2 quando comparado ao controle onde os menores valores foram encontrados nos tratamentos com a GSNO nanoencapsulada, variando de 0,661 e 0,710 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF. Por outro lado, o tratamento com GSNO livre, apesar de apresentar teores menores de H_2O_2 em relação ao controle, teve valores maiores estatisticamente quando comparado ao GSNO nanoencapsulada, variando de 0,691 a 0,779 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF.

Na condição de E.A, também foi observado maior teor de H_2O_2 no controle (1,171 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF). Sob o estresse provocado pelo E.A, os tratamentos com GSNO conseguiram reduzir os valores de H_2O_2 em relação ao controle onde o menor valor encontrado aconteceu para NP CS/TPP GSNO 2,5 mM (0,691 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF) que não diferiu do mesmo tratamento na dose de 5,0 mM (0,779 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF).

Foi observado que os valores de H_2O_2 nos tratamentos com GSNO livre variaram de 0,844 a 0,846 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF e não diferiram das NPs sem o regulador, que variaram entre 0,928 e 0,951 $\mu\text{mol g}^{-1}$ MF, e que em ambos os casos os teores de H_2O_2 foram maiores do que os tratamentos com a GSNO nanoencapsulada.

Para MDA, ao contrário do que ocorreu para H_2O_2 , houve diferença nos teores entre as duas condições de germinação (25°C e E.A-41°C) em todos os tratamentos, sempre com maiores valores em E.A e, observadas diferenças entre os tratamentos em cada condição de germinação (Tabela 6.4.3).

Figura 6.4.3 - Teores de malondialdeído (MDA) em plântulas de *Dyckia walteriana*, sob diferentes tratamentos sob condições a 25°C e envelhecimento acelerado (E.A) (41°C).



GSNO (S-nitrosoglutationa), NP (nanopartícula), CS (quitosana), TPP (tripolifosfato de sódio).
 $p_{F1(\text{Tratamento})} < 0,001$; $p_{F2(\text{Temperatura})} < 0,001$; $p_{F1 \times F2} < 0,001$; CV = 2,57%

*Letras minúsculas iguais entre os tratamentos de uma mesma condição e maiúscula entre condições de um mesmo tratamento não diferem entre si pelo teste de Tukey 5% de probabilidade de erro.

Na condição de 25°C, o tratamento controle teve maior teor de MDA com 5,62 nmol g^{-1} MF, não diferindo apenas do tratamento NP CS/TPP 2,5 mM (4,76 nmol g^{-1} MF). Assim como para a variável H_2O_2 , a presença de GSNO reduziu os teores de MDA quando comparado ao tratamento controle, onde o menor teor de MDA foi no tratamento GSNO 5,0 mM (1,36 nmol g^{-1} MF) que não diferiu apenas de NP CS/TPP GSNO 2,5 mM (1,53 nmol g^{-1} MF).

No E.A, a condição de estresse proporcionou os maiores valores de MDA no tratamento controle (328,95 nmol g⁻¹ MF). Também foi observado o efeito protetor quando aplicado o GSNO, o que é evidenciado nos tratamentos NP CS/TPP GSNO 2,5 mM e 5,0 mM, com 100,17 e 115,43 nmol g⁻¹ MF, respectivamente, além de GSNO 2,5 mM (118,52 nmol g⁻¹ MF) sendo os tratamentos de menores teores de MDA. Já os tratamentos com as NPs sem o regulador apresentaram teores entre 288,10 e 301,54 nmol g⁻¹ MF, valores estes estatisticamente menores quando comparado ao controle, mas maiores quando comparados aos tratamentos com GSNO.

Pigmentos fotossintéticos

Para os pigmentos fotossintéticos mostraram comportamento variado nas diversas variáveis. Foram observadas diferenças dentro dos tratamentos e nos diferentes ambientes (normal x E.A), exceto para os teores de clorofila *b* e a razão clorofila *a/b* que, independente da condição de germinação, não diferiram entre si, possuindo diferença somente entre os tratamentos (Tabela 6.4.3).

Tabela 6.4.3 - Teores dos pigmentos clorofila *a* e *b*, clorofila total, carotenoides, razão clorofila *a/b* e clorofila total/carotenoides em plântulas de *Dyckia walteriana* submetidas a diferentes condições de germinação normal (25°C) e envelhecimento acelerado (E.A) (41°C).

	Clor <i>a</i> (µg/mL)		Clor <i>b</i> (µg/mL)		Clor total (<i>a+b</i>) (µg/mL)	
	Normal	E.A	Normal	E.A	Normal	E.A
Controle	0,23 dA*	0,19 eA	0,16 d		0,41 dA	0,33 eB
GSNO 2,5 mM	0,62 bA	0,43 cB	0,26 bc		0,94 bA	0,63 cB
GSNO 5,0 mM	0,66 abA	0,50 bB	0,29 ab		0,99 abA	0,76 bB
NP CS/TPP GSNO 2,5 mM	0,71 aA	0,62 aB	0,34 a		1,08 aA	0,93 aB
NP CS/TPP GSNO 5,0 mM	0,68 abA	0,55 abB	0,30 ab		1,02 abA	0,81 bB
NP CS/TPP 2,5 mM	0,33 cA	0,29 dA	0,20 d		0,55 cA	0,47 dB
NP CS/TPP 5,0 mM	0,37 cA	0,32 dB	0,21 cd		0,61 cA	0,50 dB
	-	-	0,288 a	0,219 b	-	-
CV (%)	6,25		12,08		6,10	
Fator 1 (F1) 25°C	p<0,001		p<0,001		p<0,001	
Fator 2 (F2) EA	p<0,001		p<0,001		p<0,001	
F1 x F2	p<0,001		0,212		p<0,001	
	Carotenoides (µg/mL)		Clor <i>a</i> / Clor <i>b</i>		Clor total /Carotenoides	
	25°C	E.A	25°C	E.A	25°C	E.A
Controle	0,24 cB	0,33 cA	1,36 c		1,81 cA	0,99 aB
GSNO 2,5 mM	0,34 bcB	0,42 bcA	2,02 a		2,80 abA	1,52 aB
GSNO 5,0 mM	0,48 aA	0,47 abA	1,99 ab		2,11 bcA	1,63 aB
NP CS/TPP GSNO 2,5 mM	0,40 abB	0,56 aA	1,96 ab		2,70 abA	1,68 aB

NP CS/TPP GSNO 5,0 mM	0,33 bcB	0,53 aA	2,04 a	3,19 aA	1,52 aB
NP CS/TPP 2,5 mM	0,25 cB	0,32 cA	1,54 bc	2,18 bcA	1,49 aB
NP CS/TPP 5,0 mM	0,26 cB	0,37 bcA	1,70 abc	2,32 bcA	1,37 aB
	-	-	-	-	-
CV (%)	10,16		14,16		13,93
Fator 1 (F1) 25°C	p<0,001		p<0,001		p<0,001
Fator 2 (F2) E.A	p<0,001		p<0,005		p<0,001
F1 x F2	0,002		0,979		0,019

GSNO (S-nitrosoglutationa), NP (nanopartícula), CS (quitosana), TPP (tripolifosfato de sódio), CV(coeficiente de variação).

* Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha e maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Nos teores de clorofila *a*, os valores foram maiores em 25°C para a maioria dos tratamentos, exceto para NP CS/TPP 2,5 mM (0,29 a 0,33 µg/mL) e o tratamento controle (0,19 a 0,23 µg/mL) que não diferiram entre as condições. Foi observado tanto para 25°C quanto para o E.A um aumento dos teores de clorofila *a* nos tratamentos com GSNO seja na forma livre quanto nanoencapsulada.

Em 25°C, o tratamento com NP CS/TPP-GSNO 2,5 mM teve maior teor (0,71 µg/mL), não diferindo de GSNO livre 2,5 mM (0,66 µg/mL) e NP CS/TPP-GSNO 5,0 mM (0,68 µg/mL). Na condição de E.A, o maior teor de clorofila *a* foi no tratamento NP CS/TPP-GSNO 2,5 mM (0,62 µg/mL), não diferindo apenas de NP CS/TPP-GSNO 5,0 mM (0,68 µg/mL) e com valores maiores em relação ao GSNO livre, que apresentaram teores entre 0,43 e 0,50 µg/mL.

Para clorofila *b*, não houve diferença entre os tratamentos nas diferentes condições de germinação, no entanto, foi possível observar maiores teores em 25°C (0,288 µg/mL) do que em E.A (0,219 µg/mL) e uma maior quantidade de clorofila *b* nos tratamentos com GSNO quando comparado ao tratamento controle (0,16 µg/mL). Os maiores valores médios ocorreram nos tratamentos com NP CS/TPP-GSNO 2,5 (0,34 µg/mL), no entanto, não diferiram de NP CS/TPP-GSNO 5,0 (0,30 µg/mL) e GSNO livre 5,0 (0,29 µg/mL). Não houve diferença nos tratamentos com as NPs sem o regulador (0,20-0,21 µg/mL) em relação ao controle.

Para clorofila total, os teores médios atingiram os maiores valores no ambiente de 25°C em relação ao E.A para todos os tratamentos. Tanto a 25°C quanto em E.A, foram observados os menores teores de clorofila total no tratamento controle com 0,41 e 0,33 µg/mL, respectivamente. Também foram observados maiores valores nos tratamentos com GSNO onde, para 25°C, o tratamento NP CS/TPP-GSNO 2,5 mM teve a maior média (1,08), no entanto, não diferiu do mesmo tratamento na dose 5,0 mM (1,02 µg/mL) e GSNO livre 5,0 mM (0,99 µg/mL). Para E.A, a melhor resposta ocorreu no tratamento NP CS/TPP-GSNO 2,5 mM com 0,93 µg/mL, com resultado superior ao tratamento com GSNO livre (0,63 a 0,76 µg/mL).

Para os teores médios de carotenoides, o E.A proporcionou as maiores médias em relação a 25°C para todos os tratamentos, exceto GSNO livre 5,0 mM, que não diferiu entre os ambientes (0,47-0,48 µg/mL). Na condição de 25°C, o tratamento controle apresentou o menor teor de carotenoides (0,24 µg/mL), não diferindo das NPs sem o GSNO (0,25-0,26

$\mu\text{g/mL}$). Os maiores valores foram observados para GSNO livre 5,0 mM (0,48 $\mu\text{g/mL}$) e NP CS/TPP-GSNO 2,5 mM (0,40 $\mu\text{g/mL}$).

Os resultados indicaram que sob estresse o NO atua como protetor, aumentando assim os níveis de carotenoides, assim, foram observados os maiores teores nos tratamentos com GSNO. Para o E.A, houve o mesmo comportamento, com menor teor no controle (0,33 $\mu\text{g/mL}$) e aumento dos teores de carotenoides com GSNO. Os maiores teores foram obtidos para NP CS/TPP-GSNO 2,5 mM (0,56 $\mu\text{g/mL}$) e 5,0 mM (0,53 $\mu\text{g/mL}$) e GSNO livre 5,0 mM (0,47 $\mu\text{g/mL}$), que não diferiram entre si. Também não houve diferença das NPs sem o GSNO (0,32-0,37 $\mu\text{g/mL}$) em relação ao controle.

Para razão clorofila *a/b*, não foi observada diferença nas condições de germinação. Os tratamentos não diferiram entre si, exceto para o controle, que apresentou a menor razão (1,36), que não diferiu apenas de NP CS/TPP 2,5 mM (1,54) e os demais tratamentos variaram entre 1,70 e 2,04.

Para a razão clorofila total/carotenoides, em todos os tratamentos, a condição de 25°C apresentou maiores valores quando comparado ao E.A. Para 25°C, no controle, foi observada a menor razão (1,81) e os maiores valores encontrados nos tratamentos com NP CS/TPP-GSNO 5,0 mM (3,19), não diferindo de NP CS/TPP-GSNO 2,5 mM (2,70) e GSNO livre 2,5 mM (2,80). Para E.A não houve diferença entre nenhum tratamento, variando de 0,99 e 1,68.

6.5 DISCUSSÃO

Parâmetros germinativos em condições normais e após E.A

Os resultados demonstraram dois efeitos importantes do NO e que são relatados na literatura; primeiro, o estímulo na germinação e crescimento das plântulas sob condições normais; e segundo, o efeito protetor do NO na germinação sob condição de estresse que, no presente trabalho, foi simulado pelo E.A.

Primeiramente, abordando o efeito na germinação e crescimento, salienta-se a importância do NO como uma molécula sinalizadora envolvida em diversos processos fisiológicos e grande parte das mudanças morfológicas e fisiológicas causadas pelo NO ocorrem devido a diversas cascatas de sinalização celular que alteram a expressão de genes e regulam a biossíntese de diferentes hormônios vegetais. O NO, por exemplo, interage com diversos destes hormônios como o ácido abscísico (ABA), auxina (AUX), giberelina (GA), entre outros (SINGHAL *et al.*, 2021; ZHAO *et al.*, 2021).

As interações entre os hormônios vegetais são conhecidas como “crosstalk”, ou seja, casos em que um ou mais componentes de uma via de transdução de sinal afetam outra. O papel do “crosstalk” NO-ABA foi relatado em diferentes processos fisiológicos, por exemplo, durante a germinação, onde o NO atua como indutor transcricional na manutenção da dormência das sementes, no entanto, em determinada concentração, consegue quebrar esta sinalização e estimular a germinação (ZHAO *et al.*, 2021).

Esta associação entre os hormônios pode explicar as respostas positivas de estímulo de germinação e aos parâmetros de crescimento e massa seca das plântulas de *D. walteriana*. Em estudo com sementes de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), Liu *et al.* (2010) observaram que um rápido acúmulo de NO induziu uma diminuição igualmente rápida do ABA e promoveu a biossíntese de GA₃, estimulando a germinação. O pré-tratamento de embriões de maçã (*Malus domestica* Borkh.) com 5 mM do doador de NO - nitroprussiato de sódio (SNP) promoveu germinação em quase 60% após 8 dias, enquanto sementes não tratadas tiveram germinação de apenas 16% (GNIĄZDOWSKA *et al.*, 2010).

Por outro lado, nas condições de E.A, houve significativa redução da germinação nas sementes de *D. walteriana*, principalmente as que não passaram por tratamento (controle). Isso pode ser explicado pelo fato do E.A levar a um aumento da permeabilidade da membrana, fragmentação do DNA e uma menor capacidade de eliminação de danos pelo sistema antioxidante, ocasionando à perda da viabilidade das sementes e por consequência, a redução da taxa de germinação e o aumento da quantidade de plântulas com anomalias morfológicas (CORBINEAU, 2012; DEBSKA *et al.*, 2013).

Qualquer mudança nos fatores ambientais, como no teste de E.A, influencia no desenvolvimento das espécies, podendo levar a modificações fisiológicas de um estresse primário. Conforme este estresse se agrava, ocorre um desequilíbrio celular e, entre os danos causados, ocorre a formação das espécies reativas de oxigênio (EROs), que em excesso, resultam em estresse oxidativo. Vale salientar que níveis controlados de EROs são benéficas ao metabolismo vegetal, atuando em rotas bioquímicas e fisiológicas (SACHDEV *et al.*, 2021).

Sob condições a 25°C, o GSNO na forma nanencapsulada não apresentou vantagens em relação à forma livre, o que pode ter ocorrido devido às condições controladas e sem qualquer tipo de estresse das sementes. No entanto, foi observado uma redução na dose ótima, mesmo que não trazendo respostas maiores quanto ao GSNO livre. Vale salientar que o potencial das NPs liberadoras de NO depende da natureza química do doador de NO, do nanotransportador, da espécie vegetal e da natureza e intensidade do estresse abiótico (SILVEIRA *et al.*, 2019).

Por outro lado, em condições de E.A, foi observado maior efeito protetor do doador GSNO nanoencapsulado do que sua forma livre. Isso porque os doadores de NO, apesar de proporcionarem eficácia na proteção do composto, são relativamente instáveis, o que pode causar uma rápida liberação de NO, reduzindo seus efeitos benéficos de sinalização. Assim, a nanoencapsulação destes doadores é uma estratégia para proteger essas moléculas da decomposição, permitindo a liberação controlada de NO e prolongando seu período de ação (SEABRA *et al.*, 2022ab).

Um estudo sobre aplicação de NPs em plantas demonstrou que o doador de NO ácido S-nitroso-mercaptossuccínico (S-nitroso-MSA) foi mais eficiente na redução de danos induzidos por sais à atividade fotoquímica de plantas de milho em comparação com o mesmo doador de NO em sua forma livre (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Ficou claro o efeito do NO como molécula sinalizadora das plantas a estresses quando as sementes de *D.walteriana* foram submetidas ao envelhecimento acelerado, ou seja, a um estresse por temperatura, mostrando um efeito protetor contra a perda de vigor da sementes, o que não ocorreu no tratamento controle.

Os efeitos benéficos da aplicação de NO na manutenção da viabilidade em sementes de olmo (*Ulmus pumila* L.) e aveia (*Avena sativa* L.) envelhecidas artificialmente foram confirmados por He *et al.* (2018) e Mao *et al.* (2018), onde com a suplementação de SNP, como doador de NO, as sementes mantiveram o alto vigor, melhorando a taxa de germinação.

Estudos têm demonstrado que o NO aumenta a tolerância das plantas a estresses abióticos, incluindo seca, salinidade, metais pesados e temperaturas extremas (NABI *et al.*, 2019), estando envolvido em vias de sinalização que regulam mecanismos antioxidantes, protegendo as plantas contra o estresse oxidativo (SIMONTACCHI *et al.*, 2015). O GSNO pode desencadear a atividade das enzimas antioxidantes como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e ascorbato peroxidase (APX), desintoxicando o aumento da síntese de EROs (GROB; DURNER; GAUPELS, 2013; TERRÓN-CAMERO *et al.*, 2019).

Houve também efeito somente das NPs (NP CS/TPP) na germinação de *D.walteriana* e, segundo informações na literatura, a quitosana presente nas NPs, tem demonstrado ser uma molécula que induz inúmeras respostas biológicas nas plantas, dependendo de sua estrutura, concentração, espécie e estágio de desenvolvimento da planta. Estudos demonstraram efeito da quitosana no crescimento e desenvolvimento de morango (*Fragaria x ananassa* Duch.) (SAAVEDRA *et al.*, 2016) e a orquídea *Dendrobium formosum* Roxb. ex Lindl. (KANANONT *et al.*, 2010).

Malondialdeído (MDA), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e pigmentos fotossintéticos

As análises enzimáticas de H₂O₂ e MDA comprovam o diferente comportamento das sementes sob as distintas condições de germinação onde o E.A, por possuir maior temperatura, proporcionou condição mais estressante às sementes, levando ao aumento dos teores de H₂O₂ e de MDA.

Este estresse oxidativo é caracterizado pelas adições sucessivas de elétrons ao O₂ formando radicais como o ânion superóxido (O₂^{•-}) e hidroxila (•OH), que possuem alta reatividade química e, além desses, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), em alta concentração também está envolvido em danos celulares. Estas EROs têm a capacidade de reagir com ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e açúcares, levando a severos danos celulares e até a morte das mesmas. O ataque das EROs nas membranas celulares, por exemplo, resulta no aumento do nível de malondialdeído (MDA), considerado um marcador da perda de vigor das sementes (DEMIDCHIK, 2015; CIACKA *et al.*, 2022).

Como já citado, o aumento de EROs como o H₂O₂ pode levar a vários danos celulares, o que explica a redução da germinação no tratamento de E.A. Além disso, o H₂O₂ tem uma ação deletéria, porque participa da reação formadora de •OH, o oxidante mais reativo na família das EROs. O H₂O₂ possui tamanho pequeno o que possibilita atravessar membranas celulares e migrar em compartimentos diferentes, assim, difunde os danos e também atua como um mensageiro da condição de estresse (BARBOSA *et al.*, 2014).

No entanto, ressalta-se que em níveis baixos o H₂O₂ pode melhorar a tolerância de plantas sob condições estressantes. Em diversos estudos, foi constatado um efeito protetor do H₂O₂ na indução de tolerância ao estresse oxidativo causado pela salinidade, temperatura, estresse osmótico, bem como toxicidade (WANG *et al.*, 2014; HOSSAIN *et al.*, 2015). Além disso, até determinada concentração, o H₂O₂ mostra-se eficaz em melhorar a atividade de enzimas do mecanismo antioxidante das sementes, ou seja, na defesa das mesmas (HABIB; ASHRAF; SHAHBAZ, 2013; HABIB *et al.*, 2020).

O H₂O₂ atua em conjunto com o NO como importante mecanismo de sinalização de estresse, mediando às respostas das plantas a diferentes restrições ambientais, incluindo estresse hídrico, extremos de temperatura, bem como estresses bióticos (HABIB *et al.*, 2020). Juntos, eles regulam a via de sinalização para a ativação de enzimas antioxidantes em resposta a diferentes estresses abióticos (ZENG *et al.*, 2011). Além disso, estudos descobriram que o próprio H₂O₂ promove a produção de NO ao aumentar as atividades da nitrato redutase (GROB; DURNER; GAUPELS, 2013).

A superacumulação de H_2O_2 foi observada em eixos de sementes envelhecidas de girassol (*Helianthus annuus* L.) (KIBINZA *et al.*, 2011) e em sementes de aveia (*Avena sativa* L.) submetidas ao envelhecimento artificial por 16 e 32 dias (CHENG *et al.*, 2020). Também em sementes de aveia, o baixo vigor de sementes envelhecidas artificialmente foi associado ao acúmulo de H_2O_2 nas mitocôndrias (MAO *et al.*, 2018).

Apartir do acúmulo de EROs, ocorrem modificações químicas e fisiológicas que alteram diversas biomoléculas, sendo os lipídios os mais danificados, gerando a peroxidação lipídica (DEMIDCHIK, 2015; SACHDEV *et al.*, 2021). A peroxidação lipídica é um processo complexo de oxidação de ácidos graxos insaturados presentes nas membranas biológicas que leva à formação e propagação de radicais livres, rearranjo das ligações duplas e a potencial destruição dos lipídios de membrana (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014; GASCHLER; STOCKWELL, 2016).

Radicais livres, como o $\cdot OH$, reagem com o lipídio insaturado subtraindo um elétron, originando o radical lipídico que, ao reagir com oxigênio (O_2), forma o radical peroxilipídico iniciando um ciclo de propagação das lesões oxidativas em lipídios. Sendo os lipídios os principais componentes estruturais das membranas celulares, responsáveis por conferir propriedades essenciais como a permeabilidade seletiva, a peroxidação contínua dos lipídios altera a composição, estrutura e dinâmica das membranas citoplasmáticas, tornando-a mais permeável a diversos íons, podendo levar à morte celular (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014; GASCHLER; STOCKWELL, 2016).

A peroxidação lipídica origina diversos produtos secundários que agravam o dano oxidativo, dentre eles o malonaldeído (MDA) que é o principal e mais estudado produto da peroxidação lipídica (SACHDEV *et al.*, 2021). O MDA é conhecido como um marcador molecular para designar peroxidação lipídica da membrana celular em plantas sob diferentes estresses abióticos e dependendo da concentração expressa, o grau desta peroxidação e consequente dano celular (COOKE; LEISHMAN, 2016). Assim, acredita-se que a condição de E.A proporcionou uma condição estressante nas sementes elevando os danos nos lipídios, aumentando significativamente os teores de MDA.

Houve o efeito protetor e sinalizador do GSNO principalmente em condição de E.A, impedindo o aumento significativo de MDA e H_2O_2 comparado as sementes não tratadas, efeito protetor este já mencionado. O doador de NO nitroprussiato de sódio (SNP), aplicado exogenamente em (*Isatis cappadocica* desv. Dispara) aumentou a atividade de enzimas antioxidantes e reduziu a síntese de H_2O_2 e MDA em plantas estressadas por arsênio (SOURI *et al.*, 2020).

Também foi observada redução de H₂O₂ e peroxidação lipídica (MDA) nos tratamentos somente com as NPs. Acredita-se que isto se deva a presença de quitosana nas formulações que pode levar à indução de enzimas de defesa da planta e à síntese de metabólitos secundários, como polifenóis, lignina, flavonóides e fitoalexinas (ZAYED *et al.*, 2017). Além disso, Guan *et al.* (2009) observaram que a preparação de sementes de milho com quitosana sob estresse por baixa temperatura promoveu redução do teor de malondialdeído (MDA) e proporcionou aumento das concentrações de açúcares solúveis e da atividade de antioxidantes como a peroxidase e catalase.

Sob condições normais, os maiores teores de clorofila *a* e total foram observados nos tratamentos com a utilização da GSNO. No ambiente de E.A, o GSNO proporcionou o mesmo efeito de manutenção dos pigmentos fotossintéticos, no entanto, sem a presença do regulador os níveis dos pigmentos tiveram redução, indicando efeito protetor do GSNO sob estas condições. Este efeito de manutenção dos teores de clorofila pode estar relacionado pelo fato do NO atuar na manutenção da estabilidade das membranas dos tilacóides (LIU; GUO, 2013).

O NO estabilizou pigmentos fotossintéticos em cotilédones de soja (*Glycine max* L.), sugerindo seu papel no retardo do envelhecimento (JASID *et al.*, 2009) e para Ahmad *et al.* (2018), a aplicação de NO protegeu a membrana do cloroplasto e as clorofilas em condições de estresse salino em grão de bico (*Cicer arietinum* L.).

A redução dos teores de clorofilas em ambientes de estresse, como em E.A, foi desencadeado pela degradação da clorofila, através da atividade da clorofilase, regulando negativamente a biossíntese da mesma (SOLIMAN *et al.*, 2018). Em um experimento com tomate foi observada redução significativa no conteúdo de pigmentos fotossintetizantes após exposição à 40°C por 9 horas, em comparação com as plantas mantidas em 25/22°C (dia/noite) (AHAMMED *et al.*, 2018).

Além disso, a condição de estresse favorece a síntese de EROs, que induzem a oxidação dos pigmentos fotossintéticos, o que pode ser enquadrado como indício de estresse oxidativo, sendo, provavelmente, resultado de foto-oxidação dos pigmentos (CARLIN *et al.*, 2012). Estudos conduzidos com sorgo (*Sorghum bicolor* L.) Moench em condição de estresse abiótico mostraram que, quanto maior a concentração de EROs nas células dessa planta, menor o conteúdo de clorofila (NXELE; KLEIN; NDIMBA, 2017).

No entanto, houve comportamento diferenciado quando se trata do teor de carotenoides. Os carotenoides são pigmentos que atuam como antioxidantes, absorvendo os radicais livres e interrompendo as reações oxidativas de lipídios e outras moléculas (FILHO *et*

al., 2018). Como agem como protetor, a aplicação exógena de GSNO aumentou a síntese de carotenoides, efeito relatado na literatura (SOURI *et al.*, 2020). Assim, os teores foram mais significativos em E.A, do que em condições normais (25°C). Esse aumento de carotenoides também fica claro com a redução da razão de clorofila total/carotenoides.

Segundo Moura *et al.* (2016) o aumento do conteúdo de carotenoides é uma tentativa de minimizar danos ao aparato fotossintético, demonstrando ser uma estratégia de dissipação do excesso de energia. Quando os carotenoides estão ausentes ou em pequena quantidade nas plantas, o excesso de energia não é adequadamente dissipada, o que causa a formação de EROs e leva danos aos lipídios, proteínas e pigmentos, podendo provocar a morte das plantas (DARWISH *et al.*, 2015).

6.6 CONCLUSÕES

A GSNO estimulou o processo de germinação de *D.walteriana*. Sob ambiente de estresse, protegeu as sementes de danos celulares. Na forma nanoencapsulada, a GSNO apresentou melhor resposta.

Doses entre 3,7 e 5,7 mM de GSNO livre e 2,3 a 2,9 mM do GSNO nanoencapsulado são recomendadas em condição de 25°C e, sob condições de E.A, são indicadas as doses de 2,5 e 5,0 mM do GSNO nanoencapsulado.

6.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHAMMED, G. J.; XU, M.; LIU, A.; CHEN S. COMT1 Silencing Aggravates Heat Stress-Induced Reduction in Photosynthesis by Decreasing Chlorophyll Content, Photosystem II Activity, and Electron Transport Efficiency in Tomato. **Frontiers in Plant Science**, v.9, n.998, p.1-10, 2018. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00998>

AHMAD, P.; ABDEL LATEF, A. A.; HASHEM, A.; ABDALLAH, E. F.; GUCEL, S.; TRAN, L.-S. P. Nitric oxide mitigates salt stress by regulating levels of osmolytes and antioxidant enzymes in chickpea. **Frontiers in Plant Science**, v.7, n.347, p.1-11, 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00347>

ANACLETO. A.; NEGRELLE. R.R.B. Viabilidade econômica do cultivo de bromélias. **Revista Capital Científico**. v.13, n.2, p.75-95, 2015. <https://dx.doi.org/10.5935/2177-4153.20150014>

ARNON, D.I. Cooper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. **Plant Physiology**, v.24, n.1, p.1-15, 1949. <https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1>

BARBOSA, M.R.; SILVA, M.M.A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T.R. Plant generation and enzymatic detoxification of reactive oxygen species. **Ciência Rural**, v.44, n.3, p.453-460, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782014000300011>

BARBOSA, R.M.; COSTA, D.S.; SÁ, M.E. Envelhecimento acelerado em sementes de alface. **Ciência Rural**, v. 41, n.11, p.1899-1902, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011005000138>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS. 2009. 399p.

CAMEJO, G.; WALLIN, B.; ENOJARVI, M. Analyses of oxidation and antioxidants using microtiter plates. In: Armstrong, D. (Ed.), Free Radical and Antioxidants Protocols. **Humana Press**, p.377-387, 1998. <https://doi.org/10.1385/0-89603-472-0:377>

CARLIN, S. D.; RHEIN, A. F.L.; SANTOS, D.M.M. Efeito simultâneo da deficiência hídrica e do alumínio tóxico no solo na cultivar IAC91-5155 de cana-de-açúcar. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 553-564, 2012. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n2p553>

CHENG, H.; MA, X.; JIA, S.; LI, M.; MAO, P. Transcriptomic Analysis Reveals the Changes of Energy Production and AsA-GSH Cycle in Oat Embryos during Seed Ageing. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.153, p.40-52, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.03.054>

CIACKA, K.; TYMINSKI, M.; GNIAZDOWSKA, A.; KRASUSKA, U. Nitric Oxide as a Remedy against Oxidative Damages in Apple Seeds Undergoing Accelerated Ageing. **Antioxidants**, v.11, n.1. p.70, 2022. <https://doi.org/10.3390/antiox11010070>

COOKE, J.; LEISHMAN, M. R. Consistent alleviation of abiotic stress with silicone addition: a meta-analysis. **Functional Ecology**, v. 30, n. 8, p. 1340-1357, 2016. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12713>

CORBINEAU, F. Markers of Seed Quality: From Present to Future. **Seed Science Research**, v.22, p.S61-S28, 2012. <https://doi.org/10.1017/S0960258511000419>

DARWISH, M.; VIDAL, V.; LOPEZ-LAURI, F.; ALNASER, O.; JUNGLEE, S.; MAATAOUI, M.E.; SALLANON, H. Tolerance to clomazone herbicide is linked to the state of LHC, PQ-pool and ROS detoxification in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) **Journal of Plant Physiology**, v. 175, n. 1, p.122-130, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2014.11.009>

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Environmental Toxicology**, v.2, n.53, p.1-13, 2014. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>

DEBSKA, K.; KRASUSKA, U.; BUDNICKA, K.; BOGATEK, R.; GNIAZDOWSKA, A. Dormancy Removal of Apple Seeds by Cold Stratification Is Associated with Fluctuation in H₂O₂, NO Production and Protein Carbonylation Level. **Journal of Plant Physiology**, v.170, p.480-488, 2013. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2012.11.018>

DEMIDCHIK, V. Mechanisms of Oxidative Stress in Plants: From Classical Chemistry to Cell Biology. **Environmental and Experimental Botany**, v.109, p.212-228, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2014.06.021>

DO CARMO, G.C.; IASTRENSKI, L.F.; DEBIASI, T.V.; DA SILVA, R.C.; PELEGRINO, M.T.; BIANCHINI, E.; STOLF-MOREIRA, R.; PIMENTA, J.A.; SEABRA, A.B.; 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, 112713, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112713>

FILHO, A.C.P.M.; FILHO, J.G.O.; CHRISTOFOLI, M.; CASTRO, C.F.S. Atividade Antioxidante, Conteúdo de Fenólicos Totais, Carotenoides e Provitamina A em Extratos Vegetais do Cerrado Goiano. **Uniciências**, v. 22, n. 1, p. 28-32, 2018. <http://doi.org/10.17921/1415-5141.2018v22n1p28-32>

GASCHLER, M. M., STOCKWELL, B. R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.482, n.3, p.419-425, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>

GNIAZDOWSKA, A.; KRASUSKA, U.; DEBSKA, K.; ANDRYKA, P.; BOGATEK, R. The beneficial effect of small toxic molecules on dormancy alleviation and germination of apple embryos is due to NO formation. **Planta**, v.232, n.4, p. 999-1005, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1214-x>

GOUDA, E.J.; BUTCHER, D.; GOUDA, K. **Encyclopaedia of Bromeliads Version 4**. Disponível em: <http://bromeliad.nl/encyclopedia/>. Acesso em: 07.fev.2022.

GROB, J.; DURNER, F.; GAUPELS, F. Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. **Frontiers in Plant Science**, v.4, p.1-15, 2013. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00419>

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**, v.10, n.6, p.427-433, 2009. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0820373>

HABIB, N.; ALI, Q.; ALI, S.; JAVED, M.T.; HAIDER, M, Z.; PERVEEN, R.; SHAHID, M.R.; RIZWAN, M.; ABDEL-DAIM, M.M.; ELKELISH, A.; BIN-JUMAH, N. Use of Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide for Better Yield of Wheat (*Triticum aestivum* L.) under Water Deficit Conditions: Growth, Osmoregulation, and Antioxidative Defense Mechanism. **Plants**, v.9, n.2, p.1-24, 2020. <https://doi.org/10.3390/plants9020285>

HABIB, N.; ASHRAF, M.; SHAHBAZ, M. Effect of exogenously applied nitric oxide on some key physiological attributes of rice (*Oryza sativa* L.) plants under salt stress. **Pakistan Journal of Botany**, v.45, p.1563-1569, 2013.

HE, Y.; XUE, H.; LI, Y.; WANG, X. Nitric Oxide Alleviates Cell Death through Protein S-Nitrosylation and Transcriptional Regulation during the Ageing of Elm Seeds. **Journal of Experimental Botany**, v.69, n.21, p.5141-5155, 2018. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery270>.

HOSSAIN, M.A.; BHATTACHARJEE, S.; ARMIN, S.M.; QIAN, P.; XIN, W.; LI, H.Y.; BURRITT, D.J.; FUJITA, M.; TRAN, L.S. Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: Insights from ROS detoxification and scavenging. **Frontiers in Plant Science**, v.16, n.6, p.1-19, 2015. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00420>

JASID, S.; GALATRO, A.; VILLORDO, J.J.; PUNTARULO, S.; SIMONTACCHI, M. Role of Nitric Oxide in Soybean Cotyledon Senescence. **Plant Science**, v.76, n.5, p.662-668, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.02.007>

KAH, M.; KOOKANA, R.S.; GOGOS, A.; BUCHELI, T.D. A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. **Nature Nanotechnology**, v.13, n.8, p. 677-684, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41565-018-0131-1>

KANANONT, N.; PICHYANGKURA, R.; CHANPRAME, S.; CHADCHAWAN, S.; LIMPANAVECH, P. Chitosan specificity for the in vitro seed germination of two *Dendrobium orchids* (Asparagales: *Orchidaceae*). **Scientia Horticulturae**, v.124, n.2, p.239-247, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.11.019>

KHAN, M.N.; ALAMRI, S.; AL-AMRI, A.A.; ALSUBAIE, Q.D.; AL-MUNQEDI, B.; ALI, H.M.; SINGH, V.P.; SIDDIQUI, M.H. Effect of nitric oxide on seed germination and seedling development of tomato under chromium toxicity. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.40, p.2358-2370, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10212-2>

KIBINZA, S.; BAZIN, J.; BAILLY, C.; FARRANT, J.M.; CORBINEAU, F.; EL-MAAROUF-BOUTEAU, H. Catalase Is a Key Enzyme in Seed Recovery from Ageing during Priming. **Plant Science**, v.181, n.3, p.309-315, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.06.003>

LABOURIAU, L.G. **A germinação das sementes**. Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos. Washington. Estados Unidos. 1983.173p.

LIU, F.; GUO, F.Q. Nitric oxide deficiency accelerates chlorophyll breakdown and stability loss of thylakoid membranes during dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. **PLoS ONE**, v.8, e56345, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056345>

LIU, Y.; YE, N.; LIU, R.; CHEN, M.; ZHANG, J. H₂O₂ mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination. **Journal of Experimental Botany**, v.61, n.11, p.2979-2990, 2010. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq125>

MA,Y.; FU, L.; HUSSAIN, Z.; HUANG, D.; ZHU, S. Enhancement of storability and antioxidant systems of sweet cherry fruit by nitric oxide-releasing chitosan nanoparticles (GSNO-CS NPs). **Food Chemistry**, v.285, p.10-21, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.156>

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop science**, v.2, p.176-177, 1962. <https://doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>

MAO, C.; ZHU, Y.; CHENG, H.; YAN, H.; ZHAO, L.; TANG, J.; MA, X.; MAO, P. Nitric Oxide Regulates Seedling Growth and Mitochondrial Responses in Aged Oat Seeds. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, n.4, p.1-18, 2018. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19041052>.

MARCATO, P.D.; ADAMI, L.F.; BARBOSA, R.M.; MELO, O.S.; FERREIRA, I.R.; DE PAULA, L.; DURAN, N.; SEABRA, A.B. Development of a sustained-release system for nitric oxide delivery using alginate/chitosan nanoparticles. **Current Nanoscience**, v.9, n.1, p.1-7, 2013. <https://doi.org/10.2174/1573413711309010003>

MOURA, A.R.D.; NOGUEIRA, R.J.M.C.; SILVA, J.A.A.D.; LIMA, T.V.D. Relações hídricas e solutos orgânicos em plantas jovens de *Jatropha curcas* L. sob diferentes regimes hídricos. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 2, p. 345-354, 2016. <https://doi.org/10.5902/1980509822735>

MUSEGANTE, J.V.R.; RIBEIRO, J.E.L.S.; FERRAZ, J.R.; OLIVEIRA, P.O.; BIANCHINI, E.; MEDRI, C. Geographical distribution of *Dyckia walteriana* (Bromeliaceae), a recently described and endangered species endemic to the Serra Geral formation, southern Brazil. **Phytotaxa**,v.438, n.4, p.263-275, 2020. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.438.4.5>

NABI, R.B.S.; TAYADE, R.; HUSSAIN, A.; KULKARNI, K.P.; IMRAN, Q.M.; MUN, B.G.; YUN, B.W. O óxido nítrico regula as respostas das plantas à seca, salinidade e estresse por metais pesados. **Environmental and Experimental Botany**, v.161, p.120-133, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.02.003>

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES. 1999, cap.2, p.1-24.

NXELE, X.; KLEIN, A.; NDIMBA, B.K. Drought and salinity stress alters ROS accumulation, water retention, and osmolyte content in sorghum plants. **South African Journal of Botany**, v.108, p.261-266, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.11.003>

OLIVEIRA JÚNIOR, C.J.F.; GONÇALVES, F.S.; COUTO, F.; MATAJS, L. Potencial das espécies nativas na produção de plantas ornamentais e paisagismo agroecológico. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.8, n.3, p.190-200, 2013.

OLIVEIRA, H.C.; GOMES, B.C.R.; PELEGRINO, M.T.; SEABRA, A.B. Nitric oxidereleasing chitosan nanoparticles alleviate the effects of salt stress in maize plants. **Nitric Oxide**, v.61, n.30, p.10-19, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.09.010>

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 the Environment**, v.3, p.137-148, 2018. <http://dx.doi.org/10.1007/s40974-018-0090-2>

PELEGRINO, M.T.; SILVA, L.C.; WATASHI, P.S.; HADDAD, T.R.; SEABRA, A.B. Nitric oxide-releasing nanoparticles: synthesis, characterization, and cytotoxicity to tumorigenic cells. **Journal of Nanoparticle Research**, v.19, n.57, p.57-72, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11051-017-3747-4>

R CORE TEAM, R. **A language and environment for statistical computing**. Foundation for Statistical Computing. Disponível em :<http://www.r-project.org>. Acesso em: 07.fev.2022.

REFLORA. **Bromeliácea in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br>. Acesso em: 07 fev. 2022.

ROCHA, M.E.L.; BARBOSA, J.A.; ABADE, M.T.R.; CARDOSO, K.P.S.; GUIMARÃES, V.F. Ácido Salicílico na Germinação de Sementes de *Eucalyptus urophylla* X *Eucalyptus grandis*. **Ensaio e Ciência**, v.25, n.5, p.709-713, 2021. <https://doi.org/10.17921/1415-6938.2021v25n5-esp709-713>

ROJAS, A.; MORENO, L.; MELGAREJO, L. M.; RODRÍGUEZ, M. A. Physiological response of gmelina (*Gmelina arborea* Roxb.) to hydric conditions of the colombian Caribbean. **Agronomía Colombiana**, v. 30, n. 1, p. 52-58, 2012.

SAAVEDRA, G.M.; FIGUEROA, N.E.; POBLETE, L.A.; CHERIAN, S.; FIGUEROA, C.R. Effects of preharvest applications of methyl jasmonate and chitosan on postharvest decay, quality and chemical attributes of *Fragaria chiloensis* fruit. **Food Chemistry**, v.190, n.1, p.448-453, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.107>

SACHDEV, S.; ANSARI, S. A.; ANSARI, M. I.; FUJITA, M.; HASANUZZAMAN, M. Abiotic Stress and Reactive Oxygen Species: Generation, Signaling, and Defense Mechanisms. **Antioxidants**, v.10, n.2, p.277, 2021. <https://doi.org/10.3390/antiox10020277>

SEABRA, A.B.; PELEGRINO, M.T.; LOPES-OLIVEIRA, P.J.; GOMES, D.G.; OLIVEIRA, H.C. Overview of nitric oxide homeostasis: strategies for altering the levels of this signaling

molecule in plants. **Nitric Oxide in Plant Biology**, p.3-41, 2022a. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818797-5.00012-1>

SEABRA, A.B.; SILVEIRA, N.M.; RIBEIRO, R.V.; PIERETTI, J.C.; BARROSO, J.B.; CORPAS, F.J.; PALMA, J.M.; HANCOCK, J.T.; PETRIVALSKY, M.; GUPTA, K.J.; WENDEHENNE, D.; LOAKE, G.J.; DURNER, J. Nitric oxide-releasing nanomaterials: from basic research to potential biotechnological applications in agriculture. **New Phytologist**, v.234, n.4, p.1119-1125, 2022b. <https://doi.org/10.1111/nph.18073>

SHIMIZU, G.D.; MARUBAYASHI, R.Y.P.; GONÇAVES, L.S.A. **AgroR: Experimental Statistics and Graphics for Agricultural Sciences**. R package version 1.2.1.. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/AgroR/index.html>. Acesso em: 07.fev.2022.

SILVA, S.P.; SANTOS, L.N.; MELLO, R.F.A.; SANTOS, A.S.; FERREIRA, N.R. Aproveitamento racional de subprodutos da indústria pesqueira: Reação de desacetilação assistida por micro-ondas e condições de otimização utilizando Design Experimental Box-Behnken. **Brazilian Journal of Development**, v.6, n.5, p.26087-26097, 2020. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n5-169>

SILVEIRA, N.M.; FRUNGILLO, L.; MARCOS, F.C.C.; PELEGRINO, M.T.; MIRANDA, M.T.; SEABRA, A.B.; SALGADO, I.; MACHADO, E.C.; RIBEIRO, R.V. Exogenous nitric oxide improves sugarcane growth and photosynthesis under water deficit. **Planta**, v.244, p.181-190, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2501-y>

SILVEIRA, N.M.; SEABRA, A.B.; MARCOS, F.C.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, n.1, p.38,44, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.01.004>

SIMONTACCHI, M.; GALATRO, A.; RAMOS-ARTUSO, F.; SANTA-MARÍA, G.E. Sobrevivência da planta em um ambiente em mudança: O papel do óxido nítrico nas respostas das plantas ao estresse abiótico. **Frontiers in Plant Science**, v.6, p.1-9, 2015. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00977>

SINGHAL, R.K.; JATAV, H.S.; AFTAB, T.; PANDEY, S.; MISHRA, U.N.; CHAUHAN, J.; CHAND, S.; SAHA, D.; DADARWAL, B.K.; CHANDRA, K.; KHAN, M.A.; RAJPUT, V.D.; MINKINA, T.; NARAYANA, E.S.; SHARMA, M.K.; AHMED. Roles of Nitric Oxide in Conferring Multiple Abiotic Stress Tolerance in Plants and Crosstalk with Other Plant Growth Regulators. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.40, p.2303-2328, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10446-8>

SOLIMAN, M.H.; ALAYAFI, A.A.M.; EL KELISH, A.A.; ABU-ELSAOUD, A.M. Acetylsalicylic acid enhance tolerance of *Phaseolus vulgaris* L. to chilling stress, improving photosynthesis, antioxidants and expression of cold stress responsive genes. **Botanical Studies**, v.59, n.1, p. 1-17, 2018. <https://doi.org/10.1186/s40529-018-0222-1>

SOURI, Z.; KARIMI, N.; FAROOQ, M.A.; SANDALIO, L.M. Nitric oxide improves tolerance to arsenic stress in *Isatis cappadocica* desv. Shoots by enhancing antioxidant defenses. **Chemosphere**, v.239, p. 124523, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124523>

TERRÓN-CAMERO, L.C.; PELÁEZ-VICO, M.A.; DEL-VAL, C.; SANDALIO, L.M.; ROMERO-PUERTAS, M.C. Role of nitric oxide in plant responses to heavy metal stress: exogenous application versus endogenous production. **Journal of Experimental Botany**, v.70, n.17, p.4477-4488, 2019. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz184>

TOMAZINI, L.N.; ANDRADE, W.H.N.; MÁXIMO, L.N.C. Óxido nítrico: Um breve revisão sobre aspectos históricos, estrutura química e algumas aplicações relevantes para o corpo humano. **Multi-Science Journal**, v.2, n.2, p.82-88, 2019. <http://dx.doi.org/10.33837/msj.v2i2.941>

VERSIEUX, L.M. Brazilian plants urgently needing conservation: the case of *Vriesea minarum* (Bromeliaceae). **Phytotaxa**, v.28, p.35-49, 2011. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.28.1.5>

VITOR, S.; DUARTE, G.T.; SAVIANI, E.E.; VINCENTZ, M.; OLIVEIRA, H.; SALGADO, I. Nitrate reductase is required for the transcriptional modulation and bactericidal activity of nitric oxide during the defense response of *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae*. **Planta**, v.238, n.3, p.475-486, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1906-0>

WANG, Y.; ZHANG, J.; LI, J.L.; MA, X.R. Exogenous hydrogen peroxide enhanced the thermo tolerance of *Festuca arundinacea* and *Lolium perenne* by increasing the antioxidative capacity. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.36, n.11, p.2915-2924, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1661-2>

WELLBURN, A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, p. 307-313, 1994. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)

ZAYED, M.M.; ELKAFARI, S.H.; ZEDAN, A.M.G.; DAWOUD, S.F.M. Effect of Nano Chitosan on Growth, Physiological and Biochemical Parameters of *Phaseolus vulgaris* under Salt Stress. **Journal of Plant Production**, v.8, n.5, p.577-585, 2017. <https://doi.org/10.21608/jpp.2017.40468>

ZENG, C.L.; LIU, L.; WANG, B.R.; WU, X.M.; ZHU, Y. Physiological effects of exogenous nitric oxide on *Brassica juncea* seedlings under NaCl stress. **Biologia Plantarum**, v.55, n.2, p.345-348, 2011.

ZHAO, D.; WANG, H.; CHEN, S.; YU, D.; REITER, R.J. Phyto-melatonin: an emerging regulator of plant biotic stress resistance. **Trends in Plant Science**, v.26, n.1, p.70-82, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.08.009>.

7 CONCLUSÕES GERAIS

As bromélias como já citado ao longo do trabalho, são de fundamental importância econômica, exercendo papel na floricultura e ornamentação, como também ecológica, gerando importante papel ambiental. O Brasil, apresentando grande diversidade em número de espécies, tem como contrapartida, poucos estudos associados a espécies nativas, como diversas dentro do gênero *Dyckia*.

Desse modo, o estudo apresentado mostrou a importância do conhecimento fisiológico das sementes de algumas das espécies nativas de bromélias durante e após o armazenamento. Assim, foi observado perda da germinabilidade das sementes após o período de conservação, associado a presença de dormência fisiológica das mesmas seja pelo desbalanço hormonal ou a presença de substâncias inibidoras da germinação. Assim, o uso de reguladores vegetais visava melhorar a germinação das sementes. Para isso, foram utilizados o ácido giberélico (GA₃) já bem conhecido a respeito da ação na germinação e o óxido nítrico (NO), molécula em ascensão de estudos e também com efeitos nas sementes.

Tanto o GA₃ quanto o NO mostraram efeito benéfico na germinação de duas das quatro espécies utilizadas (*D. dusenii* e *D. walteriana*). Também foi estudada a associação da nanotecnologia com estas moléculas vista a relativa instabilidade química e degradação. Assim, o estudo serviu como base de informações para estudos mais detalhados quanto à aceitação das nanopartículas pelas sementes. Ficou claro o efeito superior as nanopartículas em ambiente sob estresse, indicando também resultados promissores para estudos futuros.

De forma geral, o trabalho se torna importante visto a ênfase com estudos de espécies nativas, com pouco ou nenhum estudo e ainda com algumas em espécie de extinção antes mesmo de serem realizados estudos mais detalhados. Além disso, sob o aspecto ambiental e econômico, o conhecimento da germinação destas espécies auxilia na produção em larga escala, o que pode auxiliar na redução da ameaça de extinção destas espécies e ainda abrir oportunidades para a comercialização e utilização destas plantas no mercado de plantas ornamentais.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI KHALAKI, M.; MOAMERI, M.; ASGARI LAJAYER, B.; ASTATKIE, T. Influence of Nano-Priming on Seed Germination and Plant Growth of Forage and Medicinal Plants. **Plant Growth Regulation**, v.93, p.13-28, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10725-020-00670-9>

ABDI - Agência Brasileira do Desenvolvimento Industrial. **Estudo prospectivo nanotecnologia**. Série Cadernos da Indústria. Brasília. 2010. Disponível em: <http://www.abdi.com.br>. Acesso em: 20. Fev. 2022.

ABDULHALEM, A.G. Effect of gibberellin and saponins extract of Sanscevieria leaves on anise seeds germination. **Plant Archives**, v.20, n.1, p.1045-1050, 2020.

ACHARYA, P.; JAYAPRAKASHA, G.K.; CROSBY, K.M.; JIFON, J.L.; PATIL, B.S. Green-Synthesized Nanoparticles Enhanced Seedling Growth, Yield, and Quality of Onion (*Allium cepa* L.). **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v.7, n.17, p.14580-14590, 2019. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b02180>

ACHARYA, P.; JAYAPRAKASHA, G.K.; CROSBY, K.M.; JIFON, J.L.; PATIL, B.S. Nanoparticle-Mediated Seed Priming Improves Germination, Growth, Yield, and Quality of Watermelons (*Citrullus lanatus*) at Multi-Locations in Texas. **Scientific Reports**, v.10, n.5037, p.1-16, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61696-7>

AGUIAR, R.P. **Obtenção de classes de vigor e viabilidade em sementes de *Urochloa brizantha* cv marandu, através de imagens de teste de tetrazólio**. 2017. 71p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, 2017.

ANACLETO, A.; BORNANCIN, A. P. A. Perfil e comportamento do consumidor de bromélias, orientação a produção rural. **Revista Brasileira de Planejamento e Desenvolvimento**, v. 7, n. 1, p. 51-66, 2018.

AQIL, F.; MUNAGALA, R.; JEYABALAN, J.; VADHANAM, M.V. Bioavailability of phytochemicals and its enhancement by drug delivery systems. **Cancer Letters**, v.334, n.1, p.133-141, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.02.032>

ARC, E.; SECHET, J.; CORBINEAU, F.; RAJJOU, L.; MARION-POLL, A. ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. **Frontiers in Plant Science**, v.4, p.1-19, 2013. <https://doi.org/doi:10.3389/fpls.2013.00063>

ASTIER, J.; GROSS, I.; DURNER, J. Nitric oxide production in plants: an update. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, n. 14, p. 3401-3411, 2018. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx420>

BARBIERI, R.L.; STUMPF, E.R.T. **Origem e evolução de plantas cultivadas**. Embrapa Informação Tecnológica. 2008. 108p.

BARBOSA, G.C.V. **Substrato e indutores de florescimento em bromélias ornamentais**. 2007. 88p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

BARBOSA-FILHO, W.G; ARAUJO, A.C. **Eficiência de polinização e biologia reprodutiva de Bromélia balansae Mez (Bromeliaceae) em um fragmento de Cerrado, Mato Grosso do Sul.** 2007. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, Caxambu-MG.

BARBOSA, M.R.; SILVA, M.M.A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T.R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v.44, n.3, p.453-460, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782014000300011>

BASUDHAR, D.; CHENG, R.C.; BHARADWAJ, G.; RIDNOUR, L.A.; WINK, D.A.; MIRANDA, K.M. Chemotherapeutic potential of diazeniumdiolatebased aspirin prodrugs in breast cancer. **Free Radical Biology and Medicine**, v.83, p. 101-114, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.029>

BENZING, D. H. **Bromeliaceae: Profile of an Adaptive radiation.** Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 690p.

BERED, F.; SANTOS, K.E.; PALMA, S.C.; PAGGI, G.M. Bromélias - A beleza exótica do Novo Mundo. In: BARBIERI, R.L. STUMPF, E.R.T (eds). **Origem e evolução de plantas cultivadas.** Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, p. 235-251, 2008.

BESSON-BARD, A.; ASTIER, J.; RASUL, S.; WAWER, I.; DUBREUIL-MAURIZI, C.; JEANDROZ, S. WENDEHENNE, D. Current view of nitric oxide-responsive genes in plants. **Plant Science**, v.177, p.302-309, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.06.006>

BEZERRA, P.Q.M.; DE SOUZA, C.O.; FERREIRA, C.D.; SASSAKI, B.S.; DA SILVA, I.R.C.; NUNES, I.L. **Estudo prospectivo de nanopartículas de compostos bioativos com ênfase em nanoencapsulamento: uma contribuição sobre a potencialidade desta tecnologia.** 8º International Symposium on Technological Innovation (ISTI), Sergipe, Aracajú, v.8, n.1, p.530-541, 2017. <https://doi.org/10.7198/S2318-3403201700080056>

BOHM, F.M.L.Z.; FERRARESE, M.L.L.; ZANARDO, D.I.L.; MAGALHAES, J.R.; FERRARESE-FILHO, O. Nitric oxide affecting root growth, lignification and related enzymes in soybean seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.32, 1039-1046, 2010. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0494-x>

BONIN, M.P.; MORAES, P.; MARTINI, G.A.; VERDOLIN-BENEDITO, P.; SOUZA-LEAL, T. Avaliação dos tratamentos pré-germinativos em diferentes concentrações de GA₃ na germinação de *Alcantarea imperialis* (Vell.) Harms. **Scientia Plena**, v.6, n.5, p. 1-4, 2010.

BOTIN, A.A.; CARVALHO, A. Reguladores de crescimento na produção de mudas florestais. **Revista de Ciências Agroambientais**, v.13, n.1, p.83-96, 2015.

BOURIOUG, M.; EZZAZA, K.; BOUABID, R.; ALAOU-MHAMDI, M.; BUNGAU, S.; BOURGEADE, P.; ALAOU-SOSSÉ, L.; ALAOU-SOSSÉ, B.; ALEYA, L. Influence of Hydro- and Osmo-Priming on Sunflower Seeds to Break Dormancy and Improve Crop Performance under Water Stress. **Environmental Science and Pollution Research**, v.27,

p.13215-13226, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-07893-3>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Instrução Normativa MMA - Portaria 148/2022 - Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção**. 2022. Acessado em 10 de Junho de 2022.

BSI- BROMELIAD SOCIETY INTERNATIONAL. **Taxonomy**. Disponível em: <https://www.bsi.org/new/taxonomy/>. Acesso em: 30. Mar. 2022.

BUZATO, S.; SAZIMA, M.; SAZIMA, I. Hummingbird-pollinated floras at three Atlantic Forest sites. **Biotropica**, v.32, p.824-841, 2000. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7429.2000.tb00621.x>

CAMARA, M.C.; CAMPOS, E.V.R.; MONTEIRO, R.A.; DO ESPIRITO SANTO PEREIRA, A.; DE FREITAS PROENÇA, P.L.; FRACETO, L.F. Development of Stimuli-Responsive Nano-Based Pesticides: Emerging Opportunities for Agriculture. **Journal of Nanobiotechnology**, v.17, n. 100, p.1-19, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0533-8>.

CARDOSO, V.J.M. Dormência: estabelecimento do processo. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Orgs.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 95-108.

CARVALHO, A.C.P.P.; MERCIER, H. Bromeliaceae. In: TERAPO, D.; CARVALHO, A. C.P.P.de; BARROSO, T.C. da S.F. (Ed.). **Flores Tropicais**. Brasília: Embrapa, p. 59-83, 2005.

CARVALHO, V.; NETO, A.A.C. **Espécies Reativas de Oxigênio em Plantas**, VI Botânica no Inverno, Chapter: 18, p.161-168, 2016.

CHEN, K.; CHEN, L.; FAN, J.; FU, J. Alleviation of heat damage to photosystem II by nitric oxide in tall fescue. **Photosynthesis Research**, v.116, p.21-31, 2013. <https://doi.org/doi:10.1007/s11120-013-9883-5>

CHEN, R.; RATNIKOVA, T.A.; STONE, M.B.; LIN, S.; LARD, M.; HUANG, G.; KE, P.C. Differential Uptake of Carbon Nanoparticles by Plant and Mammalian Cells. **Small**, v.6, n.5, p.612 - 617, 2010. <https://doi.org/10.1002/sml.200901911>

CNCFlora. **Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012**. 2012. Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br>. Acesso em: 16 Fev.2022.

COLEBROOK, E.H.; THOMAS, S.G.; PHILLIPS, A.L.; HEDDEN, P. The Role of Gibberellin Signalling in Plant Responses to Abiotic Stress. **The Journal of Experimental Biology**, v.217, n.1, p. 67-75, 2014. <https://doi.org/10.1242/jeb.089938>

CORREA-ARAGUNDE, N.; LOMBARDO, C.; LAMATTINA, L. (2008). Nitric oxide: an

active nitrogen molecule that modulates cellulose synthesis in tomato roots. **New Phytologist**, v.179, p.386-396, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02466.x>

CORTESE-KROTT, M.M.; FERNANDEZ, B.O.; SANTOS, J.L.T.; MERGIA, E.; GRMAN, M.; NAGY, P.; KELM, M.; BUTLER, A.; FEELISCH, M. Nitrosopersulfide (SSNO-) accounts for sustained NO bioactivity of S-nitrosothiols following reaction with sulfide, **Redox Biology**, v.2, p.234-244, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.031>

COUVREUR, P. Nanoparticles in drug delivery: Past, present and future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.65, n.1, p.21-23, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.04.010>

DE JONG, W.H.; BORM, P.J. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. **International Journal of Nanomedicine**, v.3, n.2, p.133-149, 2013. <https://doi.org/10.2147/ijn.s596>

DEL CASTELLO, F.; NEJAMKIN, A.; CASSIA, R.; CORREA-ARAGUNDE, N.; FERNÁNDEZ, B.; FORESI, N.; LOMBARDO, C.; RAMIREZ, L.; LAMATTINA, L. The era of nitric oxide in plant biology: twenty years tying up loose ends. **Nitric Oxide : Biology and Chemistry**, v.85, p.17-27, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.01.013>

DELCLARO, K. Origens e importância das relações plantas-animais para a ecologia e conservação. In: SILINGARDI, T.; MAURA, H. (Orgs). **Ecologia das Interações Plantas-Animais: Uma Abordagem Ecológico-Evolutiva**. Rio de Janeiro: Technical Books, 2012. 336p.

DO CARMO, G.C.; IASTRENSKI, L.F.; DEBIASI, T.V.; DA SILVA, R.C.; PELEGRINO, M.T.; BIANCHINI, E.; STOLF-MOREIRA, R.; PIMENTA, J.A.; SEABRA, A.B.; 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, 112713, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112713>

DUONG, H.T.T.; KAMARUDIN, Z.M.; ERLICH, R.B.; LI,Y.; JONES, M.W.; KAVALLARIS, M.; BOYER, C.; DAVIS, T.P. Intracellular nitric oxide delivery from stable NO-polymeric nanoparticle carriers. **Chemical communications**, v. 49, n. 39, p. 4190-4192, 2013. <https://doi.org/10.1039/c2cc37181b>

DURÁN, N.; MATTOSO, L.H.C.; MORAIS, P.C. **Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. Artliber Editora Ltda.: São Paulo, 2006. 208p.

DURAN, N.M.; SAVASSA, S.M.; LIMA, R.G.D.; DE ALMEIDA, E.; LINHARES, F.S.; VAN GESTEL, C.A.M.; PEREIRA DE CARVALHO, H.W. X-Ray Spectroscopy Uncovering the Effects of Cu Based Nanoparticle Concentration and Structure on *Phaseolus vulgaris* Germination and Seedling Development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.65, n.36, p.7874-7884, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03014>

EALIA, A.M.; SARAVANAKUMAR, M. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v.263, n.3, 032019, 2017.

ENGLERT, S. I. **Orquídeas & bromélias: manual prático de cultivo**. Guaíba: Agropecuária, 2000. 96p.

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. Biointerfaces*, v. 90, p. 21-27, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.042>

FANCY, N.N.; BAHLMANN, A.K.; LOAKE, G.J. Nitric oxide function in plant abiotic stress. *Plant, Cell & Environment*, v. 40, n. 4, p. 462-472, 2017. <https://doi.org/10.1111/pce.12707>

FARAJI, J.; SEPEHRI, A. Efeitos benéficos de nanopartículas de TiO₂ e nitroprussiato de sódio na germinação de sementes e no crescimento de plântulas de trigo sob estresse hídrico estimulado por PEG. *Journal of Seed Science*, v.41, n.3, p.309-317, 2019. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v41n3213139>.

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, n.471, p.1-15, 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00471>

FAROOQ, M.; BASRA, S.M.A.; WAHID, A.; REHMAN, H. Exogenously applied nitric oxide enhances the drought tolerance in fine grain aromatic rice. *Journal of Agronomy and Crop Science*, v. 195, n. 4, p. 254-261, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2009.00367.x>

FEELISCH, M.; OLSON, K.R. Embracing sulfide and CO to understand nitric oxide biology. *Nitric Oxide*, v. 35, p. 2-4, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2013.06.004>

FERNÁNDEZ-MARCOS, M.; SANZ, L.; LEWIS, D. R.; MUDAY, G. K.; LORENZO, O. Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PINFORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.108, p.18506-18511, 2011. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1108644108>

FERREIRA, C.A.; PAIVAI, P.D. de O.; RODRIGUES, T.M.; RAMOS, D.P.; CARVALHO, J.G. DE; PAIVA, R. Desenvolvimento de mudas de bromélia (*Neoregelia cruenta* (R. Graham) L. B. Smith) cultivadas em diferentes substratos e adubação foliar. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 31, n. 3, p.666-671, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-70542007000300010>.

FERREIRA, H.S.; RANGEL, M.C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. *Química Nova*, v.32, n.7, p.1860-1870, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000700033>

FISCHER, E.A. **Polinização, fenologia e distribuição espacial de Bromeliaceae numa comunidade de Mata Atlântica, litoral sul de São Paulo**. 1994. 80p. Dissertação (Mestrado em Ecologia), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

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, 2016.

<https://doi.org/10.3389/fenvs.2016.00020>

FRANÇA, C.A.M.; MAIA, M.B.R. **Panorama do agronegócio de flores e plantas ornamentais do Brasil**. XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. 2008.10p.

FURLANETO, F.P.B. Nanotecnologia no setor agropecuário. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 8, n. 2, 2011. Disponível em: www.apta regional.sp.gov.br. Acesso em: 18. Fev.2021.

GAMCSIK, M.P.; KASIBHATLA, M.S.; TEETER, S.D.; COLVIN, M. Glutathione levels in human tumors. **Biomarkers**, v. 17, n. 8, p. 671-691, 2012. <https://doi.org/10.3109/1354750X.2012.715672>

GIVNISH, T.J.; BARFUSS, M.H.J.; VAN, E.E.B.; RIINA, R.; SCHULTE, K.; HORRES, R.; GONSISKA, P.A.; JABAILY, R.S.; CRAYN, D.M.; SMITH, A.C.; WINTER, K.; BROWN, G.K.; EVANS, T.M.; HOLST, B.K.; LUTHER, H.; TILL, W.; ZIZKA, G.; BERRY, P.E.; SYTSMAN, K.J. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in bromeliaceae: insights from an eight-locus plastid phylogeny. **American Journal of Botany**, v. 98, n. 5, p. 1-24, 2011. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000059>

GNIAZDOWSKA, A.; KRASUSKA, U.; BOGATEK, R. Dormancy removal in apple embryos by nitric oxide or cyanide involves modifications in ethylene biosynthetic pathway. **Planta**, v. 232, n. 6, p.1397-1407, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1262-2>

GÖKDERE, M.; ATEŞ, S. Extractive fermentation of gibberellic acid with free and immobilized *Gibberella fujikuroi*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v.44, n.1, p. 80-89, 2014. <https://doi.org/10.1080/10826068.2013.792275>

GOUDA, E.J; BUTCHER, D. (cont. updated) **A List of Accepted Bromeliaceae Names**. Disponível em: <http://bromeliad.nl/bromNames/>. University Botanic Gardens, Utrecht. Acesso em: 30 de mar. 2022.

GRUPTA, K.J.; HANCOCK, J.T.; PETRIVALSKY, M.; KOLBERT, Z.; LINDERMAYR, C.; DURNER, J.; BARROSO, J.B.; PALMA, J.M.; BROUQUISSE, R.; WENDEHENNE, D.; CORPAS, F.J.; LOAKE, G.J. Recommendations on terminology and experimental best practice associated with plant nitric oxide research. **New Phytologist**, v.225, p.1828-1834, 2019. <https://doi.org/10.1111/nph.16157>

GUPTA, R.; CHAKRABARTY, S. K. Gibberellic acid in plant. **Plant Signaling & Behavior**, v.8, n.9, e25504, 2013. <https://doi.org/10.4161/psb.25504>

HAN, J.; MURRAY, J.E.; YU, Q.; MOORE, P.H.; MING, R. The Effects of Gibberellic Acid on Sex Expression and Secondary Sexual Characteristics in Papaya. **HortScience**, v.49, n.3, p.378-383, 2014. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.49.3.378>

HEDDEN, P.; SPONSEL, V.A Century of Gibberellin Research. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.34, n.4, p.740-760, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9546-1>

HEIDEN, G; BARBIERI, R, L; STUMPF, E, R, T. Considerações sobre o uso de plantas ornamentais nativas. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v.12, n.1, p.2-7, 2006.

HONG, T.D.; ELLIS, R.H. **A protocol to determine Seed Storage Behaviour**. 1996. 62p.

HUSEN, A.; SIDDIQI, K. S. Carbon and fullerene nanomaterials in plant system. **Journal of Nanobiotechnology**, v.12. n.1, p.16, 2014. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-12-16>

IAPAR - **Instituto Agronômico do Paraná**. Dados climáticos de Londrina - PR 2019. Disponível em: <http://www.iapar.br/>. Acesso em: 24. Fev. 2022.

IBRAHIM, E.A. Seed Priming to Alleviate Salinity Stress in Germinating Seeds. **Journal of Plant Physiology**, v.192, p.38-46, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.12.011>.

IBRAFLOR - Instituto Brasileiro de Floricultura. **O mercado de flores no Brasil**. 2021. 5p.

IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRNS, R.E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 84, n. 24, p. 9265-9269, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.84.24.9265>

INPI - **Instituto Nacional da Propriedade Industrial**. Ministério da Economia. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/inpi/pt-br>. Acesso em: 01. Mar. 2022.

IQBAL, M.; ASHRAF, M. Gibberellic acid mediated induction of salt tolerance in wheat plants: Growth, ionic partitioning, photosynthesis, yield and hormonal homeostasis. **Environmental and Experimental Botany**, v.86, p.76-85, 2013. <http://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.06.002>

JAHNOVÁ, J.; LUHOVÁ, L.; PETŘIVALSKÝ, M. S-Nitrosoglutathione Reductase- The Master Regulator of Protein S-Nitrosation in Plant NO Signaling. **Plants**, v. 8, n. 2, p. 48, 16 2019. <https://doi.org/10.3390/plants8020048>

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 612p.

JUNQUEIRA, A.H.; PEETZ, M. Intellectual property rights in Brazilian floriculture: innovations for the growth and development of the market. **Ornamental Horticulture**, v. 23, n. 3, p.296-306, 2017. <http://doi.org/10.14295/oh.v23i3.1071>

KABASHIMA, Y.; ANDRADE, M.L.F.; GANDARA, F.B.; TOMAS, F.L.; POLIZEL, J.L.; VELASCO, G.D.N.; SILVA, L.F.; DOZZO, A.D.P.; MOURA, R.G.; FILHO, D.F.S. Histórico da composição da vegetação arbórea do parque do Ibirapuera e sua contribuição para a conservação da biodiversidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana**, v.6, n.4, p.125-144, 2011.

KAH M.; KOOKANA, R.S.; GOGOS, A.; BUCHELI, T.D. A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. **Nature Nanotechnology**, v. 13, n. 8, p. 677-684, 2018. <http://doi.org/10.1038/s41565-018-0131-1>

KAH, M.; HOFMANN, T. Nanopesticide research: Current trends and future priorities. **Environment International**, v.63, p.224-235, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.11.015>

KANNAUJIA, R.; SRIVASTAVA, C.M.; PRASAD, V.; SINGH, B.N.; PANDEY, V. *Phyllanthus emblica* Fruit Extract Stabilized Biogenic Silver Nanoparticles as a Growth Promoter of Wheat Varieties by Reducing ROS Toxicity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.142, p.460-471, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.08.008>

KASOTE, D.M.; LEE, J.H.J.; JAYAPRAKASHA, G.K.; PATIL, B.S. Seed Priming with Iron Oxide Nanoparticles Modulate Antioxidant Potential and Defense-Linked Hormones in Watermelon Seedlings. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v.7, n.5, p.5142-5151, 2019. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b06013>

KERBAUY, G.B. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Guanabara Koogan, 2019. 430p.

KHODAKOVSKAYA, M.V.; KIM, B.-S.; KIM, J.N.; ALIMOHAMMADI, M., DERVISHI, E.; MUSTAFA, T.; CERNIGLA, C.E. Carbon nanotubes as plant growth regulators: effects on tomato growth, reproductive system, and soil microbial community. **Small**, v.9, n.1, p.115-123, 2013. <https://doi.org/10.1002/sml.201201225>

KHURANA, A.; KHURANA, J. P.; BABBAR, S. B. Nitric oxide induces flowering in the duckweed *Lemna aequinoctialis* Welw. (Syn. *L. paucicostata* Hegelm.) under noninductive conditions. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.30, p.378-385, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00344-011-9199-7>

KOHLI, S.K.; KHANNA, K.; BHARDWAJ, R.; ABD-ALLAH, E.F.; AHMAD, P.; CORPAS, F.J. Assessment of subcellular ROS and NO metabolism in higher plants: multifunctional signaling molecules. **Antioxidants**, v.8, n.641, p.641-668, 2019. <https://doi.org/10.3390/antiox8120641>

KOLBERT, Z.S.; BARROSO, J.B.; BROUQUISSE, R.; CORPAS, F.J.; GUPTA, K.J.; LINDERMAYR, C.; LOAKE, G.J.; PALMAD, J.M.; PETRIVALSKÝ, M.; WENDEHENNE, D.; HANCOCOK, J.T. A forty year journey: The generation and roles of NO in plants. **Nitric Oxide**, v.93, n.1, p.53-70, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.09.006>

KOLLARIGOWDA, R.H. Recent view on pectin-based polysaccharide nanoscience and their biological applications. **Nano LIFE**, v. 7, n. 2, p. 1730002, 2017. <https://doi.org/10.1142/S1793984417300023>

KONDHARE, K.R.; FARRELL, A.D.; KETTLEWELL, P.S.; HEDDEN, P.; MONAGHAN, J.M. Pre-maturity α -amylase in wheat: The role of abscisic acid and gibberellins. **Journal of Cereal Science**, v.63, p. 95-108, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.03.004>

KRANZ, W.M. *Dyckia* (Bromeliaceae, Pitcairnioideae), um gênero relicto. 2013. In: 64º Congresso Nacional de Botânica, Belo Horizonte, Disponível em: <https://www.botanica.org.br/>. Acesso em: 20. Mar. 2021.

KRASUSKA, U.; CIACKA, K.; ANDRYKA-DUDEK, P.; AND BOGATEK, R. (2015). **Reactive Oxygen and Nitrogen Species Signaling and Communication in Plants**. GUPTA, K. J; IGAMBERDIEV, A.U. (New York City, NY: Springer International Publishing), 2015. 316p.

KRÖMER, T.; KESSLER, M.; LOHAUS, G.; SCHMIDT-LEBUHN, N.A. Nectar sugar composition and concentration in relation to pollination syndromes in Bromeliaceae. **Plant Biology**, v.10, n.4, p.502-511, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00058.x>

KUBITZKI, K. **The families and genera of vascular plants. Flowering plants. Monocotyledons. Alismatanae and Commelinanae (except Graminaeae)**. Berlim: Springer Verlag, 1998. 551p.

KUMAR, S.; NEHRA, M.; DILBAGHI, N.; MARRAZZA, G.; TUTEJA, S.K.; KIM, K.-H. Nanovehicles for Plant Modifications towards Pestand Disease-Resistance Traits. **Trends in Plant Science**, v.25, n.2, p.198-212, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.10.007>

LABOURIAU, L.G. **A germinação das sementes**. Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, Washington, Estados Unidos. 1983.173p.

LARUE, C.; CASTILLO-MICHEL, H.; SOBANSKA, S.; CÉCILLON, L.; BUREAU, S.; BARTHÈS, V.; SARRET, G. Foliar exposure of the crop *Lactuca sativa* to silver nanoparticles: evidence for internalization and changes in Ag speciation. **Journal of Hazardous Materials**, v.264, p.98-106, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.10.053>

LAVAGNINI, C.G.; DI CARNE, C.A.V.; CORREA, F.; HENRIQUE, F.; TOKUMO, L.E.; SILVA, M.H.; SANTOS, P.C.S. Fisiologia Vegetal - Hormônio Giberelina. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v.25, n.1, p.48-52, 2014.

LEAL, L.; BIONDI, D. Potencial ornamental de espécies nativas. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, n.8, p.1-16, 2006.

LEE, B. K.; YUN, Y. H.; PARK, K. Smart Nanoparticles for Drug Delivery: Boundaries and Opportunities. **Chemical Engineering Science**, v. 125, p. 158-164, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2014.06.042>

LEE, K.Y.; MOONEY, D.J. Alginate: Properties and biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v.37, p.106-126, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>

LEME, E.M.C.; RIBEIRO, O.B.C.; MIRANDA, Z.J.G. New species of *Dyckia* (Bromeliaceae) from Brazil. **Phytotaxa**, v. 67, p. 9-37, 2012. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.67.1.2>

LENZI, M.; ORTH, A.I. Mixed reproduction systems in *Opuntia monacantha* (Cactaceae) in southern Brazil. **Brazilian Journal of Botany**, v.35, n.1, p.49-58, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042012000100006>

- LENZI, M.; PAGGI, G.M. Reproductive biology of *Dyckia excelsa* Leme (Bromeliaceae): a xerophyte species from ironstone outcrops in central-western Brazil. **Plant Species Biology**, v. 35, n. 1, p. 97-108, 2020. <https://doi.org/10.1111/1442-1984.12261>
- LIU, F.; GUO, F.Q. Nitric oxide deficiency accelerates chlorophyll breakdown and stability loss of thylakoid membranes during dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. **PLoS ONE**, v.8, e56345, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056345>
- LIU, Y.; SUN, Y.; HE, S.; ZHU, Y.; AO, M.; LI, J.; CAO, Y. Synthesis and characterization of gibberellin -chitosan conjugate for controlled-release applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.57, p. 213-217, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.024>
- LOMBARDO, M.C.; GRAZIANO, M.; POLACCO, J.C.; LAMATTINA, L. Nitric Oxide Functions as a Positive Regulator of Root Hair Development. **Plant Signaling & Behavior**, v.1, p.28-33, 2006. <https://doi.org/10.4161/psb.1.1.2398>
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Nova Odessa, 2009. 384p.
- LOZANO-JUSTE, J.; COLOM-MORENO, R.; LEÓN, J. In vivo protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*. **The Journal of Experimental Botany**, v.62, n.10, p.3501-3517, 2011. <https://doi.org/10.1093/jxb/err042>
- LUTHER, H. E. **An alphabetical list of Bromeliad Binomials**. Marie Selby Botanical Gardens & Bromeliad Society International. 14 ed. 2014. 45p.
- LÜTTGE, U. Ability of crassulacean acid metabolism plants to overcome interacting stresses in tropical environments. **AoB Plants**, v.2010, p.1-15, 2011. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plq005>
- MA, X.; GEISER-LEE, J.; DENG, Y.; KOLMAKOV, A. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. **Science of The Total Environment**, v.408, n.16, p. 3053-3061, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.03.031>
- MADEJÓN, P.; CANTOS, M.; JIMÉNEZ-RAMOS, M.C.; MARAÑÓN, T.; MURILLO, J.M. Effects of soil contamination by trace elements on white poplar progeny: seed germination and seedling vigour. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 11, p.663-674, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4893-8>
- MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop science**, v. 2, p. 176-177, 1962. <https://doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>
- MALUHY, S.A. **Importância do Uso de Nativas (inclusive as Não-Convencionais) no Paisagismo**. 2020. Disponível em: <https://arquitetosdapaisagem.com.br/a-importancia-do-uso-de-nativas-no-paisagismo/>. Acesso em 28 de Jun. 2022.
- MALUIN, F.N.; HUSSEIN, M.Z.; YUSOF, N.A.; FAKURAZI, S.; IDRIS, A.S.; HILMI,

N.H.Z.; DAIM, L.D.J. Phytotoxicity of Chitosan-Based Agronanofungicides in the Vegetative Growth of Oil Palm Seedling. **PLOS ONE**, v.15, n.4, e0231315, doi:10.1371/journal.pone.0231315.

MARCATO, P.D.; ADAMI, L.F.; BARBOSA, R.M.; MELO, O.S.; FERREIRA, I.R.; DE PAULA, L.; DURAN, N.; SEABRA, A.B. Development of a sustained-release system for nitric oxide delivery using alginate/chitosan nanoparticles. **Current Nanoscience**, v.9, n.1, p.1-7, 2013. <https://doi.org/10.2174/1573413711309010003>

MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed., Londrina: ABRATES, 2015. 660p.

MARTINELLI, G.; VIEIRA, C.M.; GONZALES, M.; LEITMAN, P.; PIRATININGA, A.; COSTA, A.F.; FORZZA, R.C. Bromeliaceae da Mata Atlântica Brasileira: Lista de espécies, distribuição e conservação. **Rodriguésia**, v.59, n.1, p.209-258, 2008. <https://doi.org/10.1590/2175-7860200859114>

MARTINI, A.; BIONDI, D.; BATISTA, A.C.; NATAL, C.M. Fenologia de espécies nativas com potencial paisagístico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n.1, p.75-84, 2010.

MEDEIROS, M.J.; OLIVEIRA, M.T.; WILLADINO, L.; SANTOS, M.G. Overcoming seed dormancy using gibberellic acid and the performance of young *Syagrus coronata* plants under severe drought stress and recovery. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.97, 278-286, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.10.008>

MEYER, B.; GENONI, A.; BOUDIER, A.; LEROY, P.; RUIZ-LOPEZ, M.F. Structure and stability studies of pharmacologically relevant S-nitrosothiols: A theoretical approach. **The Journal of Physical Chemistry A**, v.120, n.24, p.4191-4200, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.6b02230>

MINCEA, M.; NEGRULESCU, A.; OSTAFE, V. Preparation, modification, and applications of chitin nanowhiskers: a review. **Reviews on Advanced Materials Science**, v. 30, p. 225-242, 2012.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro - Região sul**. In: CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. 2011. 934p.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA. **Biodiversidade Brasileira – Sabores e Aromas** In: SANTIAGO, R.A.C.; CORADIN, L. 2018. 906p.

MIRZAJANI, F.; ASKARI, H.; HAMZELOU, S.; FARZANEH, M.; GHASSEMPOUR, A. Effect of silver nanoparticles on *Oryza sativa* L. and its rhizosphere bacteria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 88, p.48-54, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.10.018>.

MOREAU, M.; LINDERMAYR, C.; DURNER, J.; KLESSIG, D. F. NO synthesis and signaling in plants – where do we stand? **Physiologia Plantarum**, v.138, p.372-383, 2010. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01308.x>.

MUNZEL, T.; DAIBER, A.; GORI, T. More answers to the still unresolved question of nitrate tolerance. **European Heart Journal**, v.34, n.34, p. 2666-2673, 2013. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/eh249>.

MURARO, D. **Germinação em substratos alternativos ao xaxim e aspectos fenológicos e reprodutivos de *Vriesea incurvata* Gaudich.: subsídios à produção sustentável**. 2006. 66p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

MUSEGANTE, J.V.R.; RIBEIRO, J.E.L.S.; FERRAZ, J.R.; OLIVEIRA, P.O.; BIANCHINI, E.; MEDRI, C. Geographical distribution of *Dyckia walteriana* (Bromeliaceae), a recently described and endangered species endemic to the Serra Geral formation, southern Brazil. **Phytotaxa**, v.438, n.4, p.263-275, 2020. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.438.4.5>

NAGPAL, K.; SINGH, S.K.; MISHRA, D.N. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 11, p. 1423-1430, 2010. <https://doi.org/10.1248/cpb.58.1423>

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYZANOSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap.2, p.1-24.

NEGRELLE, R.R.B.; ANACLETO, A. Extrativismo de bromélias no Estado do Paraná. **Revista Ciência Rural**, v. 42, n. 6, p. 981-986, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782012000600005>.

NETO, E.R.L. Aspectos relevantes da nanotecnologia e a sua aplicação na construção civil. **Revista Especialize**, On-line IPOG - Goiânia - 6ª Edição nº 006 Vol.01/2013, 2013.19p.

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, n.30, p.10-19, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.09.010>

OLIVEIRA, M.G. S-nitrosothiols as platforms for topical nitric oxide delivery. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 3, p.49-56, 2016. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12588>

OLIVEIRA, R.R. Importância das bromélias epífitas na ciclagem de nutrientes da Floresta Atlântica. **Acta Botanica Brasílica**, v.18, n.4, p.793-799, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062004000400009>

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 the Environment**, v 3, p.137-148, 2018. <http://dx.doi.org/10.1007/s40974-018-0090-2>

PAULA, C. C. **Cultivo de bromélias**. Viçosa: UFV, 2000. 139p.

PAULA, C. C.; SILVA, H. M. P. **Cultivo prático de bromélias**. 3. ed. Viçosa: Editora UFV, 2004. 106p.

PELEGRINO, M.T.; SILVA, L.C.; WATASHI, P.S.; HADDAD, T.R.; SEABRA, A.B. Nitric oxide-releasing nanoparticles: synthesis, characterization, and cytotoxicity to tumorigenic cells. **Journal of Nanoparticle Research**, v.19, n.57, p.57-72, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11051-017-3747-4>

PEREIRA, A.E.S. **Desenvolvimento e avaliação de sistemas nanocarreadores para o regulador de crescimento vegetal Ácido Giberélico**. 2017. 123p. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular na área de Bioquímica). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

PEREIRA, A.E.S.; OLIVEIRA, H.C.; FRACETO, L.F. Polymeric nanoparticles as an alternative for application of gibberellic acid in sustainable agriculture: a field study. **Scientific Reports**, v.9, p.7135, 2019. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-43494-y>

PEREIRA, A.E.S.; OLIVEIRA, H.C.; FRACETO, L.F.; SANTAELLA, C. Nanotechnology Potential in Seed Priming for Sustainable Agriculture. **Nanomaterials**, v.11, n. 267, p.1-29, 2021. <https://doi.org/10.3390/nano11020267>

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 Surf Biointerfaces**, v.1, n.150, p.141-152, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.11.027>

PEREIRA, B.L.; BORGES, E.E.L.; OLIVEIRA, A.C.; LEITE, H.G.; GONÇALVES, J.F.C. Influência do óxido nítrico na germinação de sementes de *Plathymenia reticulata* Benth com baixo vigor. **Scientia Forestalis**, v.38, n. 88, p. 629-636, 2010.

PEREIRA, S.T.S. **Influência de fatores do ambiente na germinação de sementes de grama-tapete (*Axonopus affinis* Chase)**. 2016. 41p. Dissertação (Mestre em Agronomia). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2016.

PÉREZ-DE-LUQUE, A. Interaction of Nanomaterials with Plants: What do we need for real applications in agriculture ?. **Frontiers in Environmental Science**, v.5, n.12, p.1-7, 2017. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2017.00012>

PERILLI, S.; DI MAMBRO, R.; SABATINI, S. Growth and development of the root apical meristem. **Current Opinion in Plant Biology**, v.15, n.1, p.17-23, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.10.006>

PETRI, J.L.; HAWERROTH, F.J.; LEITE, G.B.; SEZERINO, A.A.; COUTO, M. **Reguladores de crescimento para frutíferas de clima temperado**. Epagri, 2016. 141p.

PINANGÉ, D.B. **Filogenia molecular e estudos populacionais no gênero *Dyckia* Schult. & Schult.f. (Bromeliaceae)**. 2013. 121p. Tese (Doutorado em Biotecnologia/Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

PIRES, A.L.R.; BIERHALZ, A.C.K.; MORAES, A.M. Biomaterials: types, applications, and market. **Química Nova**, v.38, n.7, p.957-971, 2015. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150094>.

PODEROSO, J.J.; HELFENBERGER, K.; PODEROSO, C. The effect of nitric oxide on mitochondrial respiration. **Nitric Oxide**, v.88, n.1, p.61-72, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.04.00>

POPOVA, L.; TUAN, T. Nitric oxide in plants: properties, biosynthesis and physiological functions. **Iranian Journal of Science & Technology**, v, 34, No. A3, 2010. <https://doi.org/10.22099/ijsts.2010.2186>

RADI, R. Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. **Accounts of Chemical Research**, v.46, n.2, p.550–559, 2013. <https://doi.org/10.1021/ar300234c>

RALIYA, R.; TARAFDAR, J.C. Novel approach for silver nanoparticle synthesis using aspergillus terreus czr-1: mechanism perspective. **Journal of Bionanoscience**, v.6, n.1, p. 12-16, 2012. <https://doi.org/10.1166/jbns.2012.1073>

RANGASWAMY, V. Improved Production of Gibberellic Acid by *Fusarium moniliforme*. **Journal of Microbiology Research**, v.2, n.3, p. 51-55, 2012. <https://doi.org/10.5923/j.microbiology.20120203.02>

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, 2014. 876p.

REFLORA. **Bromeliaceae in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB66>. Acesso em: 30. Mar. 2022.

REITZ, R. **Bromeliáceas e a malária-bromélia endêmica**. Itajaí: Flora Ilustrada Catarinense, p.1-159, 1983. 518p.

RIBEIRO, M. B. Fibrocultura: o Semi-Árido é o paraíso das fibras vegetais. In: RIBEIRO, M.B. (ed.). A potencialidade do semi-árido brasileiro. Brasília: **Revan. Acta Crystallography**, v. 136, p.121, 2007.

RIBOLDI, B.M. **Nanotecnologia: Fundamentos e Aplicações**. 2009. 215p. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), 2009.

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. Biointerfaces**, v.93, p.36-40, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.11.051>

RODRIGUES, C.; VANDENBERGHE, L. P. DE S.; OLIVEIRA, J. DE.; SOCCOL, C. R. New perspectives of gibberellic acid production: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.32, n.3, p.263-273, 2012. <https://doi.org/10.3109/07388551.2011.615297>

ROGALSKI, J.M. **Biologia da conservação da reófito *Dyckia brevifolia* Baker (Bromeliaceae) no Rio Itajaí Açu, SC**. 2007. 86p. Tese (Doutorado em Recursos de genética vegetal) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

ROMERO, G.Q. **Associações entre aranhas Salticidae e Bromeliaceae: história natural, distribuição espacial e mutualismos**. 2005. 92p Tese (Doutorado em Ecologia) - Universidade de Campinas, Campinas, 2005.

RYU, H.; CHO, Y.G. Plant hormones in salt stress tolerance. **Journal of Plant Biology**, v.58, n.3, p.147-155, 2015. <https://doi.org/10.1007/s12374-015-0103-z>

SANZARI, I.; LEONE, A.; AMBROSE, A. Nanotechnology in Plant Science: To make a Long Story Short. **Bioengineering and Biotechnology**, v.7, p.1-12, 2019. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00120>

SASTRY, R. K.; RASHMI, H. B.; RAO, N. H. Nanotechnology for enhancing food security in India. **Food Policy**, v. 36, n. 3, p. 391-400, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2010.10.012>

SATHIYABAMA, M.; MUTHUKUMAR, S. Chitosan Guar Nanoparticle Preparation and Its in Vitro Antimicrobial Activity towards Phytopathogens of Rice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.153, n.15, p.297-304, 2020. <https://doi.org/j.ijbiomac.2020.03.001>

SCOTT, N.; CHEN, H. Nanoscale science and engineering for agriculture and food systems. **Industrial Biotechnology**, v.8, n.6, p.340-343, 2012. <https://doi.org/10.1089/ind.2012.1549>

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.1, n.3, p.1370-1379, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.005>

SEABRA, A.B.; OLIVEIRA, H. C. How nitric oxide donors can protect plants in a changing environment: what we know so far and perspectives. **AIMS Molecular Science**, v. 3, n. 4, p. 692-718, 2016. <https://doi.org/10.3934/molsci.2016.4.692>

SEABRA, A.B.; PELEGRINO, M.T.; LOPES-OLIVEIRA, P.J.; GOMES, D.G.; OLIVEIRA, H.C. Overview of nitric oxide homeostasis: strategies for altering the levels of this signaling molecule in plants. **Nitric Oxide in Plant Biology**, p.3-41, 2022a. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818797-5.00012-1>

SEABRA, A.B.; SILVEIRA, N.M.; RIBEIRO, R.V.; PIERETTI, J.C.; BARROSO, J.B.; CORPAS, F.J.; PALMA, J.M.; HANCOCK, J.T.; PETRIVALSKY, M.; GUPTA, K.J.; WENDEHENNE, D.; LOAKE, G.J.; DURNER, J. Nitric oxide-releasing nanomaterials: from basic research to potential biotechnological applications in agriculture. **New Phytologist**, v.234, n.4, p.1119-1125, 2022b. <https://doi.org/10.1111/nph.18073>

SHABALA, S.; WHITE, R.G.; DJORDJEVIC, M.A.; RUAN, Y.L.; MATHESIUS, U. Root-to-shoot signalling: integration of diverse molecules, pathways and functions. **Functional Plant Biology**, v.43, n.2, p.87-104, 2016. <https://doi.org/10.1071/FP15252>

SHAKIBA, S.; ASTETE, C.E.; PAUDEL, S.; SABLIOV, C.M.; RODRIGUES, D.F.; LOUIE, S.M. Emerging Investigator Series: Polymeric Nanocarriers for Agricultural Applications: Synthesis, Characterization, and Environmental and Biological Interactions. **Environmental**

Science: Nano, v.7, p.37-67, 2020. <https://doi.org/10.1039/C9EN01127G>

SIDDIQUI, M.H.; AL-WHAIBI, M.H.; BASALAH, M.O. Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. **Protoplasma**, v. 248, p. 447- 455, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0206-9>

SILVA, L.A.S.; COSTA, A.O.; BATISTA, D.S.; SILVA, M.L.; NETTO, A.P.C.; ROCHA, D.I. Exogenous gibberellin and cytokinin in a novel system for in vitro germination and development of African iris (*Dietes bicolor*). **Revista Ceres**, v. 67, n.5, p. 402-409, 2020 <https://doi.org/10.1590/0034-737X202067050008>

SILVA, M.T.B. **Relação da água e dos detritos com a riqueza de macroinvertebrados em bromélias**. Inpa. 2009. 9p.

SILVEIRA, N.M.; FRUNGILLO, L.; MARCOS, F.C.C.; PELEGRINO, M.T.; MIRANDA M.T.; SEABRA, A.B.; SALGADO, I.; MACHADO, E.C.; RIBEIRO, R.V. Exogenous nitric oxide improves sugarcane growth and photosynthesis under water deficit. **Planta**, v.244, n.1, p.181-190, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2501-y>.

SINHA, V.R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN, A. **International Journal of Pharmaceutics**, v.278, n.1, p. 1-23, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.01.044>

SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. Pitcairnoideae (Bromeliaceae). Flora Neotropica Monograph. **The New York Botanical Garden**, v.14, n.1, p.1-678, 1974.

SOUZA, G.C.S.; ARAÚJO, K.L.G.; SILVA, R.C.S.; COELHO, W.S.S.; DANTAS, B.F. **Germinação de sementes de *Rhaphiodon echinus* Shauer diferentes concentrações de ácido giberélico**. Anais da XIII Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Semiárido, 2018. 4p.

SOUZA, P.M.S.; LOBO, F.A.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Desenvolvimento de nanocápsulas de poli-ε-caprolactona contendo o herbicida atrazina. **Química nova**, v.35, n.1, p.132-137, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000100024>

SOUZA, B. I., SOUZA, R. S. Processo de ocupação dos Cariris Velhos–PB e efeitos na cobertura vegetal: contribuição à Biogeografia Cultural do semiárido. **Caderno de Geografia**, v.26, n.2, 229-258. 2016.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2. ed. São Paulo: Nova Odessa, 2008. 704p.

SUN, C.; ZHANG, Y.; LIU, L.; LIU, X.; LI, B.; JIN, C.; LIN, X. Molecular functions of nitric oxide and its potential applications in horticultural crops. **Horticulture Research**, v.8, n.1, 71, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00500-7>

SUNDAR, S.; KUNDU, J.; KUNDU, S.C. Biopolymeric nanoparticles. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 11, n.1, p. 1-13, 2010. <https://doi.org/10.1088/1468-6996/11/1/014104>

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.M.; MURPHY, A. **Fisiologia e Desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888p.

TICHÁ, T.; CINCALOVA, L.; KOPECNY, D.; SEDLAROVÁ, M.; KOPECNÁ, M.; LUHOVÁ, L.; PETRIVALSKÝ, M. Characterization of S-nitrosoglutathione reductase from Brassica and *Lactuca* spp. and its modulation during plant development. **Nitric Oxide**, v. 68, p. 68-76, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.12.002>

TING, Y.; JIANG, Y.; HO, C.T.; HUANG, Q. Common delivery systems for enhancing in vivo bioavailability and biological efficacy of nutraceuticals. **Journal of Functional Foods**, v.7, p.112-128, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.12.010>

TOMAZINI, L.N.; ANDRADE, W.H.N.; MÁXIMO, L.N.C. Óxido nítrico: uma breve revisão sobre aspectos históricos, estrutura química e algumas aplicações relevantes para o corpo humano. **Multi-Science Journal**, v.2. n.2, p.82-88, 2019. <https://doi.org/10.33837/msj.v2i2.941>

VALE, N.F.L.; SOUSA, G.S.; MATA, M.F.; BRAGA, P.E.T. Inventário da arborização do parque da cidade do município de Sobral, Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana**, v.6, n.4, p.145-157, 2011.

VANSTRAELEN, M.; BENKOVÁ, E. Hormonal Interactions in the Regulation of Plant Development. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.28, n.1, p. 463-487, 2012. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155741>

VARASSIN, I.G. **Estrutura espacial e temporal de uma comunidade de Bromeliaceae e seus polinizadores em Floresta Atlântica no sudeste do Brasil**. 2002. 96p. Tese (Doutorado em Ecologia) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

VEGA-VÁSQUEZ, P.; MOSIER, N.S.; IRUDAYARAJ, J. Nanoscale drug delivery systems: from medicine to agriculture. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v.8, n.79, p.1-16, 2020. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00079>

VIEIRA, L.M.; SILVA, J.R.M.; OLIVEIRA, L.N.; SOUZA, A.P.S.; MORAIS, M.C. Bromelina extraída do abacaxi - uma revisão. **Revista Referências em Saúde da Faculdade Estácio de Sá de Goiás**, v.3, n.2, p.53-60, 2020.

VOSGUERITCHIAN, S.B.; BUZATO, S. Reprodução sexuada de *Dyckia tuberosa* (Vell.) Beer (Bromeliaceae, Pitcairnioideae) e interação planta-animal. **Revista Brasileira de Botânica**, v.29, p.433-442, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042006000300010>

WANDERLEY, M.G.L.; MARTINS, S.E. Bromeliaceae. **Flora Fanerogâmica do estado de São Paulo**. São Paulo: FAPESP, v.5, 2007. 259p.

WANG, P.; DU, Y.; HOU, Y.J.; ZHAO, Y.; HSU, C.C.; YUAN, F.; ZHU, X.; TAO, W.A.; SONG, C.P.; 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, n. 2, p. 613-618, 2015. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423481112>

WOLOWSKI, M.; FREITAS, L. An overview on pollination of the Neotropical Poales. **Rodriguésia**, v.66, n.2, p.329-336, 2015. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201566204>

YANG, D.L.; YANG, Y.; HE, Z. Roles of Plant Hormones and Their Interplay in Rice Immunity. **Molecular Plant**, v.6, n.3, p.675-685, 2013. <https://doi.org/10.1093/mp/sst056>

YOUNES, I.; RINAUDO, M.; Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 3, p. 1133-1174, 2015. <http://dx.doi.org/10.3390/md13031133>.

ZANELLA ,C.M.; BRUXEL, M.; PAGG,I G.M.; GOETZE, M.; BUTTOW, M.V.; CIDADE F.W.; BERED, F. Genetic structure and phenotypic variation in wild populations of the medicinal tetraploid species *Bromelia antiacantha* (Bromeliaceae). **American Journal of Botany**, v. 98, p.1511-1519, 2011. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000458>

ZANG, Y.X.; CHUN, I.J.; ZHANG, L.L.; HONG, S.B.;ZHENG, W.W.;XU, K. Effect of gibberellic acid application on plant growth attributes, return bloom, and fruit quality of rabbiteye blueberry. **Scientia Horticulturae**, v.200, p.13-18, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.12.057>

ZHANG, H.; SHEN, W.B.; ZHANG, W.; XU, L.L. A rapid response of β -amylase to nitric oxide but not gibberellin in wheat seeds during the early stage of germination. **Planta**, v. 220, n.5, p. 708-716, 2005. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1390-7>

ZHU, Z.J.; WANG, H.; YAN, B.; ZHENG, H.; JIANG, Y.; MIRANDA, O. R.; VACHET, R. W. Effect of surface charge on the uptake and distribution of gold nanoparticles in four plant species. **Environmental Science & Technology**, v.46, n.22, p.12391-12398, 2012. <https://doi.org/10.1021/es301977w>