



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GIOVANNA CAMARGO DO CARMO

**EFEITO DE DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO
NANOENCAPSULADO SOBRE MUDAS DE ESPÉCIES
ARBÓREAS NATIVAS DA MATA ATLÂNTICA SUBMETIDAS
À DEFICIÊNCIA HÍDRICA SEVERA**

Londrina
2022

GIOVANNA CAMARGO DO CARMO

**EFEITO DE DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO
NANOENCAPSULADO SOBRE MUDAS DE ESPÉCIES
ARBÓREAS NATIVAS DA MATA ATLÂNTICA SUBMETIDAS
À DEFICIÊNCIA HÍDRICA SEVERA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira
Co-orientador: Prof. Dr. José Antonio Pimenta

Londrina
2022

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

C172 do Carmo, Giovanna Camargo.
Efeito de doador de óxido nítrico nanoencapsulado sobre mudas de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica submetidas à deficiência hídrica severa / Giovanna Camargo do Carmo. - Londrina, 2022.
75 f.

Orientador: Halley Caixeta Oliveira.
Coorientador: José Antonio Pimenta.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2022.
Inclui bibliografia.

1. Reflorestamento - Tese. 2. Nanopartículas - Tese. 3. Déficit hídrico - Tese. 4. Mata Atlântica - Tese. I. Oliveira, Halley Caixeta . II. Pimenta, José Antonio . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU 574

GIOVANNA CAMARGO DO CARMO

**EFEITO DE DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO
NANOENCAPSULADO SOBRE MUDAS DE ESPÉCIES
ARBÓREAS NATIVAS DA MATA ATLÂNTICA SUBMETIDAS
À DEFICIÊNCIA HÍDRICA SEVERA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

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

Dra. Lindamir Pastorini
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Dr. Cristiano Medri
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 25 de fevereiro de 2022.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Eliana e Amaral, e meus familiares, pelo apoio, força e incentivo para que eu pudesse me dedicar ao estudo.

Ao Felipe por todo o companheirismo, gentileza, paciência, amor e ajuda em todos os momentos.

Aos meus amigos da vida, por todo o apoio, acolhimento e carinho fundamentais em todas as etapas.

Aos meus amigos de turma de mestrado pelo suporte fundamental e por todo o carinho.

Ao Prof. Dr. e orientador Halley Caixeta de Oliveira e ao Prof. Dr. e co-orientador José Antonio Pimenta, pela paciência, apoio, por toda dedicação, pela orientação excelente e por todas as contribuições fundamentais para o pleno desenvolvimento deste estudo.

À equipe do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal pelo auxílio durante o desenvolvimento do estudo, companheirismo, amizade e por todos os momentos de muito conhecimento e aprendizagem compartilhados.

À Prof.^a Dr.^a Amedea Barozzi Seabra, Joana Claudio Pieretti e à equipe do Laboratório Bionano Metals (UFABC) pelo fornecimento das nanopartículas doadoras de óxido nítrico.

Aos professores do curso de Ciências Biológicas da UEL, por todos os ensinamentos ao longo da graduação e pós-graduação, essenciais para a realização deste trabalho.

À Fundação Araucária, Biodiversa, Fundação de Amparo À Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, por viabilizar a realização deste trabalho.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

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

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001"

"Esta pesquisa foi financiada por meio da chama conjunta BiodivERsA 2019-2020 para propostas de pesquisa, sob o programa BiodivClim ERA-Net COFUND, e com as agências de fomento Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Agência Nacional da Pesquisa (França) e Ministério Federal da Educação e da Pesquisa (Alemanha)."

"This research was funded through the 2019-2020 BiodivERsA joint call for research proposals, under the BiodivClim ERA-Net COFUND programme, and with the funding organisations Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Agence Nationale de la Recherche (France) and Federal Ministry of Education and Research (Germany)."

Muito obrigada!

CARMO, Giovanna Camargo do. **Efeito de doador de óxido nítrico nanoencapsulado sobre mudas de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica submetidas à deficiência hídrica severa.** 2022. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora envolvida na proteção de plantas contra a deficiência hídrica (DH). Porém, sua aplicação é dificultada devido à sua natureza química instável. A nanoencapsulação de moléculas doadoras de NO constitui uma estratégia para propiciar liberação lenta e eficaz deste gás, o que poderia aumentar a sua atividade biológica. Assim, este estudo teve por objetivo avaliar o efeito de tratamentos com nanopartículas (NPs) de quitosana contendo o doador de NO S-nitrosoglutationa (GSNO) em mudas das espécies arbóreas *Cariniana estrellensis* e *Cecropia pachystachya* submetidas ao DH severo em casa de vegetação, hipotetizando que GSNO nanoencapsulada induz respostas efetivas na proteção das mudas de diferentes grupos ecológicos contra os efeitos deletérios da seca. Mudas em DH foram tratadas por três dias alternados com NPs contendo GSNO, nas concentrações 25 e 50 μM , para *C. pachystachya*; e 200, 400 e 600 μM , para *C. estrellensis*; além de dois tratamentos controles que não receberam formulação, um com plantas mantidas em DH e outro com plantas mantidas em capacidade de campo. A condutância estomática (g_s) das plantas foi medida diariamente, juntamente com a avaliação dos sintomas de murcha. No quinto dia de DH, foram medidos a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m), o potencial hídrico, o conteúdo relativo de água (CRA) das folhas e a biomassa das plantas de ambas as espécies. Para *C. estrellensis* ainda foram avaliadas a taxa fotossintética e transpiração. Para *C. pachystachya*, o tratamento com 50 μM aumentou a g_s das plantas em DH ao amanhecer (que diminuiu no decorrer do dia), aumentou o F_v/F_m , potencial hídrico e CRA. Nenhum parâmetro avaliado em *C. estrellensis* respondeu à aplicação de NO em nenhuma concentração. Os parâmetros relativos aos sintomas de murcha e biomassa não foram alterados com a aplicação de NO em nenhuma espécie. De maneira geral, os resultados evidenciaram que a aplicação do doador GSNO nanoencapsulado pode aumentar a tolerância à seca de plantas de *C. pachystachya*, no entanto, não apresentou efeito sobre *C. estrellensis*. Estes resultados indicam o potencial da aplicação de NPs liberadoras de NO para a obtenção de mudas, de algumas espécies arbóreas, mais tolerantes à seca, para a utilização em programas de reflorestamento.

Palavras-chave: quitosana; nanopartículas; déficit hídrico; condutância estomática; reflorestamento.

CARMO, Giovanna Camargo do. **Effect of nanoencapsulated nitric oxide donors on seedlings of native Atlantic Forest trees species subjected to severe water deficiency**. 2022. 73 p. Dissertation (Master's degree in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is a signaling molecule involved in plant protection against water deficit (WD). However, its application is hampered due to its unstable chemical nature. The nanoencapsulation of NO donor molecules is a strategy to provide slow and efficient release of this gas, which might increase its biological activity. Thus, this study aimed to evaluate the effect of treatments with chitosan nanoparticles (NPs) containing the NO donor S-nitrosoglutathione (GSNO) in seedlings of the tree species *Cariniana estrellensis* and *Cecropia pachystachya* submitted to severe WD in a greenhouse, hypothesizing that nanoencapsulated GSNO induces effective responses in protecting seedlings of different ecological groups against the deleterious effects of drought. The seedlings were treated for three alternate days with NPs containing GSNO, at concentrations 25 and 50 μM for *C. pachystachya* and 200, 400 and 600 μM for *C. estrellensis*, as well as control treatments in WD and field capacity without receiving formulation. Stomatal conductance (g_s) of the plants was measured daily, along with the evaluation of wilting symptoms. On the fifth day of WD, the maximum efficiency of photosystem II (F_v/F_m), water potential, relative water content (RWC) of the leaves, and plant biomass of both species were measured. For *C. estrellensis*, photosynthetic rate and transpiration were also measured. For *C. pachystachya*, the treatment with 50 μM increased the g_s of plants in WD at dawn and decreased it during the day, increased the F_v/F_m , water potential and RWC. *Cariniana estrellensis* did not respond to the application of NO in any concentration, in any parameter. The parameters related to wilting symptoms and biomass were not altered with the application of NO in any species. In general, the results showed that the use of nanoencapsulated GSNO protected the seedlings of *C. pachystachya* submitted to WD, but showed no effect on *C. estrellensis*, highlighting the potential of the application of NO-releasing NPs to obtain seedlings of some drought-tolerant tree species for reforestation programs.

Key words: chitosan; nanoparticles; drought; stomatal conductance; reforestation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Condutância estomática (g_s) de mudas de *Cecropia pachystachya* às 7:30 h, 10 h, 14 h e 16 h do primeiro (a), segundo (b) e terceiro dia de experimento (c). CC: Capacidade de campo; DH: déficit hídrico; NO 25: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 25 μM ; NO 50: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 50 μM . Os dados estão expressos como média \pm erro padrão ($n = 12$). Letras iguais acima das barras indicam médias semelhantes, de acordo com a ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....53
- Figura 2** – Condutância estomática (g_s) de mudas de *Cariniana estrellensis* às 7:30 h, 10 h, 14 h e 16 h do primeiro (a), segundo (b) e terceiro dia de experimento (c). CC: Capacidade de campo; DH: déficit hídrico; NO 200: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 200 μM ; NO 400: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 400 μM ; NO 600: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 600 μM . Os dados estão expressos como média \pm erro padrão ($n = 12$). Letras iguais acima das barras indicam médias semelhantes, de acordo com a ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....54
- Figura 3** – Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) de mudas de *Cecropia pachystachya* (a) e *Cariniana estrellensis* (b) ao final do experimento. CC: Capacidade de campo; DH: déficit hídrico; NO 25: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 25 μM ; NO 50: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 50 μM ; NO 200: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 200 μM ; NO 400: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 400 μM ; NO 600: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 600 μM . Os dados estão expressos como média \pm erro padrão ($n = 12$).

Letras iguais acima das barras indicam médias semelhantes, de acordo com a ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).55

Figura 4 – Taxa fotossintética (A) e Transpiração (E) de mudas de *Cariniana estrellensis* no dia zero (a e b) e no quarto dia de experimento (c e d). CC: Capacidade de campo; DH: déficit hídrico; NO 200: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 200 μM ; NO 400: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 400 μM ; NO 600: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 600 μM . Os dados estão expressos como média \pm erro padrão ($n = 7$). Letras iguais acima das barras indicam médias semelhantes, de acordo com a ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).56

Figura 5 – Conteúdo relativo de água (CRA) (a e c) e Potencial hídrico (ψ_w) (b e d) de mudas de *Cecropia pachystachya* (a e b) e *Cariniana estrellensis* (c e d) ao final do experimento. CC: Capacidade de campo; DH: déficit hídrico; NO 25: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 25 μM ; NO 50: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 50 μM ; NO 200: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 200 μM ; NO 400: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 400 μM ; NO 600: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 600 μM . Os dados estão expressos como média \pm erro padrão ($n = 5$). Letras iguais acima das barras indicam médias semelhantes, de acordo com a ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). 58

Figura 6 – Massa seca total (a e c) e razão entre a massa seca da raiz e massa seca da parte aérea (b e d) de mudas de *Cecropia pachystachya* (a e b) e *Cariniana estrellensis* (c e d) ao final do experimento. CC: Capacidade de campo; DH: déficit hídrico; NO 25: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 25 μM ; NO 50: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana

contendo GSNO a 50 μM ; NO 200: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 200 μM ; NO 400: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 400 μM ; NO 600: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 600 μM . Os dados estão expressos como média \pm erro padrão ($n = 5$). Letras iguais acima das barras indicam médias semelhantes, de acordo com a ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)..... 59

Figura 7 – Quantidade de dias até a murcha inicial (a e d), Quantidade de dias até a murcha permanente (b e e) e quantidade de dias até aparecer sinais de necrose foliar (c e f) de *Cecropia pachystachya* (a, b e c) e *Cariniana estrellensis* (d, e e f). DH: déficit hídrico; NO 25: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 25 μM ; NO 50: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 50 μM ; NO 200: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 200 μM ; NO 400: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 400 μM ; NO 600: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 600 μM . Os dados estão expressos como média \pm erro padrão ($n = 7$). Letras iguais acima das barras indicam médias semelhantes, de acordo com a ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)..... 60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Taxa fotossintética líquida
ABA	Ácido abscísico
APX	Ascorbato peroxidase
CAT	Catalase
CO ₂	Dióxido de carbono
CRA	Conteúdo relativo de água
DH	Déficit hídrico
<i>E</i>	Transpiração
ERN	Espécie reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Eficiência no uso da água
F_v/F_m	Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II
GR	Glutathione redutase
g_s	Condutância estomática
GSH	Glutathione reduzida
GSNO	S-nitrosoglutathione
GSNO _r	S-nitrosoglutathione redutase
GSSG	Glutathione oxidada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
MDA	Malondialdeído
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NH ₃	Amônia
NO	Óxido nítrico
NO ₂ ⁻	Nitrito
NO ₃ ⁻	Nitrato
NPs	Nanopartículas

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
O_2^-	Ânion superóxido
$\bullet\text{OH}$	Radical hidroxila
RSNO	S-nitrosotíol
Rubisco	Ribulose-1,5-bifosfato-carboxilase/oxigenase
SNAC	S-nitroso-N-acetilcisteína
S-nitroso-MSA	Ácido S-nitrosomercaptosuccínico
SNP	Nitroprussiato de sódio
SOD	Superóxido dismutase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	MUDANÇAS CLIMÁTICAS E REFLORESTAMENTO	17
2.2	DÉFICIT HÍDRICO	21
2.3	ÓXIDO NÍTRICO	26
2.4	DOADORES DE ÓXIDO NÍTRICO	29
	REFERÊNCIAS	34
3	Capítulo 1. EFEITO DE DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO NANOENCAPSULADO SOBRE MUDAS DE ESPÉCIES ARBÓREAS NATIVAS DA MATA ATLÂNTICA SUBMETIDAS À DEFICIÊNCIA HÍDRICA SEVERA	41
3.1	INTRODUÇÃO	43
3.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.2.1	Material Vegetal e Condições de Cultivo.....	46
3.2.2	Preparo das Formulações e Aplicação dos Tratamentos	47
3.2.3	Trocas Gasosas	48
3.2.4	Potencial Hídrico	49
3.2.5	Conteúdo Relativo de Água	50
3.2.6	Parâmetros de Murcha.....	50
3.2.7	Análises de Crescimento.....	50
3.2.8	Análise Estatística	51
3.3	RESULTADOS	51
3.4	DISCUSSÃO	61
3.5	CONCLUSÕES.....	66
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
	REFERÊNCIAS	69
	APÊNDICE	73

1. INTRODUÇÃO GERAL

As alterações climáticas ocasionadas, principalmente, por ações antrópicas têm causado expectativas alarmantes quanto à ocorrência e aumento na intensidade de eventos meteorológicos como a seca, que afetam fortemente o crescimento e desenvolvimento de espécies vegetais. Aliado a isso, o avanço econômico e populacional tem refletido em severa degradação de ecossistemas florestais, principalmente a partir do desmatamento. Os índices de desmatamento e alterações em ambientes florestais são extremamente expressivos no Brasil, sendo um dos principais desafios a serem enfrentados.

Portanto, devido ao alto grau de intervenção humana nos biomas brasileiros, tem crescido o interesse pela restauração ecológica, principalmente, a partir do reflorestamento com mudas de espécies nativas, na tentativa de diminuir os impactos causados pela degradação ambiental e reestabelecer a biodiversidade presente, originalmente, nos ambientes. Além disso, o reestabelecimento florestal a partir do reflorestamento é uma alternativa para mitigar os impactos das mudanças climáticas, uma vez que florestas em regeneração são importantes sequestradoras de carbono. Assim, soluções que buscam melhorar o desempenho de mudas destinadas ao replantio são de extrema importância para auxiliar no combate aos efeitos de eventos meteorológicos extremos.

Plantas são organismos sésseis constantemente expostos a fatores ambientais adversos ao longo de seu ciclo de vida, que podem influenciar negativamente o seu crescimento e desenvolvimento. Esses fatores podem ser intensificados como consequência das alterações climáticas, como eventos de seca,

que podem causar grande estresse em plantas não adaptadas à escassez de água. O déficit hídrico (DH) é um fator de estresse caracterizado pela baixa disponibilidade de água para a manutenção do metabolismo e da fisiologia vegetal, influenciando negativamente diversos aspectos relacionados ao desenvolvimento das plantas, sendo um dos principais fatores de risco associados ao replantio de espécies em campo e causando altas taxas de mortalidade em sítios de reflorestamento. Desse modo, em um contexto de condições de DH cada vez mais frequentes, o uso de técnicas e tecnologias associadas a geração de respostas de tolerância à limitação de água é de extrema importância para aumentar o sucesso e diminuir os custos associados aos programas de reflorestamento.

O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora associada à tolerância contra estresses abióticos. Devido às características químicas da molécula de NO, sua aplicação direta nas plantas é dificultada. Assim, moléculas doadoras de NO vem sendo utilizadas para aumentar a tolerância de plantas aos efeitos negativos de estresses como o DH. Entretanto, as moléculas doadoras são térmica e fotoquimicamente instáveis, de forma que a sua incorporação em nanomateriais é uma estratégia eficiente para protegê-las contra a rápida decomposição e, assim, prolongar os seus efeitos biológicos.

Cecropia pachystachya Trécul e *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze, espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica, são comumente utilizadas em programas de reflorestamento. Dessa forma, torna-se importante testar a aplicação de doadores de NO com a finalidade de aumentar a tolerância dessas plantas contra o DH. Além disso, ambas as espécies e o doador de NO testados neste trabalho foram selecionados a partir da adequação ao projeto transnacional RESTORE (*nature based solutions for improving restoration*).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tratamento com NPs contendo GSNO sobre a fisiologia de mudas de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica submetidas ao DH severo em casa de vegetação. A hipótese levantada é que GSNO nanoencapsulada induz respostas efetivas na proteção das mudas de diferentes grupos ecológicos contra os efeitos do DH.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mudanças climáticas e reflorestamento

Atividades antropogênicas têm causado impactos cumulativos no planeta nas últimas décadas, como o aumento significativo dos gases de efeito estufa na atmosfera, principalmente, o dióxido de carbono (CO₂). Segundo o site Climate Watch, em 2016, a principal fonte de emissão deste gás para a atmosfera, representando 73,2% da quantidade total lançada, se deu a partir da produção de energia. A segunda maior fonte de emissão de carbono é a agricultura e pecuária, com 16,2%. O desmatamento tem contribuído para 2,2% da emissão de CO₂, representando mais de 580 milhões de toneladas, apenas no ano de 2016.

O aumento da concentração de gases de efeito estufa vem provocando uma tendência alarmante de aumento na temperatura da atmosfera global e oceanos, denominado aquecimento global (Zandalinas et al., 2021), que tem levado a mudanças drásticas no clima do planeta, acompanhadas por aumento na frequência e intensidade de eventos climáticos extremos, como seca prolongada e ondas de calor e precipitação torrencial com inundações (IPCC, 2021; Zandalinas et al., 2021).

O desenvolvimento da ciência e tecnologia moderna foi capaz de aumentar amplamente nossa capacidade de explorar os recursos naturais, resultando em uma

melhora significativa da qualidade de vida humana. Por outro lado, o crescimento populacional, a desigualdade na distribuição dos recursos, a degradação dos ecossistemas e as mudanças climáticas acentuam a escassez desses recursos. Frequentemente, a elevação das temperaturas médias, alterações nos padrões de chuva e secas mais frequentes e intensas, são eventos citados como impactos em decorrência das alterações climáticas (Wilkinson e Davies, 2010; Fang e Xiong, 2014; Swann, 2018; Zeng et al., 2021).

As florestas em regeneração são grandes aliadas na tentativa de mitigar os efeitos das alterações climáticas, pois são capazes de acumular carbono na biomassa e no solo. Dessa forma, as áreas florestais diminuem a emissão líquida de CO₂, e contribuem para a proteção e manutenção dos recursos hídricos e da biodiversidade, porém, elas também sofrem os efeitos das mudanças climáticas (Ellison et al., 2017). Nesse sentido, a conservação de ambientes florestais e a recuperação de áreas degradadas são medidas extremamente necessárias para aumentar a retenção de carbono e diminuição da emissão para a atmosfera, mitigando, assim, o avanço das mudanças climáticas (Cunningham et al., 2015;).

Porém, a perda de cobertura vegetal em florestas tropicais vem se intensificando ao longo da história, sobretudo, considerando a exploração de fontes energéticas, expansão da agropecuária e urbanização, atividades antrópicas que ocorrem de maneira desorganizada e predatória, fruto do modelo capitalista de produção, acumulação e exploração insustentável dos recursos naturais, o que resulta na degradação e destruição dos ecossistemas (de Moura Laurentino et al., 2021).

O bioma Mata Atlântica, historicamente, sofreu intensa perda de cobertura florestal, com taxas alarmantes de perda de biodiversidade, sendo considerado um

bioma prioritário para a restauração (Weber et al., 2021). Segundo o relatório anual de 2015 da Fundação SOS Mata Atlântica, atualmente restam apenas 8,5% de remanescentes florestais acima de 100 hectares, e somados todos os fragmentos de floresta nativa acima de três hectares, restam apenas 12,5% de remanescentes. Além disso, a biodiversidade é considerada uma importante fonte de substâncias biologicamente ativas, sendo a maioria dos fármacos de uso clínico ou são de origem natural ou de origem química planejada a partir de produtos naturais (Barreiro e Bolzani, 2009; Weber et al., 2021).

Ainda assim, a Mata Atlântica é a segunda maior floresta tropical da América do Sul, compreendendo uma região heterogênea que se distribui em milhares de fragmentos na costa brasileira, do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul, que inclui uma grande pluralidade de fitofisionomias e diferentes composições florestais. Estas florestas abrigam milhares de espécies de plantas e animais, resultado de um intercâmbio biótico ao longo da história evolutiva desse ecossistema (Soares; Medri, 2002; Ribeiro et al., 2011).

Haja vista tal cenário, a prática de restauração ecológica vem sendo empregada com a finalidade de restabelecer a diversidade, além de mitigar o processo de perda na biodiversidade dos ambientes (Williams, 2011; Zhang et al., 2021). A restauração ecológica consiste em ações que buscam iniciar ou acelerar processos naturais de regeneração, recuperando as propriedades de um ecossistema degradado, incluindo as interações ecológicas (Williams, 2011).

Uma das estratégias de restauração dos ecossistemas é o reflorestamento ativo de mudas de espécies nativas e de diferentes estádios sucessionais. Estas mudas precisam estar aptas a crescer de maneira rápida e sobreviver às condições extremas, visto que ambientes desmatados apresentam alterações na estrutura e

baixa fertilidade do solo, incidência luminosa alta e baixa umidade relativa do ar (Cunningham et al., 2015; Ellison et al., 2017). O plantio de espécies nativas pode aprimorar a estrutura, o microclima e a biodiversidade presente nas áreas degradadas, pois elas permitem o crescimento e estabelecimento de outras espécies nativas, diminuindo a incidência luminosa e aumentando a atratividade da fauna para o local (Cusack e Montagnini, 2004; Cunningham et al., 2015). Além disso, as mudas de espécies arbóreas nativas, após estabelecidas, podem ajudar na promoção de serviços ambientais. Entre estes serviços, destacam-se a preservação dos recursos hídricos, a redução de enxurradas, a estocagem de carbono na biomassa vegetal e no solo, a transferência de nutrientes da atmosfera e de camadas profundas do solo para as mais superficiais (Rodrigues et al., 2009; Allen et al., 2010; Pan et al., 2011).

Contudo, diversos fatores podem influenciar negativamente o sucesso do estabelecimento das mudas nos reflorestamentos. Além da alta intensidade luminosa, pode-se destacar a deficiência nutricional, presença de contaminantes e alterações no pH do solo, temperaturas elevadas e o déficit hídrico (DH) (de-Bashan et al., 2012).

O estágio mais vulnerável ao estresse para as mudas, durante o reflorestamento, é o processo de estabelecimento em campo. Isto porque as mudas são mais sensíveis ao DH, principalmente, em decorrência de seu sistema radicular limitado. Além disso, a seca resulta intensifica a compactação do solo, que leva a diminuição da infiltração, dificultando ainda mais a captação de água pelas raízes e aumentando a desidratação das mudas (Nolan et al., 2018; Axelsson et al., 2020).

Portanto, a qualidade morfofisiológica das mudas pode garantir o crescimento inicial e sua sobrevivência, de modo que o plantio de mudas de baixa qualidade

representa alta mortalidade, elevando o custo de implementação do programa (Botelho e Davide, 2002; Cunha et al., 2005).

Para elevar o percentual de sobrevivência das mudas no campo, elas são submetidas à um processo de aclimatação nos viveiros, expondo-as gradativamente às condições ambientais mais semelhantes àquelas encontradas nos locais de plantio, possibilitando que desenvolvam alterações metabólicas e morfoanatômicas que podem conferir maior resistência e chance de sobrevivência. Portanto, a aclimatação para as condições de DH é importante, visto que em ambientes em que houve a remoção da cobertura florestal com degradação do solo, há diminuição na infiltração de água e da capacidade de retenção no solo (Calzavara et al., 2015; Mazzanatti et al., 2016).

Embora sejam necessários mais estudos, no decurso das últimas décadas houve o aprimoramento da tecnologia de produção de mudas de espécies arbóreas nativas, com grande aumento da qualidade das mudas produzidas, levando a um aumento substancial das taxas de sobrevivência e crescimento em campo (Cortina et al., 2013). Moléculas que atuam como sinalizadores de respostas a estresses podem ser aplicadas de maneira exógena para estimular a tolerância ao DH. Portanto, técnicas e tecnologias que influenciem de maneira positiva a sobrevivência das mudas são de extrema importância para o sucesso dos programas de reflorestamento.

2.2 Déficit hídrico

Eventos de seca podem ocasionar déficit hídrico (DH) em plantas, caso estas não estejam adaptadas às condições de baixa disponibilidade de água, fator limitante para o crescimento vegetal. O DH, além de ocasionar grandes perdas de

produção agrícola, também contribui para danos nos ecossistemas naturais, desertificação e erosão do solo. Sendo assim, a seca é considerada um problema ambiental muito relevante (Fang e Xiong, 2014).

O DH ocorre quando o suprimento de água é incapaz de atender à demanda da planta, podendo ocorrer danos aos tecidos e morte em situações mais intensas (Wilkinson e Davies, 2010; Swann, 2018). Em situações de DH, o potencial hídrico do solo se torna muito baixo, levando a diminuição do fluxo de água no *continuum* solo-planta-atmosfera, ou seja, ocorre diminuição na absorção de água pelas raízes, impedindo o funcionamento normal do metabolismo das plantas (Fang e Xiong, 2014; Marusig et al., 2020). Em ambientes tropicais, o DH pode ocorrer quando há a queda do potencial hídrico do solo, aumento no déficit de pressão de vapor na atmosfera e/ou quando há estresse salino (Wilkinson e Davies, 2010).

A água é crucial para a sobrevivência das plantas. Quando expostas ao DH, elas reagem ao estresse integrando diversos tipos de respostas, nos níveis anatômico, morfológico, fisiológico e molecular. Essas respostas podem variar conforme as diferentes espécies de plantas ou entre genótipos dentro de uma mesma espécie (Jaleel et al., 2009; Fang e Xiong, 2014).

O conteúdo relativo de água (CRA), potencial hídrico, condutância estomática, taxa de transpiração e a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II são parâmetros frequentemente utilizados para indicar respostas ao DH. O CRA, por exemplo, é considerado uma medida do status hídrico da planta, e está intimamente relacionado ao potencial hídrico. Portanto, frequentemente, é observado uma diminuição no CRA em resposta ao DH (Anjum et al., 2011). O potencial hídrico é o parâmetro mais utilizado como indicador do estado hídrico da planta, pois ele é uma medida da energia livre da água nos tecidos. À medida que a disponibilidade de

água no solo diminui e a demanda evapotranspiratória aumenta, o potencial hídrico da planta cai, aumentando a probabilidade de embolia no xilema e, conseqüentemente, de diminuição da capacidade de transporte de seiva por este tecido (Marusig et al., 2020).

Além disso, diante da percepção do DH pelas raízes, tem-se um aumento nos níveis de ácido abscísico (ABA), que através do transporte via xilema, chega até a parte aérea e provoca o fechamento estomático, ou seja, queda na condutância estomática (g_s) (Davies e Zhang, 1991; Wilkinson e Davies, 2010, Gupta et al., 2020). Este fechamento leva a uma redução na perda de água através da transpiração, atenuando a queda do potencial hídrico das folhas. Porém, a queda g_s ocasiona limitação das trocas gasosas, refletindo em diminuição na entrada de CO_2 no meio intercelular do mesofilo, limitando a atividade da enzima Rubisco. Isso culmina na diminuição da assimilação líquida de carbono e, por conseqüência, menor incremento de biomassa vegetal (Grant, 2011; Gupta et al., 2020). A diminuição do tamanho dos estômatos também é uma estratégia de grande importância na regulação das trocas gasosas foliares em plantas submetidas ao DH, pois, estômatos menores proporcionam menor perda de água por transpiração por unidade de carbono assimilado e, portanto, maior eficiência no uso da água (EUA) pela planta (Melo et al., 2007; Ding et al., 2021).

O fechamento estomático é um dos principais mecanismos que minimizam os efeitos nocivos do DH. Nesse sentido, as plantas podem ser classificadas como isohídricas e anisohídricas. As espécies isohídricas são aquelas que fecham seus estômatos diante de uma queda no potencial hídrico do solo e, assim, mantêm o potencial hídrico de suas folhas relativamente constante ao longo do dia. As plantas anisohídricas, pelo contrário, exercem um controle estomático mais fraco, não

fechando ou fechando menos seus estômatos e continuam a transpirar, mesmo quando o potencial hídrico do solo diminui (McDowell et al., 2008; Hugalde e Vila, 2014).

Tais estratégias resultam em diferentes efeitos nas plantas. Por exemplo, as espécies isohídricas podem enfrentar um declínio na absorção líquida de CO₂ e nas taxas fotossintéticas, que pode resultar em um balanço negativo de carbono. Já as espécies anisohídricas estão mais propensas a enfrentar falhas hidráulicas, que é hipotetizada para ocorrer quando a perda de água pela transpiração excede a absorção pela raiz e culmina em cavitação. Embora tal separação seja feita, é importante mencionar que as espécies isohídricas também podem sofrer pela falha hidráulica, e outros fatores e interações podem estar envolvidos nesses processos, como a relação entre o conteúdo de carboidratos e a recuperação da função hidráulica (McDowell et al., 2008; Tomasella et al., 2019; Li et al., 2020).

Com a redução da absorção de CO₂ ocasionada pela redução da g_s frente ao DH, tem-se a diminuição das reações de carboxilação e a baixa recuperação de ADP e de NADP⁺, causando comprometimento da fase fotoquímica da fotossíntese. Assim, o oxigênio pode se tornar um dos aceptores de elétrons na cadeia de transporte de elétrons desta fase, e a redução do O₂ gera espécies reativas de oxigênio (EROs), como o oxigênio singleto (¹O₂), radical hidroxila (\bullet OH), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ânion superóxido (\bullet O₂⁻) (Anjum et al., 2011).

Mesmo em situações não estressantes, processos metabólicos, como a fotossíntese e a respiração celular, podem gerar EROs. Porém, quando há redução no metabolismo fotossintético, a geração de EROs pode se elevar a níveis tóxicos, sendo altamente reativas, as EROs podem danificar seriamente as células vegetais, aumentando a peroxidação lipídica, degradação proteica e fragmentação do DNA. A

superprodução de EROs induzida pelo DH aumenta também o conteúdo de malondialdeído (MDA), que é considerado um marcador da peroxidação lipídica de membranas (Anjum et al., 2011; Grant, 2011; Gupta et al., 2020).

Para mitigar os efeitos negativos causados pelas EROs, as plantas possuem um sistema antioxidante enzimático e não enzimático. Os antioxidantes não enzimáticos atuam mantendo a integridade das membranas, enquanto as enzimas antioxidantes têm a capacidade de eliminar EROs. Assim, a atividade do sistema antioxidante determina se o dano ocorrerá ou não, e se ocorrer, em que nível ocorrerá (Anjum et al., 2011; Swann, 2018). As principais enzimas antioxidantes que atuam na eliminação de EROs são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e a glutatona redutase (GR) (Esposito et al., 2018; Fang e Xiong, 2014).

Ainda, dentre as respostas fisiológicas frente ao déficit hídrico, podem ser ressaltados os mecanismos de dissipação de energia nos cloroplastos, como a perda de energia na forma de calor por pigmentos protetores, fotorrespiração e o fluxo cíclico de elétrons no fotossistema I, que diminuem o potencial de formação de EROs e auxiliam na proteção do aparato fotossintético, protegendo a planta contra a fotoinibição crônica (Fang e Xiong, 2014; Gupta et al., 2020).

O DH também prejudica gravemente o crescimento e o desenvolvimento da planta, sendo o alongamento e a multiplicação celular considerados processos fisiológicos mais sensíveis ao DH, devido a redução da pressão de turgor. Além disso, o DH resulta em diminuição no número de folhas por planta e na área foliar, atribuída à redução da fotossíntese e ao menor alongamento celular (Anjum et al., 2011; Hasanuzzaman et al., 2021). Ainda, sobre as respostas biométricas, as plantas podem investir no crescimento das raízes e no desenvolvimento de pelos

radiciais em detrimento do crescimento da parte aérea. Essas respostas aumentam a área de absorção em detrimento da área de perda de água. Além disso, as plantas podem apresentar senescência e abscisão foliar, diminuindo a superfície transpirante (Poorter et al., 2012, Hasanuzzaman et al., 2017; Gupta et al., 2020).

Diante de uma queda no potencial hídrico do solo, a manutenção do turgor celular pode ser alcançada por meio do ajuste osmótico, através do acúmulo de diferentes íons e solutos orgânicos no citosol, como prolina e glicina-betaína. Esses solutos são capazes de diminuir o potencial osmótico das células, o que diminui o potencial hídrico e possibilita a manutenção do gradiente decrescente de potencial hídrico no sistema solo-planta-atmosfera, o que ajuda na absorção de água, mesmo em solos com baixo potencial hídrico (Anjum et al., 2011; Per et al., 2017).

2.3 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO), que interage com todas as classes de hormônios vegetais, podendo atuar sobre respostas a condições de estresse como o DH (Prakash et al., 2019). O NO é uma importante molécula sinalizadora responsável por atuar em diversos processos do metabolismo vegetal, incluindo respostas a estresses bióticos e abióticos (Nabi et al., 2019). Ele consiste em uma espécie reativa de nitrogênio (ERN) e possui um elétron não pareado em seu orbital π , o que reflete um caráter altamente reativo e relativamente instável. O NO é um gás incolor, possui meia-vida de poucos segundos ($t_{1/2} < 6$ s), apresenta alta difusividade ($4.8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ em H_2O) e é altamente lipofílico, o que o torna capaz de entrar facilmente na fase lipídica das membranas celulares (Sahay e Gupta, 2017; Singhal et al., 2021).

O NO pode ser sintetizado pela própria planta, chamado de NO endógeno, ou

ser aplicado de maneira exógena (Simontacchi et al., 2015). A síntese endógena de NO pode ocorrer em diferentes órgãos ou células estressados (Astier et al., 2018). Ainda que vários estudos relatem a síntese do NO em plantas, este processo ainda não foi totalmente elucidado, isto porque há várias rotas oxidativas e redutivas descobertas para a síntese de NO, refletindo em vários mecanismos possível para a sua síntese (Fancy et al., 2017; Nabi et al., 2019).

As vias oxidativas de produção de NO em plantas incluem a oxidação de L-arginina, por uma enzima semelhante a óxido nítrico sintase (envolvida na biossíntese de NO em animais), além de poliaminas e hidroxilamina. Também têm sido propostas diversas vias de conversão de nitrito (NO_2^-) a NO. Evidências sugerem o envolvimento da enzima nitrato redutase na síntese do NO, pois, além de catalisar a redução do nitrato (NO_3^-) a NO_2^- , ensaios indicaram que ela pode reduzir o NO_2^- a NO. Outras vias de redução do NO_2^- a NO incluem a cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, além da conversão não enzimática de NO_2^- em NO em condições ácidas (Astier et al., 2018; Nabi et al., 2019).

O NO pode atuar controlando a expressão gênica e modificando a atividade proteica por meio de alterações pós-traducionais, como a S-nitrosação. Nessa modificação, de natureza rápida e reversível, o NO é covalentemente ligado aos grupos tióis dos resíduos de cisteínas, formando S-nitrosotióis (RSNO) (Farnese et al., 2016; Astier et al., 2018; Nabi et al., 2019). As modificações mediadas por este radical livre estão relacionadas a vários aminoácidos além da cisteína, como a tirosina, triptofano e metionina. Porém, a S-nitrosação é um dos mecanismos mais comuns encontrado em organismos vivos. As alterações na estrutura das proteínas são um importante mecanismo existente para que elas possam desempenhar novas funções (Nabi et al., 2019).

Um dos RSNO mais importantes é a S-nitrosoglutationa (GSNO), que é considerada o principal reservatório de NO nas células, além de ser uma molécula sinalizadora de longa distância. Por meio de uma ligação covalente, o NO pode se ligar à glutathiona reduzida (GSH), formando GSNO (Corpas et al., 2013; Nabi et al., 2019; Singhal et al., 2021). A degradação da GSNO a glutathiona oxidada (GSSG) e amônia (NH₃) é catalisada pela enzima S-nitrosoglutathiona redutase (GSNOR), constituindo um importante papel na regulação dos níveis intracelulares de NO (Salgado et al., 2013; Jahnová et al., 2019).

Diversos estudos relatam o papel do NO durante o crescimento e desenvolvimento de plantas em condições normais e de estresse, como a seca, atuando como uma molécula sinalizadora capaz de ativar enzimas eliminadoras de EROs (Nabi et al., 2019; Silveira et al., 2019). Porém, as plantas cultivadas em condições de DH passam por vários mecanismos adaptativos que auxiliam na redução do estresse, incluindo alongamento das raízes, diminuição da área foliar e da permeabilidade da cutícula, e muitas dessas aclimações podem envolver o NO (Nabi et al., 2019; Singhal et al., 2021).

As respostas induzidas pelo NO incluem o controle sobre a fisiologia estomática, reduzindo a transpiração (Nabi et al., 2019); o aumento da eficiência fotossintética, resultando em efeitos sobre a biomassa e aumento do conteúdo de clorofila (Oliveira et al., 2016); alteração na arquitetura das raízes, promovendo a formação de raízes laterais, raízes adventícias, pelos radiciais e o crescimento de raízes principais (Lombardo et al., 2006; Lira-Ruan et al., 2013; Lombardo e Lamattina, 2018); diminuição dos danos oxidativos, através da eliminação de EROs e aumento da atividade das enzimas antioxidantes, em que há alteração da expressão gênica e atividade proteica (Gan et al., 2015); produção de compostos

antioxidantes (Wang et al., 2016); e aumento no CRA (Silveira et al., 2016).

O NO é um importante mensageiro secundário que auxilia em diversas funções estomáticas em várias espécies de plantas (Ahammed et al., 2021). Porém, o efeito do NO sobre a fisiologia estomática depende fundamentalmente da concentração, podendo aumentar ou reduzir a g_s (Silveira et al., 2016). Ele pode atuar como um modulador endógeno de ABA, regulando o fechamento estomático induzido pelo ABA, para inibir a perda de água (Ahammed et al., 2021). Estudos anteriores relataram a ambiguidade na função do NO sobre a sinalização do ABA, podendo ser importante também para a abertura estomática, através da S-nitrosação de proteínas (Silveira et al., 2016; Singhal et al., 2021).

2.4 Doadores de NO

A aplicação de moléculas doadoras de NO em plantas de forma exógena é capaz de estimular respostas de tolerância frente a situações de estresse, além de ser uma estratégia amplamente utilizada para esclarecer como o NO afeta o metabolismo e a fisiologia das plantas em condições estressantes, promovendo a tolerância delas frente situações de estresse (Nabi et al., 2019; Silveira et al., 2021). Estes doadores de NO são importantes na aplicação exógena do NO, devido às características químicas desta molécula que torna inviável o seu uso direto (Seabra et al., 2015). Existem diversas classes de doadores de NO, que diferem em relação à estrutura química, meia-vida e taxa de liberação de NO, com sua ação dependendo de fatores como a concentração, pH, luz e temperatura (Seabra et al., 2015; Silveira et al., 2021)

Uma das classes mais importantes de moléculas doadoras são os RSNOs, como a GSNO, S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) e o ácido S-nitroso-

mercaptosuccínico (S-nitroso-MSA). Os RSNOs, como o GSNO, apresentam baixo peso molecular, são térmica e fotoquimicamente instáveis e liberam NO através da clivagem da ligação do enxofre com o NO, sem que haja produção de compostos tóxicos (Oliveira et al., 2016; Silveira et al., 2016; Silveira et al., 2021). Porém, o caráter relativamente instável destes doadores pode causar liberação rápida e excessiva de NO, causando toxicidade, devido ao fato do NO poder reagir com outras moléculas e causar danos nas membranas celulares (Seabra et al., 2015; Hill et al., 2010).

Portanto, uma estratégia eficiente para liberação controlada de NO e para reduzir a fotossensibilidade e instabilidade destas moléculas é a incorporação das moléculas doadoras em nanopartículas (NPs), protegendo-as da rápida degradação, e garantindo uma liberação lenta e gradual de NO, prolongando e melhorando seus efeitos (Seabra et al., 2015; Silveira et al., 2021). Além disso, a aplicação de nanotecnologia em plantas, principalmente na agricultura, tem aumentado significativamente nos últimos anos, pois constitui uma ferramenta importante na tentativa de alcançar produções maiores e mais sustentáveis (Fiol et al., 2021; Seabra et al., 2014).

A quitosana é um biopolímero derivado da quitina e bastante utilizado na produção de NPs. As propriedades mucoadesivas comuns às quitosanas facilitam o transporte de compostos ativos, como os doadores de NO, pelas membranas celulares (Seabra et al., 2014), enquanto as fortes interações eletrostáticas do esqueleto de quitosana com as moléculas doadoras levam a uma alta eficiência de encapsulação, permitindo aplicação versátil de NPs de quitosana carreando doadores de NO na medicina e na agricultura (Pelegriño et al., 2017).

Esse derivado de quitina é biodegradável e constitui um polímero de baixo

custo, podendo ser isolado em resíduos marinhos, a partir de insetos e fungos (Yu et al., 2021). Além disso, tal substância é biocompatível e oferece baixa toxicidade aos seres vivos, sendo pouco danosa para a aplicação no solo. A quitosana possui atividade promotora do crescimento vegetal, antimicrobiana, além de não apresentar influência negativa sobre o metabolismo vegetal (Seabra et al., 2014; Yu et al., 2021). Além disso, a quitosana pode apresentar alguns efeitos positivos, como melhorar as respostas fisiológicas das plantas e mitigar os efeitos adversos causados por estresses abióticos (Hidangmayum et al., 2019). Há evidências de que a aplicação de quitosana pode estimular a taxa fotossintética, o fechamento estomático, o aumento de enzimas antioxidantes além da indução da produção de ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos e metabólitos envolvidos no ajuste osmótico (Hidangmayum et al., 2019; Yu et al., 2021).

Oliveira et al (2016), em um estudo pioneiro na aplicação de NPs como carreadoras de NO em plantas, verificaram o efeito de NPs de quitosana contendo S-nitroso-MSA sobre plantas de milho submetidas ao estresse salino. Os resultados indicaram liberação mais lenta e controlada de NO, resultando em proteção contra os efeitos negativos da alta salinidade, incluindo melhora na atividade do fotossistema II, teor de clorofila e crescimento das plantas.

Lopes-Oliveira et al (2019) verificaram que em condições de estresse luminoso, a aplicação de NPs de quitosana carreando S-nitroso-MSA favoreceu o desenvolvimento de mudas de *Heliocarpus popayanensis*, espécie arbórea pioneira da Mata Atlântica. Já para *Cariniana estrellensis*, espécie arbórea não pioneira, não houve alterações no desenvolvimento das mudas com a aplicação das NPs liberadoras de NO.

Silveira et al (2019) realizaram ensaios com plantas de cana-de-açúcar

cultivadas em solução nutritiva, submetidas ao DH e pulverizadas com GSNO livre e nanoencapsulado em NPs de quitosana. De maneira geral, tanto o GSNO nanoencapsulado quanto livre foram capazes de atenuar os efeitos da seca. No entanto, apenas o doador nanoencapsulado levou a maiores taxas fotossintéticas e aumento na razão raiz/parte aérea.

Mais recentemente, Silveira et al (2021) realizaram um estudo em que plantas de cana-de-açúcar bem hidratadas foram comparadas com plantas submetidas ao DH e previamente pulverizadas com diferentes doadores de NO nanoencapsulados, sendo eles, S-nitroso-MSA, GSNO, SNAC e nitroprussiato de sódio (SNP). A pulverização de SNAC atenuou de maneira parcial o impacto do DH sobre a fotossíntese, manteve a EUA semelhante às bem hidratadas e promoveu o crescimento das plantas. SNAC e GSNO foram capazes de melhorar a fotossíntese também durante o período de recuperação das plantas ao DH. A aplicação de SNP não foi eficaz em atenuar os efeitos do DH. De maneira geral, com os resultados obtidos, Silveira et al (2021) verificaram que a pulverização foliar com SNAC ou GSNO foram as melhores alternativas para melhorar o desempenho fisiológicos das plantas após o DH.

Em um estudo com *H. popayanensis*, espécie arbórea nativa da Mata Atlântica, do Carmo et al (2021) verificaram que a nanoencapsulação em quitosana desacelerou a liberação de NO através do doador S-nitroso-MSA, apresentando maiores níveis de RSNO nas raízes e folhas. Além disso, mesmo sem estar nanoencapsulado, o doador de NO foi capaz de evitar a queda da fotossíntese induzida pelo DH nessa espécie. Porém, as NPs contendo o S-nitroso-MSA induziram este efeito mais rapidamente, com menos aplicações. Além disso, apenas o doador nanoencapsulado foi capaz de aumentar o CRA das folhas e a formação

de pelos radiciais em plantas estressadas pelo DH.

Estes resultados indicam um importante papel desempenhado pelo NO em plantas submetidas a seca, destacando o potencial de aplicação das NPs liberadoras de NO na obtenção de mudas de árvores mais tolerantes à seca. Porém, é essencial verificar se a proteção contra os efeitos danosos do DH também ocorre em outras espécies e em diferentes grupos ecológicos, e se o efeito protetor permanece mesmo sob DH severo.

REFERÊNCIAS

- Ahammed GJ, Li X, Mao Q, Wan H, Zhou G, Cheng Y (2021) The SIWRKY81 transcription factor inhibits stomatal closure by attenuating nitric oxide accumulation in the guard cells of tomato under drought. *Physio Plant*. <https://doi.org/10.1111/ppl.13243>
- Allen CD, Macalady AK, Chenchouni H, Bachelet D, McDowell N, Vennetier M, Kitzberger T, Rigling A, Breshears DD, Hogg EH, Gonzalez P, Fensham R, Zhang Z, Castro J, Demidova N, Lim JH, Allard G, Running SW, Semerci A, Cobb N (2010) A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *For Ecol*. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.09.001>
- Anjum SA, Xie XY, Wang LC, Saleem MF, Man C, Lei W (2011) Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *Afri J agric res*. <https://doi.org/10.5897/AJAR10.027>
- Astier J, Gross I, Durner J (2018) Nitric oxide production in plants: an update. *J Exp Bot*. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx420>
- Axelsson EP, Grady KC, Lardizabal ML, Nair IB, Rinus D, Ilstedt U (2020) A pre-adaptive approach for tropical forest restoration during climate change using naturally occurring genetic variation in response to water limitation. *Restor Ecol*. <https://doi.org/10.1111/rec.13030>
- Barreiro EJ, Bolzani VDS (2009) Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Quím nova*. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300012>
- Botelho SA, Davide AC (2002) Métodos silviculturais para recuperação de nascentes e recomposição de matas ciliares. *Simp Nac sobre Recup de áreas degradadas*.
- Calzavara AK, Bianchini E, Mazzanatti T, Oliveira HC, Stolf-Moreira R, Pimenta JA (2015) Morphoanatomy and ecophysiology of tree seedlings in semideciduous forest during high-light acclimation in nursery. *Photosynth*. <https://doi.org/10.1007/s11099-015-0151-0>
- Calzavara AK, Rocha JS, Lourenço G, Sanada K, Medri C, Bianchini E, Pimenta JA, Stolf-Moreira R, Oliveira HC (2017) Acclimation responses to high light by *Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae) leaves at different stages of development. *Plant Biol*. <https://doi.org/10.1111/plb.12592>
- Corpas FJ, Alché JDD, Barroso JB (2013) Current overview of S-nitrosoglutathione (GSNO) in higher plants. *Frontiers plant sci*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00126>
- Cortina J, Vilagrosa A, Trubat R (2013) The role of nutrients for improving seedling quality in drylands. *New For*. <https://doi.org/10.1007/s11056-013-9379-3>
- Cunningham SC, Mac Nally R, Baker PJ, Cavagnaro TR, Beringer J, Thomson JR, Thompson, RM (2015) Balancing the environmental benefits of reforestation in agricultural regions. *Perspect in Plant Ecol Evol Syst*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ppees.2015.06.001>

Cusack D, Montagnini F (2004) The role of native species plantations in recovery of understory woody diversity in degraded pasturelands of Costa Rica. *For Ecol Manag.* [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(03\)00302-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(03)00302-5)

Davies WJ, Zhang J (1991) Root signals and the regulation of growth and development of plants in drying soil. *Ann rev plant biol.* <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.000415>

de Moura Laurentino CM, da Silva LAP, Marques SCS, Leite ME (2021) Desmatamento na bacia do Rio Verde Grande, norte de Minas Gerais-Brasil. *Geoamb.* <https://doi.org/10.5216/revgeoamb.i39.64618>

De-Bashan LE, Hernandez JP, Bashan Y (2012) The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation—A comprehensive evaluation. *Appl Soil Ecol.* <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.09.003>

Ding Y, Nie Y, Chen H, Wang K, Querejeta JI (2021) Water uptake depth is coordinated with leaf water potential, water-use efficiency and drought vulnerability in karst vegetation. *New Phytol.* <https://doi.org/10.1111/nph.16971>

do Carmo GC, Iastrenski LF, Debiassi TV, da Silva RC, Gomes DG, Pelegrino MT, Bianchini E, Stolf-Moreira R, Pimenta JA, Seabra AB, Oliveira HC (2021) Nanoencapsulation improves the protective effects of a nitric oxide donor on drought-stressed *Heliocarpus popayanensis* seedlings. *Ecotox Environ Saf.* <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112713>

Ellison D, Morris CE, Locatelli B, Sheil D, Cohen J, Murdiyarso D, Gutierrez V, Meine VN, Creed IF, Pokorny J, Gaveau D, Spracklen DV, Tobella AB, Ilstedt U, Teuling AJ, Gebrehiwot SG, Sands DC, Muys B, Verbist B, Springgay E, Sugandi Y, Sullivan CA (2017) Trees, forests and water: Cool insights for a hot world. *Glob Environ Change.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2017.01.002>

Esposito MP, Nakazato RK, Pedroso ANV, Lima MEL, Figueiredo MA, Diniz AP, Domingos M (2018) Oxidant-antioxidant balance and tolerance against oxidative stress in pioneer and non-pioneer tree species from the remaining Atlantic Forest. *Sci Total Environ.* <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.255>

Fancy NN, Bahlmann AK, Loake GJ (2017) Nitric oxide function in plant abiotic stress. *Plant Cell Environ.* <https://doi.org/10.1111/pce.12707>

Fang Y, Xiong L (2014) General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cell and Mol Life Sci.* <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1767-0>

Farnese FS, Menezes-Silva PE, Gusman GS, Oliveira JA (2016) When bad guys become good ones: the key role of reactive oxygen species and nitric oxide in the plant responses to abiotic stress. *Frontiers plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00471>

Fiol DF, Terrile MC, Frik J, Mesas FA, Álvarez VA, Casalengué CA (2021) Nanotechnology in plants: recent advances and challenges. *J Chem Technol Biotech.* <https://doi.org/10.1002/jctb.6741>

Fundação SOS Mata Atlântica., 2015. Relatório Anual de Atividades - Edição 2015. Fundação SOS Mata Atlântica, São Paulo.

Gan L, Wu X, Zhong Y (2015) Exogenously applied nitric oxide enhances the drought tolerance in Hulless barley. *Plant Prod Sci.* <https://doi.org/10.1626/pp.s.18.52>

Grant, OM (2011) Understanding and exploiting the impact of drought stress on plant physiology. In: *Abiotic stress responses in plants*. Springer, New York, p 89.

Gupta A, Rico-Medina A, Caño-Delgado AI (2020) The physiology of plant responses to drought. *Sci.* <https://doi.org/10.1126/science.aaz7614>

Hasanuzzaman M, Inafuku M, Nahar K, Fujita M, Oku H (2021) Nitric oxide regulates plant growth, physiology, antioxidant defense, and ion homeostasis to confer salt tolerance in the Mangrove Species, *Kandelia obovata*. *Antioxidants.* <https://doi.org/10.3390/antiox10040611>

Hasanuzzaman M, Nahar K, Hossain MS, Anee TI, Parvin K, Fujita M (2017) Nitric oxide pretreatment enhances antioxidant defense and glyoxalase systems to confer PEG-induced oxidative stress in rapeseed. *J Plant Interact.* <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1362052>

Hidangmayum A, Dwivedi P, Katiyar D, Hemantaranjan A (2019) Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress. *Physiol Mol Biol Plants.* <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0633-1>

Hill BG, Dranka BP, Bailey SM, Lancaster JR, Darley-Usmar VM (2010) What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *J Biol Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.101618>

Hugalde, IP, Vila HF (2014) Comportamiento isohídrico o anisohídrico en vides....¿ Una controversia sin fin? *Rev. Investig. Agropecu.* <https://doi.org/10.1016/j.wace.2021.100304>

IPCC, 2021. *Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Masson-Delmotte V, Zhai P, Pirani A, Connors SL, Péan C, Berger S, Caud N, Chen Y, Goldfarb L, Gomis MI, Huang M, Leitzell K, Lonnoy E, Matthews JBR, Maycock TK, Waterfield T, Yelekçi O, Yu R, Zhou B. Cambridge University, Cambridge, New York.

Jahnová J, Luhová L, Petřivalský M (2019) S-nitrosoglutathione reductase—The master regulator of protein S-nitrosation in plant NO signaling. *Plants.* <https://doi.org/10.3390/plants8020048>

Jaleel CA, Paramasivam M, Abdul W, Mihammad F, Hameed JAJ, Ramamurthy S, Rajaram P (2009). Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agric. Biol.*

Li Q, Zhao M, Wang N, Liu S, Wang J, Zhang W, Du N (2020) Water use strategies and drought intensity define the relative contributions of hydraulic failure and carbohydrate depletion during seedling mortality. *Plant Physiol Biochem.*

<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.05.023>

Lira-Ruan V, Napsucialy MS, Dubrovsky JG (2013) Heuristic aspect of the lateral root initiation index: a case study of the role of nitric oxide in root branching. *Appl Plant Sci.* <https://doi.org/10.3732/apps.1300029>

Lombardo MC, Graziano M, Polacco JC, Lamattina L (2006) Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. *Plant Signal Behav.* <https://doi.org/10.4161/psb.1.1.2398>

Lombardo MC, Lamattina L (2018) Abscisic acid and nitric oxide modulate cytoskeleton organization, root hair growth and ectopic hair formation in *Arabidopsis*. *Nitric Oxide.* <https://doi.org/10.1016/j.niox.2018.09.002>

Lopes-Oliveira PJ, Gomes DG, Pelegriano MT, Bianchini E, Pimenta JA, Stolf-Moreira R, Seabra AB, Oliveira HC (2019) Effects of nitric oxide-releasing nanoparticles on neotropical tree seedlings submitted to acclimation under full sun in the nursery. *Sci reports.* <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54030-3>

Marusig D, Petruzzellis F, Tomasella M, Napolitano R, Altobelli A, Nardini A (2020) Correlation of field-measured and remotely sensed plant water status as a tool to monitor the risk of drought-induced forest decline. *For.* <https://doi.org/10.3390/f11010077>

Mazzanatti T, Calzavara AK, Pimenta JA, Oliveira HC, Stolf-Moreira R, Bianchini E (2016) Light acclimation in nursery, morphoanatomy and ecophysiology of seedlings of three light-demanding neotropical tree species. *Braz. J. Bot.* <https://doi.org/10.1007/s40415-015-0203-5>

McDowell N, Pockman WT, Allen CD, Breshears DD, Cobb N, Kolb T, Plaut J, Sperry J, West A, Williams DG, Yezzer EA (2008) Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought?. *New phytol.* <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02436.x>

Melo HCD, Castro EMD, Soares ÂM, Melo LAD, Alves JD (2007) Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. *Hoehnea.*

Nabi RBS, Tayade R, Hussain A, Kulkarni KP, Imran QM, Mun BG, Yun BW (2019) Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. *Environ Exp Bot.* <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.02.003>

Nolan RH, Drew DM, O'Grady AP, Pinkard EA, Paul K, Roxburgh SH, Ramp D (2018) Safeguarding reforestation efforts against changes in climate and disturbance regimes. *Ecol Manag.* <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.05.025>

Oliveira HC, Gomes BC, Pelegriano MT, Seabra AB (2016) Nitric oxide-releasing chitosan nanoparticles alleviate the effects of salt stress in maize plants. *Nitric Oxide.* <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.09.010>

Pan Y, Birdsey RA, Fang J, Houghton R, Kauppi PE, Kurz WA, Phillips OL, Shvidenko A, Lewis SL, Canadell JG, Ciais P, Jackson RB, Pacala SW, McGuire AD,

Piao S, Rautiainen A, Sitch S, Hayes D (2011) A large and persistent carbon sink in the world's forests. *Sci*. <https://doi.org/10.1126/science.1201609>

Pelegriño MT, Weller RB, Chen X, Bernardes JS, Seabra AB (2017) Chitosan nanoparticles for nitric oxide delivery in human skin. *Med Chem Comm*. <https://doi.org/10.1039/C6MD00502K>

Per TS, Khan NA, Reddy PS, Masood A, Hasanuzzaman M, Khan MIR, Anjum NA (2017) Approaches in modulating proline metabolism in plants for salt and drought stress tolerance: Phytohormones, mineral nutrients and transgenics. *Plant physiol biochem*. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.03.018>

Poorter H, Niklas KJ, Reich PB, Oleksyn J, Poot P, Mommer L (2012) Biomass allocation to leaves, stems and roots: meta-analyses of interspecific variation and environmental control. *New Phytol*. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03952.x>

Prakash V, Sing VP, Tripathi DK, Sharma S, Corpas FJ (2019) Crosstalk between nitric oxide (NO) and abscisic acid (ABA) signaling molecules in higher plants. *Environ Exp Bot*. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.10.033>

Ribeiro MC, Martensen AC, Metzger JP, Tabarelli M, Scarano F, Fortin MJ (2011) The Brazilian Atlantic Forest: a shrinking biodiversity hotspot. In *Biodiversity hotspots*. Springer, Berlin, Heidelberg, p 405.

Rodrigues RR, Lima RAF, Gandolfi S, Nave AG (2009) On the restoration of high diversity forests: 30 years of experience in the Brazilian Atlantic Forest. *Biol Conserv*. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2008.12.008>

Sahay S, Gupta M (2017). An update on nitric oxide and its benign role in plant responses under metal stress. *Nitric Oxide*. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.04.011>

Salgado I, Martínez MC, Oliveira HC, Frungillo L (2013) Nitric oxide signaling and homeostasis in plants: a focus on nitrate reductase and S-nitrosoglutathione reductase in stress-related responses. *Braz J Bot*. <https://doi.org/10.1007/s40415-013-0013-6>

Seabra AB, Justo GG, Haddad PS (2015) State of the art, challenges and perspectives in the design of nitric oxide-releasing polymeric nanomaterials for biomedical applications. *Biotech Adv*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.005>

Seabra AB, Rai M, Durán N (2014) Nano carriers for nitric oxide delivery and its potential applications in plant physiological process: a mini review. *J. Plant Biochem. Biotechnol*. <https://doi.org/10.1007/s13562-013-0204-z>

Silveira NM, Frungillo L, Marcos FC, Pelegriño MT, Miranda MT, Seabra AB, Ribeiro RV (2016) Exogenous nitric oxide improves sugarcane growth and photosynthesis under water deficit. *Nitric Oxide*. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2501-y>

Silveira NM, Prativiera PJ, Pieretti JC, Seabra AB, Almeida RL, Machado EC, Ribeiro RV (2021) Chitosan-encapsulated nitric oxide donors enhance physiological recovery of sugarcane plants after water deficit. *Environ Exp Bot*.

<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104593>

Silveira NM, Seabra AB, Marcos FC, Pelegrino MT, Machado EC, Ribeiro RV (2019) Encapsulation of S-nitrosoglutathione into chitosan nanoparticles improves drought tolerance of sugarcane plants. Nitric Oxide. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.01.004>

Simontacchi M, Galatro A, Ramos-Artuso F, Santa-María GE (2015) Plant survival in a changing environment: the role of nitric oxide in plant responses to abiotic stress. Frontiers plant sci. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00977>

Singhal RK, Jatav HS, Aftab T, Pandey S, Mishra UN, Chauhan J, Chand S, Indu, Saha D, Dadarwal BK, Chandra K, Khan MA, Rajput VD, Minkina T, Narayana ES, Sharma MK, Ahmed S (2021) Roles of nitric oxide in conferring multiple abiotic stress tolerance in plants and crosstalk with other plant growth regulators. J Plant Growth Regul. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10446-8>

Soares WL, Medri ME (2002) Alguns aspectos da colonização da bacia do Tibagi. In: Medri ME, Bianchini E, Shibatta OA, Pimenta JÁ. A bacia do rio Tibagi. Londrina: Londrina. pp. 69-79.

Swann ALS (2018) Plants and Drought in a Changing Climate. Current Clim Change Rep. <https://doi.org/10.1007/s40641-018-0097-y>

Tomasella M, Casolo V, Aichner N, Petruzzellis F, Savi T, Trifilò P, Nardini A (2019) Non-structural carbohydrate and hydraulic dynamics during drought and recovery in *Fraxinus ornus* and *Ostrya carpinifolia* saplings. Plant Physio Biochem. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.10.024>

van der Werf GR, Morton DC, DeFries RS, Olivier JGJ, Kasibhatla PS, Jackson RB, Collatz GJ, Randerson JT (2009) CO₂ emissions from forest loss. Nat Geosci. <https://doi.org/10.1038/ngeo671>

Wang H, Huang J, Li Y, Li C, Hou J, Liang W (2016) Involvement of nitric oxide-mediated alternative pathway in tolerance of wheat to drought stress by optimizing photosynthesis. Plant Cell Rep. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2014-y>

Weber C, Martins F, Neppel G, Junqueira M, Oliveira R, Cidade F (2021) Mata Atlântica: Da formação original à fragmentação e o atual estado de conservação em Santa Catarina. Estrabão. <https://doi.org/10.53455/re.v2i.45>

Wilkinson S, Davies WJ (2010) Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. Plant, cell and environment. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.02052.x>

Williams NM (2011) Restoration of nontarget species: bee communities and pollination function in riparian forests. Restor Ecol. <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2010.00707.x>

Yu J, Wang D, Geetha N, Khawar KM, Jogaiah S, Mujtaba M (2021) Current trends and challenges in the synthesis and applications of chitosan-based nanocomposites for plants: A review. Carbohydrate Polymers.

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117904>

Zandalinas SI, Fritschi FB, Mittler R (2021) Global warming, climate change, and environmental pollution: Recipe for a multifactorial stress combination disaster. *Trends in Plant Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.02.011>

Zeng P, Sun F, Liu Y, Wang Y, Li G, Che Y (2021) Mapping future droughts under global warming across China: A combined multi-timescale meteorological drought index and SOM-Kmeans approach. *Weather Clim Extrem.* <https://doi.org/10.1016/j.wace.2021.100304>

Zhang J, Fu B, Stafford-Smith M, Wang S, Zhao W (2021) Improve forest restoration initiatives to meet Sustainable Development Goal 15. *Nat Ecol Evol.* <https://doi.org/10.1038/s41559-020-01332-9>

3. CAPÍTULO 1

Efeito de doador de óxido nítrico nanoencapsulado sobre mudas de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica submetidas à deficiência hídrica severa

Giovanna Camargo do Carmo^{a,*}, José Antonio Pimenta^a, Halley Caixeta de Oliveira^a
^a*Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil*

**Autor correspondente: Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid km 380, Londrina, PR, 86057-970, Brasil*

Email: giovannacdcarmo@gmail.com

Número de telefone: +55 43999002104

Artigo a ser submetido para publicação na revista *Journal of Forestry Research*

Fator de impacto: 2,149

<https://www.springer.com/journal/11676/>

Resumo

O óxido nítrico (NO) é uma molécula sinalizadora envolvida na proteção de plantas contra a deficiência hídrica (DH). Porém, sua aplicação é dificultada devido à sua natureza química instável. A nanoencapsulação de moléculas doadoras de NO constitui uma estratégia para propiciar liberação lenta e eficaz deste gás, o que poderia aumentar a sua atividade biológica. Assim, este estudo teve por objetivo avaliar o efeito de tratamentos com nanopartículas (NPs) de quitosana contendo o doador de NO S-nitrosoglutationa (GSNO) em mudas das espécies arbóreas *Cariniana estrellensis* e *Cecropia pachystachya* submetidas ao DH severo em casa de vegetação. Foi testada a hipótese de que o GSNO nanoencapsulado induz respostas efetivas na proteção das mudas contra os efeitos deletérios da seca. As mudas em DH foram tratadas por três dias alternados com NPs contendo GSNO, nas concentrações 25 e 50 μM para *C. pachystachya* e 200, 400 e 600 μM para *C. estrellensis*, além de dois tratamentos controles que não receberam formulação, um com plantas mantidas em DH e outro com plantas em capacidade de campo. A condutância estomática (g_s) das plantas foi medida diariamente, juntamente com a avaliação dos sintomas de murcha. No quinto dia de DH, foram medidos a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m), o potencial hídrico, conteúdo relativo de água (CRA) das folhas e a biomassa das plantas de ambas as espécies. Para *C. estrellensis*, ainda, foram avaliadas a taxa fotossintética e transpiração. Para *C. pachystachya*, o tratamento com 50 μM aumentou a g_s das plantas em DH ao amanhecer (que diminuiu no decorrer do dia), aumentou o F_v/F_m , potencial hídrico e CRA. Nenhum parâmetro avaliado em *C. estrellensis* respondeu à aplicação de NO em nenhuma concentração. Os parâmetros relativos aos sintomas de murcha e biomassa não foram alterados com a aplicação de NO em nenhuma espécie. De maneira geral, os resultados evidenciaram que a aplicação do doador GSNO nanoencapsulado pode aumentar a tolerância à seca de plantas de *C. pachystachya*, no entanto, não apresentou efeito sobre *C. estrellensis*. Estes

resultados indicam o potencial da aplicação de NPs liberadoras de NO para a obtenção de mudas de algumas espécies arbóreas mais tolerantes à seca, para utilização em programas de reflorestamento.

Palavras-chave: Quitosana, Nanopartículas, Déficit hídrico, Condutância estomática, Reflorestamento.

Abstract

Nitric oxide (NO) is a signaling molecule involved in plant protection against water deficit (WD). However, its application is hampered due to its unstable chemical nature. The nanoencapsulation of NO donor molecules is a strategy to provide slow and efficient release of this gas, which might increase its biological activity. Thus, this study aimed to evaluate the effect of treatments with chitosan nanoparticles (NPs) containing the NO donor S-nitrosoglutathione (GSNO) in seedlings of the tree species *Cariniana estrellensis* and *Cecropia pachystachya* submitted to severe WD in a greenhouse, hypothesizing that nanoencapsulated GSNO induces effective responses in protecting seedlings of different ecological groups against the deleterious effects of drought. The seedlings were treated for three alternate days with NPs containing GSNO, at concentrations 25 and 50 μM for *C. pachystachya* and 200, 400 and 600 μM for *C. estrellensis*, as well as control treatments in WD and field capacity without receiving formulation. Stomatal conductance (g_s) of the plants was measured daily, along with the evaluation of wilting symptoms. On the fifth day of WD, the maximum efficiency of photosystem II (F_v/F_m), water potential, relative water content (RWC) of the leaves, and plant biomass of both species were measured. For *C. estrellensis*, photosynthetic rate and transpiration were also measured. For *C. pachystachya*, the treatment with 50 μM increased the g_s of plants in WD at dawn and decreased it during the day, increased the F_v/F_m , water potential and RWC. *Cariniana estrellensis* did not respond to the application of NO in any concentration, in any parameter. The parameters related to wilting symptoms and biomass were not altered with the application of NO in any species. In general, the results showed that the use of nanoencapsulated GSNO protected the seedlings of *C. pachystachya* submitted to WD, but showed no effect on *C. estrellensis*, highlighting the potential of the application of NO-releasing NPs to obtain seedlings of some drought-tolerant tree species for reforestation programs.

Key-words: Chitosan, Nanoparticles, Drought, Stomatal conductance, Reforestation.

3.1 Introdução

A atividade humana promove o aumento dos gases estufa na atmosfera, ocasionando o aquecimento global, e com ele, as consequentes alterações nos padrões de ocorrência de chuvas, onde a sobrevivência de espécies de plantas em ambientes naturais se torna prejudicada (Ojima et al., 2021; Zandalinas et al., 2021; Zeng et al., 2021).

Agravando este fato, o bioma Mata Atlântica tem perdido cobertura vegetal e sofrido fragmentação devido à ação antrópica, contribuindo para as mudanças climáticas. A Mata Atlântica é considerada um dos três *hotspots* de biodiversidade mais vulneráveis a essas alterações do clima (Ribeiro et al., 2011; Macedo et al., 2021).

Nesse sentido, a necessidade da restauração florestal de ambientes degradados, com a utilização de espécies arbóreas nativas, é cada vez mais urgente (Calzavara et al., 2017; Philipson et al., 2020), principalmente em regiões tropicais, que apresentam alta biodiversidade e demanda por restauração florestal (Nolan et al., 2018; Philipson et al., 2020).

Os ecossistemas florestais em regeneração influenciam diretamente na manutenção do ciclo do carbono, devido ao acúmulo de biomassa, e no ciclo da água, principalmente em ambientes continentais, com a formação de fluxos concentrados de vapor d'água, através do processo de evapotranspiração (Cunningham et al., 2015; Ellison et al., 2017; Macedo et al., 2021).

Estudos com foco nas respostas de mudas arbóreas a fatores de estresse abióticos, bem como o desenvolvimento de estratégias e tecnologias para melhorar a tolerância das mudas ao estresse, são essenciais para aumentar o sucesso de programas de reflorestamento (Nolan et al., 2018; Philipson et al., 2020). O déficit

hídrico (DH) se mostra como um dos principais fatores de estresse que podem prejudicar o crescimento e desenvolvimento de mudas de espécies arbóreas (Nolan et al., 2018).

Em situações de DH, ocorre limitação nas trocas gasosas pela planta devido ao aumento nos níveis de ácido abscísico (ABA). Isso leva ao fechamento estomático, refletindo em diminuição da transpiração e da taxa fotossintética e, conseqüentemente, em uma menor biomassa e um menor crescimento da planta (Hasanuzzaman et al., 2017; Hasanuzzaman et al., 2021). Além disso, frequentemente é observado diminuição no conteúdo relativo de água e no potencial hídrico das plantas, diante da falta de água no solo (Nolan et al., 2018; Gupta et al., 2020).

Diversos estudos têm observado a eficiência do óxido nítrico (NO) na proteção de plantas contra situações extremas (Farnese et al., 2016). O NO é uma espécie reativa de nitrogênio, pequena, gasosa, que atua como uma molécula sinalizadora associada a um espectro variado de vias de transdução de sinais ligadas à resposta contra estresses abióticos (Singhal et al., 2021; Farnese et al., 2016). Dependendo de sua concentração, ele apresenta papéis diversos e cruciais, desde a germinação da semente até a maturidade das plantas (Singhal et al., 2021). Estudos recentes apresentam o NO como um componente crucial em numerosas redes de sinalização em plantas, que interagem com auxinas, giberelinas, ABA, etileno, ácido jasmônico, brassinosteróides, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), melatonina, sulfeto de hidrogênio, ácido salicílico, leva a alteração na expressão de genes e modulam o crescimento e desenvolvimento sob estresses (Sami et al., 2018; Sahay et al., 2019; Singhal et al., 2021).

Devido à natureza química da molécula de NO, moléculas doadoras

exógenas vêm sendo amplamente utilizados para provocar respostas metabólicas e fisiológicas de tolerância em plantas submetidas a condições estressantes (Silveira et al., 2021). Uma das classes importantes de moléculas doadoras de NO são os S-nitrosotióis (RSNOs), como a S-nitrosoglutathiona (GSNO), que possuem baixo peso molecular e são sensíveis à luz e ao calor, podendo se decompor e liberar NO rápida e exageradamente (Silveira et al., 2021). Uma maneira de reduzir a suscetibilidade dos doadores de NO é a incorporação deles em nanomateriais, que surgiu com a finalidade de proteger as moléculas da degradação rápida (Seabra et al., 2015; Silveira et al., 2021). Uma das técnicas mais utilizadas é a incorporação do doador em nanopartículas (NPs) de quitosana, pois ela é uma substância biodegradável, biocompatível, amplamente utilizada como um sistema nanocarreador (Silveira et al., 2021).

Vários estudos têm obtido resultados positivos da aplicação de NPs de quitosana contendo molécula doadora de NO em plantas sob estresse (Oliveira et al., 2016; Silveira et al., 2016; Silveira et al., 2019; Lopes-Oliveira et al., 2019; do Carmo et al., 2021), inclusive alguns relacionados ao DH (Silveira et al., 2016; Silveira et al., 2019; do Carmo et al., 2021). Contudo, ainda é necessário aprofundar o conhecimento acerca dessa tecnologia para a produção de mudas mais tolerantes ao DH, principalmente, considerando um contexto em que os eventos de seca possam ser mais intensos e prolongados.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito protetor do tratamento com o doador GSNO incorporado em NPs de quitosana sobre mudas de espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica muito utilizadas em programas de reflorestamento, *Cecropia pachystachya* e *Cariniana estrellensis*, submetidas à deficiência hídrica severa, em condições de casa de vegetação. A hipótese

estabelecida é que a GSNO nanoencapsulada protege mudas de *C. pachystachya* e *C. estrellensis* contra os efeitos deletérios do DH.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material vegetal e condições de cultivo

Dentre as espécies arbóreas nativas da Mata Atlântica comumente associadas ao plantio em sítios de reflorestamento ativo de ecossistemas de Floresta Estacional Semidecidual, destacam-se *Cecropia pachystachya* Trécul (Urticaceae) e *Cariniana estrellensis* (Raddi) Kuntze (Lecythidaceae).

C. pachystachya, popularmente, conhecida como Embaúba-do-brejo, é uma espécie pioneira e intolerante à sombra, com quatro a oito metros de altura, característica das associações secundárias, colonizadora, estabelecendo-se rapidamente em clareiras e na borda de matas (Lorenzi, 2008; Carvalho, 2014).

C. estrellensis, popularmente, conhecida como Jequitibá-branco, é espécie secundária tardia e semidecídua, tolerante à sombra, com 15 a 35 metros de altura, sendo considerada ameaçada de extinção (Lorenzi, 2008; Carvalho, 2014).

Sementes de *C. pachystachya* e *C. estrellensis* adquiridas comercialmente foram semeadas em areia esterilizada. Após cerca de 60 dias, foi feito o transplante das plântulas para tubos de polipropileno de 290 mL (uma plântula em cada), contendo um substrato comercial composto por vermiculita, carvão vegetal, casca de Pinus/Eucalipto e pó de coco (Fertilizare, Toledo, Paraná, Brasil), suplementado com 5 g/L de um fertilizante de liberação controlada (14% N, 14% P₂O₅ e 14% K₂O). As mudas transplantadas foram mantidas bem hidratadas em casa de vegetação com sombreamento parcial (60% de retenção de luz) por cerca de trinta dias, para

atingirem um crescimento ótimo. Após esse período, elas foram acomodadas em casa de vegetação sem sombreamento e permaneceram bem hidratadas por quarenta e cinco dias antes de iniciar a aplicação dos tratamentos, como forma de aclimação às condições de luminosidade e temperatura.

3.2.2 Preparo das formulações e aplicação dos tratamentos

As NPs de quitosana foram obtidas através do método de gelificação ionotrópica. Primeiramente, a quitosana foi dissolvida em ácido acético 1% e foi adicionada à GSH à solução. A mistura foi mantida em agitação magnética por noventa minutos, seguida da adição gota a gota de trifosfato de sódio (TPP), obtendo-se uma suspensão de NPs contendo 20 mM de GSH como concentração final. Antes da aplicação das NPs nas plantas foi adicionado nitrito de sódio (NaNO_2) à suspensão de NPs, para que houvesse a nitroação levando à formação de GSNO, que foi mantida em geladeira (a 10°C) no escuro por uma hora. Após este período, a solução a 20 mM foi diluída em água destilada para as concentrações desejadas.

O tratamento foi iniciado quando as plantas atingiram cerca de dez centímetros de altura. Os seguintes tratamentos foram dispostos em delineamento em blocos casualizados, com doze repetições cada: capacidade de campo (CC), déficit hídrico (DH), DH + NPs contendo GSNO a 25 (NO 25) e 50 μM (NO 50) para a *C. pachystachya*; e CC, DH, DH + NPs contendo GSNO a 200 (NO 200), 400 (NO 400) e 600 μM (NO 600) para a *C. estrellensis*. As concentrações das NPs liberadoras de NO utilizadas foram previamente selecionadas a partir de um experimento teste, no qual as doses que se destacaram em proteger as trocas gasosas das mudas de *C. pachystachya* estressadas foram escolhidas (Apêndice).

Para *C. estrellensis*, nenhuma dose se destacou no experimento teste (Apêndice); portanto, foram selecionadas concentrações maiores para testar seus efeitos. As condições dos tratamentos foram determinadas a partir de testes preliminares, no qual mudas de ambas as espécies foram privadas da rega, a fim de avaliar o seu perfil de resposta frente ao DH (dados não mostrados).

Ao iniciar os tratamentos, 30 mL de formulações recém-preparadas foram aplicadas diretamente no solo, por três dias alternados, totalizando três aplicações. As plantas do tratamento DH receberam o mesmo volume de água destilada e as plantas do tratamento em capacidade de campo receberam irrigação diária, até que o solo atingisse a saturação máxima de água e o excesso escorresse pelo fundo do tubo de polipropileno. Entre os dias de tratamento todas as plantas receberam irrigação normalmente. Ao final da terceira e última aplicação das suspensões de NPs foi imposto o DH através da interrupção da rega.

Os parâmetros de trocas gasosas foliares foram medidas a partir do término da última aplicação das formulações até o terceiro dia de DH. Quatro dias após a imposição do DH, ou seja, quando as plantas dos tratamentos em DH atingiram a murcha permanente, foram realizadas novamente as medições de trocas gasosas e análises destrutivas de cinco réplicas biológicas por tratamento, para mensurar o potencial hídrico das plantas, o conteúdo relativo de água e a massa seca. As outras sete réplicas por tratamento foram acompanhadas por avaliação diária de sintomas até o aparecimento de sinais de necrose foliar, que se deu, em média, ao sétimo dia de DH.

3.2.3 Trocas gasosas

Para as mudas da espécie *C. estrellensis*, foram avaliadas a taxa

fotossintética líquida (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a transpiração (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). As medidas foram realizadas utilizando um analisador de gás infravermelho (IRGA) portátil modelo LICOR 6400 XT (LI-COR Biosciences, Lincoln, EUA) conectado a uma câmara de 6 cm^2 sob uma radiação fotossinteticamente ativa saturante de $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fluxo de $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Tais medidas foram realizadas às 7:30 da manhã, em dias ensolarados, ao final da última aplicação das formulações e ao final do experimento.

Para as mudas de *C. pachystachya* e *C. estrellensis*, analisou-se a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) em folhas intactas por meio de um fluorômetro OS1p (Opti-Sciences, Hudson, EUA), conforme descrito por Shimizu et al. (2006), antes do amanhecer (05:00-06:00 h)

Ao longo dos dias de DH, foi realizada a medida da condutância estomática (g_s , $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) na face abaxial das folhas das duas espécies, com um porômetro foliar SC-1 (Decagon, Pullman, Washington, EUA) em quatro tempos pré-estabelecidos: às 7:30 h, 10 h, 14 h e 16 h.

3.2.4 Potencial hídrico

O potencial hídrico das plantas de ambas as espécies foi medido na parte aérea utilizando uma câmara de pressão do tipo Schölander (Soil Moisture – SAPSII, modelo 3115, Santa Barbara, CA, EUA), às 6:30 da manhã, utilizando gás N_2 . A parte aérea com as folhas foi colocada em um recipiente hermético que suporta a pressão do gás inerte e, ao adicionar o gás, foi observada a seiva exsudando pelo caule. O valor marcado no manômetro no instante que a seiva exsuda é o valor do potencial de pressão da seiva do xilema e, como o potencial osmótico nesse caso pode ser considerado insignificante, considera-se esse valor como o potencial

hídrico em MPa.

3.2.5 Conteúdo relativo de água

Para estimar o conteúdo relativo de água (CRA) de folhas de *C. pachystachya* e *C. estrellensis*, foi coletado cerca de 0,1 g de massa fresca das folhas, às 6:30 da manhã. Em seguida, as folhas coletadas foram submersas em água destilada por 24 horas, e após este período foi aferida a massa túrgida. Após permanecer em estufa a 60°C por 72 horas, foi obtida a massa seca (Smart e Bingham, 1974).

O cálculo do CRA (%) foi feito da seguinte forma:

$$CRA (\%) = \frac{Massa\ fresca - massa\ seca}{Massa\ túrgida - massa\ seca} \times 100$$

3.2.6 Parâmetros de murcha

Os sintomas das plantas ao déficit hídrico foram avaliados diariamente. Foram avaliados a resistência da planta à murcha, ou seja, número de dias sem que a planta apresentasse sintoma de murcha, resistência à murcha permanente, ou seja, o número de dias até ser identificada a murcha permanente, e a resistência das plantas à necrose, ou seja, o número de dias até que apareça os primeiros sinais de necrose foliar (Giauque et al., 2019).

3.2.7 Análises de crescimento

Para avaliar o crescimento das mudas, foram mensuradas as massas secas da raiz, caule e folhas, ao término do experimento, ou seja, no quarto dia de déficit hídrico. Para isso, as partes vegetativas foram secas a 60 °C por 72 h, e, depois, pesadas. Foi calculado a massa seca total das plantas (soma do peso seco de todos os órgãos) e razão entre a massa seca da raiz e com a da parte aérea (massa seca

da raiz dividida pela massa seca das folhas e caule).

3.2.8 Análise estatística

No experimento, para cada espécie, foi adotado o delineamento em blocos ao acaso. Doze réplicas biológicas foram utilizadas para as análises de F_v/F_m e g_s . Para os dados de parâmetros de resistência à murcha, A e E , foram utilizadas sete réplicas. Para os dados de potencial hídrico, CRA e crescimento foram utilizadas cinco réplicas biológicas. Os dados foram submetidos a testes de normalidade (Shapiro Wilk-W) e de homogeneidade de variância (Levene) para, em seguida, serem submetidos a uma Análise de Variância (ANOVA), e Análise de Variância de medidas repetidas para g_s , pelo software STATISTICA. Quando necessário, os dados foram transformados em log ou raiz quadrada para atingir os pressupostos dos testes paramétricos. Os dados de porcentagem e proporção foram transformados em arco seno da raiz quadrada da proporção. Quando detectada significância pela ANOVA, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.3 Resultados

Com relação à g_s das mudas de *C. pachystachya*, no primeiro dia de DH, não houve diferença entre os tratamentos; as plantas em CC e DH apresentaram valores semelhantes, independente da aplicação de NO (Fig. 1a). Para o segundo dia de DH, observou-se diminuição da g_s das plantas em relação à CC, porém, na primeira medida da manhã, às 7:30 h, as mudas em DH tratadas com NO 50 μM apresentaram a maior média entre as plantas em DH (aumento de 11,6% em relação ao tratamento DH) (Fig. 1b). Já às 10 h e 14 h, no tratamento NO 50, foi observada a

menor g_s entre as plantas em DH (Fig. 1b). Às 16 h não houve diferença entre os tratamentos em DH, diferindo apenas DH de CC, que apresentou a maior média (Fig. 1b). Com relação ao terceiro dia de DH, às 7:30 h da manhã, não houve diferença entre os tratamentos mantidos em condições de seca; apenas foi detectada a diferença entre as plantas em DH e as em CC (Fig. 1c). Às 10 h da manhã, as plantas em DH que receberam o NO a 50 μ M apresentaram a maior g_s (aumento de 175% em relação ao tratamento DH), sendo o tratamento NO 25 μ M com valor semelhante ao NO 50 e ao tratamento DH sem a adição das NPs liberadoras de NO (Fig. 1c). Às 14 h e 16 h, o DH continuou a induzir os menores valores de g_s , porém não houve diferença entre os tratamentos que receberam ou não NO (Fig. 1c).

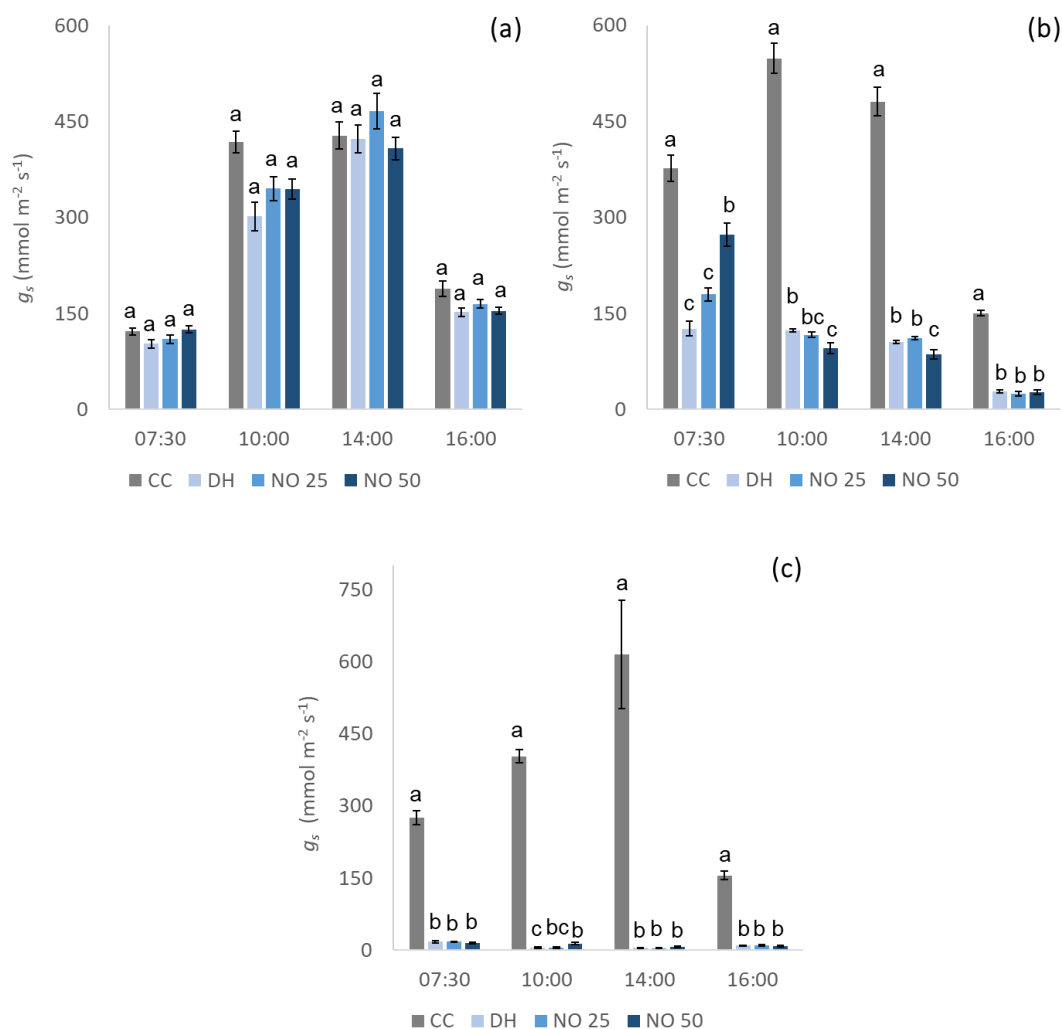


Fig. 1. Condutância estomática (g_s) de mudas de *Cecropia pachystachya* às 7:30 h, 10 h, 14 h e 16 h do primeiro (a), segundo (b) e terceiro dia de experimento (c). CC: Capacidade de campo; DH: déficit hídrico; NO 25: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 25 μM ; NO 50: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 50 μM . Os dados estão expressos como média \pm erro padrão (n = 12). Letras iguais acima das barras indicam médias semelhantes, de acordo com a ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey (p<0,05).

Para as mudas de *C. estrellensis*, já no primeiro dia de suspensão da irrigação, foi observada diminuição na g_s das mudas em relação àquelas mantidas na CC, em todos os horários de medições; porém, nenhum tratamento com adição das NPs liberadoras de NO diferiu do tratamento apenas em DH (Fig. 2a). Para o segundo e terceiro dia de seca, o mesmo padrão relacionado ao primeiro dia foi

observado, ou seja, o DH diminuiu a g_s das plantas, porém a adição de NO em qualquer concentração não foi capaz de induzir algum efeito (Fig 2b, c).

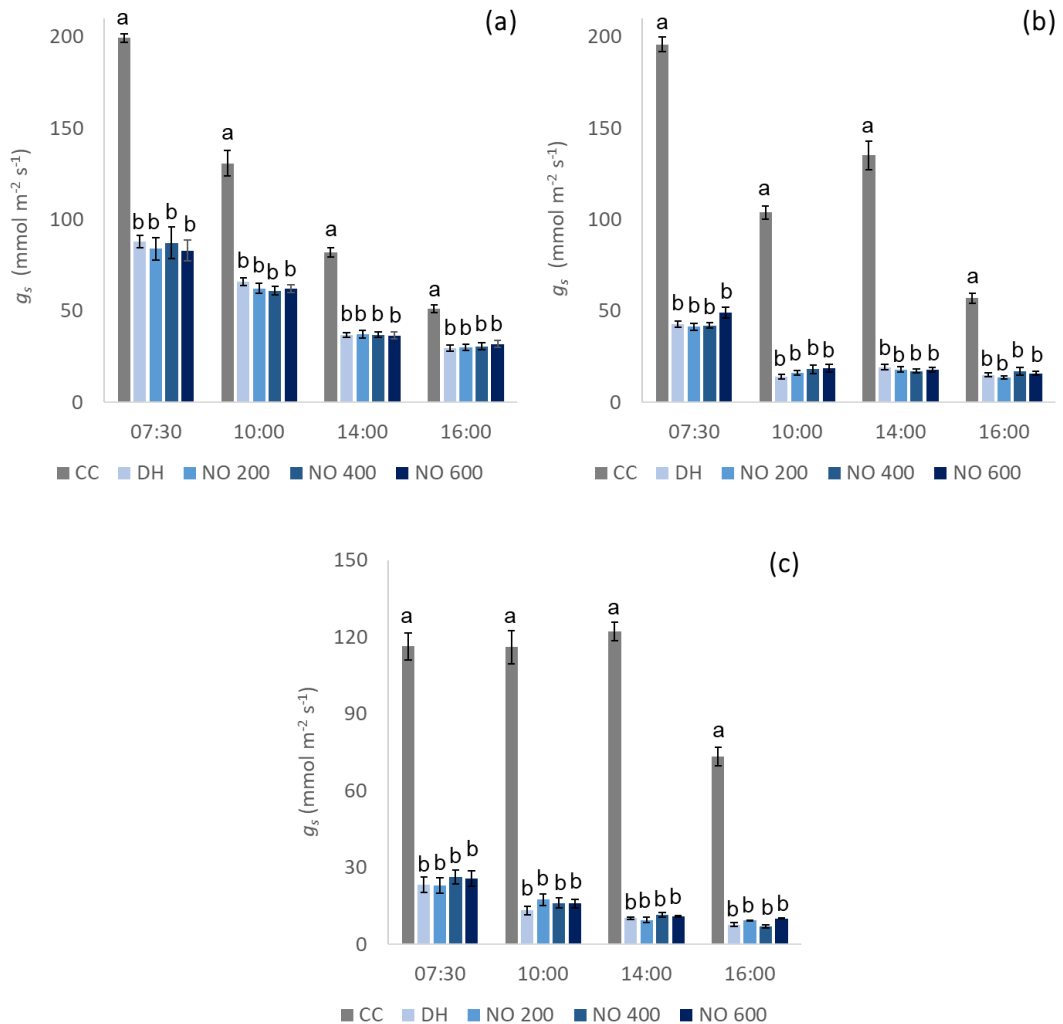


Fig. 2. Condutância estomática (g_s) de mudas de *Cariniana estrellensis* às 7:30 h, 10 h, 14 h e 16 h do primeiro (a), segundo (b) e terceiro dia de experimento (c). CC: Capacidade de campo; DH: déficit hídrico; NO 200: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 200 μM ; NO 400: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 400 μM ; NO 600: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 600 μM . Os dados estão expressos como média \pm erro padrão (n = 12). Letras iguais acima das barras indicam médias semelhantes, de acordo com a ANOVA de medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Com relação aos valores de F_v/F_m das plantas de *C. pachystachya*, foi possível observar grande diminuição nas plantas em DH, em comparação às

hidratadas (decréscimo de 87,0%) (Fig. 3a). Porém, as plantas que receberam o doador nanoencapsulado a 50 μM apresentaram valor cerca de 50% maior do que as plantas sem NO e que receberam o doador nanoencapsulado a 25 μM (Fig. 3a). Para *C. estrellensis*, a falta de água também resultou em diminuição do F_v/F_m (decréscimo de 80,4%), porém em nenhuma concentração com o doador nanoencapsulado foi observada diferença em relação às plantas somente em DH (Fig. 3b).

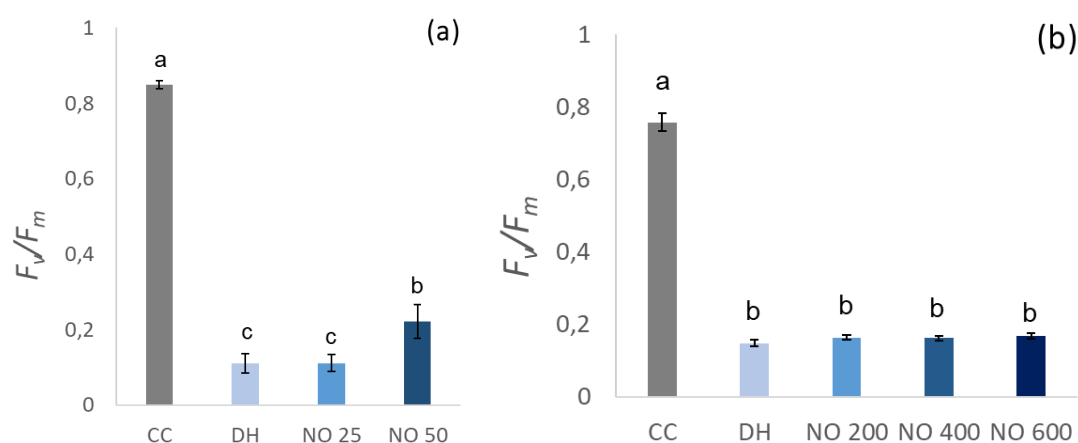


Fig. 3. Eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) de mudas de *Cecropia pachystachya* (a) e *Cariniana estrellensis* (b) ao final do experimento. CC: Capacidade de campo; DH: déficit hídrico; NO 25: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 25 μM ; NO 50: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 50 μM ; NO 200: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 200 μM ; NO 400: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 400 μM ; NO 600: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 600 μM . Os dados estão expressos como média \pm erro padrão (n = 12). Letras iguais acima das barras indicam médias semelhantes, de acordo com a ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A taxa fotossintética e a transpiração das plantas de *C. estrellensis* mensuradas no dia zero, ou seja, no dia da última aplicação das NPs liberadoras de NO e da última rega, apresentaram valores semelhantes entre todos os tratamentos

(Fig. 4a, b). No quinto dia de DH, foi observado decréscimo de cerca de 90% tanto na taxa fotossintética quanto na transpiração, em todos os tratamentos em DH independente da aplicação ou não de doador nanoencapsulado (Fig. 4c, d).

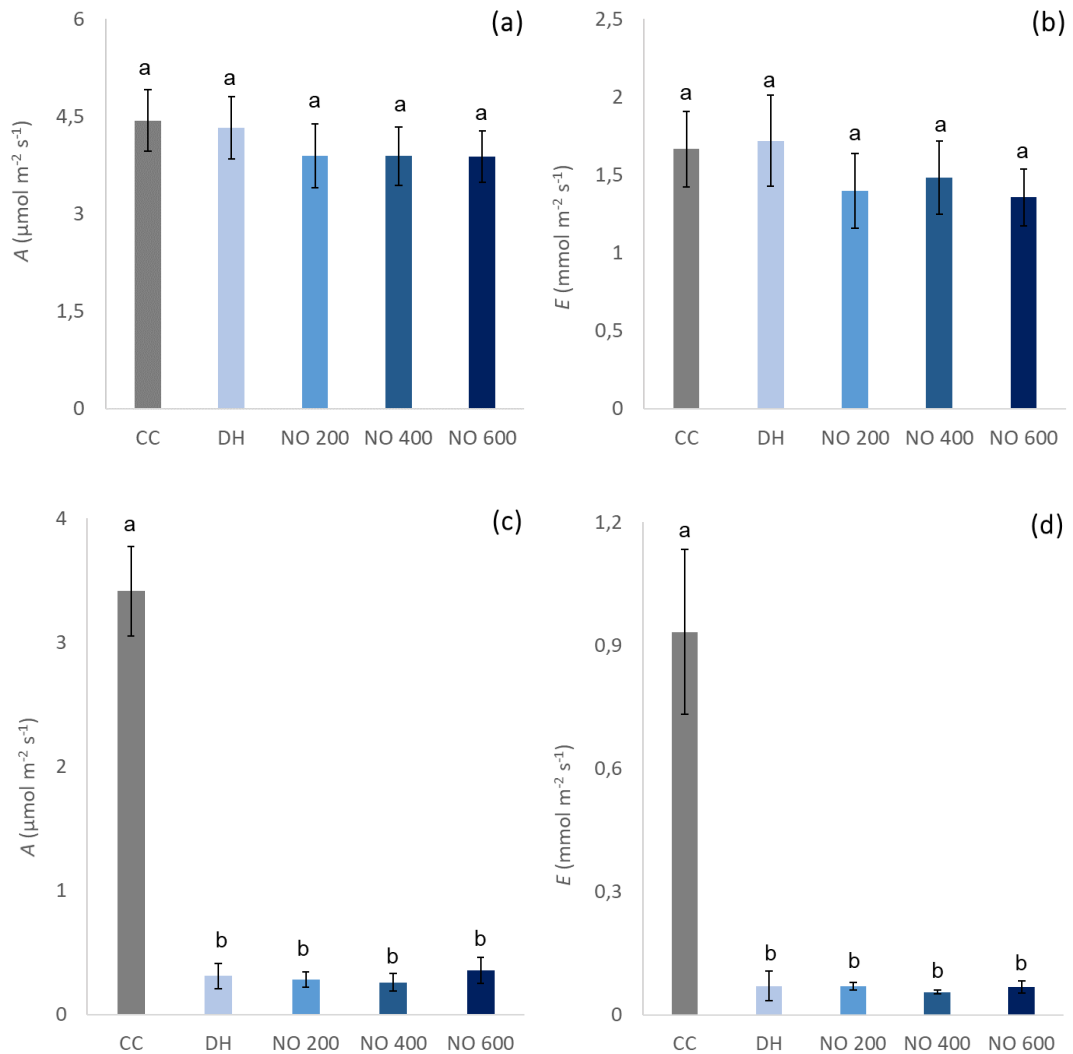


Fig. 4. Taxa fotossintética líquida (A) e Transpiração (E) de mudas de *Cariniana estrellensis* no dia zero (a e b) e no quarto dia de experimento (c e d). CC: Capacidade de campo; DH: déficit hídrico; NO 200: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 200 μM ; NO 400: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 400 μM ; NO 600: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 600 μM . Os dados estão expressos como média \pm erro padrão ($n = 7$). Letras iguais acima das barras indicam médias semelhantes, de acordo com a ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O CRA foliar das plantas de *C. pachystachya* que foram mantidas em DH diminuiu 53,4% em relação às plantas em CC; porém, o tratamento com NO 50 μ M foi capaz de manter o maior CRA das folhas das plantas sob condições de seca (aumento de 32,9% em relação ao DH), diferindo do tratamento DH e NO 25 (Fig. 5a). Para a *C. estrellensis*, o CRA das folhas também diminuiu sob DH (51,8%) com ou sem adição de NO (Fig. 5c).

Com relação ao potencial hídrico das mudas, o resultado observado acompanhou o que foi observado no CRA das folhas. Ou seja, as plantas de *C. pachystachya* submetidas somente ao DH apresentaram potencial hídrico menor (mais negativo) em comparação às mudas hidratadas (decréscimo de 84,6%); porém, o potencial hídrico das mudas do tratamento em DH com as NPs liberadoras de NO à 50 μ M foi maior do que dos outros tratamentos em DH (aumento de 54,6% em relação ao tratamento DH) (Fig. 5b).

Nas plantas de *C. estrellensis* também foi possível observar a diminuição no potencial hídrico das plantas em DH (73,2%), mas não houve efeito das NPs liberadoras de NO (Fig. 5d).

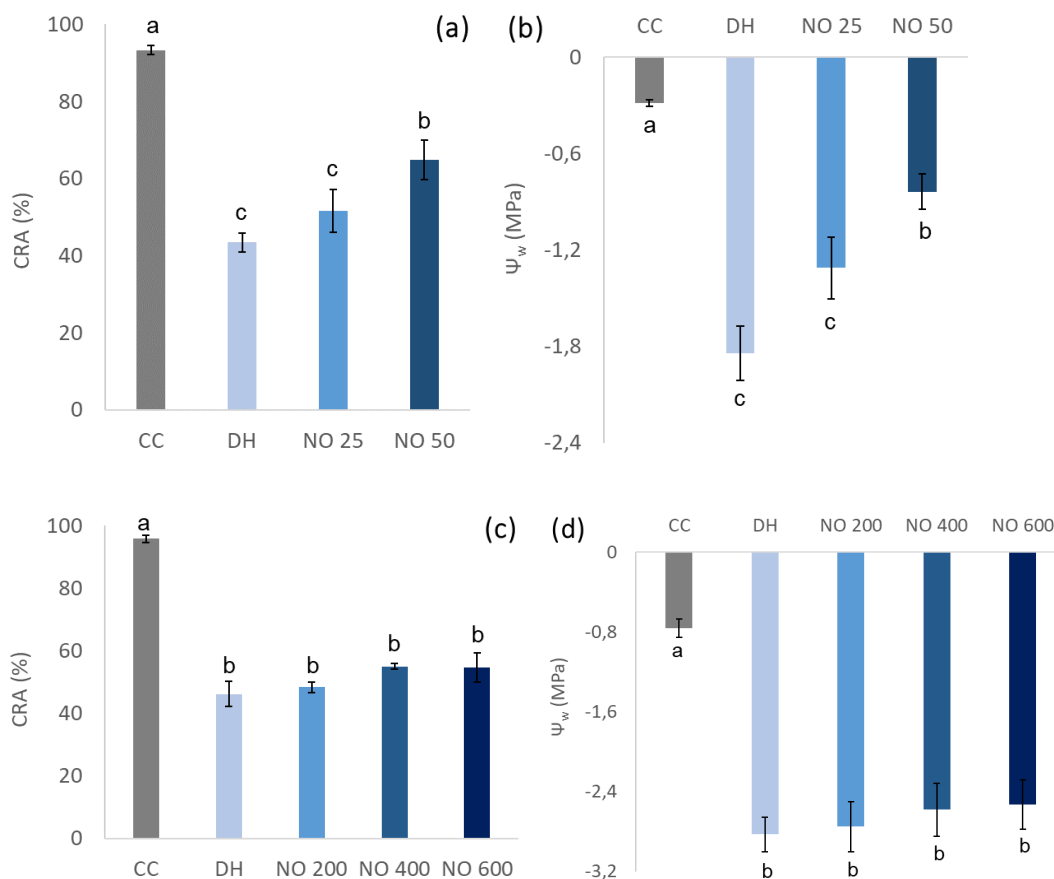


Fig. 5. Conteúdo relativo de água (CRA) (a e c) e potencial hídrico (Ψ_w) (b e d) de mudas de *Cecropia pachystachya* (a e b) e *Cariniana estrellensis* (c e d) ao final do experimento. CC: Capacidade de campo; DH: déficit hídrico; NO 25: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 25 μM ; NO 50: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 50 μM ; NO 200: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 200 μM ; NO 400: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 400 μM ; NO 600: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 600 μM . Os dados estão expressos como média \pm erro padrão ($n = 5$). Letras iguais acima das barras indicam médias semelhantes, de acordo com a ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para *C. pachystachya* e *C. estrellensis*, o DH não interferiu na massa seca total das plantas e na razão entre a massa seca das raízes e da parte aérea, uma vez que todas as médias se mantiveram semelhantes para as duas espécies, independente da falta de água e da aplicação das NPs liberadoras de NO (Fig. 6).

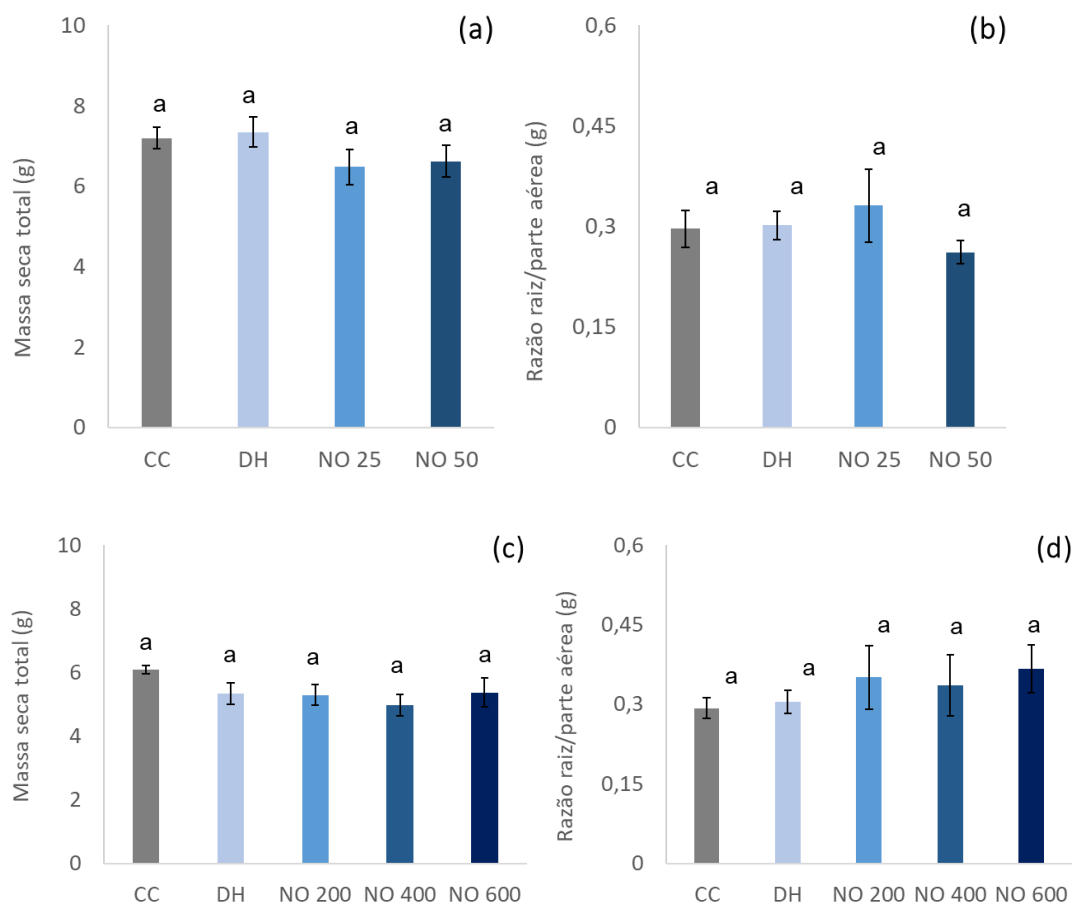


Fig. 6. Massa seca total (a e c) e razão entre a massa seca da raiz e massa seca da parte aérea (b e d) de mudas de *Cecropia pachystachya* (a e b) e *Cariniana estrellensis* (c e d) ao final do experimento. CC: Capacidade de campo; DH: déficit hídrico; NO 25: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 25 µM; NO 50: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 50 µM; NO 200: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 200 µM; NO 400: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 400 µM; NO 600: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 600 µM. Os dados estão expressos como média ± erro padrão (n = 5). Letras iguais acima das barras indicam médias semelhantes, de acordo com a ANOVA seguida pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Foram avaliadas a quantidade de dias até que as plantas apresentassem a murcha inicial, murcha permanente e os primeiros sinais de necrose foliar. Tanto para *C. pachystachya* (Fig. 7 a, b, c) quanto para *C. estrellensis* (Fig. 7 d, e, f) esses parâmetros não diferiram entre as mudas que foram mantidas em DH sem aplicação de NO em comparação com aquelas em DH em que foram aplicadas NPs contendo

o doador.

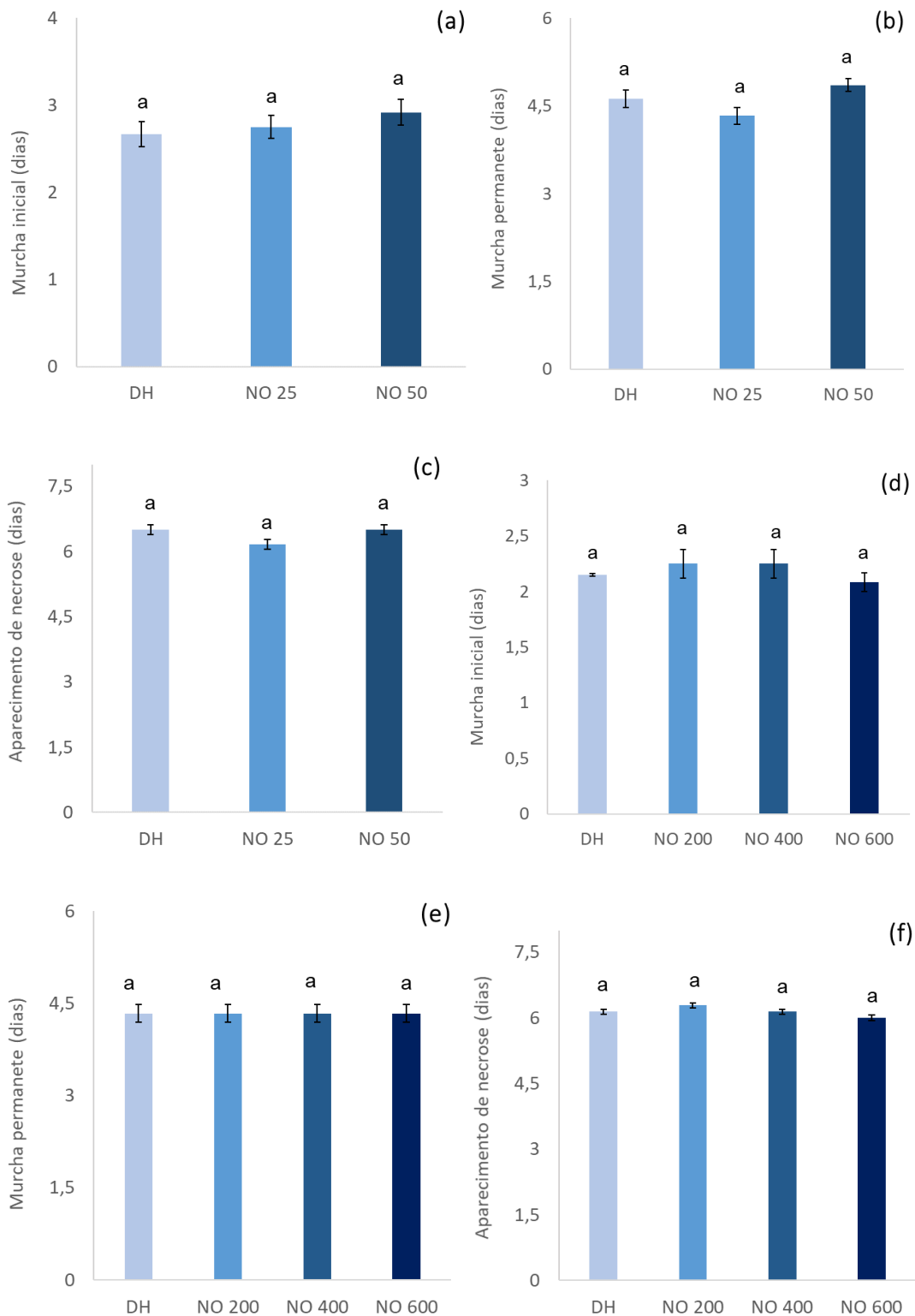


Fig. 7. Quantidade de dias até a murcha inicial (a e d), Quantidade de dias até a murcha permanente (b e e) e quantidade de dias até aparecer sinais de necrose foliar (c e f) de *Cecropia pachystachya* (a, b e c) e *Cariniana estrellensis* (d, e e f).

DH: déficit hídrico; NO 25: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 25 μM ; NO 50: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 50 μM ; NO 200: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 200 μM ; NO 400: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 400 μM ; NO 600: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 600 μM . Os dados estão expressos como média \pm erro padrão ($n = 7$). Letras iguais acima das barras indicam médias semelhantes, de acordo com a ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.4 Discussão

Os resultados obtidos indicaram que as NPs liberadoras de NO aumentaram a tolerância à seca em mudas da espécie *C. pachystachya*, visto que foram observados efeitos positivos sobre a g_s , eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II, CRA das folhas e sobre o potencial hídrico. Já para a espécie tolerante à sombra, *C. estrellensis*, a aplicação do doador de NO nanoencapsulado não apresentou efeitos, indicando nenhuma resposta da espécie à aplicação do NO. Estes resultados sugerem que as respostas das plantas à aplicação de NO pode variar de acordo com a espécie.

O efeito benéfico do NO nanoencapsulado nas plantas de *C. pachystachya*, submetidas ao DH, provavelmente, está relacionado à liberação controlada de NO e à proteção do doador contra a degradação proporcionado pelas NPs. A quitosana possui propriedades mucoadesivas que podem favorecer a adesão das NPs às raízes, gerando liberação controlada de NO (Seabra et al., 2014) o que explicaria os resultados observados para *C. pachystachya* neste estudo. Este fato evidencia o papel desempenhado pela nanoencapsulação na melhoria da biodisponibilidade do NO para as células vegetais, de maneira local e sistêmica (Seabra et al., 2014; Lopes-Oliveira et al., 2019; do Carmo et al., 2021).

Estudos recentes têm registrado que a incorporação de doadores de NO em NPs de quitosana gera liberação de NO mais sustentada em comparação com os

doadores livres, ou seja, a decomposição do doador e a liberação de NO se dá de maneira gradual, por períodos maiores, contribuindo para prolongar os efeitos do NO no metabolismo vegetal (Oliveira et al., 2016; Lopes-Oliveira et al., 2019; do Carmo et al., 2021). Dada a biodegradabilidade, biocompatibilidade e síntese de baixo custo das NPs contendo S-nitrosotióis, elas emergiram como uma solução sustentável e econômica na tentativa de ajudar a melhorar a tolerância das plantas contra a seca (Seabra et al., 2015; do Carmo et al., 2021).

Oliveira et al (2016) verificaram o efeito de NPs de quitosana contendo S-nitroso-MSA sobre plantas de milho em condições de estresse salino. Observaram que o doador nanoencapsulado promoveu a liberação lenta e controlada de NO, que resultou em proteção contra os efeitos do estresse salino. Porém, no presente estudo, os efeitos positivos da nanoencapsulação do doador GSNO não foram observados para a espécie tolerante à sombra *C. estrellensis*, indicando que essa espécie parece ser menos responsiva ao NO, mesmo testando diferentes doses.

Lopes-Oliveira et al. (2019) observaram que, em condições de sol pleno no viveiro, o uso de NPs carreando S-nitroso-MSA favoreceu o desenvolvimento de mudas da espécie arbórea intolerante à sombra *Heliocarpus popayanensis*, enquanto para *C. estrellensis* (tolerante à sombra) não houve alterações na fisiologia das mudas com a aplicação do doador de NO, tanto em sua forma livre quanto nanoencapsulado.

Os resultados obtidos através no presente estudo evidenciam que somente a espécie intolerante à sombra respondeu à aplicação do doador nanoencapsulado. Portanto, é possível que o NO esteja envolvido na resposta de *C. pachystachya* sob DH, mas não de *C. estrellensis*, o que sugere que o efeito é dependente da espécie, corroborando os resultados de Lopes-Oliveira et al. (2019). Portanto, é importante

que sejam desenvolvidos estudos com maior número de espécies.

Para as plantas de *C. pachystachya*, o NO alterou o comportamento estomático ao longo do dia, mantendo maiores g_s ao amanhecer e menores à medida que as horas passaram. O NO pode atuar aumentando ou diminuindo a g_s , dependendo da dose aplicada (Wang et al., 2016; Casaretto et al., 2020; do Carmo et al., 2021). Sob as condições deste estudo, ambas as espécies apresentaram controle estomático anisohídrico, ou seja, a redução da abertura estomática ocorrida em condições de seca não foi suficiente para evitar a queda do potencial hídrico.

O NO está relacionado com a S-nitrosação das proteínas Open Stomata 1 (OST1), regulando a sinalização de ABA nas células guarda. A S-nitrosação da proteína OST1, mediada pelo NO, afeta a sua atividade, tornando-a inibida. Portanto, a S-nitrosação atua como um regulador negativo da sinalização do ABA em plantas (Wang et al., 2016; Casaretto et al., 2020; Singhal et al., 2021), processo que favorece a abertura dos estômatos e a assimilação de CO₂ mesmo em condições de seca (Wang et al., 2016; Casaretto et al., 2020; do Carmo et al., 2021).

Em *C. pachystachya*, o tratamento NO 50 alterou a fisiologia estomática no decorrer do dia. Esta resposta é interessante pois indica que em momentos favoráveis, como logo ao amanhecer, a manutenção da g_s é importante para manter as trocas gasosas das plantas, porém, à medida que o tempo passa, e o DH se torna mais intenso devido às condições ambientais, a diminuição da g_s é importante para manter o status hídrico e a manutenção do metabolismo vegetal.

Ahammed et al (2021) verificaram um importante papel do NO no movimento estomático regulado pelo fator de transcrição SIWRKY81, em tomate. Alguns estudos têm verificado que o acúmulo de NO sintetizado a partir da redução do nitrito pela enzima nitrato redutase é essencial para o fechamento dos estômatos

(Shi et al., 2015; Li et al., 2020; Nabi et al., 2019; Ahammed et al., 2021). O NO desencadeia várias mudanças nas células guarda, como aumento de Ca^{2+} e da alcalinização citosólica, e participa da ativação dos canais de efluxo de K^+ , levando ao aumento do potencial hídrico, efluxo de água e consequente perda do turgor celular, levando ao fechamento estomático (Ahammed et al., 2021). O NO também pode atuar sobre a resposta estomática induzida pelo ABA por outras vias de sinalização, como a ativação das cascatas de sinalização das proteínas quinase ativada por mitógeno (MAPK) e acúmulo de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), que ativa genes de defesa nas plantas (Nabi et al., 2019).

Similarmente, o ajuste da g_s pode ter favorecido a manutenção do CRA e potencial hídrico nas plantas de *C. pachystachya*, pois mesmo submetidas ao DH, quando tratadas com NO 50, as plantas mantiveram CRA semelhante às plantas em CC. Além da melhora no CRA, as mudas de *C. pachystachya* mantidas em DH e com aplicação das NPs liberadoras de NO à 50 μM ainda apresentaram potencial hídrico menos negativo do que as que não receberam o tratamento. Em estudo com plantas de soja, de Sousa et al. (2020) evidenciaram o efeito de doador de NO livre sobre a manutenção do status hídrico das folhas. Indivíduos sob DH que receberam o doador de NO apresentaram maior abertura estomática em comparação às plantas em DH que não receberam o doador. A maior abertura estomática foi relacionada com alterações morfoanatômicas, como o aumento da densidade estomática na face abaxial das folhas e diminuição no tamanho do estômato na face adaxial, além do aumento na g_s . Essas alterações contribuíram para maior condutividade hidráulica, que resultou em diminuição da dessecação das folhas.

Além disso, do Carmo et al. (2021) verificaram que o doador S-nitroso-MSA impediu a inibição da assimilação de CO_2 induzida pelo DH, independente da

nanoencapsulação, mas o doador nanoencapsulado induziu esse efeito mais cedo em mudas de *H. popayanensis*. As NPs liberadoras de NO foram capazes de aumentar o CRA das folhas de *H. popayanensis* em DH (de 32,3% para 60,5%), além de induzir aumento de 36,6% na formação de pelos absorventes em relação às plantas bem hidratadas. Silveira et al. (2019) em seu estudo com plantas de cana-de-açúcar, observaram efeito positivo da GSNO no CRA foliar, independente de estar nanoencapsulada ou livre. É importante ressaltar que diferentemente dos trabalhos mencionados acima, este estudo testou o potencial da aplicação das NPs liberadoras de NO sob seca severa, em uma espécie tolerante e uma não tolerante à sombra.

O tratamento NO 50 foi capaz de manter o maior F_v/F_m entre as plantas sob seca. A melhora de parâmetros relacionados à fotossíntese pode estar associada aos efeitos do NO sobre processos não estomáticos, como a proteção das moléculas de clorofila, devido à redução de sua degradação, prevenção da fotoinibição devido à melhora na estabilidade do FSII e proteção contra o estresse oxidativo através da indução da resposta antioxidante (Misra et al., 2014; Oliveira et al., 2016; Leite et al., 2019; Wang et al., 2019). Em situações de DH ou estresse osmótico, o NO pode atuar diretamente sobre a maquinaria fotossintética, influenciando o complexo liberador de oxigênio ou a organização do complexo do FSII. A organização do FSII e o estado de oxidação do Mn do complexo S0S4 estão relacionados pois um aumento nos centros do FSII no estado S0 está conectado a um aumento na oligomerização da proteína LHCII, o que gera o aumento da estabilidade do FSII diante do estresse abiótico, e este processo pode ser mediado a partir da sinalização do NO (Misra et al., 2014). Ainda, o NO pode aliviar os danos do DH a partir da prevenção da inibição da atividade fotoquímica, melhorando a

abertura dos centros de reação do FSII, aumentando a capacidade de transporte de elétrons. O NO também pode estimular a atividade de enzimas importantes para a fotossíntese, como a Rubisco, e desta forma, melhorar a assimilação de CO₂ (Gan et al., 2015; Silveira et al., 2017). Além disso, em nível molecular, o NO pode induzir a expressão de genes relacionados à deficiência hídrica, que estão envolvidos em diversos processos celulares e fisiológicos, como o sistema de defesa antioxidante, metabolismo fotossintético, transdução de sinais hormonais, carboidratos e metabolismo secundário (Misra et al., 2014; Lau et al., 2021). Porém, os detalhes do processo de sinalização do NO e como ele interage com outras moléculas ainda não estão completamente elucidados (Lau et al., 2021).

Apesar dos efeitos observados da aplicação de GSNO nanoencapsulado, eles não retardaram a aparição de sinais de murcha, necrose foliar e nem afetaram a biomassa das plantas, em ambas as espécies. Isto pode se dar devido ao tipo de estresse aplicado neste estudo, ou seja, o sistema de seca severa e rápida, em tubos de polipropileno pequenos e com rápido decaimento do potencial hídrico. Será importante também desenvolver estudos sob seca moderada de longo prazo, com o objetivo de adicionar informações sobre os efeitos do NO sobre mudas de espécies arbóreas em condições diferentes de DH. Todos estes estudos possibilitarão desenvolver um protocolo de rastreio do efeito das formulações na resposta de mudas de várias espécies submetidas à seca, o que possibilitará a comparação de espécies de diferentes grupos funcionais.

3.5 Conclusões

Com as análises realizadas nesta dissertação, conclui-se que a aplicação de NPs liberadoras de NO apresentam potencial para aumentar a tolerância ao DH da

espécie *Cecropia pachystachya*, mas não de *Cariniana estrellensis*.

A aplicação das NPs de quitosana contendo a molécula doadora GSNO a 50 μM afetou positivamente as características fisiológicas das mudas de *C. pachystachya*, aumentando o potencial hídrico, CRA e F_v/F_m , além de manter maior g_s ao amanhecer e menor g_s à medida que as horas do dia passavam, indicando efeito positivo sobre a tolerância ao DH severo. Para as mudas de *C. estrellensis*, nenhum efeito da aplicação das NPs liberadoras de NO foi observado. Portanto, dependendo da espécie em questão, o uso desta técnica pode ser eficiente para a produção de mudas que apresentam maior tolerância a seca, o que é muito desejável em programas de reflorestamentos.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos efeitos observados a partir da aplicação de GSNO a 50 μM em *C. pachystachya*, não é possível afirmar que os efeitos foram provocados pelo NO sozinho, visto que a quitosana pode também apresentar algum efeito benéfico para as plantas sob estresse. Porém, estudos anteriores registraram efeitos positivos da quitosana em plantas sob DH somente na atenuação do estresse oxidativo. Portanto, em experimentos futuros é importante adicionar um controle com as NPs de quitosana sem a molécula doadora, além do GSNO livre, para que seja possível comparar e confirmar o efeito do doador de NO nanoencapsulado.

Embora este estudo mostre os efeitos da aplicação de NPs liberadoras de NO em casa de vegetação, existe a possibilidade de que estes resultados se repitam em campo, podendo sofrer influência da variação das condições abióticas e bióticas do local específico. Portanto, os efeitos das NPs liberadoras de NO sobre espécies

arbóreas nativas da Mata Atlântica, em um contexto de restauração florestal, precisam ser investigados em futuros estudos, para que se torne viável a aplicação desta tecnologia baseada na natureza em programas de reflorestamentos.

REFERÊNCIAS

- Ahammed GJ, Li X, Mao Q, Wan H, Zhou G, Cheng Y (2021) The SIWRKY81 transcription factor inhibits stomatal closure by attenuating nitric oxide accumulation in the guard cells of tomato under drought. *Physio Plant*. <https://doi.org/10.1111/ppl.13243>
- Calzavara AK, Rocha JS, Lourenço G, Sanada K, Medri C, Bianchini E, Pimenta JA, Stolf-Moreira R, Oliveira HC (2017) Acclimation responses to high light by *Guazuma ulmifolia* Lam. (Malvaceae) leaves at different stages of development. *Plant Biol*. <https://doi.org/10.1111/plb.12592>
- Carvalho, PER (2014) Espécies arbóreas brasileiras. Coleção Espécies Arbóreas Brasileiras. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, p 209.
- Casaretto E, Signorelli S, Gallino JP, Vidal S, Borsani O (2020) Endogenous NO accumulation in soybean is associated with initial stomatal response to water deficit. *Physiol Plant*. <https://doi.org/10.1111/ppl.13259>
- Cunningham SC, Mac Nally R, Baker PJ, Cavagnaro TR, Beringer J, Thomson JR, Thompson, RM (2015) Balancing the environmental benefits of reforestation in agricultural regions. *Perspect in Plant Ecol Evol Syst*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ppees.2015.06.001>
- De Sousa LF, Menezes-Silva PED, Lourenço LL, Galmés J, Guimarães AC, da Silva AF, Farnese FDS (2020) Improving water use efficiency by changing hydraulic and stomatal characteristics in soybean exposed to drought: the involvement of nitric oxide. *Physiol Plant*. <https://doi.org/10.1111/ppl.12983>
- do Carmo GC, Iastrenski LF, Debiasi TV, da Silva RC, Gomes DG, Pelegrino MT, Bianchini E, Stolf-Moreira R, Pimenta JA, Seabra AB, Oliveira HC (2021) Nanoencapsulation improves the protective effects of a nitric oxide donor on drought-stressed *Heliocarpus popayanensis* seedlings. *Ecotox Environ Saf*. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112713>
- Ellison D, Morris CE, Locatelli B, Sheil D, Cohen J, Murdiyarso D, Gutierrez V, Meine VN, Creed IF, Pokorny J, Gaveau D, Spracklen DV, Tobella AB, Ilstedt U, Teuling AJ, Gebrehiwot SG, Sands DC, Muys B, Verbist B, Springgay E, Sugandi Y, Sullivan CA (2017) Trees, forests and water: Cool insights for a hot world. *Glob Environ Change*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2017.01.002>
- Farnese FS, Menezes-Silva PE, Gusman GS, Oliveira JA (2016) When bad guys become good ones: the key role of reactive oxygen species and nitric oxide in the plant responses to abiotic stress. *Frontiers plant Sci*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00471>
- Gan L, Wu X, Zhong Y (2015) Exogenously applied nitric oxide enhances the drought tolerance in Hulless barley. *Plant Prod Sci*. <https://doi.org/10.1626/pps.28.52>

Giaque H, Connor EW, Hawkes CV (2019) Endophyte traits relevant to stress tolerance, resource use and habitat of origin predict effects on host plants. *New Phytol.* <https://doi.org/10.1111/nph.15504>

Hasanuzzaman M, Nahar K, Hossain MS, Anee TI, Parvin K, Fujita M (2017) Nitric oxide pretreatment enhances antioxidant defense and glyoxalase systems to confer PEG-induced oxidative stress in rapeseed. *J Plant Interact.* <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1362052>

Hasanuzzaman M, Inafuku M, Nahar K, Fujita M, Oku H (2021) Nitric oxide regulates plant growth, physiology, antioxidant defense, and ion homeostasis to confer salt tolerance in the Mangrove Species, *Kandelia obovata*. *Antioxidants.* <https://doi.org/10.3390/antiox10040611>

Lau SE, Hamdan MF, Pua TL, Saidi NB, Tan BC (2021) Plant nitric oxide signaling under drought stress. *Plants.* <https://doi.org/10.3390/plants10020360>

Leite RS, do Nascimento MN, Tanan TT, Neto LPG, da Silva-Ramos CA, da Silva AL (2019) Alleviation of water deficit in *Physalis angulata* plants by nitric oxide exogenous donor. *Agric. Water Manag.* <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2019.02.001>

Li Q, Zhao M, Wang N, Liu S, Wang J, Zhang W, Du N (2020) Water use strategies and drought intensity define the relative contributions of hydraulic failure and carbohydrate depletion during seedling mortality. *Plant Physiol Biochem.* <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.05.023>

Lopes-Oliveira PJ, Gomes DG, Pelegriano MT, Bianchini E, Pimenta JA, Stolf-Moreira R, Seabra AB, Oliveira HC (2019) Effects of nitric oxide-releasing nanoparticles on neotropical tree seedlings submitted to acclimation under full sun in the nursery. *Sci reports.* <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54030-3>

Lorenzi H (2008) *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil*. Nova Odessa, São Paulo, p 186.

Macedo TM, Costa WS, Brandes AFN, Valladares F, Barros CF (2021) Diversity of growth responses to recent droughts reveals the capacity of Atlantic Forest trees to cope well with current climatic variability. *For Ecol Manag.* <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.118656>

Majeed S, Nawaz F, Naeem M, Ashraf MY, Ejaz S, Ahmad KS, Tauseef S, Farid G, Khalid I, Mehmood K (2020) Nitric oxide regulates water status and associated enzymatic pathways to inhibit nutrients imbalance in maize (*Zea mays* L.) under drought stress. *Plant Physiol Biochem.* <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.07.005>

Misra AN, Vladkova R, Singh R, Misra M, Dobrikova AG, Apostolova EL (2014) Action and target sites of nitric oxide in chloroplasts. *Nitric Oxide.* <https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.04.003>

Nabi RBS, Tayade R, Hussain A, Kulkarni KP, Imran QM, Mun BG, Yun BW (2019) Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. *Environ Exp Bot.* <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.02.003>

Nolan RH, Drew DM, O'Grady AP, Pinkard EA, Paul K, Roxburgh SH, Ramp D (2018) Safeguarding reforestation efforts against changes in climate and disturbance regimes. *Ecol Manag.* <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.05.025>

Ojima DS, Conant RT, Parton WJ, Lockett JM, Even TL (2021) Recent climate changes across the Great Plains and implications for natural resource management practices. *Rangel Ecol Manag.* <https://doi.org/10.1016/j.rama.2021.03.008>

Oliveira HC, Gomes BC, Pelegriano MT, Seabra AB (2016) Nitric oxide-releasing chitosan nanoparticles alleviate the effects of salt stress in maize plants. *Nitric Oxide.* <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.09.010>

Oliveira RS, Costa FR, van Baalen E, de Jonge A, Bittencourt PR, Almanza Y, Barros FV, Cordoba EC, Fagundes MV, Garcia S, Guimaraes ZTM, Hertel M, Schietti J, Rodrigues-Souza J, Poorter L (2019). Embolism resistance drives the distribution of Amazonian rainforest tree species along hydro-topographic gradients. *New Phytol.* <https://doi.org/10.1111/nph.15463>

Philipson CD, Cutler ME, Brodrick PG, Asner GP, Boyd DS, Costa PM, Fiddes J, Foody GM, van der Heijden GMF, Burslem DF (2020) Active restoration accelerates the carbon recovery of human-modified tropical forests. *Sci.* <https://doi.org/10.1126/science.aay4490>

Ribeiro MC, Martensen AC, Metzger JP, Tabarelli M, Scarano F, Fortin MJ (2011) The Brazilian Atlantic Forest: a shrinking biodiversity hotspot. In *Biodiversity hotspots*. Springer, Berlin, Heidelberg, p 405.

Sahay S, Khan E, Gupta M (2019) Nitric oxide and abscisic acid protects against PEG-induced drought stress differentially in Brassica genotypes by combining the role of stress modulators, markers and antioxidants. *Nitric Oxide.* <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.05.005>

Sami F, Faizan M, Faraz A, Siddiqui H, Yusuf M, Hayat S (2018) Nitric oxide-mediated integrative alterations in plant metabolism to confer abiotic stress tolerance, NO crosstalk with phytohormones and NO-mediated post translational modifications in modulating diverse plant stress. *Nitric Oxide.* <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.12.005>

Seabra AB, Rai M, Durán N (2014) Nano carriers for nitric oxide delivery and its potential applications in plant physiological process: a mini review. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s13562-013-0204-z>

Seabra AB, Justo GG, Haddad PS (2015) State of the art, challenges and perspectives in the design of nitric oxide-releasing polymeric nanomaterials for biomedical applications. *Biotech Adv.* <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.005>

Shi H, Chen Y, Tan DX, Reiter RJ, Chan Z, He C (2015) Melatonin induces nitric oxide and the potential mechanisms relate to innate immunity against bacterial pathogen infection in Arabidopsis. *J Pineal Res.* <https://doi.org/10.1111/jpi.12244>

Shimizu M, Ishida A, Tange T, Yagi H (2006) Leaf turnover and growth responses of

shade-grown saplings of four Shorea rain forest species to a sudden increase in light. *Tree Physiol.* <https://doi.org/10.1093/treephys/26.4.449>

Silveira NM, Frungillo L, Marcos FC, Pelegrino MT, Miranda MT, Seabra AB, Ribeiro RV (2016) Exogenous nitric oxide improves sugarcane growth and photosynthesis under water deficit. *Nitric Oxide.* <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2501-y>

Silveira NM, Hancock JT, Frungillo L, Siasou E, Marcos FC, Salgado I, Machado EC, Ribeiro RV (2017) Evidence towards the involvement of nitric oxide in drought tolerance of sugarcane. *Plant Physiol Biochem.* <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.04.011>

Silveira NM, Seabra AB, Marcos FC, Pelegrino MT, Machado EC, Ribeiro RV (2019) Encapsulation of S-nitrosoglutathione into chitosan nanoparticles improves drought tolerance of sugarcane plants. *Nitric Oxide.* <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.01.004>

Silveira NM, Prativiera PJ, Pieretti JC, Seabra AB, Almeida RL, Machado EC, Ribeiro RV (2021) Chitosan-encapsulated nitric oxide donors enhance physiological recovery of sugarcane plants after water deficit. *Environ Exp Bot.* <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104593>

Singhal RK, Jatav HS, Aftab T, Pandey S, Mishra UN, Chauhan J, Chand S, Indu, Saha D, Dadarwal BK, Chandra K, Khan MA, Rajput VD, Minkina T, Narayana ES, Sharma MK, Ahmed S (2021) Roles of nitric oxide in conferring multiple abiotic stress tolerance in plants and crosstalk with other plant growth regulators. *J Plant Growth Regul.* <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10446-8>

Smart RE, Bingham GE (1974) Rapid estimates of relative water content. *Plant Physiol.* <https://doi.org/10.1104/pp.53.2.258>

Wang H, Huang J, Li Y, Li C, Hou J, Liang W (2016) Involvement of nitric oxide-mediated alternative pathway in tolerance of wheat to drought stress by optimizing photosynthesis. *Plant Cell Rep.* <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2014-y>

Wang X, Mao Z, Zhang J, Hemat M, Huang M, Cai J, Jiang D (2019) Osmolyte accumulation plays important roles in the drought priming induced tolerance to post-anthesis drought stress in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *Environ Exp Bot.* <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103804>

Zandalinas SI, Fritsch FB, Mittler R (2021) Global warming, climate change, and environmental pollution: Recipe for a multifactorial stress combination disaster. *Trends in Plant Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.02.011>

Zeng P, Sun F, Liu Y, Wang Y, Li G, Che Y (2021) Mapping future droughts under global warming across China: A combined multi-timescale meteorological drought index and SOM-Kmeans approach. *Weather Clim Extrem.*

APÊNDICE – Figuras do experimento teste

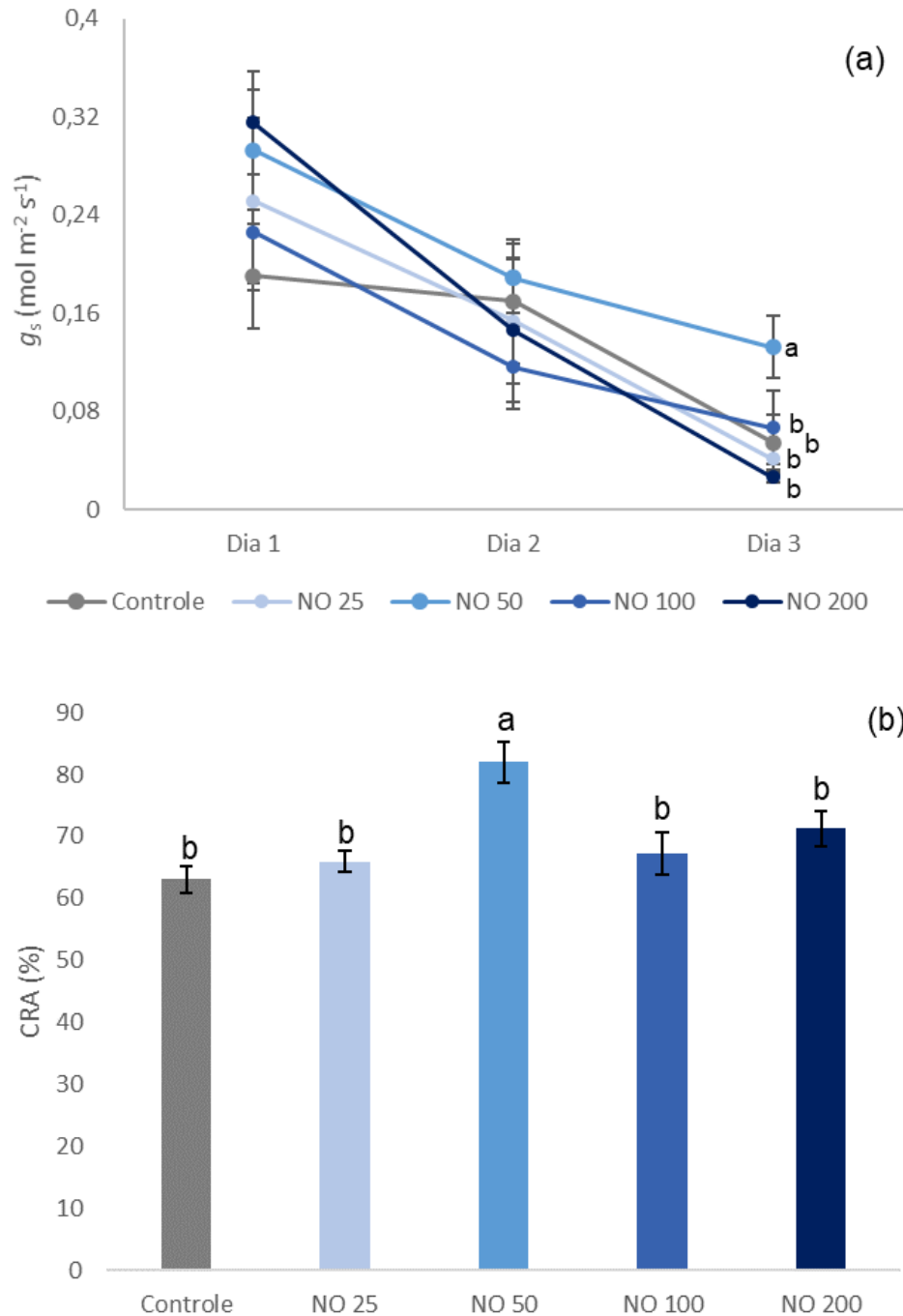


Fig. 1. Condutância estomática (g_s) ao longo de três dias de déficit hídrico (a) e Conteúdo relativo de água das folhas (CRA) no terceiro dia de déficit hídrico (b) de mudas de *Cecropia pachystachya* no experimento teste. Controle: Capacidade de campo; NO 25: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 25 μM ; NO 50: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 50 μM ; NO 100: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 100 μM ; NO

200: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 200 μM . Os dados estão expressos como média \pm erro padrão ($n = 12$). Letras iguais acima das barras indicam médias semelhantes, de acordo com a ANOVA para o CRA e ANOVA de medidas repetidas para g_s seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

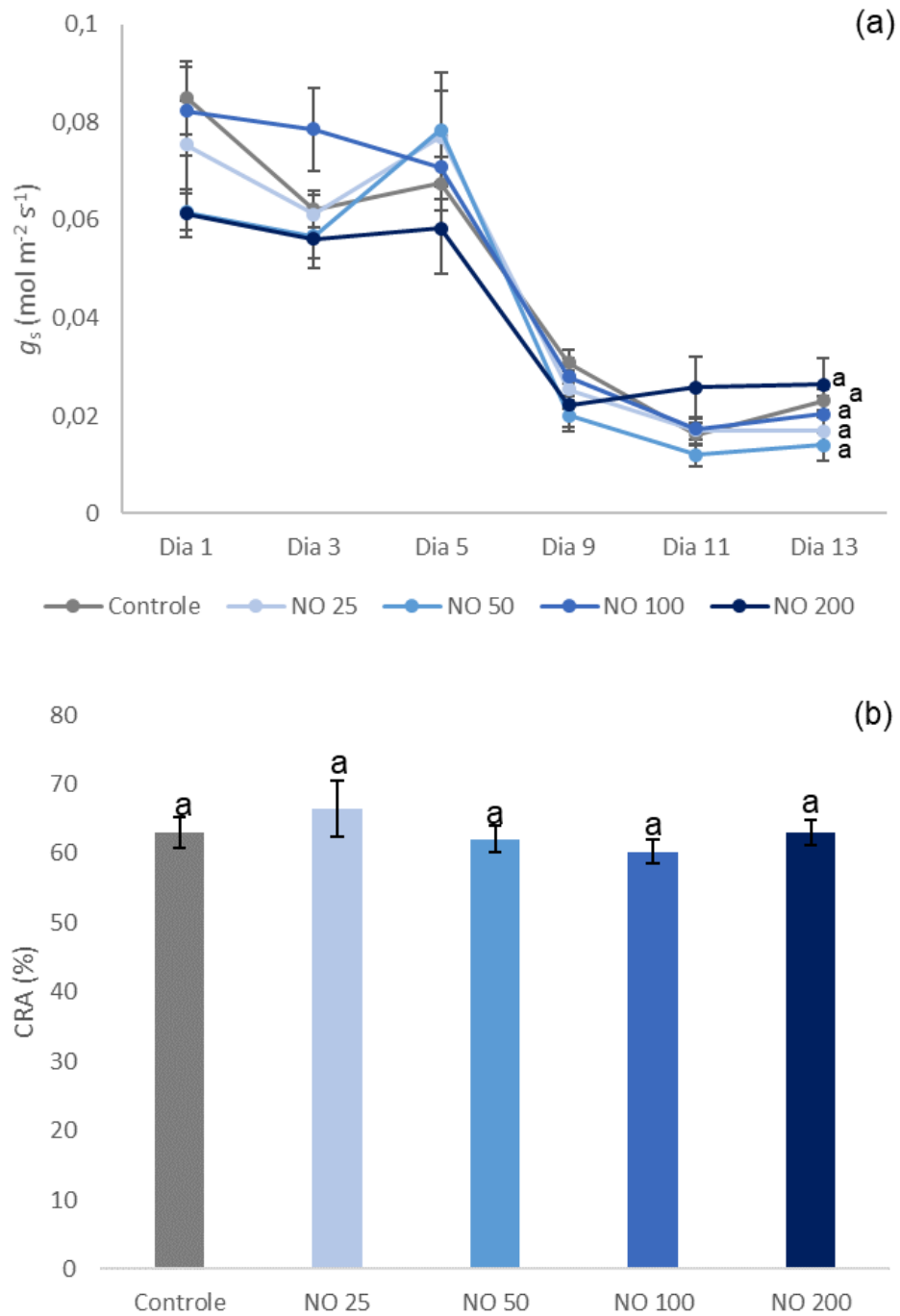


Fig. 2. Condutância estomática (g_s) ao longo de treze de déficit hídrico (a) e Conteúdo relativo de água das folhas (CRA) no décimo terceiro dia de déficit

hídrico (b) de mudas de *Cariniana estrellensis* no experimento teste. Controle: Capacidade de campo; NO 25: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 25 μM ; NO 50: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 50 μM ; NO 100: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 100 μM ; NO 200: déficit hídrico + nanopartículas de quitosana contendo GSNO a 200 μM . Os dados estão expressos como média \pm erro padrão ($n = 12$). Letras iguais acima das barras indicam médias semelhantes, de acordo com a ANOVA para o CRA e ANOVA de medidas repetidas para g_s seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).