



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DIEGO GENUÁRIO GOMES

**RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE
PLANTAS DE SOJA AO ACRÉSCIMO DE COBRE NO SOLO:
EFEITO DE DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO LIVRE E
NANOENCAPSULADO**

Londrina
2019

DIEGO GENUÁRIO GOMES

**RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE
PLANTAS DE SOJA AO ACRÉSCIMO DE COBRE NO SOLO:
EFEITO DE DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO LIVRE E
NANOENCAPSULADO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de Mestre em Agronomia

Orientador: Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira

Londrina
2019

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

Gomes, Diego Genuário.

Respostas morfofisiológicas e bioquímicas de plantas de soja ao acréscimo de cobre no solo: efeito de doadores de óxido nítrico livre e nanoencapsulado / Diego Genuário Gomes. - Londrina, 2019.
102 f.: il.

Orientador: Halley Caixeta de Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Metais Pesados - Tese. 2. Estresse Oxidativo - Tese. 3. NO - Tese. 4. Nanotecnologia - Tese. I. Oliveira, Halley Caixeta de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

DIEGO GENUÁRIO GOMES

**RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE PLANTAS
DE SOJA AO ACRÉSCIMO DE COBRE NO SOLO: EFEITO DE
DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO LIVRE E NANOENCAPSULADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de Mestre em Agronomia

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Amedea Barozzi Seabra
Universidade Federal do ABC - UFABC

Prof. Dr. Luciano Freschi
Universidade de São Paulo - USP

Londrina, 26 de fevereiro de 2019.

À minha família

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida e a oportunidade de mais esta conquista.

À minha mãe Albertina, por todo o apoio necessário para chegar até aqui, pela paciência, incentivo incondicional, carinho, a total dedicação e por estar sempre ao meu lado. A você meu sincero e eterno amor, carinho e respeito.

À minha namorada Bruna, pelo amor incondicional, compreensão, companheirismo e por ser essa pessoa maravilhosa.

Às minhas tias Madalena e Izabel e meus primos Samuel e Nathália, pelo apoio, carinho e por sempre estarem ao meu lado.

Ao Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira pela orientação, compreensão, incentivo e amizade.

Aos Profs. Drs. Renanta Stolf Moreira e José Antonio Pimenta pela disponibilidade e apoio.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal (LEFIV) por todos os momentos compartilhados, amizade e pela ajuda oferecida ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Programa de pós-graduação em agronomia pela amizade e momentos compartilhados ao longo do mestrado.

À Milena Trevisan Pelegrino pela síntese, instruções e envio das nanopartículas.

À Prof. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez pelo suporte e contribuições feitas a este trabalho.

Ao Prof. Dr. Thiago Montagner Souza pelas contribuições feitas na qualificação.

À Prof. Dra. Amedea Barozzi Seabra pelo suporte, orientação no desenvolvimento deste trabalho e pela participação na banca examinadora desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Luciano Freschi pela participação na banca examinadora desta dissertação e pelas contribuições feitas a este trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos que de certa forma contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigado!

GOMES, Diego Genuário. **Respostas morfofisiológicas e bioquímicas de plantas de soja ao acréscimo de cobre no solo:** efeito de doadores de óxido nítrico livre e nanoencapsulado. 2019. 102 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2019.

RESUMO

O acúmulo de metais pesados em solos agricultáveis é um perigo potencial à segurança alimentar, limitando o uso da terra e reduzindo a produtividade. A ferrugem asiática da soja é a principal doença da cultura, estando presente em todas as regiões produtoras. É uma doença de difícil controle devido à resistência do patógeno (*Phakopsora pachyrhizi* Syd & Syd) aos fungicidas de ação sistêmica disponíveis no mercado. Nas últimas safras para contornar a resistência adquirida pelo fungo, estão sendo feita a associação de fungicidas cúpricos aos sistêmicos, estratégia que pode contribuir para o acúmulo de cobre nas regiões produtoras. A aplicação exógena de óxido nítrico (NO) aliada à nanotecnologia representa uma nova abordagem a ser explorada em plantas como mecanismo de proteção ao estresse induzido pelo acúmulo de metais. Objetivou-se avaliar o efeito induzido pelo acúmulo de cobre (Cu) no solo em plantas de soja e se nanopartículas liberadoras de NO protegeriam as plantas contra esse fator de estresse abiótico. As plantas de soja (*Glycine max* L. Merr. cv. BRS257) foram cultivadas em casa de vegetação sob essa condição estressante e parâmetros de crescimento, fisiologia e metabolismo das plantas foram avaliados. Para avaliar o efeito do NO, as plantas estressadas foram tratadas com aplicação via solo de nanopartículas de quitosana contendo o doador de NO ácido nitroso-mercaptosuccínico (*S*-nitroso-MSA), além do doador de NO não-nanoencapsulado para fins de comparação, ambos na concentração de 1mM. Observou-se que o excesso de cobre influenciou o desenvolvimento normal das plantas de soja. Na avaliação morfofisiológica, foi possível verificar um efeito positivo no desenvolvimento das plantas nas concentrações mais baixas (50; 100 ppm), porém o crescimento (principalmente da raiz) foi comprometido em função do aumento do teor de cobre no solo. As plantas de soja da cultivar BRS 257 limitam a translocação do cobre para parte aérea, adotaram metabolismo e uso de água conservativos e ativaram mecanismos de defesa antioxidante. A aplicação exógena de NO (nanoencapsulado e livre) protegeu as plantas de soja contra os efeitos do excesso de cobre no crescimento, na fisiologia e no estresse oxidativo. O NO nanoencapsulado foi mais eficiente que o livre na prevenção das plantas de soja aos efeitos deletérios do estresse por cobre. A cultivar utilizada é relativamente tolerante ao Cu, garantindo sua sobrevivência mesmo em níveis elevados de cobre no solo. A associação de doadores de NO e nanomateriais podem viabilizar sua aplicação na agricultura, criando mecanismos de liberação controlada capazes de evitar os efeitos tóxicos das altas concentrações de NO, bem como a instabilidade dos seus doadores, consolidando-se como uma estratégia a ser explorada em um futuro próximo.

Palavras-chave: Metais pesados. Estresse oxidativo. *Glycine max* (L.) Merr. NO. Nanotecnologia.

GOMES, Diego Genuário. **Morphophysiology and biochemical responses of soybean plants to the addition of copper in the soil: effect of free and nanoencapsulated nitric oxide donors**. 2019. 102 p. Dissertation (Master's degree in Agronomy) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2019.

ABSTRACT

The heavy metals accumulation in agricultural soils is a potential hazard to food security, limiting land use and reducing productivity. Asian soybean rust is the main disease of the crop, being present in all producing regions. It is a disease of difficult control due to the resistance of the pathogen (*Phakopsora pachyrhizi* Syd & Syd) to the systemic action fungicides available in the market. In the last harvests to overcome the resistance acquired by the fungus, the association of cupric fungicides with the systemic ones is being done, a strategy that can contribute to the accumulation of copper in the the producing regions. The exogenous application of nitric oxide (NO) combined with nanotechnology represents a new approach to be explored in plants as a mechanism of stress protection induced by the metals accumulation. The objective was to evaluate the effect induced by the copper (Cu) accumulation in the soil on soybean plants and verify the protective effect of that NO-releasing nanoparticles against this abiotic stress factor. The soybean (*Glycine max* L. Merr. cv. BRS257) plants were cultivated in a greenhouse under this stressful condition and parameters of growth, physiology and plant metabolism were evaluated. To evaluate the effect of NO, stressed plants were treated with chitosan nanoparticles containing nitroso-mercaptoposuccinic acid (S-nitroso-MSA), in addition to the non-nanoencapsulated NO donor for comparison purposes, both at the 1mM concentration. It was observed that excess copper influenced the normal development of soybean plants. In the morphophysiological evaluation, it was possible to verify a positive effect on the development of plants at the lower concentrations (50; 100 ppm) however, the growth (mainly of the root) was compromised with the increase of copper content in the soil. The BRS 257 soybean plants limit copper translocation to shoot, adopted conservative water metabolism and use, and activated antioxidant defense mechanisms. Exogenous application of NO (nanoencapsulated and free) protected soybean plants from the effects of excess copper on growth, physiology, and oxidative stress. Nanoencapsulated NO was more efficient than free in the prevention of soybean plants to the deleterious effects of copper stress. The cultivar used is relatively tolerant to Cu, guaranteeing its survival even at high levels of copper in the soil. The association of NO donors and nanomaterials can facilitate their application in agriculture, creating controlled release mechanisms capable of avoiding the toxic effects of high concentrations of NO, as well as the instability of its donors, consolidating itself as a strategy to be explored in the near future.

Keywords: Heavy metals. Oxidative stress. *Glycine max* (L.) Merr. NO. Nanotechnology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 -** (A) Comprimento do sistema radicular (CSR), (B) massa seca radicular (MSR), (C) comprimento da parte aérea (CPA), (D) massa seca da parte aérea (MSPA) e (E) área foliar (AF) de plantas de soja cultivadas em solos suplementados com diferentes concentrações de cobre (0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ppm). Os dados representam as médias ($n = 10$). O coeficiente de determinação (R^2) também é apresentado..... 59
- Figura 2 -** Plantas de soja cultivadas em solos suplementados com diferentes concentrações de cobre (0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ppm, respectivamente)..... 60
- Figura 3 -** (A) teor de cobre, (B) teor de ferro, (C) teor de manganês, (D) teor de zinco, (E) teor de nitrogênio, (F) teor de fósforo e (G) teor de enxofre nas raízes de plantas de soja cultivadas em solos suplementados com diferentes concentrações de cobre (0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ppm). Os dados representam as médias ($n = 4$). O coeficiente de determinação (R^2) também é apresentado 61
- Figura 4 -** (A) teor de cobre, (B) teor de ferro, (C) teor de manganês e (D) teor de zinco nas folhas de plantas de soja cultivadas em solos suplementados com diferentes concentrações de cobre (0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ppm). Os dados representam as médias ($n = 4$). O coeficiente de determinação (R^2) também é apresentado 62
- Figura 5 -** (A) teor de nitrogênio, (B) teor de potássio, (C) teor de fósforo, (D) teor de enxofre e (E) teor cálcio nas folhas de plantas de soja cultivadas em solos suplementados com diferentes concentrações de cobre (0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ppm). Os dados representam as médias ($n = 4$). O coeficiente de determinação (R^2) também é apresentado..... 63
- Figura 6 -** (A) taxa fotossintética líquida (A), (B) transpiração (E), (C) condutância estomática (g_s), (D) razão C_i/C_a , (E) eficiência no uso da água e (F) eficiência instantânea de carboxilação (k) de plantas de soja cultivadas em solos suplementados com diferentes concentrações de cobre (0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ppm). Os dados representam as médias ($n = 10$). O coeficiente de determinação (R^2) também é apresentado 64

- Figura 7 -** (A) taxa relativa de transporte de elétrons pelo fotossistema II (rETR), (B) atividade potencial do fotossistema II (F_v/F_o) e (C) fluorescência basal (F_o) de soja cultivadas em solos suplementados com diferentes concentrações de cobre (0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ppm). Os dados representam as médias ($n = 10$). O coeficiente de determinação (R^2) também é apresentado 65
- Figura 8 -** (A) clorofilas totais e (B) proteínas solúveis totais nas raízes, de soja cultivadas em solos suplementados com diferentes concentrações de cobre (0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ppm). Os dados representam as médias ($n = 4$). O coeficiente de determinação (R^2) também é apresentado..... 65
- Figura 9 -** (A) conteúdo de H_2O_2 (B) conteúdo de dienos conjugados e (C) conteúdo de malondialdeído nas raízes de soja cultivadas em solos suplementados com diferentes concentrações de cobre (0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ppm). Os dados representam as médias ($n = 4$). O coeficiente de determinação (R^2) também é apresentado..... 66
- Figura 10 -** (A) atividade da enzima superóxido dismutase nas raízes (SOD), (B) atividade da enzima ascorbato peroxidase nas raízes (APX), (C) atividade da enzima peroxidase nas raízes (POD) e (D) atividade da enzima catalase nas raízes (CAT) de plantas de soja cultivadas em solos suplementados com diferentes concentrações de cobre (0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ppm). Os dados representam as médias ($n = 4$). O coeficiente de determinação (R^2) também é apresentado..... 67
- Figura 11 -** (A) Nitrosação do MSA formando o *S*-nitroso-MSA. (B) Decomposição do *S*-nitroso-MSA, liberando o NO e originando MSA oxidado..... 83
- Figura 12 -** (A) Sistema radicular de plantas de soja referente aos tratamentos Controle; Água; NPNO; NO; NP, respectivamente e cultivadas em solos suplementados com 200 ppm de cobre. (B) Sistema radicular de plantas de soja referente aos tratamentos Controle; Água; NPNO; NO; NP, respectivamente e cultivadas em solos suplementados com 300 ppm de cobre 88

- Figura 13 - (A|B)** Atividade potencial do fotossistema II (F_v/F_o) e **(C|D)** taxa relativa de transporte de elétrons pelo fotossistema II (rETR) de plantas de soja cultivadas em solos suplementados com 200 e 300 ppm de cobre e submetidas aos tratamentos com água destilada (Água), nanopartículas contendo *S*-nitroso-MSA a 1 mM (NPNO), *S*-nitroso-MSA livre a 1 mM (NO) e nanopartículas contendo o MSA não nitrosado a 1 mM (NP). As plantas Controle foram cultivadas em solo sem a suplementação de cobre. Os dados representam as médias \pm SE ($n = 8$). Letras iguais nas colunas não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ($p < 0,05$)..... 89
- Figura 14 - (A|B)** Taxa fotossintética líquida (A), **(C|D)** condutância estomática (g_s) e **(E|F)** eficiência instantânea de carboxilação (k) de plantas de soja cultivadas em solos suplementados com 200 e 300 ppm de cobre e submetidas aos tratamentos com água destilada (Água), nanopartículas contendo *S*-nitroso-MSA a 1 mM (NPNO), *S*-nitroso-MSA livre a 1 mM (NO) e nanopartículas contendo o MSA não nitrosado a 1 mM (NP). As plantas Controle foram cultivadas em solo sem a suplementação de cobre. Os dados representam as médias \pm SE ($n = 8$). Letras iguais nas colunas não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) 90
- Figura 15 - (A|B)** Dienos conjugados nas raízes e **(C|D)** peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas raízes de soja cultivadas em solos suplementados com 200 e 300 ppm de cobre e submetidas aos tratamentos com água destilada (Água), nanopartículas contendo *S*-nitroso-MSA a 1 mM (NPNO), *S*-nitroso-MSA livre a 1 mM (NO) e nanopartículas contendo o MSA não nitrosado a 1 mM (NP). As plantas Controle foram cultivadas em solo sem a suplementação de cobre. Os dados representam as médias \pm SE ($n = 4$). Letras iguais nas colunas não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ($p < 0,05$)..... 91

Figura 16 - (A|B) Atividade da enzima superóxido dismutase nas raízes (SOD), (C|D) consumo de peróxido de hidrogênio nas raízes (CAT), (E|F) consumo de ascorbato nas raízes (APX) e (G|H) formação de purpurogalina nas raízes (POD) de soja cultivadas em solos suplementados com 200 e 300 ppm de cobre e submetidas aos tratamentos com água destilada (Água), nanopartículas contendo *S*-nitroso-MSA a 1 mM (NPNO), *S*-nitroso-MSA livre a 1 mM (NO) e nanopartículas contendo o MSA não nitrosado a 1 mM (NP). As plantas Controle foram cultivadas em solo sem a suplementação de cobre. Os dados representam as médias \pm SE ($n = 4$). Letras iguais nas colunas não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atributos químicos e físicos do solo utilizado como substrato	31
Tabela 2 - Modelo de regressão ajustado para os teores de nutrientes essenciais, com respectivos coeficientes de determinação (R^2)	57
Tabela 3 - Modelos de regressão ajustados para as variáveis morfofisiológicas e bioquímicas, com os respectivos coeficientes de determinação (R^2)	58
Tabela 4 - Comprimento do sistema radicular (CSR), massa seca radicular (MSR), comprimento da parte aérea (CPA), massa seca da parte aérea (MSPA) e área foliar (AF) de plantas de soja cultivadas em solos suplementados com 200 ppm de cobre	87
Tabela 5 - Comprimento do sistema radicular (CSR), massa seca radicular (MSR), comprimento da parte aérea (CPA), massa seca da parte aérea (MSPA) e área foliar (AF) de plantas de soja cultivadas em solos suplementados com 300 ppm de cobre	87

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	CULTURA DA SOJA	17
2.2	METAIS PESADOS	18
2.3	COBRE	19
2.4	ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES	20
2.5	ÓXIDO NÍTRICO	22
2.6	NANOTECNOLOGIA NA AGRICULTURA	28
3	MATERIAL E MÉTODOS GERAL	31
3.1	CARACTERIZAÇÃO DO SOLO	31
3.2	MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	31
3.3	VARIÁVEIS MORFOLÓGICAS	32
3.4	VARIÁVEIS FISIOLÓGICAS	32
3.5	VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS	33
	REFERÊNCIAS	36
4	ARTIGO I - RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS INDUZIDAS POR COBRE EM PLANTAS DE SOJA	51
4.1	RESUMO	51
4.2	INTRODUÇÃO	52
4.3	MATERIAL E MÉTODOS	54
4.4	RESULTADOS	56
4.5	DISCUSSÃO	67
4.6	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS	72

5	ARTIGO II – EFEITO DE DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO LIVRE E NANOENCAPSULADO NA RESPOSTA DE PLANTAS DE SOJA AO EXCESSO DE COBRE NO SOLO	79
5.1	RESUMO	79
5.2	INTRODUÇÃO.....	80
5.3	MATERIAL E MÉTODOS	82
5.4	RESULTADOS	86
5.5	DISCUSSÃO.....	93
5.6	CONCLUSÃO	96
	REFERÊNCIAS	97

1. INTRODUÇÃO GERAL

As plantas são organismos sésseis constantemente expostas a fatores ambientais adversos ao longo de sua vida, influenciando negativamente seu desenvolvimento. Essas condições podem ser causadas por atividades antropogênicas, como indústrias de mineração, fundições, queima de combustíveis fósseis e práticas agrícolas, levando ao acúmulo de compostos tóxicos no ambiente. Entre esses compostos, os metais pesados são os contaminantes ambientais com maior potencial nocivo à qualidade ambiental e a vitalidade dos seres vivos, devido à contaminação da cadeia alimentar, toxicidade e alta persistência no ambiente.

Metais pesados podem ser categorizados em dois tipos: essenciais e não-essenciais. Elementos como cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), níquel (Ni) e zinco (Zn) são micronutrientes essenciais para os organismos vivos, desempenhando papéis fundamentais no metabolismo quando presentes na quantidade requerida, mas são tóxicos em altas concentrações. Os não-essenciais como alumínio (Al), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo (Cr) e mercúrio (Hg) não possuem funções biológicas conhecidas, sendo muito tóxicos mesmo em concentrações baixas. Os metais pesados podem entrar no agrossistema através de processos naturais, nos quais os solos herdaram esses elementos do material original de sua formação, possuindo naturalmente altas concentrações. Eles também podem entrar pela ação direta do homem, contaminando solos agrícolas principalmente pelo uso inadequado de agroquímicos.

No Brasil o excesso de cobre no solo é observado ao sul do país nas regiões destinadas ao cultivo da videira, sendo áreas que apresentam elevados índices pluviométricos, elevada umidade relativa do ar e altas temperaturas ao longo do ciclo produtivo. Essas condições são favoráveis ao surgimento de várias doenças fúngicas, capazes de causar severos danos à cultura, diminuindo a produtividade e qualidade de frutos. Em função das aplicações sucessivas de fungicidas com cobre em sua constituição visando ao controle das doenças, ocorrem o escoamento do elemento químico nas superfícies das folhas via água da chuva e a deposição de folhas senescentes ou galhos na superfície do solo. Dessa forma, o cobre pode se acumular no solo nas camadas mais superficiais, aumentando sua disponibilidade às plantas, causando toxidez às videiras e plantas de cobertura de vinhedos. O acúmulo de cobre no solo é constatado por enquanto apenas em áreas produtoras de uva; entretanto, tem potencialidade de se espalhar por outras culturas onde aplicações sucessivas de fungicidas com cobre em sua formulação é usado para controle de doenças fúngicas.

Na cultura da soja, por exemplo, a ferrugem asiática é considerada uma das doenças mais severas, causada pelo fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd & Syd., sendo relatada em todas

as áreas produtoras da leguminosa. Nas últimas safras, vem sendo feita a associação de fungicidas sistêmicos aos fungicidas protetores que possuem múltiplos sítios de atuação no patógeno, como alternativa a perda da eficiência de controle dos produtos sistêmicos. Porém, alguns fungicidas protetores registrados atualmente para cultura da soja são cúpricos, a base de oxiclreto de cobre, sulfato de cobre ou óxido de cobre.

A inclusão dos fungicidas protetores na cultura criou um novo mercado dentro da proteção de plantas. Existe uma estimativa de que 12% dos sojicultores já utilizam fungicidas protetores em suas lavouras. Levando-se em consideração que, em média, são realizadas de duas a três aplicações de protetores visando ao manejo da resistência, tem-se uma quantidade expressiva de ativos sendo utilizados. O uso indiscriminado somado às práticas agrícolas inadequadas pode torná-los uma questão ambiental, levando ao acúmulo do metal nos solos das regiões produtoras. Apesar disso, as respostas morfofisiológicas e bioquímicas de plantas de soja ao aumento gradual de cobre no solo ainda não são bem conhecidas.

A aplicação exógena de óxido nítrico (NO) pode compensar a inibição do crescimento pelo estresse induzido por metais pesados e diminuir a absorção e acumulação do excesso dos metais pelas plantas. Entretanto, a natureza gasosa do NO e a relativa instabilidade dos compostos doadores dificultam sua utilização como mecanismo exógeno de proteção de plantas. O uso da nanotecnologia pode ser uma estratégia apropriada para desenvolver sistemas carreadores constituídos por nanomaterias, permitindo a liberação controlada do NO e a encapsulação dos compostos doadores, evitando sua rápida degradação no ambiente.

O presente trabalho é o primeiro a destacar todas as alterações no desenvolvimento da soja induzidas pelo excesso de um metal potencialmente tóxico, quando disponível em grandes quantidades no solo. Apresenta uma estratégia inovadora de proteção de plantas ao estresse oxidativo, utilizando nanomateriais de baixo custo como ferramenta para desenvolver uma agricultura mais sustentável. Nesta dissertação foram testadas as seguintes hipóteses: 1) o aumento da concentração de cobre no solo influencia negativamente o desenvolvimento das plantas de soja. 2) o doador de NO exógeno será mais eficiente na proteção das plantas de soja contra os efeitos do estresse quando associado às nanopartículas.

Neste contexto, os seguintes objetivos específicos foram enfocados: 1) avaliar as respostas bioquímicas, fisiológicas e morfológicas de plantas de soja induzidas por diferentes concentrações de cobre no solo. 2) avaliar o efeito protetor das nanopartículas liberadoras de NO contra os efeitos tóxicos do Cu nas plantas, comparando-se com o doador de NO não-nanoencapsulado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CULTURA DA SOJA

A produção mundial de soja no ano agrícola de 2017/2018 foi de 341,68 milhões de toneladas, sendo o Brasil neste ano o maior produtor do grão no mundo com uma produção de 122 milhões de toneladas (35,71%). A estimativa para o ciclo vigente é que a produção nacional seja de aproximadamente 117 milhões de toneladas em uma área plantada superior a 36,0 milhões de hectares (USDA, 2019). No ano de 2018, as exportações do complexo soja (grãos, farelo e óleo) somaram 102,10 milhões de toneladas, 22,2% acima dos 83,56 milhões de toneladas no ano anterior. Em receita, o país exportou US\$ 40,96 bilhões em 2018 (MDIC, 2019).

O sucesso da soja encontra-se dentro de suas múltiplas aplicações, sendo usada desde alimentação humana até mesmo como matéria prima para biocombustíveis e, sobretudo, o seu farelo pode ser usado como fonte de proteína em rações animais (KOHLHEPP, 2010; BOEREMA *et al.*, 2016). A soja é uma planta da família das leguminosas oriunda da Ásia e foi domesticada há cerca de 4500-4800 anos com o objetivo de utilizar o grão na dieta humana. A cultura se difundiu em 1739 na Europa, em 1765 nos Estados Unidos e no Brasil em 1882 no estado da Bahia, seguido por São Paulo em 1891 chegando ao Rio Grande do Sul no ano de 1914. Somente após a década de 1960 surgem os primeiros plantios comerciais sendo incorporados rapidamente no sistema de rotação de verão com milho e em sucessão as culturas do trigo, cevada, aveia branca e aveia preta, sendo dessecada e utilizada como cobertura no inverno (MUNDSTOCK & THOMAS, 2005).

A planta de soja é uma dicotiledônea com seu desenvolvimento dividido em dois períodos, o estágio vegetativo (V) e o estágio reprodutivo. O crescimento vegetativo da planta vai depender de condições edafoclimáticas adequadas. A fase de estabelecimento das plantas é de fundamental importância para obtenção de elevados rendimentos de grãos, pois determinará o número de plantas por área e a formação do dossel compostos pelas folhas e as diversas ramificações dos caules. A fase reprodutiva da soja compreende o florescimento, desenvolvimento dos legumes, enchimento de grãos e maturação. Durante o florescimento ocorre o acúmulo de matéria seca e nutrientes nas partes vegetativas, bem como aumento da taxa de fixação de nitrogênio pelos nódulos. No início do enchimento de grãos, a planta atinge o máximo índice de área foliar, desenvolvimento de raízes e fixação de nitrogênio. No final do enchimento de grãos as folhas começam a amarelar e a cair, começando pela parte inferior

das plantas. A maturação fisiológica ocorre quando o grão perde sua coloração verde, apresentando em torno de 60% de umidade, sendo que o ideal para colheita ocorre quando os grãos apresentam menos de 15% de umidade (MUNDSTOCK & THOMAS, 2005).

As condições climáticas adequadas são fundamentais para o bom desenvolvimento da cultura e obtenção do máximo rendimento. A água é importante principalmente no momento da germinação-emergência, assim como na floração-enchimento de grãos (FARIAS, 2011). Na germinação-emergência tanto o excesso quanto a falta são prejudiciais a uma uniformidade no estande da população de plantas. A semente precisa absorver pelo menos 50% do seu peso em água para adquirir boa germinação, entretanto, o conteúdo de água no solo não deve exceder a 85% do total máximo de água disponível e nem ser inferior a 50%. A necessidade hídrica aumenta constantemente conforme a planta se desenvolve, e atinge o máximo durante a floração-enchimento de grãos, decrescendo após esse período (SANTOS, 2008).

A soja é melhor adaptada na faixa de temperatura entre 20°C e 30°C, sendo que a temperatura ideal para seu crescimento e desenvolvimento está ao redor dos 30°C. O crescimento vegetativo da soja é pequeno ou nulo a temperaturas menores ou iguais a 10°C. Por outro lado, temperaturas acima de 40°C possuem efeito adverso na taxa de crescimento, diminuindo a retenção de vagens e provocando distúrbios na floração, efeitos estes que podem ser acentuados na presença de déficit hídricos. Em função da alta sensibilidade, o fotoperíodo é outro fator limitante no desenvolvimento da cultura. Esta característica pode variar entre os cultivares e influenciar a adaptação da soja na medida em que se desloca seu cultivo em direção ao sul ou ao norte (SANTOS, 2008).

2.2 METAIS PESADOS

Metais e metaloides com massa atômica específica maior que 5 g cm⁻³ são classificados como metais pesados (BHARGAVA *et al.*, 2012). Existem duas categorias de metais pesados, os essenciais e não essenciais. Os elementos essenciais, como cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), níquel (Ni) e zinco (Zn), considerados metais pesados, são requeridos por organismos em pequenas quantidades, sendo utilizados nas estruturas de proteínas, facilitando a transferência de elétrons e podendo catalisar reações químicas. No entanto, quantidades excessivas destes elementos podem tornar-se prejudiciais aos organismos. Os elementos não essenciais, como chumbo (Pb), cádmio (Cd), mercúrio (Hg) e

arsênio (As), não têm nenhum efeito benéfico sobre os organismos e, portanto, são potencialmente tóxicos a qualquer forma de vida (MARQUES *et al.*, 2009).

A contaminação ambiental em função do acúmulo de metais pesados aumentou significativamente durante as últimas décadas (ZHANG & GAO, 2015; RIZWAN *et al.*, 2016) devido à queima de combustíveis fósseis (MURADOGLU *et al.*, 2015), eliminação de resíduos municipais (KHAN *et al.*, 2017), mineração e fundição (CHEN *et al.*, 2016), aplicação de defensivos agrícolas (IQBAL *et al.*, 2016), lodo de esgoto (FARAHAT *et al.*, 2015) e fertilizantes (HAMZAH *et al.*, 2016; RAFIQUE & TARIQ, 2016). Esses metais não podem ser degradados ou destruídos, embora possam alterar suas formas químicas. Uma vez dispersos em água, solo e ar, plantas e animais podem acumulá-los (CHENG *et al.*, 2017). Todos os tipos de metais pesados causam a superprodução de espécies reativas de oxigênio. Contudo, metais não essenciais inibem muito mais processos biológicos por substituição de metais essenciais ou alterando a estrutura das biomoléculas e importantes proteínas reguladoras do estresse (SARWAR *et al.*, 2010).

Nas plantas, os excessos de ambas as classes de metais pesados produzem os mesmos efeitos, tais como baixa acumulação de biomassa, clorose, inibição do crescimento e da assimilação de nutrientes e indução de senescência, causando sua morte. O sistema radicular é a parte da planta que primeiro sofre com os efeitos do estresse induzido pelo excesso de metal no solo, sendo objeto de estudo para avaliar o impacto desse agente estressor (SINGH *et al.*, 2016). Nos solos, o acúmulo pode alterar as propriedades físico-químicas, resultar em diminuição da atividade microbiana, perdas de rendimento agrícola e redução da fertilidade (GAO *et al.*, 2010). Além dos impactos adversos, metais pesados são considerados uma ameaça para vitalidade dos seres vivos devido a sua persistência e bioacumulação (SINGH *et al.*, 2016), podendo contaminar a cadeia alimentar humana (HABIBA *et al.*, 2015; IQBAL *et al.*, 2016; KHAN *et al.*, 2017).

2.3 COBRE

O cobre (Cu) é um elemento essencial para todos os organismos, exercendo um importante papel biológico desde o aparecimento do oxigênio na atmosfera terrestre. Nas plantas superiores, a disponibilidade de Cu é um pré-requisito para o crescimento e o desenvolvimento. O teor de Cu dos solos varia de 2 a 100 ppm, com um valor médio de cerca de 30 ppm, mas a maioria está em forma mineral não disponível (YRUELA, 2013). Como metal de transição, possui dois estados de oxidação em condições fisiológicas, Cu^{2+} e Cu^+ .

Como resultado, Cu é o cofator de numerosas enzimas envolvidas em reações de transporte de elétrons na fotossíntese e respiração (BURKHEAD *et al.*, 2009). Nos cloroplastos, é um componente da plastocianina, a proteína de cobre mais abundante em cloroplastos de plantas, atuando na transferência de elétrons nas reações luminosas da fotossíntese. O Cu também é um constituinte da enzima Cu / Zn - superóxido dismutase (Cu / Zn-SOD), que se localiza no estroma e atua na proteção contra espécies reativas de oxigênio (YRUELA, 2009).

Os efeitos da fitotoxicidade do Cu dependem da solubilidade e disponibilidade do metal no solo. Tanto a deficiência como o excesso de Cu inibem o crescimento da planta e alteram processos bioquímicos importantes. O limiar para deficiência de Cu em plantas é inferior a 5 mg kg⁻¹ de peso seco na parte aérea. Neste nível, o crescimento das plantas é reduzido, e podem ocorrer sintomas de deficiência. Em contraste, a maior concentração de Cu na planta pode atingir um valor crítico a partir do qual os sintomas de toxicidade aparecem (MARSCHNER, 1995). O aparato fotossintético é sensível ao Cu onde o excesso gera danos fisiológicos irreversíveis. O excesso de Cu leva à diminuição da atividade do fotossistema II, redução da taxa de transferência de elétrons, inibição da atividade de enzimas do Ciclo de Calvin-Benson, modificação do lado aceptor do fotossistema II, diminuição no conteúdo de pigmentos e redução na síntese de plastocianina (SHI-SENG, 2007; YRUELA, 2009; CAMBROLLÉ *et al.*, 2011).

A toxicidade reflete também na redução da produtividade, baixa germinação de sementes, alterações ultraestruturais e anatômicas e a formação de espécies reativas de oxigênio (WHEELER & POWER, 1995; GAJEWSKA & SKODOWSKA 2010; METWALI *et al.* 2013; DRESLER *et al.*, 2014).

2.4 ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESA DE PLANTAS

Sob circunstâncias normais de crescimento, espécies reativas de oxigênio (ERO) são constantemente produzidas em plantas como subprodutos do metabolismo aeróbico (APEL & HIRT, 2004). Entretanto, o equilíbrio entre a síntese e remoção de ERO pode ser rompido devido ao acúmulo acelerado de ERO e/ou queda na atividade antioxidante, ocasionando a condição de estresse oxidativo, o que pode levar a efeitos deletérios nas células (SCANDALIOS, 2005). Tal estresse ocorre em condições ambientais adversas como radiação UV, alta luminosidade, temperaturas extremas, estresses mecânicos, exposição a herbicidas, metais pesados, ataque de patógenos e déficit hídrico (MITTLER, 2006).

A produção de ERO se dá em diferentes localizações. A principal fonte dessas moléculas são os cloroplastos, que produzem oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) no fotossistema II e radicais superóxidos (O_2^-) nos fotossistemas I e II (ASADA, 2006). Em mitocôndrias, ocorre produção de (O_2^-) nos complexos I e III (MØLLER, 2001), e os peroxissomos são responsáveis pela síntese de (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através de várias reações metabólicas (DEL RIO et al., 2006). Ainda, a NADPH oxidase presente na membrana plasmática produz O_2^- , que participa em diversos processos fisiológicos. O radical hidroxila (OH) pode ser formado a partir da reação entre (H_2O_2) e (O_2^-) em presença de íons metálicos (Fe^{+2} e Cu^{+3}) na chamada reação de Haber-Weiss (TORRES & DANGL, 2005).

Os efeitos deletérios provocados pelo estresse oxidativo ocorrem devido à oxidação de moléculas biológicas pelas ERO. A grande maioria dessas moléculas é não-radicaís e, quando reagidas com radicais livres, um novo radical é formado, levando assim à ocorrência de reações em cadeia. Membranas lipídicas, ácidos nucleicos, proteínas e carboidratos são os principais alvos das ERO (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2006), resultando em alterações celulares como danos em membranas, perda de funções das organelas, redução na eficiência metabólica e na fixação do carbono, perda de eletrólitos e mutações, que levam a disfunções fisiológicas, podendo acarretar em morte celular (SCANDALIOS, 2005).

Para minimizar os efeitos tóxicos dos metais, as plantas desenvolveram um sistema de eliminação de ERO composto por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. As enzimas antioxidantes têm a capacidade de eliminar ERO, prevenindo o dano oxidativo. O sistema antioxidante compreende várias enzimas, destacando-se: superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), glutathione redutase (GR, EC 1.8.1.7) e peroxidases (POD, EC 1.11.1.7). Também se podem incluir aqueles mecanismos não enzimáticos, como o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C), glutathione reduzida (GSH) e compostos fenólicos. Essas substâncias são oxidáveis, com alto poder redutor, reagindo assim rapidamente com ERO, antes que possam lesar as células (KHATUN *et al.*, 2008).

A SOD é a primeira a agir entre as enzimas antioxidantes, catalisando a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a partir de radicais superóxidos (O_2^-) (OLMOS *et al.*, 2003). O H_2O_2 formado é neutralizado pela atuação da CAT, convertendo-o em água e oxigênio molecular, desde que a concentração de H_2O_2 esteja em níveis elevados, caracterizando um estresse severo (ARORA *et al.*, 2002). A remoção em baixas concentrações de H_2O_2 é executada pela APX, permitindo o controle dessa ERO na ordem de μM e em locais mais específicos que a CAT (MITTLER, 2002). A APX utiliza ascorbato como doador de elétrons

para reduzir H_2O_2 à água, fazendo parte do ciclo ascorbato-glutationa (SHIGEOKA *et al.*, 2002). A POD utiliza H_2O_2 como oxidante e compostos fenólicos como doadores de elétrons; dessa maneira, juntamente com a CAT e APX contribui para remoção do H_2O_2 formado pela ação da SOD (HEGEDÜS *et al.*, 2001).

A SOD é uma metaloenzima que apresenta três isoformas de acordo com o metal ao qual se liga: Cu/Zn-SOD no citosol e cloroplasto, Fe-SOD no cloroplasto e Mn-SOD na mitocôndria (ALSCHER *et al.*, 2002; RESENDE *et al.*, 2003; APEL & HIRT, 2004). Possuindo diferentes isoformas em plantas, a CAT é dividida em três classes: as que removem o H_2O_2 produzido durante a fotorrespiração em tecidos fotossintéticos (classe 1); CAT presente nos peroxissomos dos tecidos vasculares e cuja função biológica é desconhecida (classe 2); CAT presente nos glioxissomos das sementes em germinação e células das folhas de plantas jovens, removendo H_2O_2 produzidos durante a degradação dos ácidos graxos (GARG & MANCHANDA, 2009; GILL & TUTEJA, 2010; SHARMA, 2012).

A APX é uma heme peroxidase, composta por cinco isoformas diferentes, que inclui isoenzimas do tilacóide, estroma, citosol, peroxissomo e apoplasto (MIYAKE & ASADA, 1992; JIMÉNEZ *et al.*, 1997). Em plantas a POD possui várias isoformas envolvidas em uma série de processos celulares, algumas sendo constitutivamente expressas, enquanto outras são induzidas por estresses ambientais. Situadas principalmente na parede celular e no vacúolo das células, sua atividade pode ser utilizada como marcador bioquímico do estresse oxidativo induzido por fatores bióticos e abióticos (TIECHER, 2016a e 2016b).

2.5 ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é uma molécula diatômica pequena e com alta difusividade ($4.8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ em H_2O), apresentando propriedades hidrofóbicas. Assim, o NO não só pode migrar facilmente nas regiões hidrofílicas da célula, como o citoplasma, mas também difundir livremente através da fase lipídica das membranas (ARASIMOWICZ & FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007). Dessa forma, ele atua como uma importante molécula sinalizadora em uma variedade de processos fisiológicos nas plantas, incluindo germinação de sementes, homeostase do ferro, funcionalidade mitocondrial, formação de raízes adventícias, morte celular programada, florescimento, fechamento estomático e respostas de defesa a fatores de estresse bióticos e abióticos (BAUDOIN, 2011; CORPAS *et al.*, 2011; GUPTA *et al.*, 2011; LIN *et al.*, 2011; LIN *et al.*, 2012; KHAN *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2014).

É amplamente admitido que o NO regula as respostas das células vegetais sob condições fisiológicas e patológicas ao longo de todo o ciclo de vida da planta (YEMETS *et al.*, 2011). Além disso, foi estabelecido que a exposição prolongada de plantas a condições de estresse pode resultar na produção aumentada de NO e moléculas relacionadas, acionando um amplo espectro de alterações intracelulares conhecidas sob o termo coletivo de “estresse nitrosativo”, que podem acarretar em toxicidade para as células e tecidos (CORPAS *et al.*, 2008; VALDERRAMA *et al.*, 2007). Os efeitos protetores do NO em plantas submetidas a estresses abióticos são induzidos por baixas concentrações desta molécula de sinalização (nano a micromolar), enquanto que as concentrações milimolares de NO podem exercer toxicidade, evidenciando o duplo efeito da molécula, no qual a mesma propriedade que a torna útil em diversos processos fisiológicos também a torna letal (SANTISREE *et al.*, 2015).

Diversas vias são propostas para a síntese de NO endógeno em plantas, sendo que a contribuição de cada via para a produção de NO é dependente da espécie, fase de desenvolvimento e do ambiente no qual as plantas são cultivadas (NEILL *et al.*, 2003). As rotas de produção de NO propostas em plantas são: conversão não enzimática de nitrito (NO_2^-) em NO no apoplasto; formação de NO dependente de nitrato redutase (NR) e atividade similar a NO sintase (NOS), isto é, formação de NO dependente de L-arginina (WILSON *et al.*, 2008; BESSON-BARD *et al.*, 2008).

Devido ao fato de a NR apresentar uma atividade secundária redutora de NO_2^- somente em condições específicas, como baixas concentrações de oxigênio, baixo pH e altos níveis de NO_2^- (ROCKEL *et al.*, 2002; PLANCHET *et al.*, 2005), alguns trabalhos sugerem que o principal papel da NR na síntese de NO seja a geração de NO_2^- , que posteriormente é reduzido a NO pela cadeia respiratória mitocondrial (MODOLO *et al.*, 2005). Outras vias não-enzimáticas foram propostas para a formação de NO, como a redução do NO_2^- pelos carotenoides, mediada por luz (WOJTASZEK, 2000; DEL RÍO *et al.*, 2004). As poliaminas, que incluem moléculas como a putrescina, espermidina e espermina, que são sintetizados a partir de L-arginina, podem induzir a produção do NO; no entanto, o mecanismo exato ainda é desconhecido (TUN *et al.*, 2006).

Alguns estudos utilizando plantas de *Arabidopsis thaliana* duplamente deficiente em NR (*nia1 nia2*) evidenciam uma frequente diminuição da produção de NO quando a NR foi inibida, corroborando com as ideias de que a NR está envolvida na produção de NO nas plantas.

Desikan *et al.* (2002) verificaram que o NO é necessário para o fechamento estomático induzido pelo ácido abscísico (ABA), aumentando a tolerância da planta ao estresse hídrico,

sendo constatado que plantas de *A. thaliana* duplamente deficiente em NR (*nia1 nia2*) não fecharam seus estômatos em resposta ao ABA. Acredita-se que a via de sinalização que leva à produção de NO via NR ativa uma cascata de sinalização de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) para direcionar o fechamento estomático (DESIKAN *et al.* 2002; BRIGHT *et al.* 2006). Zhao *et al.* (2009) observaram que, no processo de aclimação ao frio, a concentração endógena de NO nas folhas em plantas do tipo selvagem de *A. thaliana* aumentou, enquanto que o mutante *nia1 nia2* permaneceu com baixas concentrações. Nas plantas mutantes, houve um menor acúmulo de prolina quanto comparadas ao tipo selvagem, sugerindo que produção de NO dependente de NR desempenha um papel importante na aclimação ao frio e tolerância ao congelamento, induzido pela modulação e acumulação de prolina em *Arabidopsis*.

Oliveira *et al.* (2009 e 2010) evidenciaram a síntese de NO dependente de NR durante as interações fitopatogênicas. O mutante *nia1 nia2* de *A. thaliana* é suscetível à linhagem avirulenta *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (Psm), tendo como possíveis causas da suscetibilidade a baixa concentração endógena de NO e conteúdo de aminoácidos livres. As plantas mutantes não apresentaram aumento significativo da emissão de NO, nem desenvolveram respostas hipersensíveis, apresentando evolução severa dos sintomas da doença nas folhas. Corroborando com os resultados, as plantas mutantes cultivadas com glutamina ou arginina para aumentar o conteúdo de aminoácidos das folhas para níveis semelhantes ou superiores às plantas de tipo selvagem, também não apresentaram respostas hipersensíveis e nem aumento do conteúdo endógeno de NO, enquanto que nas plantas do tipo selvagem o conteúdo de NO aumentou substancialmente em função da inoculação das plantas com Psm. Os resultados sugerem que a suscetibilidade à Psm do mutante *nia1 nia2* não resulta de um conteúdo deficiente de aminoácidos e pode, em vez disso, ser uma consequência da capacidade reduzida de sintetizar NO.

Kolbert *et al.* (2010), utilizando o mutante *nia1 nia2*, investigaram a síntese de NO dependente da NR nas raízes das plantas sob estresse osmótico, induzido pelo tratamento com polietileno glicol-6000 (PEG 6000). Os resultados obtidos sugerem que a síntese inicial de NO foi originária de uma via não-enzimática ou dependente da liberação de um reservatório intracelular (Ex: GSNO), sendo embasado pela detecção do NO transitório nas raízes dos mutantes. Com a continuidade do estresse, foi verificado que o acúmulo de NO nas raízes dependia da atividade da NR, evidenciando o papel da enzima na síntese de NO nas raízes de *A. thaliana* em um estágio tardio de estresse osmótico.

Lombardo e Lamattina (2012) investigaram a essencialidade do NO nos processos de crescimento de pelos radiculares em *A. thaliana*. Em um dos experimentos, comparando o tipo selvagem com o mutante *nial1 nia2*, os mutantes apresentavam baixas concentrações de NO nos pelos radiculares e um crescimento anormal das raízes. Quando as plantas mutantes foram cultivadas em um meio suplementado com 200 μ M S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP), a fluorescência para o NO utilizando o marcador 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM DA) foi igual ao tipo selvagem e o desenvolvimento dos pelos radiculares semelhante.

Experimentos utilizando células de tabaco livre de NR (*Nia30*) (PLANCHET & KAISER, 2006) e tungstato de sódio como inibidor da NR (FRESCHI *et al.*, 2010), também evidenciaram a síntese de NO dependente de NR. Reforçando a hipótese de que o principal papel da NR na síntese de NO é a geração de nitrito, o qual posteriormente será reduzido a NO, experimentos utilizaram o mutante de *A. thaliana nox1* (também conhecido como *cue1-6*), que são plantas deficientes para nitrito redutase (NiR), apresentaram um elevado acúmulo de NO e conseqüente defeitos na transição floral, meristemas apicais e morte celular programada induzida por patógenos (HE *et al.*, 2004; FERNÁNDEZ-MARCOS *et al.*, 2011; YUN *et al.*, 2011), sendo estes, indícios da síntese de NO a partir da redução do nitrito.

O NO interage também com ácido salicílico, jasmonatos e moléculas sinalizadoras como, Ca^{2+} e GSH, afetando eventos de desenvolvimento e adaptação ao estresse (FANCY *et al.*, 2017). Desta forma, o NO surge como uma molécula de grande importância na resposta dos vegetais contra diversos estresses (FARNESE *et al.*, 2016), mediando ações hormonais, interagindo com ERO e modificando a expressão gênica e a atividade proteica (SIMONTACCHI *et al.*, 2015).

As modificações pós-traducionais de proteínas podem ser o resultado da S-nitrosilação (também conhecida como S-nitrosação) em resíduos de cisteína e a nitrosilação de centros metálicos de metaloproteínas, além da nitração de resíduos de tirosina (ASTIER & LINDERMAYR, 2012; KOVACS & LINDERMAYR, 2013; RADI, 2013). A S-nitrosilação é uma modificação reversível que regula uma grande variedade de funções celulares e eventos de sinalização (HESS *et al.*, 2005; GOULD *et al.*, 2013). Diferentemente, a nitração de resíduos de tirosina é uma modificação permanente, favorecida em situações de altos níveis de NO e ERO; situação na qual há geração de ERN (RIDNOUR *et al.*, 2004). O ONOO⁻ transfere um grupo de NO₂ para o anel aromático de um resíduo de tirosina. Esse tipo de modificação pode levar a mudanças estruturais e funcionais profundas nas proteínas (RADI, 2013).

A *S*-nitrosilação gera as moléculas de *S*-nitrosotióis (RSNOs) que são compostos importantes em sistemas animais e vegetais (FOSTER *et al.*, 2003; LINDERMAYR & DURNER, 2009; ASTIER *et al.*, 2011; BRONIEWSKA & HOGG, 2012). Os RSNOs são formados pela modificação covalente entre o grupo tiol de resíduos de cisteína com o NO, tanto em proteínas quanto em tíois de baixo peso molecular. Os RSNOs são considerados elementos chave da interação entre ERN e ERO, tanto sob condições fisiológicas quanto de estresse, levando a vários cenários de estresse oxidativo, nitrosativo ou nitro-oxidativo (CORPAS & BARROSO, 2013). A *S*-nitrosilação é considerada como uma das mais importantes modificações pós-traducionais em proteína e o aumento do número de alvos de nitrosilação foi identificado entre proteínas e enzimas envolvidas em processos celulares cruciais (SETH & STAMLER, 2011).

Entre os RSNOs, a *S*-nitrosoglutationa (GSNO) resultante da ligação entre NO e glutatona (GSH) é considerado como um reservatório intracelular de NO, bem como um transportador de NO (transnitrosação), expandindo a atividade biológica do NO. GSNO é o mais abundante *S*-nitrosotiol de baixo peso molecular e seu nível é regulado pela sua produção ou degradação. A produção depende da disponibilidade de NO e GSH e da presença de condições aeróbicas, que promovem sua reação (BRONIEWSKA *et al.*, 2013). Sua degradação pode ocorrer através de processos enzimáticos e não enzimáticos. Processos não enzimáticos incluem tratamento com luz UV, alta temperatura ou condições alcalinas e o mecanismo de remoção enzimática é realizado pela enzima *S*-nitrosoglutationa redutase (GSNOR) (SAKAMOTO *et al.*, 2002; ACHKOR *et al.*, 2003), a qual catalisa a redução de GSNO dependente de NADH, levando à formação glutatona oxidada (GSSG) e NH₃ (BARROSO *et al.*, 2006; CORPAS *et al.*, 2008; LETERRIER *et al.*, 2011). Promovendo a remoção de GSNO, GSNOR exerce um papel fundamental no metabolismo de ERN, regulando os níveis intracelulares de NO e controlando a *S*-nitrosilação (FRUNGILLO *et al.*, 2014). Além disso, a reação é irreversível e seus produtos são incapazes de nitrosar proteínas celulares (STAAB *et al.*, 2008).

Plantas mutantes de *A. thaliana* defectivas em GSNOR (*gsnor1-3*) e que consequentemente, apresentam níveis de RSNOs significativamente aumentados, foram utilizadas para investigar a relação do NO com fitormônios, os parâmetros fisiológicos e as implicações da *S*-nitrosilação nesses processos. Shi *et al.* (2015), utilizando os mutantes *gsnor1-3*, investigaram o papel da *S*-nitrosilação na fisiologia da auxina em plantas de *Arabidopsis*. Comparando as plantas mutantes com o grupo funcional, evidenciaram que a sinalização, transporte polar e distribuição da auxina foram comprometidos, entretanto não

foram completamente anulados, sugerindo que esses processos podem ser regulados pela *S*-nitrosilação de componentes envolvidos na sinalização e transporte da auxina. Wang *et al.* (2015) verificaram que a sinalização do ABA em células-guarda foi prejudicada nos mutantes *gsnor1-3* mediante a *S*-nitrosilação da subfamília de proteínas quinases relacionadas à sacarose não fermentativa-1 (OST1/SnRK2.6), cruciais no controle da abertura estomática induzidas pelo ABA (ZHENG *et al.*, 2010).

Hu *et al.* (2015) analisaram o nível de proteínas *S*-nitrosiladas no mutante de *A. thaliana gsnor1-3*, comparando-o com o tipo selvagem. Foram detectados uma maior quantidade de proteínas *S*-nitrosiladas nos mutantes, em consequência ao aumento de ERN. Coerentemente, os mutantes apresentaram diminuição no conteúdo de clorofila e alteração nos parâmetros fotossintéticos, evidenciando a importância do controle da *S*-nitrosilação. Os mutantes para sensibilidade à altas temperaturas (*hot5*) e resistência ao herbicida paraquat (*par2*) também são alélicos para *gsnor1*. Semelhante aos mutantes *gsnor1-3*, apresentam elevado acúmulo de NO, resultando em fenótipos pleiotrópicos, com desenvolvimento anormal nos estágios reprodutivos e vegetativos (LEE *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009; KWON *et al.*, 2012).

Diversos estudos indicaram que o NO pode sequestrar ERO e proteger as células vegetais de danos oxidativos, enquanto outros têm demonstrado que o NO estimula a produção de ERO ou que ambos interagem durante a morte celular (CLARK *et al.*, 2000; DELLEDONNE *et al.*, 2001; BELIGNI *et al.*, 2001; DE PINTO *et al.*, 2002) e nas respostas de defesa (WANG & WU, 2005).

Tem sido averiguado também que a aplicação exógena de NO melhora a tolerância à salinidade, toxicidade por metais, temperaturas extremas e estresse hídrico em diferentes espécies de plantas (SEABRA & OLIVEIRA, 2016). O uso de doadores de NO é uma opção para a investigação das funções biológicas dessa molécula em plantas sob condições ambientais adversas (ZHENG *et al.*, 2009). O tratamento de sementes de trigo com nitroprussiato de sódio (SNP, um doador de NO) reverteu os efeitos inibitórios do estresse induzido pelo cobre na germinação, por promover um aumento na atividade SOD e CAT e reduzir o conteúdo de H₂O₂ e de malondialdeído (MDA) (HU *et al.*, 2007). Efeito similar foi observado em folhas de plantas de arroz submetidas ao estresse por cobre, já que o tratamento com doador de NO também reduziu o conteúdo de MDA e promoveu um aumento da atividade de enzimas detoxificantes de ERO (YU *et al.*, 2005).

Foi constatado por Zhang *et al.* (2009) que a aplicação de SNP em mudas de tomate cultivadas sob condição de estresse induzido por Cu, promoveu um aumento significativo na

atividade das enzimas APX, SOD e POD, reduzindo o conteúdo de H₂O₂ e os efeitos inibitórios do Cu no crescimento e na atividade das enzimas H⁺-ATPases. Hu *et al.* (2015) também confirmaram a atenuação do efeito inibitório do Cu no crescimento de mudas de cevada, mediante a aplicação de SNP, protegendo as plantas do dano oxidativo em função do aumento das atividades antioxidantes enzimáticas (SOD, GR, CAT e APX).

Em mudas de *Lolium perenne* L. (azevém) o tratamento com SNP melhorou os parâmetros fisiológicos alterados pelo excesso de cobre em solução hidropônica, aumentou o conteúdo de clorofila, a fotossíntese e a atividade enzimática antioxidante (SOD, CAT, POD e APX), levando a diminuição do dano oxidativo e do acúmulo de Cu nas folhas (DONG *et al.*, 2014). Khairy *et al.* (2016) observaram que a suplementação de SNP em plantas de *Nicotiana tabacum* (tabaco) cultivadas *in-vitro* sob a toxicidade causada pelo Cd e Cu, aumentou a massa fresca e o conteúdo de clorofilas totais, além do conteúdo e atividades da ribulose-1,5-bisfosfato-carboxilase/oxigenase (RuBisCo) e RuBisCo activase.

2.6 NANOTECNOLOGIA NA AGRICULTURA

A nanotecnologia controla e reestrutura a matéria para que a mesma passa a exibir novos fenômenos, possibilitando seu uso em novas aplicações (LINDQUIST *et al.*, 2010). O desenvolvimento da nanotecnologia proporcionou inovações para quase todos os campos industriais com profundo impacto na vida humana (LINKOV *et al.*, 2011). De acordo com a lei da União Europeia, a definição aceitável de “nanomaterial” é: “um material natural, incidental ou manufacturado contendo partículas, em estado não ligado ou agregado ou aglomerado e onde, para 50% ou mais das partículas na distribuição em tamanho, uma ou mais dimensões externas esteja na faixa de tamanho de 1-100 nm” (EUROPEAN COMMISSION, 2011).

As nanopartículas possuem uma grande área de superfície, permitindo manifestar algumas características exclusivas inerente ao tamanho reduzido e que estão ausentes em materiais a granel ou partículas maiores (Lee *et al.*, 2015). Nesse sentido, alguns autores consideram que a definição de nanopartículas não está necessariamente limitada ao tamanho exato das partículas, mas sim se as nanopartículas têm propriedades diferentes em comparação com as não-nanopartículas do mesmo material (Lee *et al.*, 2015).

Esta tecnologia evidenciou aplicações amplas e notáveis em diversas áreas, como eletrônicos, medicamentos, cosméticos, têxteis, ciência alimentar, setor de energia e agricultura (CARUTHERS *et al.*, 2007; SHARON *et al.*, 2010; SASTRY *et al.*, 2011). O

crescimento populacional gera uma demanda por maiores rendimentos agrícolas e estratégias mais efetivas para otimizar as práticas agrícolas (GOGOS *et al.*, 2012). As propriedades únicas dos materiais em nanoescala os fazem candidatos adequados para desenvolver projetos e novas técnicas em função de uma agricultura mais sustentável (FRACETO *et al.*, 2016).

A agricultura pode se beneficiar com o desenvolvimento de sistemas carreadores capazes de melhorar a estabilidade físico-química de agroquímicos, bem como o a liberação modificada para tais ingredientes ativos, ajudando a fornecê-los no momento e lugar certos, reduzindo a ação de agentes externos e minimizando as perdas por degradação, lixiviação e volatilização, além das ações indesejadas sobre os organismos não alvo. O efeito esperado deve ser uma redução na quantidade de substâncias químicas ativas incorporadas nas plantas e nos solos, atenuando o impacto negativo no meio ambiente (PASCOLI *et al.*, 2018).

Embora vários estudos tenham destacado importantes papéis fisiológicos do NO endógeno nas plantas, o uso de NO exógeno na agricultura ainda é muito limitado. A aplicação de doadores de NO em plantas pode resultar em várias vantagens para a agricultura, e precisa ser mais explorada em um futuro próximo (SEABRA *et al.*, 2014). Estudos demonstram a ação benéfica do NO em plantas sob estresse induzido por cobre (HU *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2016; PETÓ *et al.*, 2013), porém, o tratamento direto das plantas com NO é tecnicamente difícil, dada a natureza gasosa do NO (VITOR *et al.*, 2013). Além disso, doadores de NO são compostos relativamente instáveis que podem ter sua decomposição acelerada pela ação de altas temperaturas e exposição à luz, levando a uma rápida liberação de NO, o que pode resultar em efeitos tóxicos e redução da eficácia (SEABRA & DURÁN, 2010; SEABRA *et al.*, 2015a).

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 há muito tempo explorada em aplicações biomédicas, evidenciando o efeito benéfico da associação do doador de NO com nanomateriais (SEABRA & DURÁN, 2010; CARDOZO *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2014; SEABRA *et al.*, 2015a e 2015b). A caracterização do doador de NO S-nitroso-N-acetylpenicillamine nanoencapsulado com lipossomos foi descrita por Koehler *et al.* (2008), tendo como vantagem a possibilidade da liberação de NO ser fotoestimulada e dinamicamente modulada nos níveis biológicos.

Nanopartículas de sílica foram demonstradas por Hetrick *et al.* (2008), como sendo um eficiente sistema de liberação controlada de NO contra *Pseudomonas aeruginosa* e sem efeito tóxico em células fibroblasto humanas. Oliveira *et al.* (2016) demonstraram que nanopartículas

contendo o doador de NO ácido *S*-nitroso-mercaptosuccínico (*S*-nitroso-MSA) foram mais efetivas na proteção de plantas de milho sob estresse salino do que o mesmo doador sem a nanoencapsulação, liberando o NO de forma gradativa, o que prolongou sua ação sobre as plantas de milho. A liberação gradual e em baixas concentrações do NO em função da associação com nanopartículas pode garantir o efeito protetor do NO na manutenção das funções regulatórias e antioxidantes, impedindo sua liberação em altas concentrações potencialmente tóxicas para as plantas (SEABRA *et al.*, 2014).

A quitosana, um polissacarídeo natural, é considerada o biomaterial mais importante após a celulose em termos de utilização e distribuição (MINCEA *et al.*, 2012). É produzida pela desacetilação da quitina (NAGPAL *et al.*, 2010; RIDOLFI *et al.*, 2012), elemento estrutural encontrado no exoesqueleto de crustáceos, como camarões, lagostas e caranguejos, ou de ocorrência natural em alguns microrganismos, como fungos (ILLUM *et al.*, 2001). Esse material tem várias aplicações devido às suas propriedades, como biodegradabilidade e biocompatibilidade, que aumenta o transporte de compostos polares ativos através das superfícies epiteliais em diversas aplicações biológicas (DUTTA *et al.*, 2004). A quitosana possui também propriedades mucoadesivas, facilitando o transporte desses compostos ativos através das membranas celulares, o que implica um grande potencial para uso na indústria agroquímica (HARISH PRASHANTH & THARANATHAN, 2007), além de ser considerada um excelente biopolímero para preparação de micro e nanopartículas (SUNDAR *et al.*, 2010). Entre os vários métodos desenvolvidos para preparar nanopartículas de quitosana, a gelificação iônica usando tripolifosfato de sódio (TPP) é prático, porque o processo é relativamente fácil de controlar e não requer o uso de solventes orgânicos (AGNIHOTRI *et al.*, 2004; FAN *et al.*, 2012).

Um sistema de produção sustentável e eficiente com auxílio da nanotecnologia pode ser uma excelente estratégia para fazer uma revolução nas práticas agrícolas convencionais e, assim, reduzir os impactos negativos no meio ambiente bem como melhorar a qualidade e a produtividade (SEKHON, 2014; LIU & LAL, 2015). Entretanto, alguns obstáculos ainda dificultam o uso de sistemas nanoestruturados na agricultura, como ausência de marcos regulatórios específicos para avaliações de risco ecológico (WALKER *et al.*, 2017) e a percepção do mercado agrícola quanto ao potencial dos nanomateriais (KAH, 2015). O custo de produção de nanomateriais também é crucial, mas estudos promissores, particularmente utilizando polímeros naturais, indicam que os nanomateriais podem ser obtidos em grandes quantidades a baixo custo (PÉREZ-DE-LUQUE, 2017).

3. MATERIAL E MÉTODOS GERAL

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO SOLO

O experimento foi realizado em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Biologia Animal e Vegetal da Universidade Estadual de Londrina (UEL), situada na cidade de Londrina – PR. O solo utilizado como substrato para os experimentos foi coletado na camada de 10-20 cm, em uma área de pousio localizada na Fazenda Escola da UEL, Estado do Paraná, Brasil, nas coordenadas 23°20'28'' S e 51°12'36'' W, e 550 m de altitude. Após a secagem ao ar, o solo foi homogeneizado e peneirado em malha de 2 mm. Ele é classificado como Latossolo Vermelho Escuro eutroférico (EMBRAPA, 2013). Na tabela 1 são apresentados os atributos químicos e físicos do solo utilizado como substrato.

Tabela 1. Atributos químicos e físicos do solo utilizado como substrato.

pH (CaCl ₂)	P (Mehlich) mg dm ⁻³	MO	C	NT	K	Ca	Mg	H + Al	Al	V	CTC (pH 7,0)	CTC (Efetiva)
		-----g dm ⁻³ -----			-----Cmol _c dm ⁻³ -----					-----%-----		
5,0	7,6	28,2	16,4	1,3	0,65	4,0	1,8	4,6	0,04	58,2	11,0	6,4
			Cu	Fe	Mn	Zn						
			-----mg dm ⁻³ -----									
			11,2	17,8	48,6	5,3						
% Areia (Total)		% Silte (Total)		% Argila (Total)			Classe Textural					
6,85		15,35		77,80			Muito Argilosa					

Legenda. MO = Matéria orgânica; C = Carbono; NT = Nitrogênio total; (H + Al) = Acidez potencial; V = Saturação por bases; CTC = Capacidade de troca catiônica.

3.2 MATERIAL VEGETAL E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Foram utilizadas sementes de soja (*Glycine max* L. Merr.) de uma cultivar convencional (BRS 257), com plantio recomendado para a macrorregião centro-sul do Brasil. Possui hábito de crescimento determinado, teores médios de 40,6% de proteína e 22,6% de óleo; altura de plantas de 60 a 89 cm; peso médio de 100 sementes de 14,4 g, com ciclo de 122-128 dias para altitudes entre 500-700 m (EMBRAPA, 2014). Foram utilizados vasos plásticos de 1,16 L (10,5 cm de altura x 14,5 cm de diâmetro superior) com aproximadamente 0,753 kg de solo. Foram semeadas quatro sementes por vaso, permanecendo quatro plantas para condução dos experimentos, sendo mantidas em casa de vegetação sob condições naturais de luz e temperatura.

3.3 VARIÁVEIS MORFOLÓGICAS

As variáveis morfológicas avaliadas foram obtidas ao final do período de condução dos experimentos. Para o comprimento da parte aérea (CPA), o valor da repetição foi composto pela média das quatro plantas do vaso. Para as variáveis comprimento do sistema radicular (CSR), área foliar (AF), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca do sistema radicular (MSR), os valores das repetições foram compostos pela média de duas plantas do vaso. As outras duas plantas foram utilizadas para obtenção do material vegetal para determinação das variáveis bioquímicas.

A CPA foi medida com auxílio de uma régua graduada do nível do solo até o meristema apical. Para avaliação do CSR, as unidades experimentais foram colocadas em um recipiente de plástico com água e, sob leve agitação e manuseio, as plantas foram removidas do substrato sem danificação das raízes e posteriormente seu comprimento total foi medido com auxílio da régua graduada. Para medir a AF, foi utilizado um medidor de área foliar portátil (LI-COR[®] Biosciences, Lincoln, EUA), modelo LI-3000C, acoplado em uma esteira de mesa onde as folhas destacadas eram inseridas e a área determinada ao passar pela câmara de medição. Para determinação da massa seca, o material vegetal foi separado em caules e folhas (MSPA) e raízes (MSR). Após serem acondicionados individualmente em sacos de papel, foram levados à estufa a 60°C até peso constante, e em seguida, pesados em balança semi-analítica com precisão de 0,005 g.

3.4 VARIÁVEIS FISIOLÓGICAS

As variáveis fisiológicas avaliadas foram obtidas no início da última semana do período de condução dos experimentos. As plantas de soja se encontravam no estágio fenológico V2 para V3, com o primeiro trifólio completamente desenvolvido e o segundo trifólio em expansão. Foi marcada uma planta com fita adesiva para realizar as avaliações da fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas, utilizando-se o folíolo central do primeiro trifólio. A planta escolhida era um exemplar representativo de toda unidade experimental. As variáveis de fluorescência da clorofila *a* foram medidos em folhas intactas utilizando um fluorímetro OS1p (Opti-Sciences, Hudson, NH, EUA). O rendimento quântico máximo do fotossistema II foi determinado antes do amanhecer pela relação F_v/F_m e a atividade potencial pela relação F_v/F_o , em folhas adaptadas ao escuro durante 15 minutos, onde F_v é a fluorescência variável, F_m é a fluorescência máxima e F_o a fluorescência basal. O rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{II}) obtido através da fórmula: $\Phi_{II} = \Delta F/F_m' = (F_m' - F)/F_m'$ onde F e F_m' são a

fluorescência basal e máxima da clorofila, respectivamente, medida em folhas adaptadas à luz, por volta das 10:30 hs em dia com sol pleno. A taxa relativa de transporte linear de elétrons pelo fotossistema II (rETR) foi calculada como $rETR = \Delta F / F_m' \times PAR \times 0,5 \times 0,84$; em que PAR é a radiação fotossinteticamente ativa, 0,5 a partição da luz entre o fotossistema I e fotossistema II e 0,84 o coeficiente de absorção da folha (BAKER, 2008).

As avaliações relacionadas com as trocas gasosas foram feitas das 9:00 às 11:30 hs utilizando-se um analisador portátil de gás por infravermelho (Irga), (LI-COR[®] Biosciences, Lincoln, EUA), modelo LI-6400 XT, conectado a uma câmara de 6 cm², ajustada para uma PAR saturante (1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Foram determinadas as taxas de fotossíntese líquida (*A*) e transpiração (*E*), além da condutância estomática (*g_s*) e a razão entre a concentração interna e ambiente de CO₂ (*C_i/C_a*), seguindo o método descrito por Vu *et al.* (1986). Foram calculados a eficiência do uso da água (EUA) pela razão *A/E* e a eficiência instantânea de carboxilação (*k*) por meio da razão (*A/C_i*).

Para determinação dos pigmentos fotossintéticos, 100 mg de folhas do primeiro trifólio foram macerados em nitrogênio líquido e transferidos para tubos do tipo falcon envoltos em papel alumínio contendo 10 mL de solução de acetona 80 % (v/v) em tampão fosfato de sódio 2,5 mM (pH 7,8). Posteriormente, os extratos foram centrifugados a 1800 xg por 5 minutos, utilizando-se uma centrífuga (Centribio, Xangai, China), modelo 80-2b. O sobrenadante foi separado em tubos do tipo *eppendorf* também no gelo e as leituras das absorbâncias das amostras foram realizadas nos comprimentos de onda 663,2; 646,8 e 470 nm no espectrômetro Genesys 10S UV-Vis (Thermo Scientific, Waltham, EUA). As concentrações de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides foram calculadas utilizando-se as fórmulas propostas por Lichtenthaler e Buschmann (2001). Foram calculados o teor de clorofilas totais (somando as clorofilas *a* e *b*), a razão clorofila *a*/clorofila *b* e a razão clorofilas totais/carotenóides.

3.5 VARIÁVEIS BIOQUÍMICAS

O material vegetal utilizado para as análises bioquímicas foi retirado principalmente da planta utilizada nas medições fisiológicas, no período da manhã. Quando necessário, foi coletado também de uma segunda planta em cada repetição. Para todas as análises bioquímicas, foram utilizadas quatro repetições por tratamento. Aproximadamente 100 mg de folhas do primeiro trifólio e raízes laterais foram coletados e alocados separadamente por tratamento em envelopes de alumínio previamente identificados, imediatamente imersos em nitrogênio líquido e transferidos para biofreezer a -80°C até o momento das análises.

Parâmetros que indicam a ocorrência de estresse oxidativo foram mensurados através da determinação do conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o conteúdo de dienos conjugados e malondialdeído (MDA) como produtos da peroxidação lipídica. Para medir os dienos conjugados, 100 mg de folhas ou raízes foram coletados e macerados em cadinho com nitrogênio líquido, transferidos em seguida para um *ependorf* com 1 mL de etanol 96% e acomodados em caixa com gelo. Após centrifugação a 15.645 xg, a 4°C por 20 min, utilizando-se uma centrífuga refrigerada modelo universal 320 R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Alemanha), 75 μL do sobrenadante foram misturados em um volume de 1.425 μL de etanol 96% em *ependorf* (BOVERIS *et al.*, 1980). A leitura da absorbância do sobrenadante foi realizada em espectrômetro a 234 nm e a 500 nm. A diferença entre esses dois comprimentos de onda foi utilizada para o cálculo da concentração dos dienos conjugados, usando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 2,65 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Para quantificar o H_2O_2 e o MDA, 100 mg de folhas ou raízes foram coletados e macerados em cadinho com 1,4 mL de ácido tricloroacético (TCA 0,2%) diluído em metanol. Após centrifugação a 13.700 xg, a 4°C por 5 min, o sobrenadante foi utilizado para a dosagem de H_2O_2 , pela reação com iodeto de potássio em tampão fosfato (ALEXIEVA *et al.*, 2001) e o MDA determinado por TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), seguindo a metodologia descrita por Federici *et al.* (2007).

Para determinação das atividades das enzimas ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), peroxidases (POD) e superóxido dismutase (SOD), foram utilizados extratos enzimáticos brutos obtidos por meio da homogeneização de 100 mg de folhas ou raízes. Após a maceração em nitrogênio líquido, foi adicionado 1 mL de tampão de extração, constituído de EDTA 1 mM em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,8), suplementado com polivinil-pirolidona (PVPP) 2% (p/v). O extrato foi centrifugado a 15.645 xg, a 4°C por 20 min, e o sobrenadante utilizado nas avaliações enzimáticas. O conteúdo de proteínas no sobrenadante foi determinado com o reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 da Bio-Rad, seguindo as especificações do fabricante.

A atividade da APX foi determinada de acordo com o método de Nakano e Asada (1981), com modificações para espécie. Aliquotas de 50 μL de extrato enzimático bruto foram adicionadas a 2,9 mL de um meio de reação constituído de 0,1 mM EDTA e 0,5 mM ácido ascórbico em tampão de fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0). Para cada amostra, foi feito um branco para zerar o espectrofotômetro, adicionando-se uma alíquota de 50 μL de extrato bruto em um meio de reação constituído apenas de 0,1 mM EDTA em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), sem a presença do ácido ascórbico. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 290 nm logo após a adição de 50 μL de H_2O_2 30 mM no meio de reação contendo ácido

ascórbico e medido durante os dois primeiros minutos. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

A atividade da CAT foi determinada segundo Aebi (1974) e Peixoto *et al.* (1999), com modificações para espécie. Alíquotas de 50 μL do extrato enzimático bruto foram adicionadas a 950 μL de um meio reação constituído de 0,1 mM EDTA e 12,5 mM H_2O_2 em tampão de fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0). Para cada amostra, foi feito um branco para zerar o espectrômetro, adicionando-se uma alíquota de 50 μL de extrato bruto em um meio de reação constituído apenas de 0,1 mM EDTA em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), sem a presença do H_2O_2 . O decréscimo da absorbância a 240 nm foi medido durante os três primeiros minutos da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (ANDERSON *et al.*, 1995).

A atividade da POD foi determinada segundo Peixoto *et al.* (1999), modificado para a espécie. Alíquotas de 20 μL do extrato enzimático bruto foram adicionadas a 3,58 mL de um meio de reação contendo pyrogallol 20 mM e H_2O_2 20 mM em tampão de fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8). Após 1 min, a reação foi parada com adição de 400 μL de H_2SO_4 , e a absorbância a 420 nm foi medida para quantificar a produção de purpurogalina. A atividade enzimática foi calculada usando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

A atividade da SOD foi determinada de acordo com Giannopolitis e Ries (1977), modificado para a espécie. Alíquotas de 20 μL de extrato enzimático bruto foram adicionadas a um meio de reação constituído de EDTA 0,1 mM, metionina 13 mM, riboflavina 2 μM e 75 μM NBT (Azul de nitrotetrazólio cloreto) em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8). A reação foi montada em tubos de ensaio, iniciando-se pela colocação dos tubos em uma câmara de iluminação, composta por uma caixa de isopor adaptada com três lâmpadas fluorescentes (75 W) e uma ventoinha cooler para não aumentar a temperatura durante a reação. Após 10 minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e o composto azul formado pela fotorredução do NBT (formazana) foi medido a 560 nm. Os tubos considerados brancos para a análise receberam 20 μL de extrato e os mesmos reagentes, porém foram envoltos com papel alumínio e permaneceram abrigados da luz e fora da caixa, sendo suas absorbâncias subtraídas da leitura da respectiva amostra que recebeu iluminação. O tubo que serviu de controle recebeu 20 μL de água destilada e os mesmos reagentes (na ausência de extrato) e foi colocado dentro da câmara de iluminação juntamente com as amostras. Uma unidade de SOD é definida como a atividade da enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT (em comparação com o controle).

REFERÊNCIAS

- ACHKOR, H.; DIAZ, M., FERNANDEZ, M. R.; BIOSCA, J. A.; PARES, X.; MARTINEZ, M. C. Enhanced formaldehyde detoxification by overexpression of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from *Arabidopsis*, **Plant Physiology**, Lancaster, v. 132, n. 4, p. 2248–2255, ago. 2003.
- AEBI H. In: Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**. Colowick, S,P; Kaplan, N. O. editors. Vol. 105. Florida: Acad. Press; 1984. pp. 114–121.
- AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M., Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery, **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 100, n. 1, p. 5–28, nov. 2004.
- ALEXIEVA, V; SERGIEV, I; MAPELLI, S; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 1337-1344, dez. 2001.
- ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1331- 1341, mai. 2002.
- ANDERSON, M. D.; PRASAD, T. K. STEWART, C. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology**, Lancaster v. 109, n. 4, p. 1247-1257, dez. 1995
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, jan. 2004.
- ARASIMOWICZ, M.; FLORYSZAK-WIECZOREK, J. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. **Plant Science**, Limerick, v. 172, n.5, p. 876-887, maio. 2007.
- ARORA, A.; SAIRAM, R. K.; SRIVASTAVA, G. C. Low temperature and oxidative stress. **Current Science**, Columbus, v. 82, n. 2, p. 1227-1238, jul. 2002.
- ASADA K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 141, n. 2, p. 391–396, jun. 2006.
- ASTIER, J.; LINDERMAYR, C. Nitric oxide-dependent posttranslational modification in plants: an update. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 13, n. 11, p. 15193–15208, nov. 2012.
- ASTIER, J.; RASUL, S.; KOEN, E.; MANZOOR, H.; BESSON-BARD, A.; LAMOTTE, O.; JEANDROZ, S.; DURNER, J.; LINDERMAYR, C.; WENDEHENNE, D. *S-nitrosylation: an emerging post-translational protein modification in plants*. **Plant Science**, Shannon, v. 181, n. 5, p. 527-533, nov. 2011.

BAKER, N. R. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 89–113, jun. 2008.

BARROSO, J. B.; CORPAS, F. J.; CARRERAS, A.; RODRÍGUEZ-SERRANO, M.; ESTEBAN, F. J.; FERNÁNDEZ-OCAÑA, A.; CHAKI, M.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; VALDERRAMA, R.; SANDALIO, L. M.; DEL RÍO, L. A. Localization of *S*-nitrosoglutathione and expression of *S*-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 8, p. 1785-1793, 2006.

BAUDOIN, E. The language of nitric oxide signaling. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 13, n. 2, p. 233–242, mar. 2011

BELIGNI, M. V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide: a non-traditional regulator of plant growth. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 6, n. 11, p. 508–509, nov. 2001.

BESSON-BARD, A.; PUGIN, A.; WENDEHENNE, D. New insights into nitric oxide signaling in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 21-39, jun. 2008.

BHARGAVA, A.; CARMONA, F. F.; BHARGAVA, M.; SRIVASTAVA, S. Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. **Journal of Environmental Management**. New York, v. 105, p. 103-120, ago. 2012.

BOEREMA, A.; PEETERS, A.; SWOLFS, S.; VANDEVENNE, F.; JACOBS, S.; STAES, J.; MEIRE, P. Soybean Trade: Balancing Environmental and Socio-Economic Impacts of an Intercontinental Market. **Plos One**, Iowa, v. 11, n. 5, e0155222, mai. 2016.

BOVERIS, A.; CADENAS, E.; CHANCE, B. Low-level chemi-luminescence of the lipooxygenase reaction. **Photobiochem Photobiophys**, v.1, p. 175–182, 1980.

BRIGHT, J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. T.; WEIR, I. S.; NEILL, S. J. ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. **The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 45, n.1, p. 113–122, jan. 2006.

BRONIOWSKA, K. A.; DIERS, A. R.; HOGG, N. *S*-Nitrosoglutathione. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1830, n. 5, p. 3173–3181, mai. 2013.

BRONIOWSKA, K. A.; HOGG, N. The chemical biology of *S*-nitrosothiols. **Antioxidants & Redox Signaling**, Larchmont, v. 17, n. 7, p. 969-980, out. 2012.

BURKHEAD, J.L; GOGOLIN REYNOLDS, K.A.; ABDEL-GHANY, S.E; COHU, C.M; PILON, M. Copper homeostasis. **New Phytologist**, Lancaster, v. 182, n. 4, p. 799-816, apr. 2009.

CAMBROLLÉ, J.; MATEOS-NARANJO, E.; REDONDO-GÓMEZ, S.; LUQUE, T.; FIGUEROA, M. E. Growth, reproductive and photosynthetic responses to copper in the yellow-horned poppy *Glaucium flavum* Crantz. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 71, p. 57-64, abr. 2011.

- CARDOZO, V. F. et al. Evaluation of antibacterial activity of nitric oxidereleasing polymeric particles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* from bovine mastitis, **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 473, n. 1-2, p. 20-29, out. 2014.
- CARUTHERS, S. D.; WICKLINE, S. A.; LANZA, G. M. Nanotechnological applications in medicine. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 18, n.1, p. 26–30, fev. 2007.
- CHEN, B.; STEIN, A.F.; CASTELL, N.; GONZALEZ-CASTANEDO, Y.; DE LA CAMPA, A.S.; DE LA ROSA, J.D. Modeling and evaluation of urban pollution events of atmospheric heavy metals from a large Cu-smelter. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 539, p. 17–25, jan. 2016.
- CHEN, Y. J.; KU, W. C.; LIN, P. Y.; CHOU, H. C.; KHOO, K. H.; CHEN, Y. J. *S*-alkylating labeling strategy for site-specific identification of the *s*-nitrosoproteome. **Journal of Proteome Research**, Whashington, DC, v. 9, n. 12, p. 6417–6439, 2010.
- CHENG, J.; ZHANG, X.; TANG, Z.; YANG, Y.; NIE, Z.; HUANG, Q. Concentrations and human health implications of heavy metals in market foods from a Chinese coal-mining city. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 50, p. 37-44, mar. 2017.
- CLARK, D.; DURNER, J.; NAVARRE, D. A.; KLESSIG, D. F. Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v.13, n. 12, p. 1380–1384, set. 2000.
- CORPAS, F. J, CHAKI, M.; FERNÁNDEZ-OCAÑA, A.; VALDERRAMA, R.; PALMA, J. M.; CARRERAS, A.; BEGARA-MORALES, J. C.; AIRAKI, M.; DEL RÍO, L. A.; BARROSO, J. B. Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. **Plant & Cell Physiology**, Kyoto, v.49, n. 1, p. 1711–1722, nov. 2008.
- CORPAS, F. J.; ALCHE, J. D.; BARROSO, J. B. Current overview of *S*-nitrosoglutathione (GSNO) in higher plants. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, 126. 2013.
- CORPAS, F. J.; CHAKI, M.; FERNANDEZ-OCANA, A.; VALDERRAMA, R.; PALMA, J. M.; CARRERAS, A.; BEGARA-MORALES, J. C.; AIRAKI, M.; DEL RÍO, L. A.; BARROSO, J. B. Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. **Plant & Cell Physiology**, Kyoto, v. 49, n. 11, p. 1711-1722, nov. 2008.
- CORPAS, F. J.; LETERRIER, M.; VALDERRAMA, R.; AIRAKI, M.; CHAKI, M.; PALMA, J. M.; BARROSO, J. B. Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. **Plant Science**, Shannon, v. 181, n. 5, p.604–611, nov. 2011.
- DEL RÍO, L. A.; CORPAS, F. J.; BARROSO, J. B. Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. **Phytochemistry**, London, v. 65, n. 7, p. 783–792, abr. 2004.
- DELLEDONNE, M.; ZEIER, J.; MAROCCO, A.; LAMB, C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Whashington, D. C., v. 98, n. 23, p. 13454–13459, nov. 2001

DESIKAN, R.; GRIFFITHS, R.; HANCOCK, J.; NEILL, S. A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, D. C, v. 99, n. 25, p. 16314–16318, dez. 2002.

DONG, Y.; XU, L.; WANG, Q.; FAN, Z.; KONG, J.; BAI, X. Effects of exogenous nitric oxide on photosynthesis, antioxidative ability, and mineral element contents of perennial ryegrass under copper stress. **Journal of Plant Interactions**, Milton Park, v. 9, n. 1, p. 402-411, set. 2014.

DRESLER, S.; HANAKA A.; BEDNAREK, W.; MAKSYMIEC, W. Accumulation of low-molecular-weight organic acids in roots and leaf segments of *Zea mays* plants treated with cadmium and copper. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 36, n. 6, p.1565–1575, jun. 2014.

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

EC. European Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial. **Official Journal of the European Union**, Bruxelas, v. 275, p. 38-40, out. 2011.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 3 ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA/CNPq, 2013. 353p.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Cultivares de Soja Macrorregiões 1, 2 e 3 Centro-Sul**. Londrina: EMBRAPA/Fundação Meridional, 2014 60p.

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

FANCY, N. N.; BAHLMANN, A. K.; LOAKE, G. J. Nitric oxide function in plant abiotic stress. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 462-472, abr. 2017.

FARAHAT, E.; LINDERHOLM, H.W. 2015. The effect of long-term wastewater irrigation on accumulation and transfer of heavy metals in *Cupressus sempervirens* leaves and adjacent soils. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 512, p. 1–7, apr. 2015.

FARIAS, J. R. B. Limitações climáticas à obtenção de rendimentos máximos de soja. In: CONGRESSO DE LA SOJA DEL MERCOSUR, 5., 2011, Rosario. **Workshop...** Rosario: Mercosoja, 2011. p. 1 - 4.

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**, Lausanne, v. 7, 471, abr. 2016.

FEDERICI, G.; SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress and other physiological effects. **Aquatic toxicology**, Amsterdam, v.84, n.3, p. 415-430, jul. 2007.

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 PIN-FORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Whashington, D. C., v. 108, n. 45, p. 18506–18511, nov. 2011.

FOSTER, M. W., MCMAHON, T. J.; STAMLER, J. S. S-nitrosylation in health and disease. **Trends in Molecular Medicine**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 160-168, abr. 2003

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**, Lausanne, v. 4, 20, mar. 2016.

FRESCHI, L.; RODRIGUES, M. A.; DOMINGUES, D. S.; PURGATTO, E.; VAN SLUYS, M. A.; MAGALHAES, J. R.; KAISER, W. M.; MERCIER, H. Nitric oxide mediates the hormonal control of Crassulacean acid metabolism expression in young pineapple plants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 152, n. 4, p. 1971-1985, abr. 2010.

FRUNGILLO, L.; SKELLY, M. J.; LOAKE, G. J.; SPOEL, S. H.; SALGADO, I. S-nitrosothiols regulate nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. **Nature Communications**, London, v. 5, 5401, nov. 2014.

GAJEWSKA, E.; SKODOWSKA, M. Differential effect of equal copper, cadmium and nickel concentration on biochemical reactions in wheat seedlings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 73, n. 5, p. 996–1003, jul. 2010.

GAO, S. et al. Growth and antioxidant responses in *Jatropha curcas* seedling exposed to mercury toxicity. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 182, n. 1-3, p. 591-597, out. 2010.

GARG, N.; MANCHANDA, G. ROS generation in plants: Boon or bane? **Plant Biosystems**, Bologna, v. 143, n. 1, p. 81-96, abr. 2009.

GIANNOPOLITIS, C.N., RIES, S.K.; Superóxido dismutases. I. occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 59, n. 2, p. 309-314, fev. 1977.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, n. 12, p. 909-930, dez. 2010.

GOGOS, A.; KNAUER, K.; BUCHELI, T.D. Nanomaterials in plant protection and fertilization: current state, foreseen applications, and research priorities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 60, n. 39, p.9781–9792, set. 2012.

GOULD, N., DOULIAS, P. T.; TENOPOULOU, M.; RAJU, K.; ISCHIROPOULOS, H. Regulation of protein function and signaling by reversible cysteine *S*-nitrosylation. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 288, n. 37, p. 26473–26479, set. 2013.

GUPTA, K. J.; HINCHA, D. K.; MUR, L. A. J. NO way to treat a cold. **The New Phytologist**, London, v. 189, n. 2, p. 360–363, jan. 2011.

HABIBA, U.; ALI, S.; FARID, M.; SHAKOOR, M.B.; RIZWAN, M.; IBRAHIM, M.; ABBASI, G.H.; HAYAT, T.; ALI, B. EDTA enhanced plant growth, antioxidant defense system, and phytoextraction of copper by *Brassica napus* L. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, v. 22, n. 2, p.1534–1544, jan. 2015.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 4 ed., Oxford: Clarendon Press, 2006.

HAMZAH, A.; HAPSARI, R.I.; WISNUBROTO, E.I. Phytoremediation of cadmium contaminated agricultural land using indigenous plants. **International Journal of Environmental & Agriculture Research**, Bikaner, v. 2, n. 1, p. 8–14, jan. 2016.

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

HE, Y.; TANG, R. H.; HAO, Y.; STEVENS, R. D.; COOK, C. W.; AHN, S. M.; JING, L.; YANG, Z.; CHEN, L.; GUO, F.; FIORANI, F.; JACKSON, R. B.; CRAWFORD, N.M.; PEI, Z. M. Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. **Science**, New York, v. 305, n. 5692, 1968–1971, set. 2004.

HEGEDÜS, A.; ERDEI, S.; HORVÁTH, G. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. **Plant Science**, Shannon, v. 160, n. 6, p. 1085-1093, mai. 2001.

HESS, D. T.; MATSUMOTO, A.; KIM, S. O.; MARSHALL, H. E.; STAMLER, J. S. Protein *S* nitrosylation: purview and parameters. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, London, v. 6, n. 2, p. 150–166, fev. 2005.

HETRICK, E. M.; SHIN, J. H.; STASKO, N. A.; JOHNSON, C. B.; WESPE, D. A.; HOLMUHAMEDOV, E.; SCHOENFISCH, M. H. Bactericidal efficacy of nitric oxide-releasing silica nanoparticles. **American Chemical Society Nano**, Washington D.C, v. 2, n. 2, p. 235–246, fev. 2008.

HU, J.; HUANG, X.; CHEN, L.; SUN, X.; LU, C.; ZHANG, L.; WANG, Y.; ZUO, J. Site-specific nitrosoproteomic identification of endogenously *S*-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 167, n. 4, p. 1731-1746. abr. 2015.

HU, K. D.; HU, L. Y.; LI, Y. H.; ZHANG, F. Q.; ZHANG, H. Protective roles of nitric oxide on germination and antioxidant metabolism in wheat seeds under copper stress. **Plant Growth Regulation**, The Hague, v. 53, n. 3, p. 173-183, 2007.

HU, Y.; YOU, J.; LIANG, X. Nitrate reductase-mediated nitric oxide production is involved in copper tolerance in shoots of hullless barley. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 34, n. 3, p. 367-379, mar. 2015.

ILLUM, L.; JABBAL-GILL, I.; HINCHCLIFFE, M.; FISHER, A. N.; DAVIS, S. S. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 51, p. 81-96, set. 2001.

IQBAL, M.; IQBAL, N.; BHATTI, I.A.; AHMAD, N.; ZAHID, M. Response surface methodology application in optimization of cadmium adsorption by shoe waste: a good option of waste mitigation by waste. **Ecological Engineering: The Journal of Ecotechnology**, Oxford, v. 88, p. 265–275, mar. 2016.

JIMÉNEZ, A.; HERNÁNDEZ, J.A.; DEL RÍO, L.A.; SEVILLA, F. Evidence for the presence KAH, M. Nanopesticides and nanofertilizers: emerging contaminants or opportunities for risk mitigation? **Frontiers in chemistry**, Lausanne, v. 3, n. 64, p. 1-6, nov. 2015.

KHAIRY, A. I. H.; OH, M. J.; LEE, S. M.; KIM, D. S. ROCH, K. S. Nitric oxide overcomes Cd and Cu toxicity in in vitro-grown tobacco plants through increasing contents and activities of rubisco and rubisco activase. **Biochimie Open**, Amsterdam, v. 2, p. 41-51, mar. 2016.

KHAN, A.R.; WAQAS, M.; ULLAH, I.; KHAN, A.L.; KHAN, M.A.; LEE, I.J.; SHIN, J.H. Culturable endophytic fungal diversity in the cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their role in enhancing phytoremediation. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 135, p. 126–135, mar. 2017.

KHAN, M. N.; SIDDIQUI, M. H.; MOHAMMED, F.; NAEEM, M. Interactive role of nitric oxide and calcium chloride in enhancing tolerance to salt stress. **Nitric Oxide**, Orlando, v. 27, n. 4, p. 210–218, dez. 2012.

KHATUN, S.; ALI, M. B.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Copper toxicity in *Withania somnifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 3, p. 279-285, dez. 2008.

KIM, J.; SARAVANAKUMAR, G.; CHOI, H. W.; PARK, D.; KIM, W. J. A platform for nitric oxide delivery. **Journal of Materials Chemistry B**, Cambridge, v. 2, n. 4, p. 341–356, out. 2014

KOEHLER, J. J.; ZHAO, J.; JEDLICKA, S. S.; PORTERFIELD, D. M.; RICKUS, J. L. Compartmentalized nanocomposite for dynamic nitric oxide release. **The Journal of Physical Chemistry. B**, Whashington D. C., v.112, n. 47, p. 15086–15093 nov. 2008.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 24, n. 68, p. 223-253, 2010.

KOLBERT, Z.; ORTEGA, L.; ERDEI, L. 2010. Involvement of nitrate reductase (NR) in osmotic stress-induced NO generation of *Arabidopsis thaliana* L. roots. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 167, n. 1, p. 77-80, jan. 2010.

- KOVACS, I.; LINDERMAYR, C. Nitric oxide-based protein modification: formation and site-specificity of protein *S*-nitrosylation. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v.4, 137, mai. 2013.
- KWON, E.; FEECHAN, A.; YUN, B. W.; HWANG, B. H.; PALLAS, J. A.; KANG, J. G.; LOAKE, G. J. *AtGSNOR1* function is required for multiple developmental programs in *Arabidopsis*. **Planta**, Berlin, v. 236, n. 3, p. 887–900, set. 2012.
- LEE, B. K.; YUN, Y. H.; PARK, K. Smart Nanoparticles for Drug Delivery: Boundaries and Opportunities. **Chemical Engineering Science**, Oxford, v. 125, p. 158-164, mar. 2015
- LEE, U.; WIE, C.; FERNANDEZ, B. O.; FEELISCH, M.; VIERLING, E. Modulation of nitrosative stress by *S*-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 20, n. 3, mar. 2008.
- LETERRIER, M., CHAKI, M., AIRAKI, M., VALDERRAMA, R., PALMA, J. M., BARROSO, J. B., CORPAS, F. J. Function of *S*-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 6, n. 6, p. 789-793, jun. 2011.
- LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, New York, p. 1-8, nov. 2001.
- LIN, A.; WANG, Y.; TANG, J.; XUE, P.; LI, C.; LIU, L.; HU, B.; YANG, F. Nitric oxide and Protein *S*-nitrosylation are integral to hydrogen peroxide-induced leaf cell death in rice. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 158, p. 451–464, jan. 2012
- LIN, C. C.; JIH, P. J.; LIN, H. H.; LIN, J. S.; CHANG, L. L.; SHEN, Y. H.; JENG, S. T. Nitric oxide activates superoxide dismutase and ascorbate peroxidase to repress the cell death induced by wounding. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 77, p. 235–249, jul. 2011.
- LINDERMAYR, C.; DURNER, J. *S*-Nitrosylation in plants: pattern and function. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 73, n. 1, p. 1-9, nov. 2009.
- LINDQUIST, E. L.; MOSHER-HOWE, K. N.; LIU, X. Nanotechnology. What is it good for? (Absolutelyeverything): a problem definition approach. **The Review of Policy Research**, Knoxville, v. 27, n. 3, p. 255–271, mai. 2010.
- LINKOV, I.; BATES, M. E.; CANIS, L. J.; SEAGER, T. P.; KEISLER, J. M. A decision-directed approach for prioritizing research into the impact of nanomaterials on the environment and human health. **Nature Nanotechnology**, London, v. 6, p. 784–787, out. 2011.
- LIU, R.; LAL, R. Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. **The Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 514, p. 131–139, mai. 2015.

LOMBARDO, M. C.; LAMATTINA, L. Nitric oxide is essential for vesicle formation and trafficking in Arabidopsis root hair growth. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 13, p. 4875-4885, ago. 2012.

MARQUES, A. P. G. C.; RANGEL, A. O. S. S.; CASTRO, P. M. L. Remediation of heavy metal contaminated soils: phytoremediation as a potentially promising clean-up technology. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, Boca Raton, v. 39, n. 8, p. 622–654, ago. 2009.

MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. 2 ed. London, Academic Press, 1995, p. 889.

MDIC. Ministério da Economia, Indústria, Comércio Exterior e Serviços. **Estatísticas de Comércio Exterior**. Brasília D.F: MDIC, 2019. Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/comercio-exterior/estatisticas-de-comercio-exterior/>>. Acessado em: 05 abr. 2019.

METWALI, M.R.; GOWAYED, S.M.; AL-MAGHRABI, O.A.; MOSLEH, Y. Y. Evaluation of toxic effect of copper and cadmium on growth, physiological traits and protein profile of wheat (*Triticum aestivum* L.), maize (*Zea mays* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L.). **World Applied Sciences Journal**, Deira, v. 21, n. 3, p. 301–304, jan. 2013.

MINCEA, M.; NEGRULESCU, A.; OSTAFE, V. Preparation, modification, and applications of chitin nanowhiskers: a review. **Reviews on Advanced Materials Science**, St. Petersburg, v. 30, p. 225-242, jan. 2012.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 405-410, set. 2002.

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 15–19, jan. 2006.

MIYAKE, C.; ASADA, K. Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product the monodehydroascorbate radicals in thylakoids. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 33, n. 5, p. 541-553, jul. 1992.

MODOLO, L.V.; AUGUSTO, O.; ALMEIDA, I. M. G.; MAGALHÃES, J. R.; SALGADO, I. Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, Amsterdam, v. 579, n. 17, p. 3814–3820, jun. 2005.

MØLLER, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress. Electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 561–591, jun. 2001.

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

MURADOGLU, F.; GUNDOGLU, M.; ERCISLI, S.; ENCU, T.; BALTA, F.; JAAFAR, H.Z.; ZIA-UL-HAQ, M. Cadmium toxicity affects chlorophyll a and b content, antioxidant

enzyme activities and mineral nutrient accumulation in strawberry. **Biological Research**, Santiago, v. 48, n. 11, p. 1–7, fev. 2015.

NAGPAL, K.; SINGH, S. K.; MISHRA, D. N. Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 58, n. 11, p. 1423-1430, nov. 2010.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology, Oxford**, v. 22, n. 5, p. 867-880, nov. 1981

NEILL, S.J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.T. Nitric oxide signalling in plants. **The New Phytologist**, London, v. 159, n. 1, p. 11–35, jun. 2003.

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**, Orlando, v. 61. p. 10-19, dec. 2016.

OLIVEIRA, H. C.; JUSTINO, G. C.; SODEK, L.; SALGADO, I. Amino acid recovery does not prevent susceptibility to *Pseudomonas syringae* in nitrate reductase double-deficient *Arabidopsis thaliana* plants. **Plant Science**, Shannon, v. 176, n. 1, p. 105-111, jan. 2009.

OLIVEIRA, H. C.; SAVIANI, E. E.; OLIVEIRA, J. F. P.; SALGADO, I. Nitrate reductase-dependent nitric oxide synthesis in the defense response of *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 35, n. 2, p. 104-107, abr. 2010.

OLMOS, E.; MARTÍNEZ-SOLANO, J. R.; PIQUERAS, A.; HELLÍN, E. Early steps in oxidative burst induced by cádmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 381, p. 291-301, jan. 2003.

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 & Environment**, v. 3, n.3, p. 137-148, jun. 2018.

PEIXOTO, H.P.P.; CAMBRAIA, J.; SAN'T ANA, R.; MOSQUIM, P. R.; MOREIRA, A. M. Aluminium effects on lipid peroxidation and the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 11, n. 3, p. 137-43, 1999.

PETÖ, A.; LEHOTAI, N.; FEIGL, G.; TUGYI, N.; ORDOG, A.; GÉMES, K.; TARI, I.; ERDEI, L.; KOLBERT, Z. Nitric oxide contributes to copper tolerance by influencing ROS metabolism in *Arabidopsis*. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 32, n. 12, p. 1913-1923, dez. 2013.

PLANCHET, E., KAISER, W.M. Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 12, p. 3043-3055, ago. 2006.

PLANCHET, E.; GUPTA, K. J.; SONODA, M.; KAISER, W. M. Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. **The Plant Journal**, Oxford, v. 41, n. 5, p. 732-743, fev. 2005.

RADI, R. Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. **Accounts of Chemical Research**, Whashington, v. 46, n. 2, p. 550-559, fev. 2013.

RAFIQUE, N.; TARIQ, S.R. Distribution and source apportionment studies of heavy metals in soil of cotton/wheat fields. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 188, n. 309, p. 1-10, maio. 2016.

RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 123-130, abr. 2003.

RIDNOUR, L. A.; THOMAS, D. D.; MANCARDI, D.; ESPEY, M. G.; MIRANDA, K. M., PAOLOCCI, N.; FEELISH, M.; FUKUTO, J.; WINK, D. A. The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. **Biological Chemistry**, Berlin, v. 385, n. 1, p. 1-10, jan. 2004.

RIDOLFI, D. M.; MARCATO, P. D.; JUSTO, G. Z.; CORDID, L.; MACHADO, D.; DURAN, N. Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, Amsterdam, v. 93, p. 36-40, mai. 2012

RIZWAN, M.; ALI, S.; ABBAS, T.; REHMAN, M.Z.; HANNAN, F.; KELLER, C.; AL-WABEL, M.I.; OK, Y.S. Cadmium minimization in wheat: a critical review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 130, p. 43-53, ago. 2016

ROCKEL, P.; STRUBE, F.; ROCKEL, A.; WILDT, J.; KAISER, W. M. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.53, n. 366, p. 103-110, jan. 2002.

SAKAMOTO, A.; UEDA, M.; MORIKAWA, H. *Arabidopsis* glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase, **Federation of European Biochemical Societies Letters**, Amsterdam, v. 515, n. 1-3, p. 20-24, mar. 2002.

SANTISREE, P.; BHATNAGAR-MATHUR, P.; SHARMA, K. K. NO to drought-multifunctional role of nitric oxide in plant drought: Do we have all the answers? **Plant Science**, Limerick v. 239, p. 44-55, out. 2015.

SANTOS, T. L. Soja. In: CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A.; SESTARI, I. (Ed.). **Manual de Fisiologia Vegetal: Fisiologia de Cultivos**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2008. p. 158-175.

SARWAR, N.; SAIFULLAH.; MALHI, S. S.; ZIA, M. H.; NAEEM, A.; BIBI, S.; FARID, G. Role of plant nutrientes in minimizing cadmium accumulation by plant. **Journal of The Science of Food and Agriculture**, London, v. 90, n. 925e937, p. 1-13, mar. 2010.

SASTRY, R. K.; RASHMI, H. B.; RAO, N. H. Nanotechnology for enhancing food security in India. **Food Policy**, Guildford, v. 36, n. 3, p. 391–400, jun. 2011.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SEABRA, A. B.; DURÁN, N. Nitric oxide releasing vehicles for biomedical applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n.13, p.1624-1637, 2010.

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**, New York, v. 33, n. 6, p. 1370–1379, nov. 2015a.

SEABRA, A. B.; LIMA, R. DE; CALDERÓN, M. Nitric Oxide Releasing Nanomaterials for Cancer Treatment: Current Status and Perspectives. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 15, n. 4, p. 298-308, fev. 2015b.

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**, Springfield, v. 3, n. 4, p. 692-718, dez. 2016.

SEABRA, A. B.; RAI, M.; DURÁN, N. Nano carriers for nitric oxide delivery and its potencial applications in plant physiological process: A mini review. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, Berlin, v. 23, n. 1, p. 1-10, jan. 2014.

SEKHON, B. S Nanotechnology in agri-food production: an overview. **Nanotechnology, Science and Applications**, Auckland, v. 7, p. 31–53, mai. 2014.

SETH, D.; STAMLER, J. S. The SNO-proteome: causation and classifications. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 15, n.1, p. 129–136, fev. 2011.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, New York, v. 2012, p. 1-26, fev. 2012.

SHARON, M.; CHOUDHARY, A.; KUMAR, R. Nanotechnology in agricultural diseases and food safety. **Journal of Phytology**, Kerala, v. 2, n. 4, p. 83–92, 2010.

SHI, Y. F.; WANG, D. L.; WANG, C.; CULLER, A. H.; KREISER, M. A.; SURESH, J.; COHEN, J. D.; PAN, J.; BAKER, B.; LIU, J. Z. Loss of GSNOR1 Function Leads to Compromised Auxin Signaling and Polar Auxin Transport. **Molecular Plant**, Oxford, v. 8, n. 9, p. 1350-1365, sep. 2015.

SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M.; MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1305-1319, mai. 2002.

SHI-SHENG, K. Effects of Copper on the Photosynthesis and Oxidative Metabolism of *Amaranthus tricolor* Seedlings. **Agricultural Sciences in China**, Beijing, v.6, n.10, p.1182-1192, out. 2007.

SIMONTACCHI M.; GALATRO, A.; RAMOS-ARTUSO, F.; SANTA-MARÍA, G. E. 2015. Plant survival in a changing environment: The role of nitric oxide in plant responses to abiotic stress. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, 977, nov. 2015.

SINGH, S.; PARIHAR, P.; SINGH, R.; SINGH, V. P.; PRASAD, S. M. Heavy Metal Tolerance in Plants: Role of Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics, and Ionomics. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, n. 1143, p. 1-36, fev. 2016.

STAAB, C. A.; ÅLANDER, J.; BRANDT, M.; LENGQVIST, J.; MORGENSTERN, R.; GRAFSTRÖM, R. C.; HÖÖG, J. O. Reduction of S-nitrosoglutathione by alcohol dehydrogenase 3 is facilitated by substrate alcohols via direct cofactor recycling and leads to GSH-controlled formation of glutathione transferase inhibitors. **The Biochemical Journal**, London, v. 413, n. 3, p. 493-504, ago. 2008.

SUNDAR, S.; KUNDU, J.; KUNDU, S.C. Biopolymeric nanoparticles. **Science and Technology of Advanced Materials**, New York, v. 11, n.1, p. 1-13, fev. 2010.

TIECHER, T. L.; CERETTA, C. A.; FERREIRA, P. A. A.; LOURENZI, C. R.; TIECHER, T.; GIROTTO, E.; NICOLOSO, F. T.; SORIANI, H. H.; DE CONTI, L.; MIMMO, T.; CESCO, S.; BRUNETTO, G. The potential of *Zea mays* L. in remediating copper and zinc contaminated soils for grapevine production. **Geoderma**, Amsterdam, v. 262, p. 52-61, jan. 2016a.

TIECHER, T. L.; TIECHER, T.; CERETTA, C. A.; FERREIRA, P. A. A.; NICOLOSO, F. T.; SORIANI, H. H.; TASSINARI, A.; PARANHOS, J. T.; DE CONTI, L.; BRUNETTO, G. Physiological and nutritional status of black oat (*Avena strigosa* Schreb.) grown in soil with interaction of high doses of copper and zinc. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 106, p. 253-263, set. 2016b.

TORRES, M. A.; DANGL, J. L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, n. 4, p. 397-403, ago. 2005.

TUN, N.N.; SANTA-CATARINA, C.; BEGUM, T.; SILVEIRA, V.; HANDRO, W.; FLOH, E. I. S.; SCHERER, G. F. E. Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. **Plant & Cell Physiology**, Kyoto, v. 47, n. 3, p. 346-354, mar. 2006.

USDA. United States Department of Agriculture. **Oilseeds: World Markets and Trade**. Whashington D.C: Foreign Agricultural Service/USDA, office of global analysis, 2019. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/data/oilseeds-world-markets-and-trade>>. Acessado em: 01 abr. 2019.

VALDERRAMA, R.; CORPAS, F. J.; CARRERAS, A.; FERNÁNDEZ-OCAÑA, A.; CHAKI, M.; LUQUE, F.; GÓMEZ-RODRÍGUEZ, M. V.; COLMENERO-VAREA, P.; DEL

RÍO, L. A.; BARROSO, J. B. Nitrosative stress in plants. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, Amsterdam, v. 581, n. 3, p. 453–461, fev. 2007.

VITOR, S. C.; DUARTE, G. T. 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**, Heidelberg, v. 238, n. 3, p. 475–486, jun. 2013.

VU, J. C. V.; YELENOSKY, G; BAUSHER, M. G. CO₂ exchange rate, stomatal conductance and transpiration in attached leaves of Valencia orange. **HortScience**, Alexandria, v. 21 p. 143-144. 1986

WALKER, G. W.; KOOKANA, R. S.; SMITH, N. E.; KAH, M.; DOOLETTE, C. L.; REEVES, P. T.; LOVELL, W.; ANDERSON, D. J.; TURNEY, T. W.; NAVARRO, D. A. Ecological risk assessment of nano-enabled pesticides: a perspective on problem formulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 66, n. 26, p.6480-6486, jul. 2017.

WANG, J. W.; WU, J. Y. Nitric oxide is involved in methyl jasmonate-induced defense responses and secondary metabolism activities of *Taxus* cells. **Plant & Cell Physiology**, Kyoto, v. 46, n. 6, p. 923-930, jun. 2005.

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 of the United States of America**, Washington, DC, v. 112, n. 2, p. 613-618, 2015.

WHEELER D.M.; POWER, I.L. Comparison of plant uptake and plant toxicity of various ions in wheat. **Plant and Soil**, Boston, v.172, n. 2, p. 167–173, jun. 1995.

WILSON, I. D.; NEILL, S. J.; HANCOCK, J. T. Nitric oxide synthesis and signalling in plants. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 31, n. 5, p. 622-631, mai. 2008.

WOJTASZEK, P. Nitric oxide in plants – To NO or not to NO. **Phytochemistry**, London, v. 54, n. 1, p.1–4, mai. 2000.

XU, Y.; SUN, X.; JIN, J.; ZHOU, H. Protective effect of nitric oxide on light-induced oxidative damage in leaves of tall fescue. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 167, n. 7, p. 512–518, mai. 2014.

YEMETS, A. I.; KRASYLENKO, Y. A.; LYTVYN, D. I.; SHEREMET, Y. A.; BLUME, Y. B. Nitric oxide signalling via cytoskeleton in plants. **Plant Science**, Shannon, v. 181, n. 5, p. 545-554, nov. 2011.

YRUELA, I. Copper in plants: Acquisition, transport and interactions. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 36, n. 5, p. 409–430, maio. 2009.

YRUELA, I. Transition metals in plant photosynthesis. **Metallomics**, Cambridge v. 5, n. 9, p. 1090-1109, maio. 2013.

YU, C. C.; HUNG, K. T.; KAO, C. H. Nitric oxide reduces Cu toxicity and Cu-induced NH₄⁺ accumulation in rice leaves. **Journal of Plant Physiology** Stuttgart, v. 162, p. 1319-1330, fev. 2005.

YUN, B. W.; FEECHAN, A., YIN, M., SAIDI, N.B.; LE BIHAN, T.; YU, M.; MOORE, J. W.; KANG, J. G.; KNOW, E., SPOEL, S. H.; PALLAS, J. A.; LOAKE, G. J. S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. **Nature**, London, v. 478, n.7368, p. 264–268, out. 2011.

ZHANG, J.; GAO, X. Heavy metals in surface sediments of the intertidal Laizhou Bay, Bohai Sea, China: distributions, sources and contamination assessment. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 98, n. 1-2, p. 320–327, set. 2015

ZHANG, Y.; HAN, X.; CHEN, X.; JIN, H.; CUI, X. Exogenous nitric oxide on antioxidative system and ATPase activities from tomato seedlings under copper stress. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 123, p. 217-223, ago. 2009.

ZHAO, M. G.; CHEN, L.; ZHANG, L. L.; ZHANG, W. H. Nitric Reductase-Dependent Nitric Oxide Production Is Involved in Cold Acclimation and Freezing Tolerance in *Arabidopsis* **Plant Physiology**, Lancaster, v. 151, n. 2, p. 755–767, out. 2009.

ZHENG, C. F.; JIANG D.; LIU F. L.; DAI T. B.; LIU W. C.; JING Q.; CAO W. X. Exogenous nitric oxide improves seed germination in wheat against mitochondrial oxidative damage induced by high salinity. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 67, n. 5, p. 222–227, nov. 2009.

ZHENG, Z.; XU, X.; CROSLEY, R. A.; GREENWALT, S. A.; SUN, Y.; BLAKESLEE, B.; WANG, L.; NI, W.; SOPKO, M. S.; YAO, C.; YAU, K.; BURTON, S.; ZHUANG, M., MCCASKILL, D. G.; GACHOTTE, D.; THOMPSON, M.; GREENE, T. W. The protein kinase SnRK2.6 mediates the regulation of sucrose metabolism and plant growth in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 153, n. 1, p. 99-113, mai. 2010.

4. ARTIGO I

RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS INDUZIDAS POR COBRE EM PLANTAS DE SOJA

4.1 RESUMO

O cobre (Cu) é um micronutriente essencial para as plantas, mas pode tornar-se tóxico em altas concentrações. A ferrugem asiática da soja é a principal doença da cultura, estando presente em todas as regiões produtoras. É uma doença de difícil controle devido à resistência do patógeno (*Phakopsora pachyrhizi* Syd & Syd) aos fungicidas de ação sistêmica disponíveis no mercado. Nas últimas safras para contornar a resistência adquirida pelo fungo, estão sendo feita a associação de fungicidas cúpricos aos sistêmicos, estratégia que pode contribuir para o acúmulo de cobre nas regiões produtoras. Objetivou-se avaliar os efeitos induzidos pelo acúmulo de cobre (Cu) no solo em parâmetros bioquímicos e morfofisiológicos de plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merr. cv. BRS257). O experimento foi conduzido em casa de vegetação, seguindo um delineamento inteiramente casualizado. O ensaio foi composto pelo tratamento controle (teor natural de cobre no solo) e mais seis tratamentos com adição de cobre exógeno no solo (50, 100, 150, 200, 250 e 300 ppm) em dez repetições de quatro plantas por vaso. Os dados foram submetidos à análise de regressão ($p < 0,05$). Os modelos de regressão para a maioria das variáveis analisadas foram significativos e apresentaram bom ajuste, mostrando que o cobre influencia o desenvolvimento normal das plantas. Através das variáveis morfológicas, foi possível observar que, até 100 ppm de cobre adicionado ao solo, as plantas apresentaram um desenvolvimento superior em relação às plantas cultivadas em solo com o teor natural de cobre, porém o crescimento (principalmente da raiz) foi comprometido em função do aumento do teor de cobre no solo. As trocas gasosas e a atividade do fotossistema II indicaram modificações na fisiologia das plantas, diminuindo sua atividade nos maiores teores de cobre no solo. O excesso de cobre no solo gerou um desequilíbrio entre os cátions metálicos, restringindo consideravelmente a absorção do ferro e reduzindo parcialmente a absorção de zinco, com conseqüente diminuição do conteúdo de clorofilas e aumento da absorção de manganês. Apesar da indução do estresse oxidativo, conforme indicado pelo aumento da quantidade de dienos conjugados e do teor de peróxido de hidrogênio nas raízes, as raízes apresentaram uma alta atividade das enzimas ascorbato peroxidase, peroxidase e superóxido dismutase. A cultivar de soja estudada limitou a translocação do cobre para parte aérea, o que pode justificar as poucas alterações morfológicas na parte aérea em relação à raiz e a sobrevivência da planta nesse estresse severo. Outros fatores, como adoção de metabolismo e uso da água conservativos e ativação de mecanismos de defesa antioxidante, contribuíram para sobrevivência das plantas de soja. Por se tratar de um micronutriente essencial para o metabolismo vegetal, fica evidente o efeito benéfico da adição de cobre ao solo nas concentrações mais baixas (50 e 100 ppm), favorecendo o desenvolvimento das plantas. Entretanto, com aumento progressivo do cobre no solo (150; 200; 250 e 300 ppm), ele passa a exercer um efeito deletério nas plantas de soja, comprometendo seu pleno desenvolvimento.

Palavras-chave: *Glycine max* (L.) Merr. Metais pesados. Cu. Estresse oxidativo

4.2 INTRODUÇÃO

Os metais pesados são encontrados naturalmente nos solos através do material de origem ou são introduzidos pelas ações do homem como atividades industriais e práticas agrícolas (SHARMA & PANDEY, 2014). Metais como arsênio (As), chumbo (Pb) e mercúrio (Hg) são perigosos para saúde humana mesmo em concentrações mínimas (ABDUL *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2016). Outros metais como cobre (Cu), níquel (Ni) e zinco (Zn) são necessários para manutenção da vida, porém, a ingestão excessiva pode causar toxicidade e problemas fisiológicos (BREWER, 2010; UMER *et al.*, 2017). Nos solos, são persistentes, não se decompõem facilmente, sendo prontamente concentrados e altamente tóxicos (ODUKUDU *et al.*, 2014). Assim, promovem implicações à segurança alimentar (GALL *et al.*, 2015; TÓTH *et al.*, 2016), não só limitando o crescimento das plantas cultivadas, mas também exercendo uma séria ameaça para o homem mediante a contaminação da cadeia alimentar (ALI *et al.*, 2015; KELLER *et al.*, 2015).

O Cu é também um micronutriente essencial às plantas, cofator de várias enzimas, tendo participação em compostos enzimáticos e reações redox. Envolvido em muitas reações biológicas importantes, exerce papel chave na cadeia transportadora de elétrons na fotossíntese, respiração, metabolismo da parede celular e lignificação. Atua como elemento estrutural das proteínas, mitocôndrias e cloroplastos, bem como na resposta ao estresse oxidativo (BURKHEAD *et al.*, 2009; GARCIA-MOLINA *et al.*, 2011; GARCIA *et al.*, 2014; YRUELA, 2009). Entretanto, quantidades elevadas desse elemento no solo causam efeitos tóxicos tanto ao metabolismo vegetal quanto à biota do solo (LEQUEUX *et al.*, 2010; CAMBROLLÉ *et al.*, 2015).

O excesso de cobre no solo provoca alterações na morfologia e anatomia das raízes, reduzindo o desenvolvimento do sistema radicular e conseqüentemente restringindo a absorção de nutrientes, levando as plantas a manifestarem distúrbios nutricionais (AMBROSINI *et al.*, 2016; TOSELLI *et al.*, 2009). Podem ser afetados processos fisiológicos, como síntese de proteínas, fotossíntese, respiração, atividade enzimática e estrutura da cromatina. O acúmulo do metal também pode estimular diretamente a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO), como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot), através de reações de Fenton e Haber-Weiss, resultando em alterações na funcionalidade das membranas, perda de nutrientes vitais e destruição do equilíbrio metabólico (CAMBROLLÉ *et al.*, 2015; LEQUEUX *et al.*, 2010; ŠTORK *et al.*, 2013).

Para minimizar os efeitos tóxicos dos metais, as plantas desenvolveram um sistema de eliminação de ERO composto por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. As enzimas antioxidantes têm a capacidade de eliminar ERO, prevenindo o dano oxidativo. O sistema antioxidante compreende várias enzimas, destacando-se a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), glutathione redutase (GR, EC 1.8.1.7) e peroxidases (POD, EC 1.11.1.7). Também se podem incluir aqueles mecanismos não enzimáticos, como o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C), glutathione reduzida (GSH) e compostos fenólicos. Essas substâncias são oxidáveis, com alto poder redutor, reagindo assim rapidamente com ERO, antes que possam lesar as células (KHATUN *et al.*, 2008).

A produção agrícola depende da aplicação de agroquímicos com metais pesados em sua constituição. Na intenção de prevenir e/ou controlar doenças fúngicas em determinadas culturas, são aplicados tanto fungicidas cúpricos como a calda bordalesa, quanto aqueles com zinco em sua constituição, como o mancozeb, além dos fertilizantes orgânicos que contribuem para o acúmulo desses elementos no solo (COUTO *et al.*, 2015). Na soja, o fungo *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd pode ser considerado o principal patógeno da cultura no Brasil (GODOY *et al.*, 2016). O controle químico mediante a aplicação de fungicidas via foliar após estabelecimento da cultura, é a principal forma de controlar a doença (MINCHIO *et al.*, 2016).

Nas últimas safras, vem sendo feita a associação de fungicidas sistêmicos aos fungicidas protetores, que possuem múltiplos sítios de atuação no patógeno, como alternativa à perda da eficiência de controle dos produtos sistêmicos. Porém, alguns fungicidas protetores registrados atualmente para cultura da soja são cúpricos, a base de oxiclureto de cobre, sulfato de cobre ou óxido de cobre. Levando-se em consideração que em média são realizadas de duas a três aplicações de protetores para o manejo da resistência, tem-se uma quantidade expressiva de ativos sendo utilizados (MAISSOJA, 2018). O uso indiscriminado somado às práticas agrícolas inadequadas pode torná-los uma questão ambiental, levando ao acúmulo do metal nos solos das regiões produtoras. Apesar disso, as respostas morfofisiológicas e bioquímicas de plantas de soja ao aumento gradual de cobre no solo ainda não são bem conhecidas.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito induzido por diferentes concentrações de Cu no solo em plantas de soja (*Glycine max* L. Merr.), mediante a avaliação de variáveis morfofisiológicas e bioquímicas.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Biologia Animal e Vegetal da Universidade Estadual de Londrina (UEL), situada na cidade de Londrina – PR. O solo utilizado como substrato para compor as unidades experimentais foi um Latossolo Vermelho Escuro eutroférico, com os seguintes atributos químicos: pH (CaCl₂) 5,0; Ca, Mg, K e Al, respectivamente, 4,0; 1,8; 0,65 e 0,04 em cmol_c dm⁻³; P 7,6 mg dm⁻³; MO 28,2 g kg⁻¹, com classe textural muito argilosa (6,85% de areia; 13,35% de silte e 77,80% de argila) e teor natural de Cu de 11,2 mg dm⁻³. Foram utilizadas sementes de soja (*Glycine max* L. Merr.) de uma cultivar convencional (BRS 257), com plantio recomendado para a macrorregião centro-sul do Brasil.

O experimento foi constituído pelo controle (teor natural de cobre no solo) e mais seis tratamentos com adição de cobre ao solo nas concentrações de 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ppm. A unidade experimental foi um vaso com quatro plantas, sendo utilizadas dez repetições por tratamento para avaliação das variáveis morfofisiológicas e quatro repetições para avaliação das variáveis bioquímicas. Foram utilizados vasos plásticos de 1,16 L (10,5 cm de altura x 14,5 cm de diâmetro superior, com aproximadamente 0,753 kg de solo). A quantidade de Cu adicionado ao solo para cada concentração foi calculada, sendo fornecida mediante a adição de uma solução de sulfato de cobre (CuSO₄ 5H₂O), com volume final ajustado para 130 mL por vaso. Posteriormente, o solo foi homogeneizado em sacos plásticos sob agitação e permaneceram nos vasos por 5 dias até a semeadura.

As variáveis morfológicas avaliadas foram obtidas ao final do período de condução do experimento, onde as plantas de soja se encontravam no estágio fenológico V2 para V3, com o primeiro trifólio completamente desenvolvido e o segundo trifólio em expansão. Para o comprimento da parte aérea (CPA), o valor da repetição foi composto pela média das quatro plantas do vaso. Para as variáveis comprimento do sistema radicular (CSR), área foliar (AF), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca do sistema radicular (MSR), os valores das repetições foram compostos pela média de duas plantas do vaso. As outras duas plantas foram utilizadas para obtenção do material vegetal para determinação das variáveis bioquímicas.

Para AF, foi utilizado um medidor de área foliar portátil LI-3000C (LI-COR® Biosciences, Lincoln, EUA). Para determinação da massa seca, o material vegetal foi separado em caules e folhas (MSPA) e raízes (MSR). Após serem acondicionados individualmente em sacos de papel, foram levados à estufa a 60°C até peso constante.

As variáveis fisiológicas avaliadas foram obtidas quando as plantas de soja se encontravam no estágio fenológico V2 para V3. As variáveis de fluorescência da clorofila *a* foram medidos em folhas intactas utilizando um fluorômetro OS1p (Opti-Sciences, Hudson, EUA). O rendimento quântico máximo do fotossistema II foi determinado antes do amanhecer pela relação F_v/F_m e a atividade potencial pela relação F_v/F_o , em folhas adaptadas ao escuro durante 15 minutos (BAKER, 2008). O rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{II}) foi medido às 10:30 hs em folhas adaptadas à luz em um dia de sol pleno, e a taxa relativa de transporte linear de elétrons pelo fotossistema II (rETR) foi calculada como $rETR = \Delta F / F_m' \times PAR \times 0,5 \times 0,84$ (BAKER, 2008).

As avaliações das trocas gasosas foram feitas das 9:00 às 11:30 hs utilizando-se um analisador portátil de gás por infravermelho (Irga), (LI-COR[®] Biosciences, Lincoln, EUA), modelo LI-6400 XT, conectado a uma câmara de 6 cm², ajustada para uma densidade de fluxo de fótons saturante (1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Foram determinadas as taxas de fotossíntese líquida (*A*) e transpiração (*E*), além da condutância estomática (*g_s*) e a razão entre a concentração interna e ambiente de CO₂ (*C_i/C_a*), seguindo o método descrito por Vu *et al* (1986). Foram calculados a eficiência do uso da água (EUA) pela razão *A/E* e a eficiência instantânea de carboxilação (*k*) por meio da razão (*A/C_i*).

Os pigmentos fotossintéticos foram determinados utilizando folhas do primeiro trifólio de acordo com a metodologia descrita por Lichtenthaler e Buschmann (2001). Para a análise química, amostras secas de raízes laterais e folhas de plantas em V3 foram submetidas à digestão via úmida, sulfúrica para N e nitroperclórica para P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn e Zn. Posteriormente, os teores de N foram determinados pelo método da microdestilação Kjeldahl, com titulação através da solução de H₂SO₄ (0,05N). Os teores de P e S foram determinados por meio de espectrofotometria UV-Vis, K através de fotômetro de chama, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn por espectrofotometria de absorção atômica. Todas as análises seguiram recomendações de Malavolta *et al.* (1997).

Parâmetros que indicam a ocorrência de estresse oxidativo foram mensurados utilizando amostras de raízes laterais de plantas em V3 através da determinação do conteúdo de H₂O₂, dienos conjugados e MDA seguindo as metodologias descritas por ALEXIEVA *et al.* (2001), BOVERIS *et al.* (1980) e Federici *et al.* (2007), respectivamente.

Para determinação das atividades das enzimas antioxidantes, foram utilizados extratos enzimáticos brutos obtidos por meio da homogeneização de 100 mg de raízes laterais. Após a maceração em nitrogênio líquido, foi adicionado 1 mL de tampão de extração, constituído de EDTA 1 mM em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,8), suplementado com polivinil-

poli-pirrolidona (PVPP) 2% (p/v). O extrato foi centrifugado a 15645 xg, a 4°C por 20 min, e o sobrenadante utilizado nas avaliações enzimáticas. O conteúdo de proteínas foi determinado com o reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 da Bio-Rad, seguindo as especificações do fabricante.

A atividade da APX foi determinada de acordo com o método de Nakano e Asada (1981), através do acompanhamento do consumo de ascorbato a 290 nm na presença de H₂O₂. A atividade da CAT foi determinada segundo Aebi (1974) e Peixoto *et al.* (1999), acompanhando-se o decréscimo da absorbância do H₂O₂ a 240 nm. A atividade da POD foi determinada segundo Peixoto *et al.* (1999), através da oxidação do pyrogallol a purpurogalina na presença de H₂O₂ e medição do acréscimo da absorbância a 420 nm. A atividade da SOD foi determinada de acordo com Giannopolitis e Ries (1977), verificando a capacidade do extrato em inibir a fotoredução do NBT.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC). As pressuposições da análise de variância foram atendidas através das estatísticas de influência e análise de resíduos, aplicando-se os testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Bartlett). Os resultados foram submetidos à análise de regressão, avaliando o efeito das concentrações de cobre adicionadas ao solo sobre as variáveis mensuradas. Foi feito o ajuste de modelos polinomiais de regressão, escolhendo-se o polinômio com o maior valor do coeficiente de determinação (R²), com auxílio do programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2018), de acordo com o teste F e tomando como base $p < 0,05$.

4.4 RESULTADOS

As variáveis analisadas e as interações significativas e não significativas com as concentrações de Cu adicionadas no solo são apresentadas nas tabelas 2 e 3, mostrando a influência do Cu no desenvolvimento das plantas. Os modelos de regressão apresentaram um bom ajuste, evidenciados pelos elevados coeficientes de determinação obtidos.

Tabela 2. Modelo de regressão ajustado para os teores de nutrientes essenciais, com respectivos coeficientes de determinação (R^2).

Variável	Modelo de regressão ajustado	R^2
Teor de cobre nas raízes	$y = -3E-05x^3 + 0.0147x^2 - 0.4376x + 60.199$	0.9740 **
Teor de ferro nas raízes	$y = -0.0009x^3 + 0.6756x^2 - 169.89x + 17344$	0.9143 **
Teor de manganês nas raízes	$y = 4E-05x^3 + 0.0013x^2 - 1.899x + 288.44$	0.9888 **
Teor de zinco nas raízes	$y = 0.0009x^2 - 0.3296x + 75.269$	0.8917 *
Teor de nitrogênio nas raízes	$y = 0.011x + 18.142$	0.9316 **
Teor de fósforo nas raízes	$y = 1E-05x^2 - 0.0038x + 2.2129$	0.7380 **
Teor de potássio nas raízes ns
Teor de cálcio nas raízes ns
Teor de magnésio nas raízes ns
Teor de enxofre nas raízes	$y = 0.0127x + 4.8047$	0.9217 **
Teor de cobre nas folhas	$y = 1E-05x^3 - 0.0093x^2 + 1.2191x + 117.07$	0.9206 **
Teor de ferro nas folhas	$y = -0.5094x + 306.05$	0.7528 *
Teor de manganês nas folhas	$y = -0.1659x + 279.3$	0.7611 *
Teor de zinco nas folhas	$y = 6E-06x^3 - 0.0036x^2 + 0.5911x + 34.805$	0.8635 **
Teor de nitrogênio nas folhas	$y = -0.0303x + 33.263$	0.8615 **
Teor de fósforo nas folhas	$y = 1E-07x^3 - 5E-05x^2 + 0.0046x + 1.875$	0.8573 **
Teor de potássio nas folhas	$y = 0.0002x^2 - 0.0753x + 17.84$	0.9430 **
Teor de cálcio nas folhas	$y = 3E-06x^3 - 0.0014x^2 + 0.1224x + 32.713$	0.9242 **
Teor de magnésio nas folhas ns
Teor de enxofre nas folhas	$y = -2E-05x^2 + 0.0031x + 2.4891$	0.8507 **

** Significativo pelo teste F ao nível de 1% de probabilidade; * Significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade; ns não significativo.

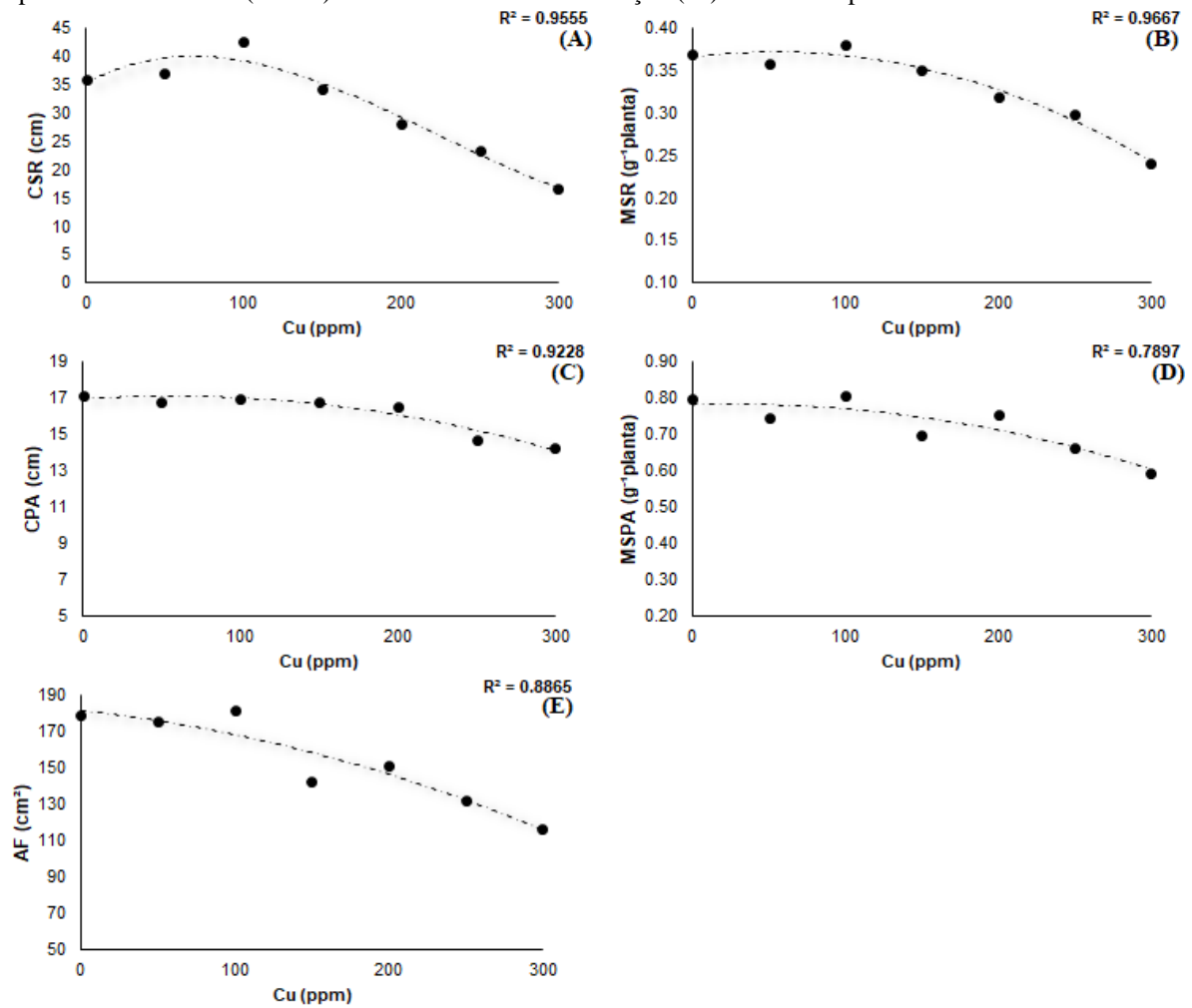
Tabela 3. Modelos de regressão ajustados para as variáveis morfofisiológicas e bioquímicas, com os respectivos coeficientes de determinação (R^2).

Variável	Modelo de regressão ajustado	R^2	
Comprimento do sistema radicular	$y = 2E-06x^3 - 0.0013x^2 + 0.1474x + 35.308$	0.9555	**
Massa seca do sistema radicular	$y = -2E-06x^2 + 0.0002x + 0.3656$	0.9667	**
Comprimento da parte aérea	$y = -5E-05x^2 + 0.0057x + 16.95$	0.9228	**
Massa seca da parte aérea	$y = -2E-06x^2 + 0.0001x + 0.7809$	0.7897	**
Área foliar	$y = -0.0004x^2 - 0.0872x + 181.52$	0.8865	**
Taxa relativa de transporte de elétrons pelo fotossistema II	$y = 7E-06x^3 - 0.0041x^2 + 0.567x + 320.92$	0.9496	**
Fluorescência basal	$y = 0.0005x^2 - 0.0633x + 157.91$	0.9606	**
Atividade potencial do fotossistema II	$y = -1E-05x^2 + 0.0021x + 4.4094$	0.9846	**
Rendimento quântico máximo do fotossistema II	ns
Clorofilas totais	$y = -2.3527x + 2215.4$	0.9591	**
Razão clorofila a/b	ns
Razão clorofilas/carotenóides	ns
Taxa fotossintética líquida	$y = -0.0093x + 19.256$	0.8288	**
Transpiração	$y = -5E-05x^2 + 0.0047x + 6.2666$	0.8741	**
Condutância estomática	$y = 7E-08x^3 - 3E-05x^2 + 0.0033x + 0.4035$	0.9044	**
Razão Ci/Ca	$y = -5E-06x^2 + 0.0008x + 0.7537$	0.9844	**
Eficiência no uso da água	$y = 2E-05x^2 - 0.0025x + 3.2295$	0.9130	**
Eficiência intrínseca no uso da água	$y = 0.0012x^2 - 0.2046x + 47.619$	0.9729	**
Eficiência instantânea de carboxilação	$y = 2E-06x^2 - 0.0003x + 0.659$	0.8640	**
Proteínas solúveis totais nas raízes	$y = 0.0094x + 3.4372$	0.9551	**
Conteúdo de malondialdeído nas raízes	$y = -0.0006x^2 + 0.141x + 41.811$	0.8043	*
Conteúdo de dienos conjugados nas raízes	$y = 0.0123x + 3.6494$	0.9710	**
Conteúdo de H_2O_2 nas raízes	$y = 0.0171x^2 + 1.2862x + 1107.4$	0.9755	**
Atividade da enzima superóxido dismutase nas raízes	$y = 5E-05x^3 - 0.0196x^2 + 2.1958x + 425.5$	0.9244	**
Atividade da enzima ascorbato peroxidase nas raízes	$y = 1E-06x^3 - 0.0005x^2 + 0.0527x + 5.0482$	0.9624	**
Atividade da peroxidase nas raízes	$y = 0.013x^2 - 0.5885x + 387.49$	0.9801	**
Atividade da catalase nas raízes	$y = 6E-06x^3 - 0.0025x^2 + 0.1399x + 109.35$	0.8328	**

** Significativo pelo teste F ao nível de 1% de probabilidade; * Significativo pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

A adição de Cu no solo exerceu um efeito semelhante entre as variáveis morfológicas (Fig. 1). O crescimento da raiz e da parte aérea (tanto em massa seca quanto em comprimento) foi crescente nas concentrações mais baixas de Cu, atingindo seus valores máximos na concentração de 100 ppm adicionado no solo. Todavia, esses parâmetros sofreram diminuição a partir do tratamento com 150 ppm de Cu.

Figura 1. (A) Comprimento do sistema radicular (CSR), (B) massa seca radicular (MSR), (C) comprimento da parte aérea (CPA), (D) massa seca da parte aérea (MSPA) e (E) área foliar (AF) de plantas de soja cultivadas em solos suplementados com diferentes concentrações de cobre (0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ppm). Os dados representam as médias ($n = 10$). O coeficiente de determinação (R^2) também é apresentado.



O efeito do aumento de Cu no solo foi mais pronunciado nas raízes em relação à parte aérea, o que também pode ser visualizado na Fig. 2.

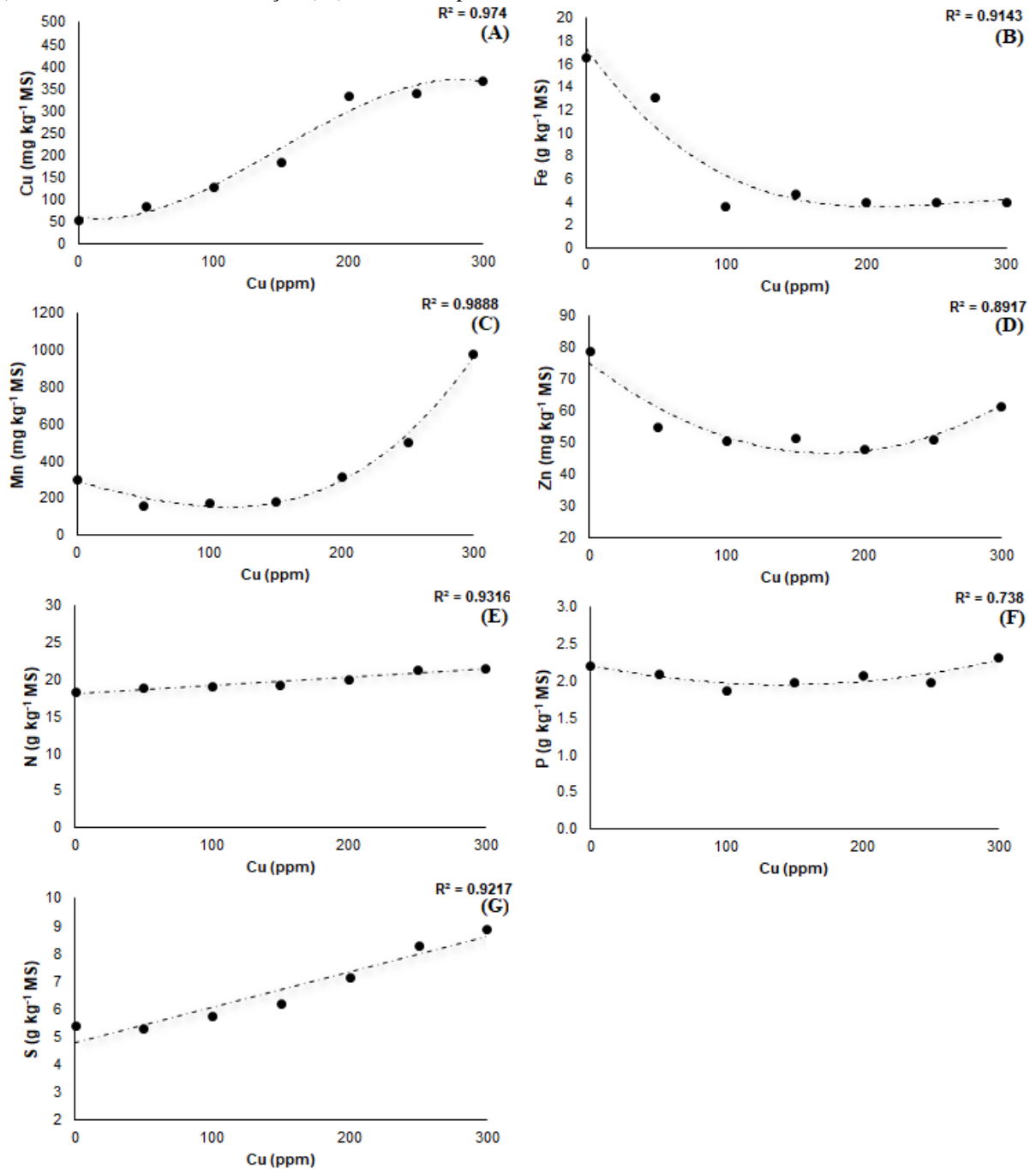
Figura 2. Plantas de soja cultivadas em solos suplementados com diferentes concentrações de cobre (0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ppm, respectivamente).



O acréscimo da concentração de Cu no solo influenciou a absorção dos nutrientes essenciais, alterando a concentração desses elementos nos órgãos das plantas. Nas raízes (Fig. 3), o teor de Cu aumentou gradualmente até atingir seu valor máximo ($368,19 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}$) no tratamento com 300 ppm. O Fe no sistema radicular foi fortemente reduzido com o aumento das concentrações de Cu no solo até 150 ppm, se mantendo constante nas concentrações de 200 a 300 ppm. Por outro lado, o Mn teve efeito oposto, observando-se um aumento considerável nos tratamentos com 200, 250 e 300 ppm de Cu.

O Zn também teve seu teor na raiz reduzido com o aumento da concentração de Cu no solo até 250 ppm, apresentando um pequeno aumento no teor de Zn nas raízes na concentração de 300 ppm. Quanto aos macronutrientes, de forma distinta, houve um aumento do teor de N, P e S nas raízes na medida em que se elevou a concentração de Cu no solo, sendo na concentração de 300 ppm a condição com os maiores valores observados para esses elementos ($21,47$; $2,32$ e $8,91 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$, respectivamente).

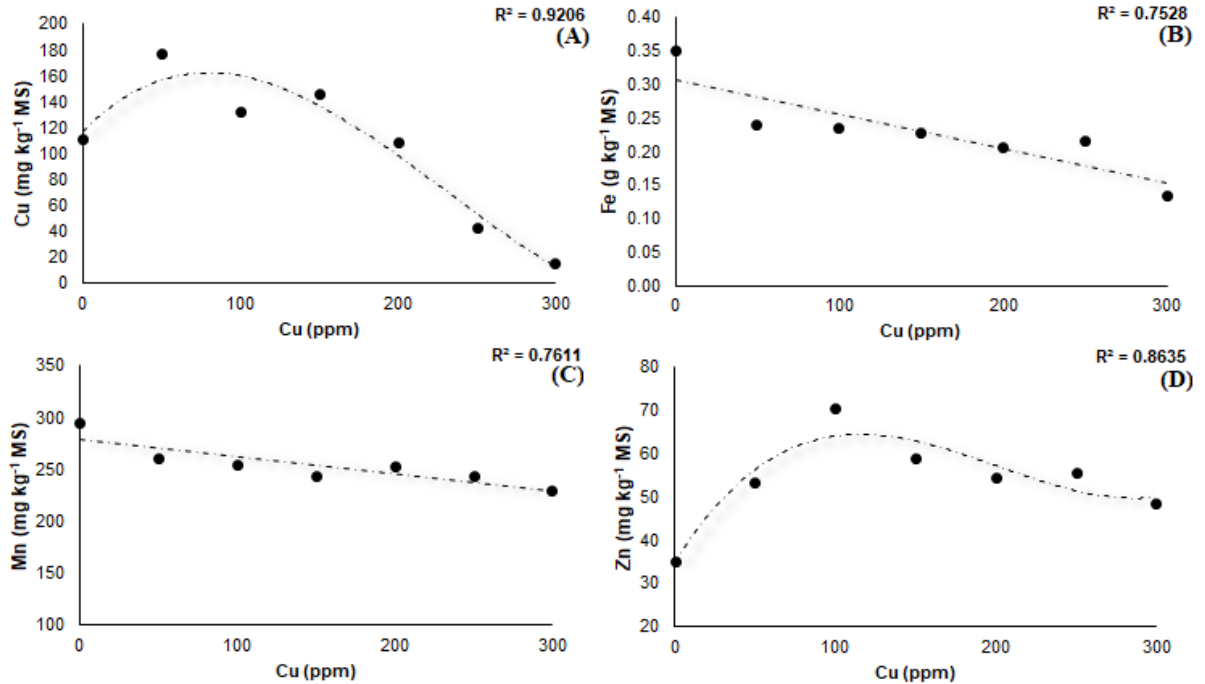
Figura 3. (A) teor de cobre, (B) teor de ferro, (C) teor de manganês, (D) teor de zinco, (E) teor de nitrogênio, (F) teor de fósforo e (G) teor de enxofre nas raízes de plantas de soja cultivadas em solos suplementados com diferentes concentrações de cobre (0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ppm). Os dados representam as médias ($n = 4$). O coeficiente de determinação (R^2) também é apresentado.



O conteúdo de Cu nas folhas caiu drasticamente a partir da concentração de 50 ppm (Fig. 4), tratamento em que se observou o teor mais elevado nas folhas ($177 \text{ mg kg}^{-1} \text{MS}$). Para Fe e Mn, os teores decaíram com o aumento das concentrações de Cu, sendo o teor natural de Cu no solo a condição em que as plantas apresentaram a maior concentração para ambos os elementos ($349,81$ e $295 \text{ mg kg}^{-1} \text{MS}$, respectivamente). Para Zn, o efeito foi semelhante ao Cu: houve aumento do elemento nas concentrações mais baixas de Cu, com seu

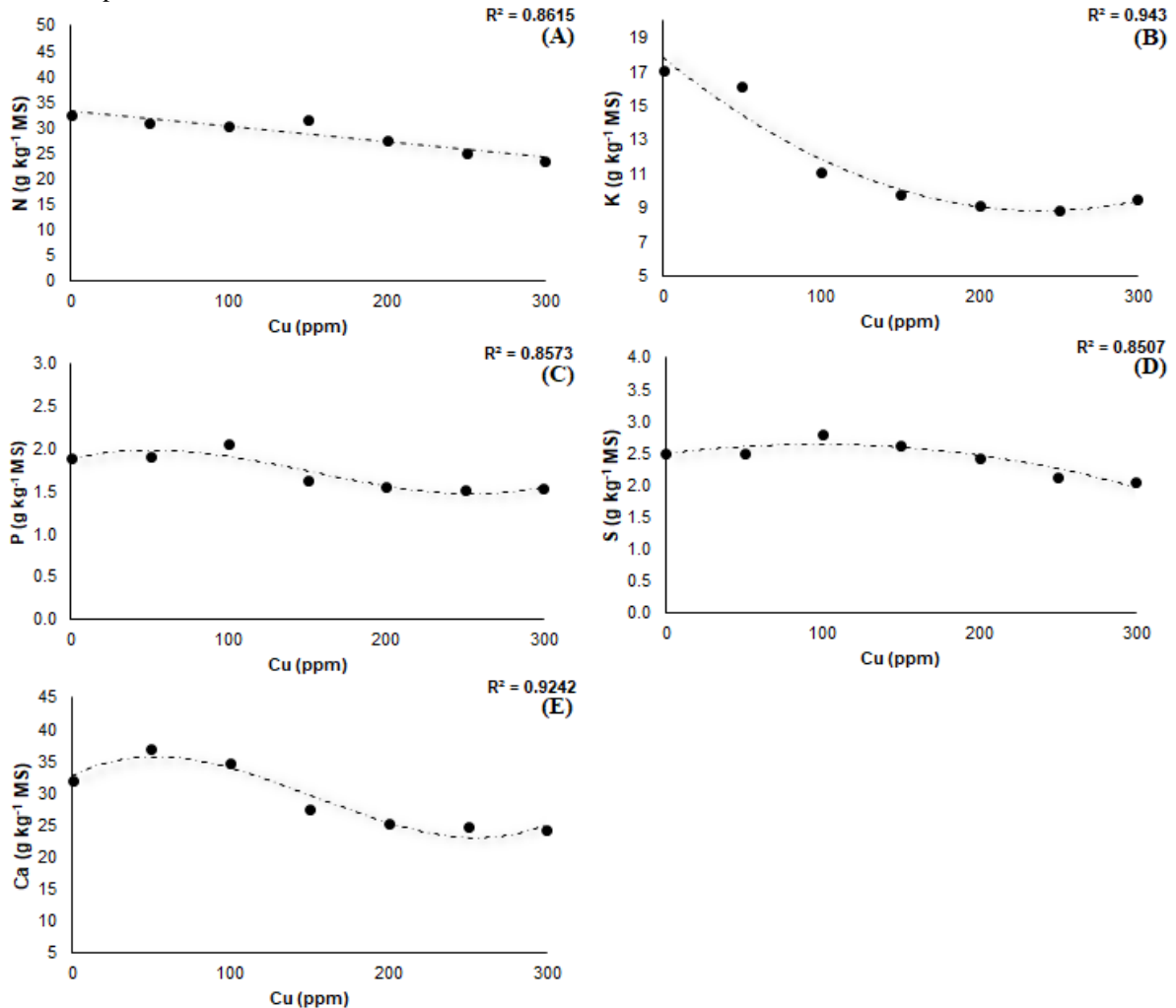
valor máximo nos tratamentos com 100 ppm de Cu ($70,38 \text{ mg kg}^{-1} \text{ MS}$), seguido de uma queda nas concentrações maiores.

Figura 4. (A) teor de cobre, (B) teor de ferro, (C) teor de manganês e (D) teor de zinco nas folhas de plantas de soja cultivadas em solos suplementados com diferentes concentrações de cobre (0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ppm). Os dados representam as médias ($n = 4$). O coeficiente de determinação (R^2) também é apresentado.



Nas folhas, houve uma redução linear do teor de N conforme o aumento do teor de Cu no solo, com o mínimo observado ($23,36 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$) na concentração de 300 ppm (Fig. 5). Houve uma redução acentuada do teor de K nas folhas, até a adição de 100 ppm de Cu no solo, se mantendo praticamente constante nas concentrações de 150 a 300 ppm. Para o P e o S, houve aumento dos teores nas folhas até o tratamento com 100 ppm de Cu ($2,05$ e $2,79 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$, respectivamente), seguida de uma diminuição nas demais concentrações de Cu acrescidas ao solo. Para o Ca, esse aumento foi mais restrito, se elevando até a concentração de 50 ppm ($37,01 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$), seguida também de sua redução nas demais concentrações de Cu adicionadas ao solo.

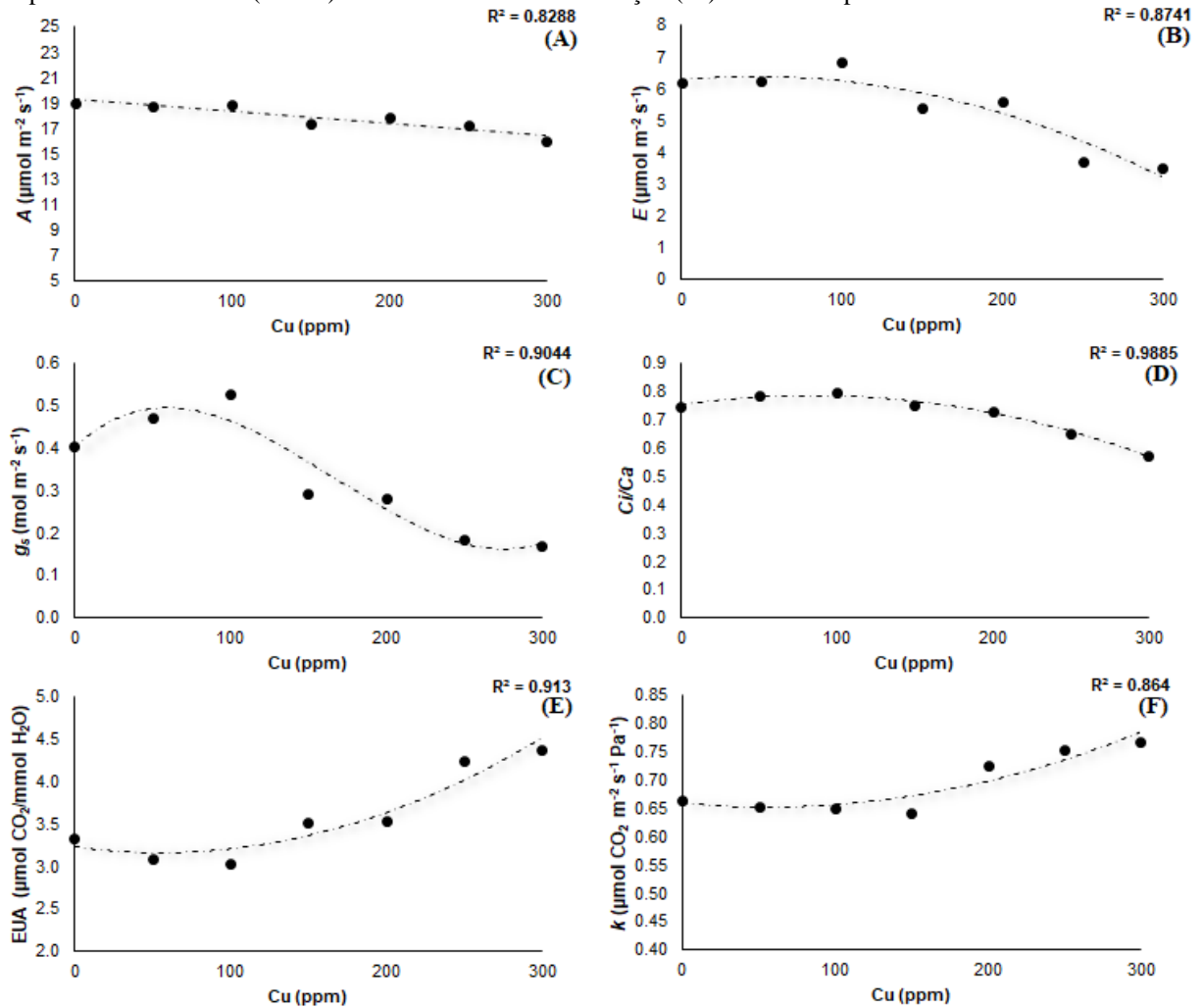
Figura 5. (A) teor de nitrogênio, (B) teor de potássio, (C) teor de fósforo, (D) teor de enxofre e (E) teor cálcio nas folhas de plantas de soja cultivadas em solos suplementados com diferentes concentrações de cobre (0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ppm). Os dados representam as médias ($n = 4$). O coeficiente de determinação (R^2) também é apresentado.



Em relação as trocas gasosas, *A* respondeu inversamente ao excesso de Cu no solo. Ela teve seu valor máximo ($19,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) em plantas cultivadas com o teor natural de Cu, ocorrendo uma queda linear com aumento das concentrações de Cu (Fig. 6). A *E* aumentou nas concentrações mais baixas atingindo seu valor máximo ($6,85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) no tratamento com 100 ppm de Cu no solo. A partir dessa concentração, houve uma queda em *E*, que foi mais acentuada que a observada para *A*.

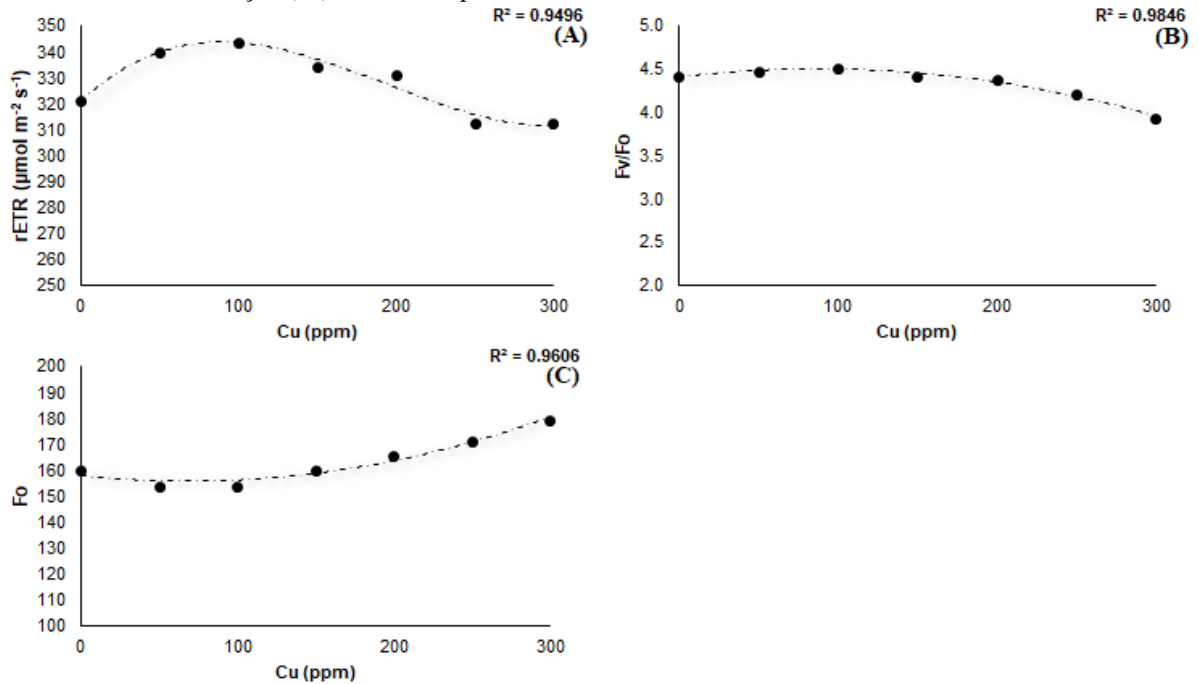
A g_s e a razão C_i/C_a foram influenciadas da mesma forma: em resposta ao aumento crescente de Cu no solo, houve um acréscimo até o tratamento com 100 ppm de Cu, com uma queda acentuada nas concentrações mais altas. A EUA e a k apresentaram um comportamento semelhante, diminuição dos valores nas concentrações iniciais de Cu (0 e 100 ppm), aumentando concomitantemente com aumento do teor de Cu no solo.

Figura 6. (A) taxa fotossintética líquida (A), (B) transpiração (E), (C) condutância estomática (g_s), (D) razão C_i/C_a , (E) eficiência no uso da água e (F) eficiência instantânea de carboxilação (k) de plantas de soja cultivadas em solos suplementados com diferentes concentrações de cobre (0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ppm). Os dados representam as médias ($n = 10$). O coeficiente de determinação (R^2) também é apresentado.



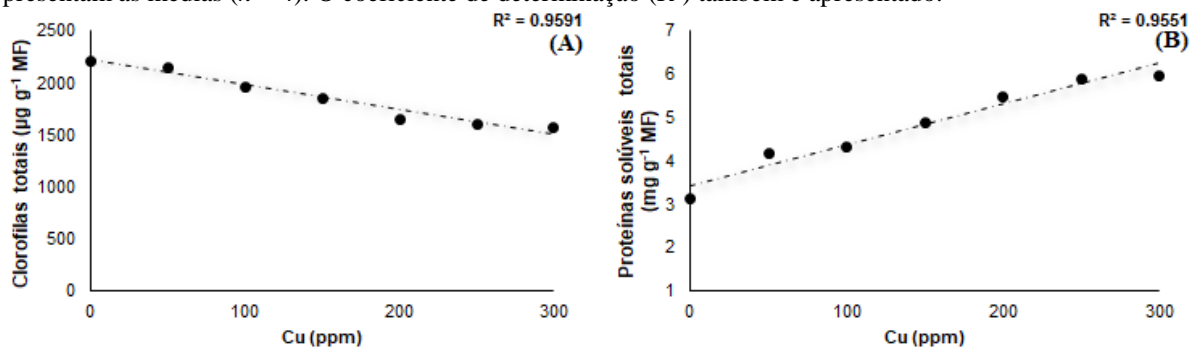
A $rETR$ e a razão F_v/F_o tiveram um comportamento semelhante ao observado para variáveis morfológicas: um aumento nas concentrações mais baixas de Cu, atingindo seu máximo na concentração de 100 ppm, seguido de uma redução nas concentrações mais elevadas de Cu (Fig. 7). Para a F_o , o efeito observado foi o inverso: a F_o diminuiu nas concentrações iniciais, seguida de um aumento concomitante com as concentrações mais elevadas de Cu adicionadas no solo.

Figura 7. (A) taxa relativa de transporte de elétrons pelo fotossistema II (rETR), (B) atividade potencial do fotossistema II (F_v/F_o) e (C) fluorescência basal (F_o) de soja cultivadas em solos suplementados com diferentes concentrações de cobre (0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ppm). Os dados representam as médias ($n = 10$). O coeficiente de determinação (R^2) também é apresentado.



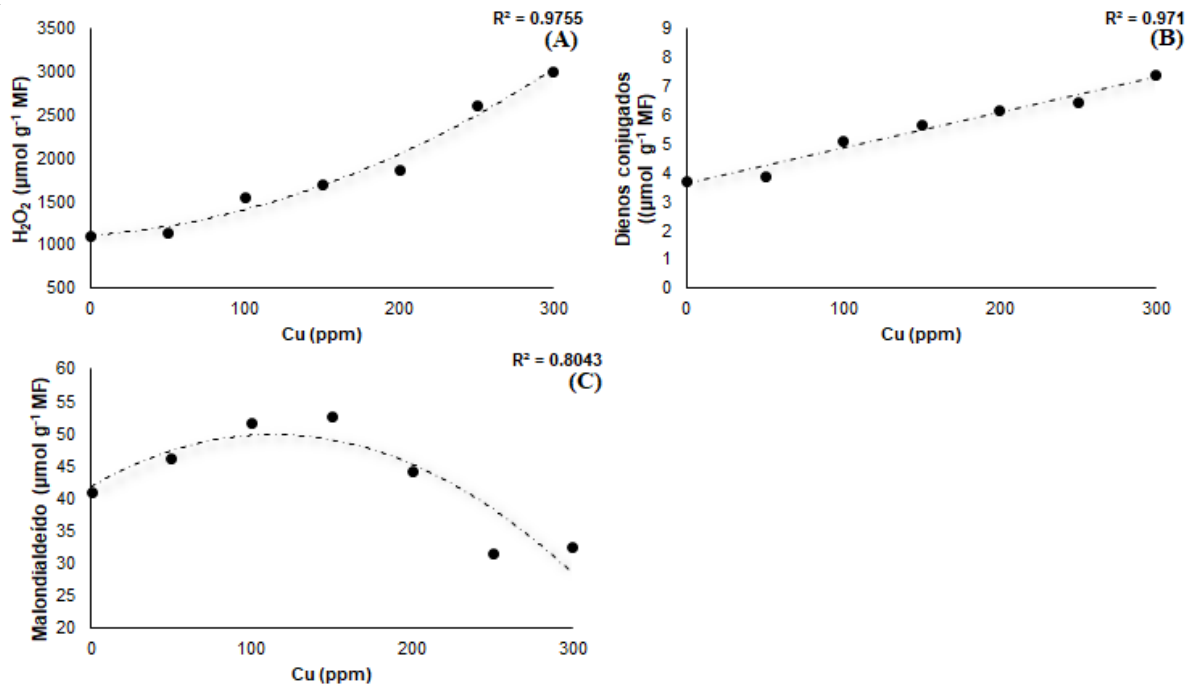
De acordo com a figura 8, a quantidade de clorofilas totais foi reduzida com o aumento do Cu no solo. Efeito oposto observado no conteúdo de proteínas solúveis totais nas raízes, havendo um aumento progressivo das proteínas na medida em que a concentração de Cu aumentou no solo, tendo seu valor máximo ($5,99 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$) na concentração de 300 ppm.

Figura 8. (A) clorofilas totais e (B) proteínas solúveis totais nas raízes, de soja cultivadas em solos suplementados com diferentes concentrações de cobre (0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ppm). Os dados representam as médias ($n = 4$). O coeficiente de determinação (R^2) também é apresentado.



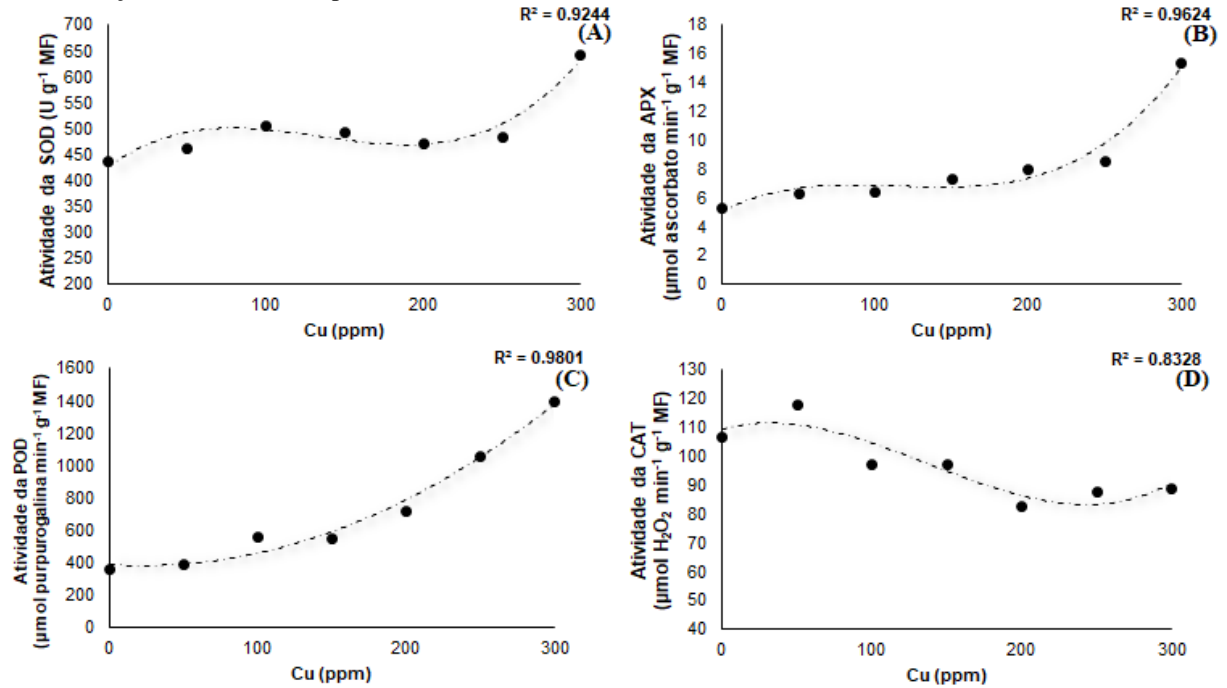
O conteúdo de H_2O_2 , dienos conjugados e MDA serviram como indicadores de estresse oxidativo (Fig. 9). Houve um acúmulo progressivo do H_2O_2 e dos dienos conjugados nas raízes desde as concentrações iniciais de Cu adicionadas no solo, tendo seu máximo na concentração de 300 ppm ($3008,24 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$; $7,43 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$, respectivamente). Por outro lado, o conteúdo de MDA apresentou acúmulo somente até a concentração de 150 ppm (máximo de $52,65 \mu\text{mol g}^{-1} \text{MF}$), seguida de uma redução acentuada nas concentrações mais elevadas de cobre adicionadas no solo.

Figura 9. (A) conteúdo de H_2O_2 (B) conteúdo de dienos conjugados e (C) conteúdo de malondialdeído nas raízes de soja cultivadas em solos suplementados com diferentes concentrações de cobre (0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ppm). Os dados representam as médias ($n = 4$). O coeficiente de determinação (R^2) também é apresentado.



As plantas apresentaram semelhanças na indução da atividade enzimática da SOD e APX nas raízes em resposta ao Cu (Fig. 10). Nas concentrações até 200 ppm de Cu, as atividades de ambas enzimas foram um pouco maiores que as atividades de plantas no teor natural de Cu, entretanto, nas concentrações de 250 e 300 ppm, passaram a ter uma alta atividade. A POD apresentou uma atividade maior em resposta até mesmo às concentrações de Cu iniciais (Fig. 6), oposto da CAT, que teve sua atividade ligeiramente diminuída com o acréscimo de Cu no solo.

Figura 10. (A) atividade da enzima superóxido dismutase nas raízes (SOD), (B) atividade da enzima ascorbato peroxidase nas raízes (APX), (C) atividade da enzima peroxidase nas raízes (POD) e (D) atividade da enzima catalase nas raízes (CAT) de plantas de soja cultivadas em solos suplementados com diferentes concentrações de cobre (0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 ppm). Os dados representam as médias ($n = 4$). O coeficiente de determinação (R^2) também é apresentado.



4.5 DISCUSSÃO

O cobre é um micronutriente requerido para o crescimento e desenvolvimento normal das plantas, participando de vários processos fisiológicos. Entretanto, em altas concentrações pode se tornar tóxico (YRUELA, 2009). Neste contexto de o uso intensivo e crescente de fungicidas cúpricos na sojicultura, o presente estudo apresenta uma análise detalhada do potencial toxicológico do cobre em uma cultivar, evidenciando o efeito das concentrações crescentes do elemento no solo sobre os parâmetros bioquímicos e ecofisiológicos das plantas de soja.

Como esperado, a aplicação de sulfato de cobre no solo elevou as concentrações de cobre e enxofre nas raízes. Entretanto, esse excesso dos elementos na raiz não refletiu também em um excedente nas folhas, onde o cobre teve sua concentração fortemente reduzida e o enxofre moderadamente reduzida. Isso pode ser um indicativo de que a cultivar de soja estudada, BRS 257, tem como uma das estratégias para se manter nessa condição estressante a limitação da translocação do cobre para parte aérea, sendo provavelmente uma planta excludora. As espécies excludoras não regulam a absorção de metais, mas limitam o transporte da raiz à

folha, onde a retenção das altas quantidades de metais nas raízes previne o efeito tóxico no aparato fotossintético das plantas (BAKER & WALKER, 1990; GOMES *et al.*, 2011)

Como consequência dessa estratégia, nas maiores concentrações de cobre no solo, o crescimento das raízes foi mais fortemente inibido que o da parte aérea, o que corrobora os resultados de estudos prévios com plantas de soja. Kulikova *et al.* (2011) observaram que o excesso de cobre retardou o desenvolvimento e principalmente o acúmulo de biomassa pelas plantas de soja cultivadas em hidroponia, com a promoção de deformações e alterações morfológicas na raiz. Angelova *et al.* (2003), Sánchez-Pardo & Zornoza (2014) e Kulivoka *et al.* (2015) também averiguaram que o excesso de cobre no solo reduziu a taxa de crescimento relativo da soja, com maior acúmulo de cobre nas raízes. A redução do desenvolvimento dos órgãos das plantas de soja, juntamente com as alterações morfológicas e bioacumulação dos metais no sistema radicular, também são descritas em situação de estresse causada por outros tipos de metais, como cádmio (HASHIM, 2014; BALESTRASSE *et al.*, 2003; SRIVASTAVA *et al.*, 2011; PÉREZ CHACA *et al.*, 2014).

O acréscimo da concentração de cobre no solo também promoveu alterações nutricionais nas plantas de soja. Todos nutrientes essenciais que interagiram significativamente com o cobre foram reduzidos nas folhas nas concentrações mais altas do metal, corroborando com os resultados obtidos por Amri *et al.* (2017), que também constataram diminuição na absorção de micro e macronutrientes por plantas de *Marrubium vulgare* L. (marroio) cultivadas em situação de estresse por cobre, sendo a diminuição da absorção de nutrientes também relatada para outras plantas em função do excesso de metais pesados como cádmio (GUIMARÃES *et al.*, 2008).

Em particular, o excesso de cobre no solo gerou um desequilíbrio entre os cátions metálicos, restringindo consideravelmente os teores de ferro em raízes e folhas e reduzindo parcialmente os níveis de zinco nos mesmos órgãos. No caso do ferro e zinco, o cobre pode deslocar esses íons do sítio de troca dos transportadores de membrana, inibindo competitivamente sua absorção (MALAVOLTA *et al.*, 1997). Por outro lado, o manganês apresentou um alto teor nas raízes, o que pode ser resultante das características do solo utilizado como teor natural elevado de manganês e pH na faixa do médio, tenham contribuído para elevar a concentração de manganês. Segundo Abreu *et al.*, (1994) pH abaixo do 5,5 podem contribuir para aumentar a disponibilidade de manganês.

Observou-se um aumento do conteúdo de nitrogênio e de proteínas solúveis totais nas raízes, apesar da diminuição do N total nas folhas. Segundo Tester & Davenport (2003), sob condições de estresse, a síntese de proteínas pode ser aumentada visando à estabilização de

membranas celulares. Contudo, também pode ser um reflexo do aumento de algum composto proteico em resposta ao estresse induzido pelo excesso de cobre na raiz. Uma possível explicação para esse aumento proteico na raiz pode ser o processo de quelação nos metais pesados, uma das estratégias adotadas pelas plantas para se manterem vivas sob estresse induzido por metais pesados. Durante o processo de quelação, os metais pesados são envolvidos por ligantes como aminoácidos, ácidos orgânicos e peptídeos como as fitoquelatinas e metalotioneínas, contribuindo para a diminuição desses elementos livres no citossol, reduzindo sua atividade, solubilidade e o aparecimento de seus efeitos tóxicos nas plantas (HALL, 2002; DOS SANTOS *et. al.*, 2011; SOUZA *et. al.*, 2011).

Nas concentrações iniciais de cobre adicionado no solo, as plantas responderam de forma positiva, apresentando maior crescimento que as plantas cultivadas em solos com teor natural de cobre, provavelmente devido às funções do cobre no metabolismo vegetal (YRUELA, 2009). Além do mais, as características físico-químicas do solo utilizado como substrato contribuíram para que o cobre na concentração até 100 ppm exercesse um efeito benéfico. O teor de matéria orgânica (28,2 g dm⁻³) pode ter contribuído para complexação do elemento e a textura muito argilosa (77,80% de argila) aumentado sua adsorção na superfície das partículas coloidais do solo, diminuindo a disponibilidade do cobre para as raízes.

As plantas adotaram um mecanismo conservativo no uso da água, reduzindo a g_s e E e aumentando a EUA. Essa estratégia adotada pelas plantas de soja pode ser a responsável pela queda da A , situação semelhante observada em outras plantas submetidas ao estresse por alumínio (AKAYA & TAKENAKA, 2001; PEIXOTO *et al.*, 2002). Todavia, outras limitações não-estomáticas podem estar relacionadas à queda da fotossíntese, como a existência de deficiências nutricionais e a conseqüente diminuição do teor de clorofilas e proteínas nas folhas (SINGH *et al.*, 2016). Além disso, o estresse induzido por cobre levou a danos no fotossistema II, indicado pelo aumento da F_0 (BAKER & ROSENQVST, 2004), e à redução da razão F_v/F_0 , com diminuição da atividade do fotossistema II e da taxa de transporte acíclico de elétrons. Todavia, é importante ressaltar que a fixação de CO_2 se manteve ativa, evidenciado pelo aumento de k mesmo com a redução de g_s e diminuição da concentração interna de CO_2 nas folhas.

Hashem (2014) demonstrou que o estresse induzido pelo cádmio, além dos efeitos morfológicos, também reduziu o conteúdo de clorofilas totais das plantas de soja. Hu *et al.* (2014) comprovaram que o estresse induzido pelo cádmio também promoveu alterações fisiológicas nas plantas, reduzindo conteúdo de clorofilas totais, A , F_v/F_m e $rETR$ e aumentando a F_0 . Mesmo que esses trabalhos tenham utilizado outro metal, os efeitos fisiológicos induzidos

nas plantas de soja são semelhantes aos dados observados neste trabalho. Todavia, os efeitos induzidos pelo cádmio ocorreram mesmo em baixas concentrações, sendo muito mais tóxico para as plantas do que o cobre, já que o cádmio, diferente do cobre, não exerce nenhum papel biológico no metabolismo vegetal (MARQUES *et al.*, 2009; SINGH *et al.*, 2016).

A toxicidade induzida pelo acúmulo de cobre na raiz está normalmente associada à indução de estresse oxidativo nesse órgão, sendo as raízes objeto de estudo afim de averiguar o impacto dos metais pesados como agente estressor (SINGH *et al.*, 2016). De fato, observou-se que o conteúdo de dienos conjugados e de H_2O_2 aumentou em todas as concentrações de cobre, em relação ao teor natural. Dienos conjugados são formados pelo ataque de radicais superóxidos ($\cdot O_2^-$) e radical peroxila ($LOO\cdot$) a grupos metileno de ácidos graxos poliinsaturados, servido assim, como marcador de lipoperoxidação (Smirnoff, 1995), e o H_2O_2 é uma importante ERO. O conteúdo de MDA, que é outro indicador de peroxidação lipídica, aumentou nas raízes até o tratamento com 150 ppm de cobre, diminuindo nas concentrações mais elevadas de cobre (provavelmente devido à indução de vias que metabolizam o MDA). Menezes (2018), estudando as alterações bioquímicas na espécie *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O' Donell (corda-de-viola) causadas pela fração butanólica da palhada de *Urochloa ruziziensis* e da saponina protodioscina, encontrou um resultado semelhante ao presente trabalho. Houve aumento do conteúdo de dienos conjugados e consequente indicação da lipoperoxidação, enquanto o conteúdo de MDA nos tratamentos eram inferiores ao encontrado nas plantas controle.

A indução de mecanismos antioxidantes é uma resposta comum ao excesso de metais, incluindo o cobre (LENG *et al.*, 2015). No presente trabalho, houve um aumento nas atividades das enzimas POD, SOD e APX nas raízes em resposta ao aumento dos níveis de cobre no solo. As localizações das enzimas podem contribuir para explicação da atividade. A POD localiza-se principalmente na parede celular e no vacúolo (LIMA & ABDALLA, 2001; PIZA *et al.*, 2003; LOCATO, 2010; KIM & KWAN, 2010), provavelmente sujeita a uma maior exposição ao cobre e ao estresse oxidativo por ele induzido, matem sua atividade na desintoxicação do H_2O_2 até mesmo nas concentrações mais baixas de cobre. A SOD e APX estando dentro das células (MITTLER, 2002; BHATTACHARJEE, 2010; DABROWSKA *et al.*, 2007; DE GARA, 2004), aumentam sua atividade na medida que os níveis de cobre começam a ser deletérios ao crescimento.

A CAT teve sua atividade estimulada nas concentrações iniciais e posterior redução nas concentrações mais altas de cobre. Provavelmente a remoção do H_2O_2 nas concentrações mais baixas possa ter sido realizada pela POD e posteriormente nos níveis mais elevados, uma ação

conjunta entre POD e APX. A queda na atividade da CAT pode ser explicada pelo fato de que, o elevado estresse também pode inibir a síntese da enzima ou levar a uma mudança na montagem das suas subunidades (VERMA & DUBEY, 2003). Além do mais, segundo Srivastava *et al.* (2006), a CAT é sensível ao estresse induzido por cobre, na medida que nas baixas concentrações a atividade da enzima é estimulada e nas altas concentrações é inibida, fato que corrobora com os resultados obtidos no presente estudo.

Coerente com esses resultados, também foi observado um aumento na atividade das enzimas SOD e APX em raízes de soja em resposta à exposição ao alumínio, enquanto que a atividade da CAT foi diminuída (MOURA, 2010). Efeito semelhante foi observado em plantas de trigo submetidas a diferentes fontes de cobre, onde a SOD apresentou uma alta atividade e a CAT foi inibida (OLTEANU *et al.*, 2013). Finger-Teixeira (2010), verificando a restrição do desenvolvimento das raízes de plantas de soja em função da lignificação induzida pelo cádmio, constatou que quanto maior era concentração de cádmio, maior era a atividade da POD.

Reproduzindo o estresse por cobre plausível de ser encontrada nas regiões produtoras, o presente trabalho detalhou os efeitos do excesso de cobre sobre o crescimento e desenvolvimento inicial de uma cultivar convencional de soja (BRS 257), evidenciando uma tolerância relativamente alta da soja ao cobre. Indução de respostas antioxidantes da raiz, baixa translocação para parte aérea e mudanças metabólicas, podem ter prevenido um estresse muito severo, mantendo um crescimento razoável até em certas concentrações como 200 ppm. Entretanto, em virtude da grande quantidade de ambientes de produção e variedades de soja disponíveis no mercado, seria interessante verificar se a tolerância elevada é observada em outros cultivares de soja ou até mesmo em tipos diferentes de solo, afim de determinar os níveis de cobre tolerado entre os diferentes cultivares.

4.6 CONCLUSÃO

A suplementação de cobre no solo exerceu ação dual sobre a soja. Nas concentrações iniciais promoveu um incremento no crescimento, evidenciando seu efeito benéfico como micronutriente essencial. Em concentrações mais elevadas passou a exercer um efeito negativo, induzindo distúrbios nutricionais, alterações morfofisiológicas e estresse oxidativo, que restringiram o desenvolvimento das plantas. Todavia, as plantas de soja do cultivar BRS 257 limitaram a translocação de excesso do metal para as folhas, adotaram metabolismo e uso de água conservativos e ativaram mecanismos de defesa antioxidante nas raízes, garantindo a sobrevivência das plantas mesmo em níveis muito elevados de cobre no solo.

REFERÊNCIAS

- ABDUL, K. S.; JAYASINGHE, S. S.; CHANDANA, E. P.; JAYASUMANA, C.; DE SILVA, P. M. Arsenic and human health effects: a review. **Environmental toxicology and pharmacology**, Amsterdam, v.40, n.3, p.828–846, nov. 2015.
- ABREU, C.A.; NOVAIS, R.F.; RAIJ, B.; VAN & RIBEIRO, A.C. Comparação de métodos para avaliar a disponibilidade do manganês em solos. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 18, p. 81-90, 1994.
- AEBI H. In: Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**. Colowick, S,P; Kaplan, N. O. editors. Vol. 105. Florida: Acad. Press; 1984. pp. 114–121.
- AKAYA, M.; TAKENAKA, C. Effects of aluminum stress on photosynthesis of *Quercus glauca Thurb.* **Plant and Soil**, London, v.237, n. 1, p.137-146, nov. 2001.
- ALEXIEVA, V; SERGIEV, I; MAPELLI, S; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 1337-1344, dez. 2001.
- ALI, S.; CHAUDHARY, A.; RIZWAN, M.; ANWAR, H. T.; ADREES, M.; FARID, M.; IRSHAD, M. K.; HAYAT, T.; ANJUM, S. A. Alleviation of chromium toxicity by glycinebetaine is related to elevated antioxidant enzymes and suppressed chromium uptake and oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Environmental science and pollution research international**, Landsberg, v. 22, n. 14, p. 10669–10678, jul. 2015.
- AMBROSINI, V. G.; ROSA, D. J.; BASSO, A.; BORGHEZAN, M.; PESCADOR, R.; MIOTTO, A.; MELO, G. W. B. de; SOARES, C. R. F. S.; COMIN, J. J.; BRUNETTO, G. Liming as an ameliorator of copper toxicity in black oat (*Avena strigosa* Schreb.). **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 40, n. 3, p. 404-416, nov. 2016.
- AMRI, B.; KAAB, S. B.; GOUIA, H.; MARTINO, E.; COLLINA, S.; KAÂB, L. B. Copper-induced changes in nutrient uptake, enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems in horehound (*Marrubium vulgare* L.). **Botanical Sciences**, Querétaro, v. 95, n. 3, p. 565-575, 2017.
- ANDERSON, M. D.; PRASAD, T. K. STEWART, C. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology**, Lancaster v. 109, n. 4, p. 1247-1257, dez. 1995
- ANGELOVA,V.; IVANOVA, R.; IVANOV, K. Accumulations of heavy metals in leguminous crops (bean,soybean,peas,lentilsandgram). **Journal of Environmental Protection and Ecology**, London, v. 4, n. 4, p. 784–795.
- BAKER, A. J. M. Metal tolerance. **The New Phytologist**, London, v.106, p.93-111, mai. 1987.
- BAKER, N. R. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. **Annual**

Review of Plant Biology, Palo Alto, v. 59, p. 89–113, jun. 2008.

BAKER, N.R.; ROSENQVST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, n. 403, p.1607-1621, ago. 2004.

BALESTRASSE, K. B.; BENAVIDES, M. P.; GALLEGO, S. M.; TOMARO, M. L. Effect of cadmium stress on nitrogen metabolism in nodules and roots of soybean plants. **Functional Plant Biology**, Clayton, v.30, n. 1, jan. 2003.

BHATTACHARJEE, S. **Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell**. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfi eld: Science Publishers, 2010. p.1-30.

BOVERIS, A.; CADENAS, E.; CHANCE, B. Low-level chemi-luminescence of the lipooxygenase reaction. **Photobiochem Photobiophys**, v.1, p. 175–182, 1980.

BREWER, G.J. Copper toxicity in the general population. **Clin Neurophysiol**, Amsterdam, v. 121, n. 4, p. 459–460, abr. 2010.

BURKHEAD, J. L.; REYNOLDS, K. A.; ABDEL-GHANY, S. E.; COHU, C. M.; PILON, M. Copper homeostasis. **The New phytologist**, London, v. 182, n. 4, p. 799–816, jun. 2009.

CAMBROLLÉ, J.; GARCÍA, J. L.; FIGUEROA, M. E.; CANTOS, M. Evaluating wild grapevine tolerance to copper toxicity. **Chemosphere**, Oxford, v. 120, p. 171–178, fev. 2015.

COUTO, R. da R.; BENEDET, L.; COMIN, J. J.; BELLI FILHO, P.; MARTINS, S. R.; GATIBONI, L. C.; RADETSKI, M.; VALOIS, C. M. de; AMBROSINI, V. G.; BRUNETTO, G. Accumulation of copper and zinc fractions in vineyard soil in the midwestern region of Santa Catarina, Brazil. **Environmental Earth Sciences**, Heidelberg v. 73, n. 10, p. 6379-6386, mai. 2015.

DABROWSKA, G.; KATA, A.; GOC, A.; SZECHYNSKA-HEBDA, M.; SKRZYPEK, E. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. **Acta Biologica Cracoviensia, series Botanica**, Cracow, v.49, n.1, p.7-17, 2007.

De GARA, L. Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants. **Phytochemistry Reviews**, Amsterdam, v.3, n.1-2, p.195-205, jan. 2004.

DOS SANTOS, F. S.; DO AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; MAZUR, N.; GARBISU, C.; BARRUTIA, O.; BECERRIL, J. M. Resposta antioxidante, formação de fitoquelatinas e composição de pigmentos fotoprotetores em *Brachiaria decumbens* Stapf. submetida à contaminação com Cd e Zn. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n.1, p. 16-20, jan. 2011

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema brasileiro de classificação de solos. 3 ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA/CNPS, 2013. 353p

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Cultivares de soja macrorregiões 1, 2 e 3 Centro-Sul**. Londrina: EMBRAPA/Fundação Meridional, 2014 60p.

FEDERICI, G.; SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress and other physiological effects. **Aquatic toxicology**, Amsterdam, v.84, n.3, p. 415-430, jul. 2007.

FINGER-TEIXEIRA, A.; FERRARESE, M. L. L.; SOARES, A. R.; SILVA, D.; FERRARESE-FILHO, O. Cadmium-induced lignification restricts soybean root growth. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 73, p. 1959-1964, ago. 2010.

GALL, J. E.; BOYD, R. S.; RAJAKARUNA, N. Transfer of heavy metals through terrestrial food webs: a review. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 187, n. 201, p. 1-21, abr. 2015.

GARCIA, L.; WELCHEN, E.; GONZALEZ, D. H. Mitochondria and copper homeostasis in plants. **Mitochondrion**, Amsterdam, v. 19, n. PB, p. 269–274, nov. 2014.

GARCIA-MOLINA, A.; ANDRÉS-COLÁS, N.; PEREA-GARCÍA, A.; DEL VALLE-TASCÓN, S.; PEÑARRUBIA, L.; PUIG, S. The intracellular arabidopsis COPT5 transport protein is required for photosynthetic electron transport under severe copper deficiency. **Plant journal for cell and molecular biology**, Oxford, v. 65, n. 6, p. 848–860, mar. 2011.

GIANNOPOLITIS, C.N., RIES, S.K.; Superóxido dismutases. I. occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 59, n. 2, p. 309-314, fev. 1977.

GODOY, C.V.; UTIAMADA, C.M. MEYER, M.C.; CAMPOS, H.D.; FORCELINI, C.A.; PIMENTA, C.B.; BORGES, E.P.; SIQUERI, F.V.; JULIATTI, F.C.; FAVARO, F.; FEKSA, H.R.; GRIGOLLI, J.F.J.; NUNES JUNIOR, J. CARNEIRO, L.C.; SILVA, L.H.C.P.; SATO, L.N.; CANTERI, M.G.; VOLF, M.R.; DEBORTOLI, M.P.; GOUSSAIN, M.; MARTINS, M.C.; BALARDIN, R.S.; FURLAN, S.F.; MADALOSSO, T.; CARLIN, V.J.; VENANCIO, W.S. **Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2015/16: Resultados sumarizados dos ensaios cooperativos**. Londrina: Embrapa Soja, 2016. 6 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 119).

GOMES, M. P.; MARQUES, T. C. L. L. D.; NOGUEIRA, M. D. O. G.; SILVA, G. H.; CASTRO, E. M. D.; SOARES, Â. M. Effects of tailings from zinc industry in the anatomy and growth of young plants of *Salix humboldtiana* Willd:(willow). **Hoehnea**, São Paulo, v. 38, n.1, p. 135-142, mar. 2011.

GUIMARÃES, M. D. A.; SANTANA, T. A.; SILVA, E. V.; ZENZEN, I. L.; LOUREIRO, M. E. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. **Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v.1, n.3, p. 58-68, jan. 2008.

Hall, J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 366, p. 1-11, jan. 2002.

HASHEM, H. A. Cadmium toxicity induces lipid peroxidation and alters cytokinin content and antioxidant enzyme activities in soybean. **Botany**, Ottawa, v. 92, n. 1, p. 1-7, jan. 2014.

HU, H.; WANG, L.; WANG, Q.; JIAO, L.; HUA, W.; ZHOU, Q.; HUANG, X. Photosynthesis, Chlorophyll Fluorescence Characteristics and Chlorophyll content of Soybean Seedling Under Combined Stress of Bisphenol A and Cadmium. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v.33, n. 11, p. 2455-2462, ago. 2014.

KELLER, C.; RIZWAN, M.; DAVIDIAN, J. C.; POKROVSKY, O. S.; BOVET, N.; CHAURAND, P.; MEUNIER J. D. Effect of silicon on wheat seedlings (*Triticum turgidum* L.) grown in hydroponics and exposed to 0 to 30 μ M Cu. **Planta**, Berlin, v. 241, n. 4, p. 847–860, abr. 2015.

KHATUN, S.; ALI, M. B.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Copper toxicity in *Withania somnifera*: Growth and antioxidante enzymes responses of in vitro grow plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 64, n. 3, p. 279-285, dez. 2008.

KIM, Y.H.; KWAK, S.S. **The role of antioxidant enzymes during leaf development**. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfi eld: Science Publishers, 2010. p.129-150.

KULIKOVA, A. L.; KUZNETSOVA, N. A.; BURMISTROVA, N. A. Change in Growth and Physiological Parameters in Soybean Seedlings in Response to Toxic Action of Copper. **Russian Journal of Plant Physiology**, Sófia, v. 62, n.4, p. 488-498, jun. 2015.

KULIKOVA, A. L.; KUZNETSOVA, N. A.; KHOLODOVA, V. P. Effect of Copper Excess in Environment on Soybean Root Viability and Morphology. **Russian Journal of Plant Physiology**, Sófia, v. 58, n. 5, p. 836-843, set. 2011.

LENG, X.; MU, Q.; WANG, X.; LI, X.; ZHU, X.; SHANGGUAN, L.; FANG, J. Transporters, chaperones, and P-type ATPases controlling grapevine copper homeostasis. **Functional & integrative genomics**, Berlin, v. 15, n. 6, p. 673–684, nov. 2015.

LEQUEUX, H.; HERMANS, C.; LUTTS, S.; VERBRUGGEN, N. Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, n. 8, p. 673–682, ago. 2010.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, New York, p. 1-8, nov. 2001.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v.37, n.3, p.293-303, jan. 2001.

LOCATO, V.; PARADISO, A.; PINTO, M. C.; De GARA. **Reactive oxygen species and ascorbateglutathione interplay in signaling and stress responses**. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfi eld: Science Publishers, 2010. p.45-64.

- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.
- MAISSOJA. **Impacto dos fungicidas protetores na cultura da soja**. Sana Maria: MAISSOJA, 2017. Disponível em: < <http://maissoja.com.br/impacto-dos-fungicidas-protetores-na-cultura-da-soja/>>. Acessado em: 16 ago. 2018
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. de. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2 ed. Piracicaba: Potafos, 1997. 319 p.
- MARQUES, A. P. G. C.; RANGEL, A. O. S. S.; CASTRO, P. M. L. Remediation of heavy metal contaminated soils: phytoremediation as a potentially promising clean-up technology. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, Boca Raton, v. 39, n. 8, p. 622–654, ago. 2009.
- MENEZES, P. V. M. DA COSTA. Estudo das Alterações Bioquímicas, Anatômicas e Morfológicas Causadas Pela Fração Butanólica da Palhada de *Urochloa ruziziensis* (R. Germ. & C. M. Evrard) Crins e da Saponina Protodioscina Sobre as Plantas daninhas *Ipomea grandifolia* (Dammer) O' Donell e *Digitaria insularis* (L.) Mez ex Ekman. 2018. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- MINCHIO, C. A.; CANTERI, M. G.; FANTIN, L. H.; AGUIAR E SILVA, M. Epidemias de ferrugem asiática no Rio Grande do Sul explicadas pelo fenômeno ENOS e pela incidência da doença na entressafra. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.42, n.4, p.321-326. 2016
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 405-410, set. 2002.
- MOURA, N. S. Estresse Oxidativo Induzido por AL³⁺ e pH baixo em cultivares de soja. 2010. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 867-880, nov. 1981
- ODUKUDU, F. B.; AYENIMO, J. G.; ADEKUNLE, A. S.; YUSUFF, A. M.; MAMBA, B. B. Safety evaluation of heavy metals exposure from consumer products. **International Journal of Consumers Studies**, Oxford, v.38, n. 1, p. 25-34, jan. 2014
- OLTEANU, Z., TRUTA, E., OPRICA, L., ZAMFIRACHE, M. M., ROSU, C. M. & VOCHITA, G. Copper-induced changes in antioxidative response and soluble protein level in *Triticum aestivum* cv. Betiseedlings. **Romanian Agricultural Research**, Titulescu, v. 30, p. 163-170, jan. 2013.
- PEIXOTO, H. P. P.; CAMBRAIA, J.; SAN'T ANA, R.; MOSQUIM, P. R.; MOREIRA, A. M. Aluminium effects on lipid peroxidation and the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 11, n. 3, p. 137-43, 1999.

PEIXOTO, H. P. P. ; DA MATTA, F.M. ; CAMBRAIA, J. Responses of the photosynthetic apparatus to aluminum stress in two sorghum cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.25, n. 4, p.821-832, 2002.

PÉREZ-CHACA, M. V.; VIGLIOCCO, A.; REINOSO, H.; MOLINA, A.; ABDALA, G.; ZIRULNIK, F.; PEDRANZANI, H. Effects of cádmium stress on growth, anatomy and hormone contents in *Glycine max* (L.) Merr. **Acta physiologiae plantarum**, Warszawa, v. 36, p. 2815-2826, set. 2014.

PIZA, I. M. T.; LIMA, G. P. P.; BRASIL, O. G. Atividade de peroxidase e níveis de proteínas em plantas de abacaxizeiro micropropagadas em meio salino. **Revista Brasileira de Agrobiologia**, Pelotas, v. 9, n.4, p.361-366, dez. 2003.

R, DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienn: R Foundation for Statistical Computing, [2018]. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 29 ago. 2018.

SÁNCHEZ-PARDO, B.; ZORNOZA, P. Mitigation of Cu stress by legume-*Rhizobium* symbiosis in white lupin and soybean plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 102, p. 1-5, abr. 2014.

SHARMA, P.; PANDEY, S. Status of phytoremediation in world scenario. **International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation**, Newark, v.2, n.4, p. 178–191, jul. 2014.

SINGH, S.; PARIHAR, P.; SINGH, R.; SINGH, V. P.; PRASAD, S. M. Heavy Metal Tolerance in Plants: Role of Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics, and Ionomics. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, n. 1143, p. 1-36, fev. 2016.

SMIRNOFF, N. **Antioxidant systems and plant response to the environment**. In: Environment and plant metabolism. BIOS Scientific Publishers, p. 217–241 1995.

SOUZA, E. P. D.; SILVA, I. D. F. D.; FERREIRA, L. E. Mecanismos de tolerância a estresses por metais pesados em plantas. **Current Agricultural Science and Technology**, Pelotas, v. 17, n. 2, p. 167-173, jun. 2011.

SRIVASTAVA, R.; KHAN, R.; MANZOOR, N.; UZZAFAR, M. Responses of cádmium exposures on growth, physio-biochemical characteristics and the antioxidative defence system of soybean (*Glycine max* L.). **Journal of Phytology**, Al Ain, v.3, n. 10, p. 20-25, set. 2011.

SRIVASTAVA, S., MISHRA, S., TRIPATHI, R. D., DWIVEDI, S. & GUPTA, D. K. Copper- induced stress and responses of antioxidants and phytochelatins in *Hydrilla verticillata* (L.) Royle. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 80, n. 4, p. 405-415, dez. 2006.

ŠTORK, F. et al. Changes of metal-induced toxicity by H₂O₂/NO modulators in *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyceae). **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, v. 20, n. 8, p. 5502–5511, ago. 2013.

TESTER, M.; DAVENPORT, R. Na⁺ Tolerance and Na⁺ Transport in Higher Plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 91, n. 5, p. 503-527, abr. 2003.

TOSELLI, M.; SCHIATTI, P.; ARA, D.; BERTACCHINI, A.; QUARTIERI, M. The accumulation of copper in soils of the Italian region Emilia- Romagna. **Plant, Soil and Environment**, Prague, v. 55, n. 2, p. 74-79, fev. 2009.

TÓTH, G.; HERMANN, T.; DA SILVA, M. R.; MONTANARELLA, L. Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. **Environment International**, Oxford, v. 88, p. 299–309, mar. 2016.

UMER, Z.; WASIF, M.; , KASHIF, S.; SAAD, S., AROOJ, F. Assessment of heavy metal contaminants from protein sources. **Journal of Food Technology and Preservation**, London, v. 1, n. 2, p. 2-6, jun. 2017.

VERMA, S. & DUBEY, R. S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Science**, Shannon, v. 164, n. 3, p. 645-655, jan. 2003.

VU, J. C. V.; YELENOSKY, G; BAUSHER, M. G. CO₂ exchange rate, stomatal conductance and transpiration in attached leaves of Valencia orange. **HortScience**, Alexandria, v. 21 p. 143-144. 1986

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**. 2. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 1999. 941 p.

YRUELA, I. Copper in plants: Acquisition, transport and interactions. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 36, n. 5, p. 409–430, mai. 2009.

ZHOU, T.; LI, Z.; ZHANG, F.; JIANG, X.; SHI, W.; WU, L.; CHRISTIE, P. Concentrationsof arsenic, cadmium and lead in human hair and typical foods in eleven Chinese cities. **Environmental toxicology and pharmacology**, Amsterdam, v. 48, p. 150–156, dez. 2016.

5. ARTIGO II

EFEITO DE DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO LIVRE E NANOENCAPSULADO NA RESPOSTA DE PLANTAS DE SOJA AO EXCESSO DE COBRE NO SOLO

5.1 RESUMO

O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora envolvida em muitos processos biológicos de plantas, com papel fundamental na resposta das plantas a vários estresses abióticos. A aplicação exógena por meio de doadores de NO promove benefícios às plantas; no entanto, a relativa instabilidade desses compostos dificulta seu uso para fins agrícolas. A nanoencapsulação dos doadores de NO, protegendo-os da rápida degradação, surge como uma atrativa técnica para ampliar e viabilizar a aplicação exógena de NO na agricultura. Objetivou-se avaliar o efeito da aplicação de nanopartículas de quitosana/tripolifosfato de sódio contendo doador de NO (ácido *S*-nitroso-mercaptosuccínico) na proteção de plantas de soja (*Glycine max* L. Merr.) contra o estresse induzido por cobre. As plantas de soja foram cultivadas em casa de vegetação em solo suplementado com 200 e 300 ppm de cobre e tratadas com água destilada (Água); nanopartículas com o doador de NO (NPNO) na concentração de 1 mM; doador de NO livre (NO) concentração de 1 mM; nanopartículas com a molécula precursora do NO (NP) na concentração de 1 mM e plantas tratadas com água destilada e mantidas em solo sem acréscimo de cobre (Controle). Foram avaliadas variáveis morfofisiológicas e bioquímicas da planta. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F e, quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). A aplicação exógena de NO (nanoencapsulado e livre) protegeu as plantas de soja contra os efeitos do excesso de cobre no crescimento, na fisiologia e no estresse oxidativo. O NO nanoencapsulado foi mais eficiente que o livre na prevenção das plantas de soja aos efeitos deletérios do estresse por cobre. A associação de doadores de NO e nanomateriais podem viabilizar sua aplicação na agricultura, criando mecanismos de liberação controlada capazes de evitar os efeitos tóxicos das altas concentrações de NO, bem como a instabilidade dos seus doadores, consolidando-se como uma estratégia a ser explorada em um futuro próximo

Palavras-chave: Quitosana. NO. *Glycine max* (L.) Merr. Nanotecnologia.

5.2 INTRODUÇÃO

O acúmulo de metais pesados no solo é um importante fator de estresse abiótico para os vegetais (AHMAD *et al.*, 2015; SRIVASTAVA *et al.*, 2016). Em consequência da longa persistência e potencial para se acumular na natureza, a contaminação ambiental por metais pesados é uma das poluições mais graves causadas pelas atividades antrópicas (ARORA *et al.*, 2008; BERTOLI *et al.*, 2012; NAGAJYOTI *et al.*, 2010), dada a possibilidade de contaminar a cadeia alimentar humana principalmente através das plantas cultivadas (HABIBA *et al.*, 2015; IQBAL *et al.*, 2016; KHAN *et al.*, 2017).

O cobre é um micronutriente essencial exigidos pelas plantas para seu desenvolvimento normal; no entanto, concentrações excessivas desse metal pesado podem causar vários efeitos tóxicos ao metabolismo vegetal (CHIBUIKE & OBIORA, 2014). A toxicidade pode ser causada por desequilíbrio na homeostase redox, induzindo uma superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO), como oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\cdot) (GILL & TUTEJA, 2010). A elevada produção de ERO resulta em estresse oxidativo, associado a danos a componentes celulares vitais como DNA, proteínas e lipídios, entre outros distúrbios fisiológicos, causando a morte da planta (POONAM *et al.*, 2014; HABIBA *et al.*, 2015).

As plantas desenvolveram mecanismos de proteção contra o estresse oxidativo induzido por metais, incluindo antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, para eliminar ERO e aliviar seus efeitos deletérios (COBBETT & GOLDSBROUGH, 2002). Várias enzimas antioxidativas, incluindo catalase (CAT, EC 1.11.1.6), peroxidase (POD, EC 1.11.1.7), superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), glutatona redutase (GR, EC 1.8.1.7) e guaiacol peroxidase (GPOX, EC 1.11.1.7), estão envolvidas na minimização do danos oxidativos (THOUNAOJAM *et al.*, 2012; ISERI *et al.*, 2011; SUN *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2010). Os antioxidantes não enzimáticos, tais como ascorbato (Asc), glutatona (GSH), compostos fenólicos e certos aminoácidos, também desempenham um papel central no mecanismo de defesa antioxidante nas células vegetais (GILL & TUTEJA, 2010).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa, pequena e reativa, que difunde facilmente através das células e interage com diferentes compostos celulares, incluindo outros radicais (CORREA-ARAGUNDE *et al.*, 2015). Está envolvida em vários processos fisiológicos, que incluem resposta a estresses abióticos (JOUDOI *et al.*, 2013), defesa contra patógenos (ASAI *et al.*, 2008), germinação e desenvolvimento normal de plantas (EL-

MAAROUF-BOUTEAU & BAILLY, 2008). O NO é capaz de modificar a expressão gênica e a atividade de proteínas (SIMONTACCHI *et al.*, 2015), em um processo conhecido como *S*-nitrosilação (ou *S*-nitrosação) em resíduos de cisteína e a nitrosilação de centros metálicos de metaloproteínas, além da nitração de resíduos de tirosina (ASTIER & LINDERMAYR, 2012; KOVACS & LINDERMAYR, 2013; RADI, 2013). A *S*-nitrosilação gera as moléculas de *S*-nitrosotióis (RSNOs) que são compostos importantes em sistemas animais e vegetais (FOSTER *et al.*, 2003; LINDERMAYR & DURNER, 2009; ASTIER *et al.*, 2011; BRONIOWSKA & HOGG, 2012). Os RSNOs são formados pela modificação covalente entre o grupo tiol de resíduos de cisteína com o NO, tanto em proteínas quanto em tíois de baixo peso molecular. A *S*-nitrosilação é considerada como uma das mais importantes modificações pós-traducionais de proteínas e o aumento do número de alvos de nitrosilação foi identificado entre proteínas e enzimas envolvidas em processos celulares cruciais (SETH & STAMLER, 2011).

Vários estudos demonstraram a diminuição da toxicidade por metal nas plantas pela aplicação exógena de doadores de NO (HE *et al.*, 2014a). Este efeito benéfico do NO exógeno geralmente está relacionado com a prevenção do estresse oxidativo pela remoção direta de ERO ou ativação de enzimas antioxidantes (HE *et al.*, 2014b). No entanto, o tratamento direto das plantas com NO é tecnicamente difícil, dada a natureza gasosa do NO (VITOR *et al.*, 2013). Além do mais, doadores de NO são relativamente instáveis, e suas taxas de decomposição são aumentadas por altas temperaturas e exposição à luz, levando a uma liberação rápida de NO, o que pode resultar em efeitos tóxicos e reduzir a eficácia da molécula de sinalização (SEABRA & DURÁN, 2010; SEABRA *et al.*, 2015a).

A encapsulação dos doadores de NO em nanomateriais surgiu como uma estratégia que poderia proteger essas moléculas da decomposição / degradação e permitir uma liberação controlada de NO, estendendo assim seu período de ação (SEABRA & DURÁN, 2010; CARDOZO *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2014; SEABRA *et al.*, 2015a e 2015b). A quitosana, um polissacarídeo natural, tem várias aplicações devido às suas propriedades, como biodegradabilidade e biocompatibilidade, que aumenta o transporte de compostos polares ativos através das superfícies epiteliais em diversas aplicações biológicas (DUTTA *et al.*, 2004). A quitosana possui também propriedades mucoadesivas, facilitando o transporte desses compostos ativos através das membranas celulares, o que implica um grande potencial para uso na indústria agroquímica (HARISH PRASHANTH & THARANATHAN, 2007), além de ser considerada um excelente biopolímero para preparação de micro e nanopartículas (SUNDAR *et al.*, 2010).

De fato, nanopartículas de quitosana contendo o ácido *S*-nitroso-mercaptosuccínico (*S*-nitroso-MSA) atenuaram os efeitos do estresse salino em plantas de milho (Oliveira *et al.*, 2016). A taxa de liberação de NO do doador (*S*-nitroso-MSA) quando nanoencapsulado foi em média 5,6 vezes mais lenta que a liberação do mesmo doador em sua forma livre. Avaliando o rendimento quântico máximo e a taxa de transporte de elétrons pelo fotossistema II, o doador de NO nanoencapsulado foi mais efetivo na proteção das plantas quando comparado ao doador de NO livre, ambos na mesma concentração (50 μM), sendo necessário o dobro da concentração (100 μM) do doador em sua forma livre para garantir o mesmo efeito protetor que as nanopartículas quitosana contendo o doador de NO. Todavia, a aplicação dessas nanopartículas liberadoras de NO na proteção contra o estresse induzido pelo excesso de metais ainda não foi testada.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito protetor da aplicação de nanopartículas de quitosana/tripolifosfato de sódio contendo o *S*-nitroso-MSA sobre plantas de soja (*Glycine max* L. Merr.) submetidas ao estresse induzido por cobre, comparando com doador de NO não nanoencapsulado.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

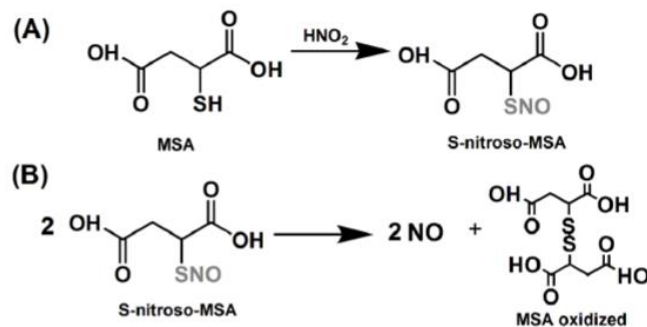
O experimento foi realizado em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Biologia Animal e Vegetal da Universidade Estadual de Londrina (UEL), situada na cidade de Londrina – PR. O solo utilizado como substrato para compor as unidades experimentais foi um Latossolo Vermelho Escuro eutrófico, com os seguintes atributos químicos: pH (CaCl_2) 5,0; Ca, Mg, K e Al, respectivamente, 4,0; 1,8; 0,65 e 0,04 em $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; P 7,6 mg dm^{-3} ; MO 28,2 g kg^{-1} , com classe textural muito argilosa (6,85% de areia; 13,35% de silte e 77,80% de argila) e teor natural de Cu de 11,2 mg dm^{-3} . Foram utilizadas sementes de soja (*Glycine max* L. Merr.) de uma cultivar convencional (BRS 257), com plantio recomendado para a macrorregião centro-sul do Brasil.

As suspensões de nanopartículas foram fornecidas pela Prof^a. Amedea Barozzi Seabra, do Centro de Ciências Naturais e Humanas pertencente à Universidade Federal do ABC, São Paulo. As nanopartículas foram preparadas por gelificação ionotrópica (ELGADIR *et al.*, 2015; TRIPATHY *et al.*, 2012). Resumidamente, quitosana (CS) (2.6 mg mL^{-1}) e ácido mercaptosuccínico (MSA) (2.7 mM) foram misturados através de agitação magnética numa solução aquosa de ácido acético (0,175 M) durante 90 min. A solução aquosa de tripolifosfato de sódio (TPP) foi adicionada gota a gota na suspensão CS / MSA, obedecendo à proporção

volumétrica de 3 CS / MSA : 1 TPP. A mistura final foi agitada durante mais 45 minutos à temperatura ambiente, produzindo uma suspensão de nanopartículas (NPs) contendo MSA na concentração final de 20 mM.

Os grupos tióis livres do MSA foram nitrosados adicionando quantidades equimolares de nitrito de sódio (NaNO_2) (20 mM) em meio acidificado ($\text{pH} = 3$). A suspensão final foi protegida da luz com papel alumínio e levada à geladeira por 90 minutos. Da mesma forma, o ácido *S*-nitroso-mercaptosuccínico (não nanoencapsulado) foi preparado através da nitrosação do MSA livre, adicionando uma quantidade equimolar de NaNO_2 . A formação do doador de NO ácido *S*-nitroso-mercaptosuccínico (Fig.1), livre ou encapsulado em nanopartículas, foi confirmada pela aparência das bandas de absorção de grupo S-NO a 336 nm ($\epsilon = 980 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ou a 545 nm ($\epsilon = 18.4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) usando o espectrofotômetro UV-Vis Agilent 8453.

Figura 11. (A) Nitrosação do MSA formando o *S*-nitroso-MSA. (B) Decomposição do *S*-nitroso-MSA, liberando o NO e originando MSA oxidado.



FONTE: SEABRA *et al* (2017).

Foram realizados dois experimentos distintos a fim de averiguar o efeito do tratamento com nanopartículas liberadoras de NO e com o doador de NO em sua forma livre na resposta de plantas de soja ao excesso de cobre no solo. No primeiro experimento, o solo utilizado como substrato foi suplementado com 200 ppm de cobre (estresse moderado) e no segundo experimento foi suplementado com 300 ppm de cobre (estresse severo).

Os tratamentos para ambos os experimentos foram constituídos da seguinte maneira: (Controle) recebeu água destilada e solo com teor natural de cobre utilizado como substrato; (Água) recebeu água destilada e solo suplementado com cobre como substrato; (NPNO) tratamento que recebeu as nanopartículas contendo o doador de NO na concentração de 1 mM e solo suplementado com cobre como substrato; (NO) tratamento que recebeu o doador de

NO na forma livre sem a presença das nanopartículas na concentração de 1 mM e solo suplementado com cobre como substrato e (NP) tratamento que recebeu as nanopartículas contendo a molécula precursora do NO na concentração de 1 mM e solo suplementado com cobre como substrato. O tratamento (NP) serviu para averiguar os efeitos das nanopartículas de quitosana sem a liberação de NO sobre as plantas de soja.

As unidades experimentais foram vasos com quatro plantas, totalizando dez repetições por tratamento. Foram utilizados vasos plásticos de 1,16 L (10,5 cm de altura x 14,5 cm largura) com aproximadamente 0,753 kg de solo. O cobre foi fornecido mediante a adição de uma solução de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), na concentração de 200 ppm para o primeiro experimento e 300 ppm para o segundo experimento, com volume final ajustado para 130 mL por vaso. Posteriormente o solo foi homogeneizado em sacos plásticos sob agitação, permanecendo nos vasos por 5 dias até a semeadura. Os tratamentos com as formulações foram realizados uma vez ao dia durante três dias consecutivos por semana, sendo iniciados logo após a semeadura e com duração de três semanas. As formulações foram aplicadas via solo em um volume de 36 mL por vaso.

As variáveis morfológicas avaliadas foram obtidas ao final do período de condução do experimento, onde as plantas de soja se encontravam no estágio fenológico V2 para V3, com o primeiro trifólio completamente desenvolvido e o segundo trifólio em expansão. Para o comprimento da parte aérea (CPA), o valor da repetição foi composto pela média das quatro plantas do vaso. Para as variáveis comprimento do sistema radicular (CSR), área foliar (AF), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca do sistema radicular (MSR), os valores das repetições foram compostos pela média de duas plantas do vaso. As outras duas plantas foram utilizadas para obtenção do material vegetal para determinação das variáveis bioquímicas.

Para AF, foi utilizado um medidor de área foliar portátil LI-3000C (LI-COR® Biosciences, Lincoln, EUA). Para determinação da massa seca, o material vegetal foi separado em caules e folhas (MSPA) e raízes (MSR). Após serem acondicionados individualmente em sacos de papel, foram levados à estufa a 60°C até peso constante.

As variáveis fisiológicas avaliadas foram obtidas quando as plantas de soja se encontravam no estágio fenológico V2 para V3. As variáveis de fluorescência da clorofila *a* foram medidos em folhas intactas utilizando um fluorômetro OS1p (Opti-Sciences, Hudson, EUA). O rendimento quântico máximo do fotossistema II foi determinado antes do amanhecer pela relação F_v/F_m e a atividade potencial pela relação F_v/F_o , em folhas adaptadas ao escuro durante 15 minutos (BAKER, 2008). O rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{II})

foi medido às 10:30 hs em folhas adaptadas à luz em um dia de sol pleno, e a taxa relativa de transporte linear de elétrons pelo fotossistema II (rETR) foi calculada como $rETR = \Delta F / F_m' \times PAR \times 0,5 \times 0,84$ (BAKER, 2008).

As avaliações das trocas gasosas foram feitas das 9:00 às 11:30 hs utilizando-se um analisador portátil de gás por infravermelho (Irga), (LI-COR[®] Biosciences, Lincoln, EUA), modelo LI-6400 XT, conectado a uma câmara de 6 cm², ajustada para uma densidade de fluxo de fótons saturante (1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Foram determinadas as taxas de fotossíntese líquida (*A*) e transpiração (*E*), além da condutância estomática (*g_s*) e a razão entre a concentração interna e ambiente de CO₂ (*C_i/C_a*), seguindo o método descrito por Vu *et al* (1986). Foram calculados a eficiência do uso da água (EUA) pela razão *A/E* e a eficiência instantânea de carboxilação (*k*) por meio da razão (*A/C_i*).

Os pigmentos fotossintéticos foram determinados utilizando folhas do primeiro trifólio de acordo com a metodologia descrita por Lichtenthaler e Buschmann (2001). Para a análise química, amostras secas de raízes laterais e folhas de plantas em V3 foram submetidas à digestão via úmida, sulfúrica para N e nitroperclórica para P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn e Zn. Posteriormente, os teores de N foram determinados pelo método da microdestilação Kjeldahl, com titulação através da solução de H₂SO₄ (0,05N). Os teores de P e S foram determinados por meio de espectrofotometria UV-Vis, K através de fotômetro de chama, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn por espectrofotometria de absorção atômica. Todas as análises seguiram recomendações de Malavolta *et al.* (1997).

Parâmetros que indicam a ocorrência de estresse oxidativo foram mensurados utilizando amostras de raízes laterais de plantas em V3 através da determinação do conteúdo de H₂O₂, dienos conjugados e MDA seguindo as metodologias descritas por ALEXIEVA *et al.* (2001), BOVERIS *et al.* (1980) e Federici *et al.* (2007), respectivamente.

Para determinação das atividades das enzimas antioxidantes, foram utilizados extratos enzimáticos brutos obtidos por meio da homogeneização de 100 mg de raízes laterais. Após a maceração em nitrogênio líquido, foi adicionado 1 mL de tampão de extração, constituído de EDTA 1 mM em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,8), suplementado com polivinil-poli-pirrolidona (PVPP) 2% (p/v). O extrato foi centrifugado a 15645 xg, a 4°C por 20 min, e o sobrenadante utilizado nas avaliações enzimáticas. O conteúdo de proteínas foi determinado com o reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 da Bio-Rad, seguindo as especificações do fabricante.

A atividade da APX foi determinada de acordo com o método de Nakano e Asada (1981), através do acompanhamento do consumo de ascorbato a 290 nm na presença de H₂O₂.

A atividade da CAT foi determinada segundo Aebi (1974) e Peixoto *et al.* (1999), acompanhando-se o decréscimo da absorvância do H₂O₂ a 240 nm. A atividade da POD foi determinada segundo Peixoto *et al.* (1999), através da oxidação do pyrogallol a purpurogalina na presença de H₂O₂ e medição do acréscimo da absorvância a 420 nm. A atividade da SOD foi determinada de acordo com Giannopolitis e Ries (1977), verificando a capacidade do extrato em inibir a fotoredução do NBT.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC). As pressuposições da análise de variância foram atendidas através das estatísticas de influência e análise de resíduos, aplicando-se os testes de normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (Bartlett). Os resultados foram submetidos à análise de regressão, avaliando o efeito das concentrações de cobre adicionadas ao solo sobre as variáveis mensuradas. Foi feito o ajuste de modelos polinomiais de regressão, escolhendo-se o polinômio com o maior valor do coeficiente de determinação (R^2), com auxílio do programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2018), de acordo com o teste F e tomando como base $p < 0,05$.

5.4 RESULTADOS

Na condição de estresse induzido pela suplementação de 200 ppm (Tabela 4), não houve diferença significativa entre os controles em relação ao desenvolvimento em comprimento e acúmulo de massa, indicando pouca influência da suplementação de cobre sobre esses parâmetros. Com a suplementação de 300 ppm (Tabela 5), foi possível observar diferenças significativas entre os controles para todos os parâmetros morfológicos mensurados, indicando a influência negativa do cobre sobre o desenvolvimento das plantas nessa condição de estresse.

Com 200 ppm de cobre no solo, os tratamentos NPNO e NO promoveram um incremento em CSR e, juntamente com NP, garantiram um acúmulo de MSR superior aos controles. NPNO foi o único tratamento que propiciou um desenvolvimento maior da parte aérea em relação ao CPA e MSPA, comparando-o aos controles. NPNO e NO promoveram um desenvolvimento da AF das plantas equivalente ao Controle.

Tabela 4. Comprimento do sistema radicular (CSR), massa seca radicular (MSR), comprimento da parte aérea (CPA), massa seca da parte aérea (MSPA) e área foliar (AF) de plantas de soja cultivadas em solos suplementados com 200 ppm de cobre.

Variável	Cu (200 ppm)				
	Controle	Água	NPNO	NO	NP
CSR (cm)	29.21 b	28.86 b	33.14 a	31.82 a	28.62 b
MSR (g ⁻¹ planta)	0.2073 b	0.2101 b	0.2461 a	0.2314 a	0.2440 a
CPA (cm)	17.51 b	16.97 b	19.02 a	17.26 b	17.36 b
MSPA (g ⁻¹ planta)	0.4351 b	0.4312 b	0.4798 a	0.4506 b	0.4502 b
AF (cm ²)	143.27 a	137.13 b	146.72 a	143.56 a	134.32 b

Os dados representam as médias ($n = 8$). Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si de acordo com o teste *F*, seguido pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Controle = tratamento com água destilada e solo com teor natural de cobre; Água = tratamento com água destilada e solo suplementado com 200 ppm de cobre; NPNO = tratamento com doador de NO nanoencapsulado e solo suplementado com 200 ppm de cobre; NO = tratamento com doador de NO na forma livre e solo suplementado com 200 ppm de cobre; NP = tratamento com nanopartículas contendo o MSA não nitrosado e solo suplementado com 200 ppm de cobre.

NPNO, NO e NP induziram um aumento no CSR em relação ao tratamento Água em solo suplementado com 300 ppm de cobre, mas nenhum dos tratamentos resultaram em CSR equivalente ao Controle. Entretanto, NPNO proporcionou o mesmo acúmulo de MSR que o Controle. Para todos os parâmetros relacionados à parte aérea das plantas (CPA, MSPA e AF), NPNO foi o único tratamento que protegeu as plantas de soja da forma a garantir um desenvolvimento igual ao Controle.

Tabela 5. Comprimento do sistema radicular (CSR), massa seca radicular (MSR), comprimento da parte aérea (CPA), massa seca da parte aérea (MSPA) e área foliar (AF) de plantas de soja cultivadas em solos suplementados com 300 ppm de cobre.

Variável	Cu (300 ppm)				
	Controle	Água	NPNO	NO	NP
CSR (cm)	28.72 a	15.32 c	20.63 b	20.59 b	20.36 b
MSR (g ⁻¹ planta)	0.1578 a	0.1134 c	0.1488 a	0.1418 b	0.1358 b
CPA (cm)	17.33 a	14.47 b	16.62 a	15.64 b	15.01 b
MSPA (g ⁻¹ planta)	0.3656 a	0.3286 b	0.3624 a	0.3448 b	0.3317 b
AF (cm ²)	116.74 a	95.92 b	110.56 a	102.13 b	94.54 b

Os dados representam as médias ($n = 8$). Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Controle = tratamento com água destilada e solo com teor natural de cobre; Água = tratamento com água destilada e solo suplementado com 300 ppm de cobre; NPNO = tratamento com doador de NO nanoencapsulado e solo suplementado com 300 ppm de cobre; NO = tratamento com doador de NO na forma livre e solo suplementado com 300 ppm de cobre; NP = tratamento com nanopartículas contendo o MSA não nitrosado e solo suplementado com 300 ppm de cobre.

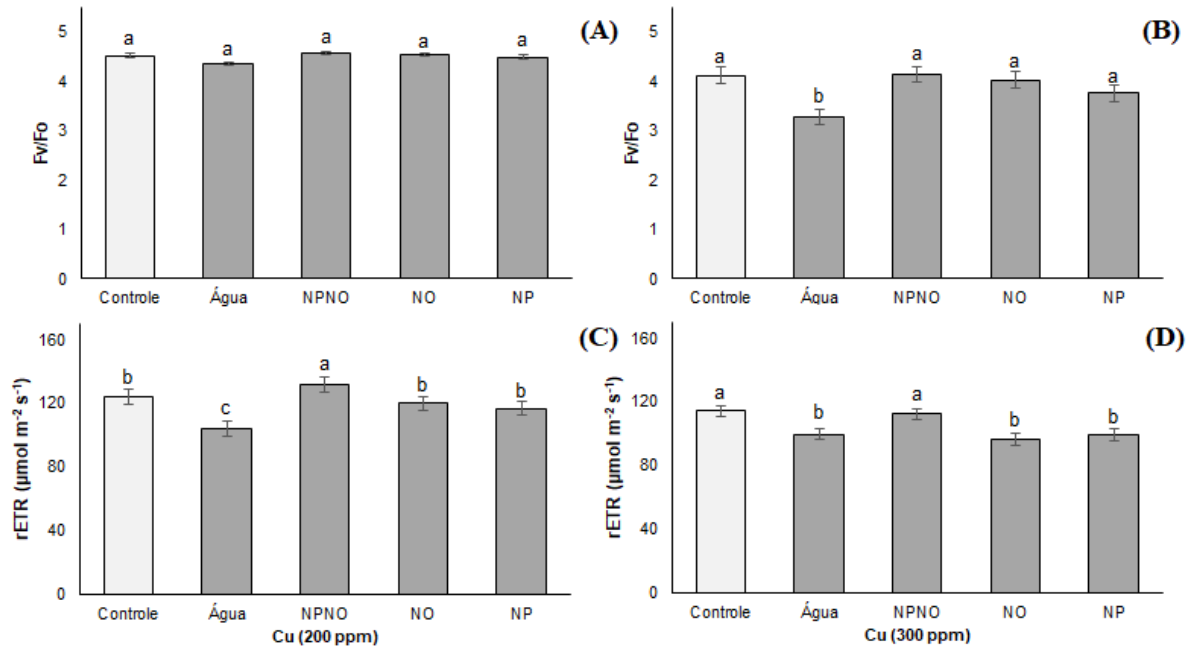
Em ambas as concentrações de cobre suplementadas no solo, os sintomas visuais mais pronunciados foram observados no sistema radicular (Fig. 12), não sendo possível verificar diferenças visuais entre os tratamentos em relação a parte aérea das plantas (resultados não mostrados).

Figura 12. (A) Sistema radicular de plantas de soja referente aos tratamentos Controle; Água; NPNO; NO; NP, respectivamente e cultivadas em solos suplementados com 200 ppm de cobre. (B) Sistema radicular de plantas de soja referente aos tratamentos Controle; Água; NPNO; NO; NP, respectivamente e cultivadas em solos suplementados com 300 ppm de cobre.



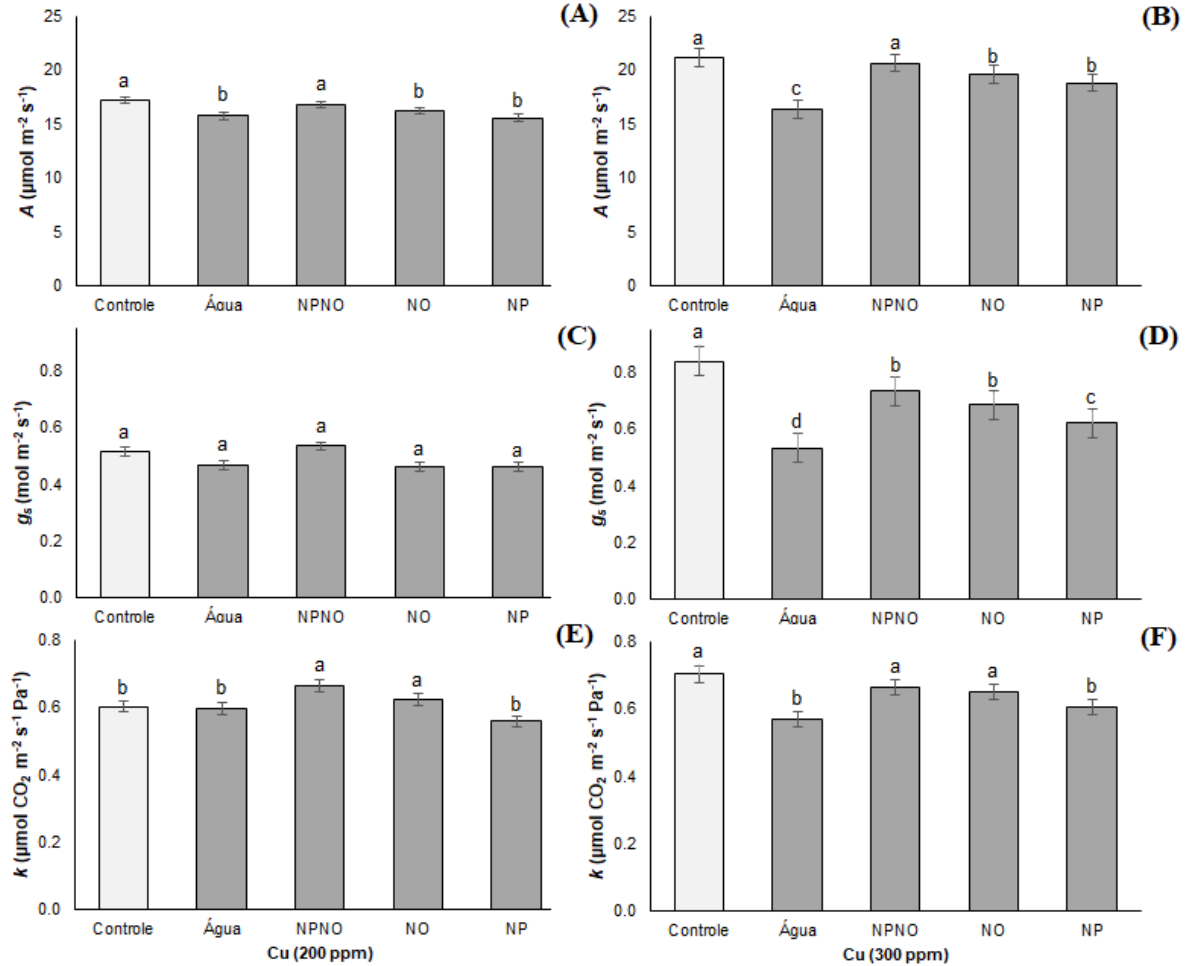
A suplementação com 300 ppm de cobre levou a uma queda do F_v/F_o , a qual foi prevenida pelos tratamentos NPNO, NO e NP (Fig. 13). Em ambas as concentrações de cobre, observou-se uma redução da rETR em relação ao Controle induzida pelo excesso do metal no solo. NPNO promoveu um aumento da rETR comparado ao tratamento Água, resultando em valores iguais (300 ppm) ou superiores (200 ppm) aos do Controle. Por outro lado, NO e NP induziram o aumento da rETR apenas em plantas cultivadas em solo com 200 ppm de cobre.

Figura 13. (A|B) Atividade potencial do fotossistema II (F_v/F_o) e (C|D) taxa relativa de transporte de elétrons pelo fotossistema II (rETR) de plantas de soja cultivadas em solos suplementados com 200 e 300 ppm de cobre e submetidas aos tratamentos com água destilada (Água), nanopartículas contendo S-nitroso-MSA a 1 mM (NPNO), S-nitroso-MSA livre a 1 mM (NO) e nanopartículas contendo o MSA não nitrosado a 1 mM (NP). As plantas Controle foram cultivadas em solo sem a suplementação de cobre. Os dados representam as médias \pm SE ($n = 8$). Letras iguais nas colunas não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).



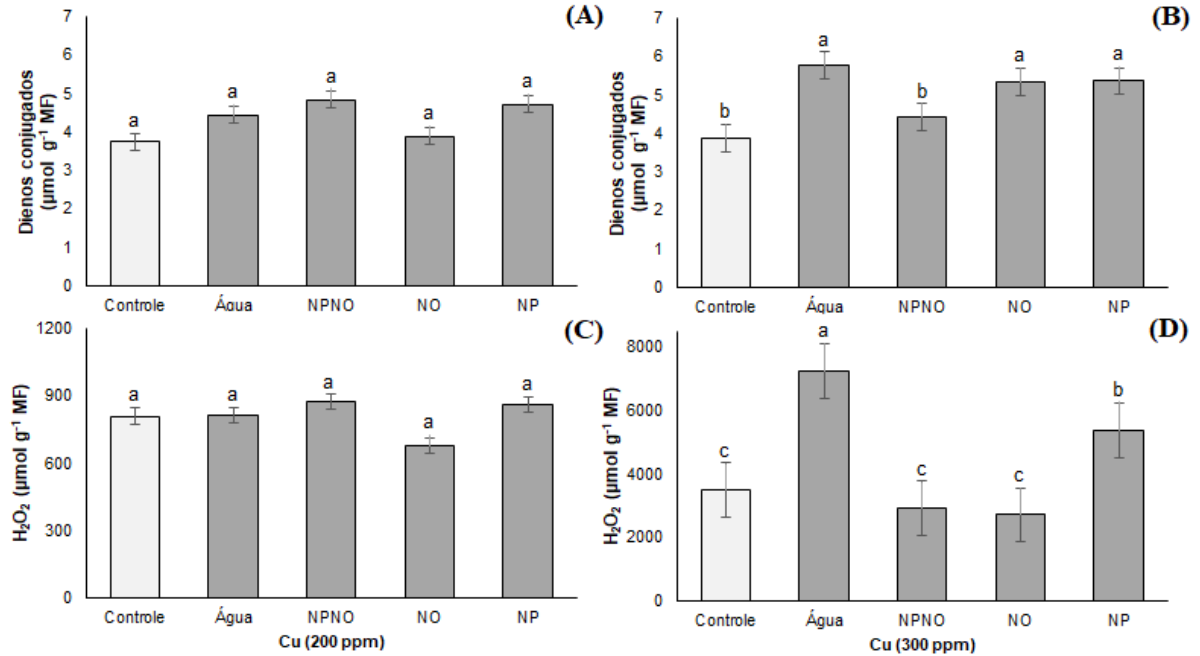
A figura 14 apresenta valores que evidenciam alterações significativas nas trocas gasosas das plantas. A suplementação com cobre provocou uma queda de A em ambas as concentrações, o qual foi prevenido pelo tratamento NPNO. No estresse mais severo, os tratamentos NO e NP sofreram a redução de A , mas conseguiram assegurar nas plantas uma taxa superior ao tratamento Água. Efeito semelhante foi observado para g_s na concentração de 300 ppm, redução no parâmetro entre os tratamentos em comparação ao Controle, mas uma prevenção da queda também é observada, garantindo valores superiores ao tratamento Água principalmente entre os tratamentos com a presença do NO (NPNO; NO). Por outro lado, o parâmetro não foi alterado pela concentração de 200 ppm. Também na concentração de 200 ppm, os tratamentos com a presença do NO promoveram aumento de k e na medida que o estresse se intensificou, evitaram sua redução.

Figura 14. (A|B) Taxa fotossintética líquida (A), (C|D) condutância estomática (g_s) e (E|F) eficiência instantânea de carboxilação (k) de plantas de soja cultivadas em solos suplementados com 200 e 300 ppm de cobre e submetidas aos tratamentos com água destilada (Água), nanopartículas contendo S-nitroso-MSA a 1 mM (NPNO), S-nitroso-MSA livre a 1 mM (NO) e nanopartículas contendo o MSA não nitrosado a 1 mM (NP). As plantas Controle foram cultivadas em solo sem a suplementação de cobre. Os dados representam as médias \pm SE ($n = 8$). Letras iguais nas colunas não diferem entre si de acordo com o de Scott-Knott ($p < 0,05$).



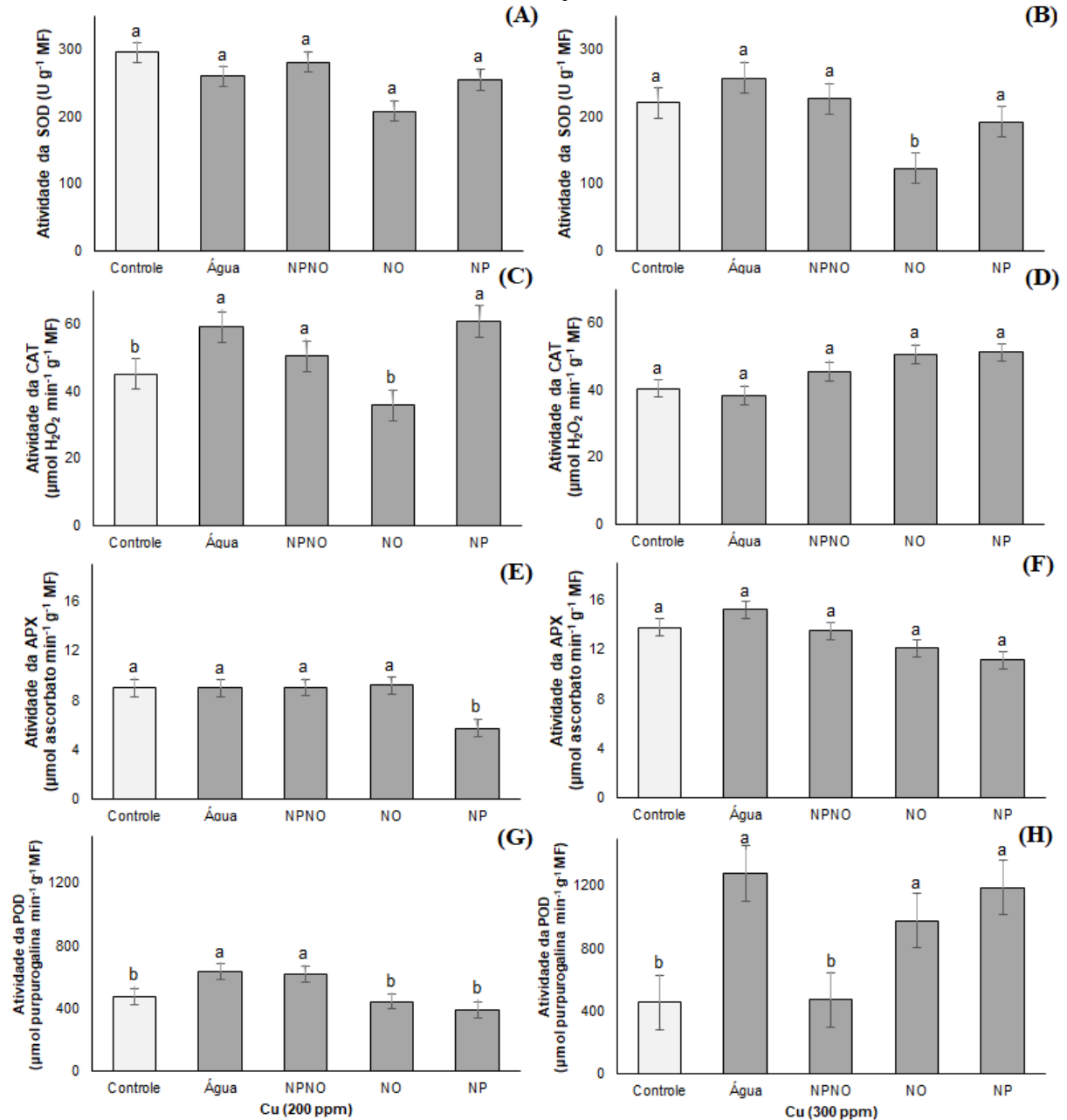
O estresse oxidativo induzido pela concentração de 200 ppm de cobre não provou diferenças significativas nos conteúdos de dienos conjugados e H_2O_2 (Fig. 15). Contudo, na intensificação do estresse é possível ver que o tratamento NPNO protegeu as plantas, matendo os níveis de dienos conjugados semelhante ao Controle, não sendo possível observar o mesmo efeito protetor nos tratamentos NO e NP. Por outro lado, a formação de H_2O_2 foi fortemente inibida entre os tratamentos com a presença de NO e moderadamente inibida no tratamento NP. Mantendo os níveis iguais ao Controle e abaixo do tratamento Água, respectivamente.

Figura 15. (A|B) Dienos conjugados nas raízes e (C|D) peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas raízes de soja cultivadas em solos suplementados com 200 e 300 ppm de cobre e submetidas aos tratamentos com água destilada (Água), nanopartículas contendo S-nitroso-MSA a 1 mM (NPNO), S-nitroso-MSA livre a 1 mM (NO) e nanopartículas contendo o MSA não nitrosado a 1 mM (NP). As plantas Controle foram cultivadas em solo sem a suplementação de cobre. Os dados representam as médias \pm SE ($n = 4$). Letras iguais nas colunas não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).



A figura 16 apresenta os valores das atividades enzimáticas. Na concentração de 200 ppm de cobre, a SOD não apresentou diferença em sua atividade entre os tratamentos, enquanto que a CAT teve sua atividade aumentada nos tratamentos Água, NPNO e NP. A atividade da APX foi parcialmente reduzida no tratamento NP, enquanto que, na atividade da POD observa-se um aumento nos tratamentos Água e NPNO. Em 300 ppm a SOD apresentou uma redução em sua atividade no tratamento NO. A atividade das enzimas CAT e APX não apresentaram diferenças entre os tratamentos. Por outro lado, é possível observar um aumento significativo na atividade da POD nos tratamentos Água, NO e NP, comparando-os aos tratamentos Controle e NPNO, os quais apresentaram uma baixa atividade para a POD.

Figura 16. (A|B) Atividade da enzima superóxido dismutase nas raízes (SOD), (C|D) consumo de peróxido de hidrogênio nas raízes (CAT), (E|F) consumo de ascorbato nas raízes (APX) e (G|H) formação de purpurogalina nas raízes (POD) de soja cultivadas em solos suplementados com 200 e 300 ppm de cobre e submetidas aos tratamentos com água destilada (Água), nanopartículas contendo S-nitroso-MSA a 1 mM (NPNO), S-nitroso-MSA livre a 1 mM (NO) e nanopartículas contendo o MSA não nitrosado a 1 mM (NP). As plantas Controle foram cultivadas em solo sem a suplementação de cobre. Os dados representam as médias \pm SE ($n = 4$). Letras iguais nas colunas não diferem entre si de acordo com o de Scott-Knott ($p < 0,05$).



5.5 DISCUSSÃO

Os relatos em torno do papel fundamental do NO na indução de respostas em plantas ao estresse por metais pesados vem ocorrendo de forma crescente, evidenciando a ação benéfica do NO mediante a neutralização das ERO pela remoção direta ou pelo estímulo ao sistema antioxidante (SAHAY & GUPTA, 2017). Foi evidenciando sua ação protetora ante ao estresse induzido por metais como cádmio, cobre, níquel e zinco, além de metaloides como arsênio (HE *et al.*, 2014). Especificamente ao estresse induzido pelo cobre, Petö *et al.* (2013) observaram que o NO pode facilitar a tolerância dependendo da intensidade do estresse. Apesar dos relatos da ação benéfica do NO endógeno, a aplicação de doadores de NO na agricultura ainda é escasso, principalmente devido à instabilidade dessas moléculas (SEABRA *et al.*, 2014).

O presente trabalho aborda uma estratégia inovadora de proteção de plantas ao estresse induzido por cobre, evidenciando os benefícios da utilização do *S*-nitroso-MSA como doador de NO, um composto de baixo custo de produção quando comparado aos doadores de NO usuais aplicados às plantas. O *S*-nitroso-MSA foi efetivo tanto em sua formulação nanoencapsulada quanto sua aplicação na forma livre, contudo, NO nanoencapsulado foi mais eficiente na proteção das plantas. Observando-se os parâmetros morfológicos e em situação de estresse moderado, o doador de NO nanoencapsulado promoveu um maior desenvolvimento dos órgãos das plantas em comprimento e acúmulo de massa, enquanto que o livre promoveu o mesmo efeito apenas nas raízes. Com a intensificação do estresse, a ação benéfica do NO foi restrita a proteger as plantas ao excesso de cobre, sendo o doador de NO nanoencapsulado o único tratamento que preveniu os efeitos induzidos pelo cobre sobre as plantas, garantindo um desenvolvimento semelhante as plantas cultivadas em substrato sem a presença do metal.

Foi observada redução da raiz em tamanho, entretanto o NO nanoencapsulado garantiu um acúmulo de massa igual às plantas controle, não sendo visível esse efeito no doador de NO em sua forma livre nessa condição de estresse. Zou *et al.* (2012) perceberam que a aplicação exógena de SNP como doador de NO contribuiu para a manutenção do desenvolvimento da radícula de *Vicia faba* (L.) (fava) submetida ao estresse por cobre. Segundo Singh *et al.* (2016) a raiz é o primeiro órgão da planta exposto ao excesso de metal no solo e vem se tornando objeto de estudo ao estresse induzido por metais pesados. No presente trabalho notou-se que a raiz da soja é a parte da planta mais sensível ao estresse e a proteção deste órgão pode vir a servir como base para avaliar a efetividade de doadores de NO na prevenção do dano causado pelo excesso de metal pesado.

As trocas gasosas foram parâmetros avaliados que corroboraram com os efeitos observados na morfologia das plantas, evidenciando a redução dos efeitos do excesso de cobre nos tratamentos com a presença do NO, com destaque ao NO nanoencapsulado, o qual propiciou a mesma A que as plantas controle cultivadas sem a presença do cobre nas duas situações de estresse. Em contrapartida, a ação protetora da aplicação exógena de NO sobre as plantas está diretamente relacionada com a concentração de doador utilizada. Os efeitos protetores do NO em plantas submetidas a estresses abióticos são induzidos por baixas concentrações desta molécula de sinalização (nano a micromolar), enquanto que as concentrações milimolares de NO podem exercer toxicidade, evidenciando o duplo efeito da molécula, no qual a mesma propriedade que a torna útil em diversos processos fisiológicos também a torna letal (SANTISREE *et al.*, 2015).

Analisando a morfologia de plantas submetidas ao estresse induzido pelo cobre, Liu *et al.* (2016) observaram que baixas concentrações de SNP promoveram o maior desenvolvimento de plantas de *Catharanthus roseus* L. (Vinca-de-Madagascar), enquanto que a maior concentração potencializou o efeito tóxico nas plantas, restringindo seu desenvolvimento de forma mais acentuada que o tratamento que contava apenas com o excesso do metal no solo. Dong *et al.* (2014) avaliando os efeitos do NO exógeno em plantas de *Lolium perenne* L. (azevém) cultivadas sob estresse por cobre, observaram um efeito protetor da aplicação exógena de SNP, revertendo o acúmulo de cobre da parte aérea para raiz, promovendo a manutenção do conteúdo de clorofila e atividade fotossintética das plantas, além de restabelecer o equilíbrio iônico intracelular. Entretanto, a aplicação de altas concentrações de SNP não reverteu a inibição causada pelo cobre e não reduziu o dano oxidativo, pelo contrário, produziu mais efeitos tóxicos nas plantas, evidenciando a dualidade da molécula de NO.

No presente estudo foram utilizadas concentrações de 1mM para os doadores de NO nanoencapsulado e em sua forma livre. Entretanto, a forma de aplicação dos tratamentos foi via solo, fato este que pode justificar o efeito protetor do NO mesmo em uma concentração relativamente alta, comparando-os aos trabalhos com tratamento foliar do NO. Todavia, a nanoencapsulação foi a responsável pela superioridade dessa formulação, garantindo a prolongação do efeito protetor mediante a liberação gradual e controlada do NO. Oliveira *et al.* (2016) demonstraram que as nanopartículas de quitosana contendo o doador de NO S-nitroso-MSA foram muito mais efetivas na mitigação do efeito deletério do estresse salino sobre os parâmetros morfofisiológicos das plantas de milho, quando comparadas ao mesmo doador de NO em sua forma livre, sendo necessária uma concentração 50% maior do NO

livre para garantir o mesmo efeito protetor que o NO nanoencapsulado. Somado a isso, a taxa de liberação de NO do doador nanoencapsulado foi em média 5,6 vezes mais lenta que a liberação do mesmo doador em sua forma livre.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os obtidos por Oliveira *et al.* (2016) evidenciando a superioridade dos doadores de NO nanoencapsulado na proteção das plantas, principalmente na condição mais severa. Outro fato observado no estudo foi o efeito positivo do tratamento com nanopartículas contendo a molécula precursora do NO (NP), onde mesmo em condição mais severas preveniram os efeitos do estresse nos parâmetros morfofisiológicos, quando comparado às plantas controle cultivadas em solo suplementado com excesso de cobre, constatando-se um maior desenvolvimento em CSR, maior MSR, maior A e g_s , conferidos provavelmente pela quitosana.

A quitosana vem sendo utilizada em plantas para conferir resistência contra estresses abióticos, como déficit hídrico, salinidade, estresse térmico e toxicidade por metais pesados. Especificamente contra estresse por metais pesados, a quitosana tem a capacidade de formar complexos com íons elementares, devido a presença de grupo amino e hidroxila, amenizando a toxicidade dos metais (HIDANGMAYUM *et al.*, 2019). Zong *et al.* (2017a, 2017b) em experimentos conduzido em hidroponia e casa de vegetação, averiguaram redução da toxicidade do cádmio sobre as plantas, através da aplicação foliar de quitosana.

Os parâmetros indicadores do estresse oxidativo e a atividade enzimática antioxidante também demonstraram superioridade do doador de NO nanoencapsulado na prevenção ao dano induzido pelo cobre. As enzimas antioxidantes apresentaram variação em sua atividade em função da suplementação de cobre no solo. Entretanto, na condição de estresse mais amena é possível afirmar que as diferenças dessas atividades entre os tratamentos não refletiram em um aumento ou diminuição do estresse oxidativo. Fato que corrobora com os valores observados para dienos conjugados e H_2O_2 , evidenciado pela similaridade dos níveis desses parâmetros entre os tratamentos.

Em contrapartida, no estresse mais severo foi observado diferenças significativas apenas em duas das quatro enzimas, sendo que a diferença significativa na atividade da SOD se deu pela redução em sua atividade no tratamento com doador de NO em sua forma livre, em níveis menores até mesmo que o tratamento controle sem cobre, onde provavelmente a quantidade liberada de NO tenha restringido parcialmente a atividade da SOD. A POD foi caracterizada pela baixa atividade no tratamento com plantas controle cultivadas em substrato sem cobre e no tratamento com doador de NO nanoencapsulado, comparando-os aos demais tratamentos.

A atividade da POD pode ser utilizada como marcador bioquímico do estresse resultante de fatores bióticos e abióticos, bem como na identificação precoce de processos morfogênicos durante a diferenciação celular, crescimento e multiplicação de plantas (LIMA & ABDALLA, 2001; PIZA et al., 2003; LOCATO, 2010; KIM & KWAN, 2010), desta maneira, a atividade observada para enzima corrobora com os dados de H₂O₂ e dienos conjugados. Apesar de não ter estimulado uma alta atividade enzimática da SOD, CAT e APX nas raízes, o doador de NO nanoencapsulado pode ter desencadeado a ativação de outros componentes do sistema de defesa antioxidante das plantas de soja.

Hu *et al.* (2007) e Wang *et al.* (2010), sugerem que a regulação dos níveis das ERO pelo NO pode acontecer através do ciclo ascorbato-glutationa, induzindo a expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes como GPX e GR. Em adição, Li *et al.* (2013) demonstraram que nas raízes de plantas de tomate submetidas ao estresse por cobre, a aplicação de SNP promoveu a mitigação do estresse mediante a regulação do ciclo ascorbato-glutationa. Também utilizando plantas de tomate submetidas ao estresse por cobre, Wang *et al.* (2015) evidenciaram que a aplicação de SNP aumentou a atividade das enzimas Glutamato-Cisteína Ligase e Glutationa sintetase, elevando o conteúdo de glutatona reduzida (GSH) nos órgãos da planta e ainda facilitando a biossíntese de fitoquelatinas nas plantas, tendo a GSH como substrato.

Mais estudos são necessários para compreender a absorção, translocação e acúmulo das nanopartículas liberadoras de NO. Contudo, a associação de doadores de NO e nanomateriais podem viabilizar sua aplicação na agricultura, criando mecanismos de liberação controlada capazes de evitar os efeitos tóxicos das altas concentrações de NO, bem como a instabilidade dos seus doadores, consolidando-se como uma estratégia a ser explorada em um futuro próximo (SEABRA *et al.*, 2014).

5.6 CONCLUSÃO

Foi possível constatar um efeito protetor da aplicação exógena de doador de NO livre e nanoencapsulado na proteção das plantas de soja contra o estresse induzido pelo cobre. Todavia, para a maioria dos parâmetros avaliados é possível verificar um efeito protetor maior das nanopartículas liberadoras de NO, principalmente na condição de estresse mais severo.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, P.; SARWAT, M.; BHAT, N. A.; WANI, M. R.; GULKAZI, A.; TRAN, L. P. Alleviation of Cadmium Toxicity in *Brassica juncea* L (Czern . & Coss .) by Calcium Application Involves Various Physiological and Biochemical Strategies. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 1, p. 1–17, jan. 2015.
- ARORA, M; KIRAN, B.; RANI, S.; RANI, A.; KAUR, B.; MITTAL, N. Heavy metal accumulation in vegetables irrigated with water from different sources. **Food Chemistry**, Barking, v. 111, n. 4, p. 811–815, dec. 2008.
- ASAI, S.; OHTA, K.; YOSHIOKA, H. MAPK Signaling Regulates Nitric Oxide and NADPH Oxidase-Dependent Oxidative Bursts in *Nicotiana benthamiana*. **The Plant Cell**, Rockville v. 20, n. 5, p. 1390–1406, mai. 2008.
- ASTIER, J.; LINDERMAYR, C. Nitric oxide-dependent posttranslational modification in plants: an update. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 13, n. 11, p. 15193–15208, nov. 2012.
- ASTIER, J.; RASUL, S.; KOEN, E.; MANZOOR, H.; BESSON-BARD, A.; LAMOTTE, O.; JEANDROZ, S.; DURNER, J.; LINDERMAYR, C.; WENDEHENNE, D. *S-nitrosylation: an emerging post-translational protein modification in plants*. **Plant Science**, Shannon, v. 181, n. 5, p. 527-533, nov. 2011.
- BAKER, N. R. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 89–113, jun. 2008.
- BERTOLI, A. C.; CANNATA, M. G.; CARVALHO, R.; BASTOS, A. R. R.; FREITAS, M. P.; AUGUSTO, A. S. *Lycopersicon esculentum* submitted to Cd-stressful conditions in nutrition solution: Nutrient contents and translocation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 86, p. 176–181, set. 2012.
- BRONIOWSKA, K. A.; HOGG, N. The chemical biology of *S*-nitrosothiols. **Antioxidants & Redox Signaling**, Larchmont, v. 17, n. 7, p. 969-980, out. 2012.
- CARDOZO, V. F.; LANCHEROS, C. A.; NARCISO, A. M.; VALERETO, E. C.; KOBAYASHI, R. K.; SEABRA, A. B.; NAKAGATA, G. Evaluation of antibacterial activity of nitric oxidereleasing polymeric particles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* from bovine mastitis. **International journal of pharmaceuticals**, v. 473, n. 1-2, p. 20-29, out. 2014
- CHIBUIKE, G. U.; OBIORA S. C. Heavy Metal Polluted Soils: Effect on Plants and Bioremediation Methods. **Applied and Environmental Soil Science**, Cairo, v. 214, p. 1-12, ago. 2014.

CORREA-ARAGUNDE, N.; FORESI, N.; LAMATTINA, L. Nitric oxide is a ubiquitous signal for maintaining redox balance in plant cells : regulation of ascorbate peroxidase as a case study. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 66, n. 10, p. 2913–2921, 2015.

DOUNG, Y.; XU, L.; WANG, Q.; FAN, Z., KONG, J., BAI, X. Effects of exogenous nitric oxide on photosynthesis, antioxidative ability, and mineral element contents of perennial ryegrass under copper stress. **Journal of Plant Interactions**, Milton Park, v. 9, n. 1, p. 402-411, jan. 2014.

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

ELGADIR, M.A.; UDDIN, M.S.; FERDOSH, S.; ADAM, A.; Chowdhury, A.J.K.; Sarker, M.Z.I. Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: a review. **Journal of Food and Drug Analysis**, Taiwan, v. 23, n. 4, p. 619-629, dez. 2014.

EL-MAAROUF-BOUATEAU, H.; BAILLY, C. Oxidative signaling in seed germination and dormancy. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 3, n. 3, p. 175–182, mar. 2008.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3 ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA/CNPQ, 2013. 353p.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Cultivares de soja macrorregiões 1, 2 e 3 Centro-Sul**. Londrina: EMBRAPA/Fundação Meridional, 2014 60p.

FEDERICI, G.; SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress and other physiological effects. **Aquatic toxicology**, Amsterdam, v.84, n.3, p. 415-430, jul. 2007.

FOSTER, M. W., MCMAHON, T. J.; STAMLER, J. S. S-nitrosylation in health and disease. **Trends in Molecular Medicine**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 160-168, abr. 2003

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Plant Physiology and Biochemistry Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, Paris, v. 48, n. 12, p. 909–930, set. 2010.

HABIBA, U.; ALI, S.; FARID, M.; SHAKOOR, M. B.; RIZWAN, M.; IBRAHIM, M.; ABBASI, G. H.; HAYAT, T.; ALI, B. EDTA enhanced plant growth, antioxidant defense system, and phytoextraction of copper by *Brassica napus* L. **Environmental science and pollution research international**, Landsberg, v. 22, n. 2, p. 1534–1544. Jan. 2015

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

HE, H.; HE, L; GU, M. The diversity of nitric oxide function in plant responses to metal stress. **BioMetals**, Amsterdam, v. 27, n. 2, p. 219-228, abr. 2014.

- HE, J.; REN, Y.; XIULAN, C.; CHEN, C. Protective roles of nitric oxide on seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.) under cadmium stress. **Ecotoxicology and environmental safety**, Amsterdam, v. 108, p. 114-119, out. 2014b
- HIDANGMAYUM, A.; DWIVEDI, P.; KATIYAR, D.; HEMANTARANJAN, A. Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress. **Physiol Mol Biol Plants**, Lucknow, v. 25, n. 2, p. 313-326, jan. 2019.
- HU, X.; JIANG, M.; ZHANG, J.; ZHANG, A.; LIN, F.; TAN, M. Calcium-calmodulin is required for abscisic acid-induced antioxidant defense and functions both upstream and downstream of H₂O₂ production in leaves of maize (*Zea mays*) plants. **New Phytol**, London, v.173, n. 1, p. 27–38, 2017.
- IQBAL, M.; IQBAL, N.; BHATTI, I. A.; AHMAD, N.; ZAHID, M. Response surface methodology application in optimization of cadmium adsorption by shoe waste: a good option of waste mitigation by waste. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v. 88, p. 265–275, mar. 2016.
- ISERI, Ö. D.; KÖRPE, D. A.; YURTCU, E.; SAHIN, F. I.; HABERAL, M. Copper-induced oxidative damage , antioxidant response and genotoxicity in *Lycopersicum esculentum* Mill. and *Cucumis sativus* L. **Plant cell reports**, Berlin, v. 30, n.9, p. 1713–1721, set. 2011.
- JOUDOI, T.; HICHIRI, Y.; KAMIZONO, N.; AKAIKE, T.; SAWA, T.; YOSHITAKE, J.; YAMADA, N.; IWAI, S. Nitrated Cyclic GMP Modulates Guard Cell Signaling in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 25, n. 2, p. 558–571, fev. 2013.
- KHAN, A. R.; WAQAS, M.; ULLAH, I.; KHAN, A. L.; KHAN, M. A.; LEE, I. J.; SHIN, J. H. Culturable endophytic fungal diversity in the cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and their role in enhancing phytoremediation. **Environmental and experimental botany**, Oxford, v. 135, p. 126–135, mar. 2017.
- KIM, J.; SARAVANAKUMAR, G.; CHOI, H. W.; PARK, D.; KIM, W. J. A platform for nitric oxide delivery. **Journal of Materials Chemistry B**, Cambridge, v. 2, n. 4, p. 341–356, out. 2014
- KIM, Y.H.; KWAK, S.S. **The role of antioxidant enzymes during leaf development**. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfi eld: Science Publishers, 2010. p.129-150.
- KOVACS, I.; LINDERMAYR, C. Nitric oxide-based protein modification: formation and site-specificity of protein *S*-nitrosylation. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v.4, 137, mai. 2013.
- LI, X. Y.; WANG, X. F.; LU, L. F.; YIN, B.; ZHANG, M.; CUI, X. M. Effects of exogenous nitric oxide on ascorbate–glutathione cycle in tomato seedlings roots under copper stress, **Chinese journal of applied ecology**, 2013, vol. 24, n. 4, p. 1023–1030, abr. 2013.
- LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v.37, n.3, p.293-303, jan. 2001.

LINDERMAYR, C.; DURNER, J. S-Nitrosylation in plants: pattern and function. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 73, n. 1, p. 1-9, nov. 2009.

LIU, SHILIANG.; YANG, R.; PAN, Y.; REN, B.; CHEN, Q.; LI, X.; XIONG, X.; TAO, J.; CHENG, Q.; MA, M. Beneficial behavior of nitric oxide in copper-treated medicinal plants. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 314, p. 140-154, ago. 2016.

LOCATO, V.; PARADISO, A.; PINTO, M. C.; De GARA. **Reactive oxygen species and ascorbateglutathione interplay in signaling and stress responses**. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfi eld: Science Publishers, 2010. p.45-64.

NAGAJYOTI, P. C.; LEE, K. D.; SREEKANTH, T. V. M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review. **Environmental Chemistry Letters**, Secaucus, v. 8, n. 3, p. 199–216, set. 2010.

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**, Orlando, v. 61. p. 10-19, dec. 2016.

PETÓ, A.; LEHOTAI, N.; FEIGL, G.; TUGYI, N.; ORDOG, A.; GÉMES, K.; TARI, I.; ERDEI, L.; KOLBERT, Z. Nitric oxide contributes to copper tolerance by influencing ROS metabolism in Arabidopsis. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 32, n. 12, p. 1913-1923, dez. 2013.

PIZA, I. M. T.; LIMA, G. P. P.; BRASIL, O. G. Atividade de peroxidase e níveis de proteínas em plantas de abacaxizeiro micropropagadas em meio salino. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n.4, p.361-366, dez. 2003.

POONAM, KAUR, R.; BALI, S.; SINGH, R.; PATI, P. K.; BHARDWAJ, R. 2014. Treatment of 24-EBL to Brassica juncea plants under Cu-metal stress lowers oxidative burst by activity of antioxidative enzymes. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, Moscow, v. 10, n. 2, p. 315–327, nov. 2014

R, DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienn: R Foundation for Statistical Computing, [2018]. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 29 ago. 2018.

RADI, R. Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. **Accounts of Chemical Research**, Whashington, v. 46, n. 2, p. 550–559, fev. 2013.

SAHAY, S.; GUPTA, M. An update on nitric oxide and its benign role in plant responses under metal stress. **Nitric Oxide**, Orlando, v. 67, p. 39-52, jul 2017.

SANTISREE, P.; BHATNAGAR-MATHUR, P.; SHARMA, K. K. NO to drought-multifunctional role of nitric oxide in plant drought: Do we have all the answers? **Plant Science**, Limerick v. 239, p. 44-55, out. 2015.

SEABRA, A. B.; DURÁN, N. Nitric oxide-releasing vehicles for biomedical applications. **Journal of Materials Chemistry**, Cambridge, v. 20, n.9, p. 1624–1637, fev. 2010.

SEABRA, A. B.; FABBRI, G. K.; PELEGRINO, M. T.; SILVA, L. C.; RODRIGUES, T. Synthesis, characterization and cytotoxicity of S-nitrosomercaptosuccinic acid-containing alginate/chitosan nanoparticles. **Journal of Physics**, Bristol, v. 838, n. 1, 2017

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**, Oxford, v. 33, n. 6, p. 1370–1379, nov. 2015a.

SEABRA, A. B.; LIMA, R. DE; CALDERÓN, M. Nitric Oxide Releasing Nanomaterials for Cancer Treatment: Current Status and Perspectives. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 15, n. 4, p. 298-308, dec. 2015b.

SEABRA, A. B.; RAI, M.; DURÁN, N. Nano carriers for nitric oxide delivery and its potencial applications in plant physiological process: A mini review. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, Berlin, v. 23, n. 1, p. 1-10, jan. 2014.

SETH, D.; STAMLER, J. S. The SNO-proteome: causation and classifications. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 15, n.1, p. 129–136, fev. 2011.

SIMONTACCHI, M.; GALATRO, A; RAMOS-ARTUSO, F.; SANTA-MARÍA, G.E. Plant survival in a changing environment: The role of nitric oxide in plant responses to abiotic stress. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v.6, 977, nov. 2015

SINGH, S.; PARIHAR, P.; SINGH, R.; SINGH, V. P.; PRASAD, S. M. Heavy Metal Tolerance in Plants: Role of Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics, and Ionomics. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, n. 1143, p. 1-36, fev. 2016.

SRIVASTAVA, A. K.; PENNA, S.; NGUYEN, D. V.; TRAN, L. S. Multifaceted roles of aquaporins as molecular conduits in plant responses to abiotic stresses. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v. 36, n. 3, p. 389-398, nov. 2016.

SUN, C.; LU, L.; LIU, L.; LIU, W.; YU, Y.; LIU, X.; HU, Y.; JIN, C.; LIN, X. Nitrate reductase-mediated early nitric oxide burst alleviates oxidative damage induced by aluminum through enhancement of antioxidant defenses in roots of wheat (*Triticum aestivum*). **New Phytologist**, London, v. 201, n.4, p. 1240–1250, nov. 2014.

SUNDAR, S.; KUNDU, J.; KUNDU, S.C. Biopolymeric nanoparticles. **Science and Technology of Advanced Materials**, New York, v. 11, n.1, p. 1-13, fev. 2010.

THAO, N. P.; TRAN, L. P. Potentials toward genetic engineering of drought-tolerant soybean Potentials toward genetic engineering of drought-tolerant soybean. **Critical Reviews in Biothechnology**, Boca Raton, v. 32, n. 4, p. 349-362, dez. 2011.

THOUNAOJAM, T. C.; PANDA, P.; MAZUMDAR, P.; KUMAR, D.; SHARMA, G. D.; SAHOO, L.; PANDA, S. K. Excess copper induced oxidative stress and response of antioxidants in rice **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 53, p. 33–39, jan. 2012.

TRIPATHY, S.; DAS, S.; CHAKRABORTY, S.P.; SAHU, S.K.; PRAMANIK, P.; ROY, S. Synthesis, characterization of chitosan-tripolyphosphate conjugated chloroquine nanoparticle and its in vivo anti-malarial efficacy against rodent parasite: a dose and duration dependent approach, **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 434, n. 1-2, p. 292-305, set. 2012.

VITOR, S. C.; DUARTE, G. T. 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, jun. 2013.

VU, J. C. V.; YELENOSKY, G; BAUSHER, M. G. CO₂ exchange rate, stomatal conductance and transpiration in attached leaves of Valencia orange. **HortScience**, Alexandria, v. 21 p. 143-144. 1986

WANG, J.; YU, S. X.; ZHANG, M.; CUI, X. M. Exogenous Nitric Oxide-Mediated GSH-PC Synthesis Pathway in Tomato under Copper Stress. **Russian Journal of Plant Physiology**, Sófia, v. 62, n. 3, p. 349-359, 2015.

WANG, L.; YANG, L.; YANG, F.; LI, X.; SONG, Y.; WANG, X.; HU, X. Involvements of H₂O₂ and metallothionein in NO-mediated tomato tolerance to copper toxicity. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 167, n.15, p. 1298–1306, jun. 2010.

XIA, X.; ZHOU, Y. H.; SHI, K.; ZHOU, J.; FOYER, C. H.; YU, J. Q. Interplay between reactive oxygen species and hormones in the control of plant development and stress tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 66, n. 10, p. 2839–2856, mar. 2015.

XU, J.; YIN, H.; LI, Y.; LIU, X. Nitric Oxide Is Associated with Long-Term Zinc Tolerance in *Solanum nigrum*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 154, n. 3, p. 1319–1334, set. 2010

ZONG, H.; LI, K.; LIU, S.; SONG, L.; XING, R.; CHEN, X.; LI, P. Improvement in cadmium tolerance of edible rape (*Brassica rapa* L.) with exogenous application of chitooligosaccharide. **Chemosphere**, Oxford, v. 181, p. 92–100, ago. 2017a.

ZONG, H.; LIU, S.; XING, R.; CHEN, X.; LI, P. Protective effect of chitosan on photosynthesis and antioxidative defense system in edible rape (*Brassica rapa* L.) in the presence of cadmium. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 138, p. 271–278, abr. 2017b.

ZOU, T.; ZHENG, L. P.; YUAN, H. Y.; YUAN, Y. F.; WANG, J. W. The nitric oxide production and NADPH-diaphorase activity in root tips of *Vicia faba* L. under copper toxicity. **Plant Omics Journal**, Lismore, v. 5, n. 2, p. 115-121, 2012.