



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DIEGO GENUÁRIO GOMES

**NANOPARTÍCULAS METÁLICAS E POLIMÉRICAS COM
COBRE:
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E PROTEÇÃO CONTRA
ESTRESSES BIÓTICOS E ABIÓTICOS EM PLANTAS**

LONDRINA
2022

DIEGO GENUÁRIO GOMES

**NANOPARTÍCULAS METÁLICAS E POLIMÉRICAS COM
COBRE:
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E PROTEÇÃO CONTRA
ESTRESSES BIÓTICOS E ABIÓTICOS EM PLANTAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Halley Caixeta de Oliveira

Londrina
2022

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

Gomes, Diego Genuário.

NANOPARTÍCULAS METÁLICAS E POLIMÉRICAS COM COBRE: :
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E PROTEÇÃO CONTRA ESTRESSES
BIÓTICOS E ABIÓTICOS EM PLANTAS / Diego Genuário Gomes. - Londrina,
2022.

158 f. : il.

Orientador: Halley Caixeta Oliveira.

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

Inclui bibliografia.

1. Nanopartículas poliméricas - Tese. 2. Nanopartículas metálicas - Tese. 3.
Quitosana - Tese. 4. Cobre - Tese. I. Oliveira, Halley Caixeta. II. Universidade
Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação
em Agronomia. III. Título.

CDU 63

DIEGO GENUÁRIO GOMES

**NANOPARTÍCULAS METÁLICAS E POLIMÉRICAS COM
COBRE:
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E PROTEÇÃO CONTRA
ESTRESSES BIÓTICOS E ABIÓTICOS EM PLANTAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Claudemir Zucareli
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Marcelo Augusto Batista
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Dra. Luciana Harumi Shigueoka
Instituto de Desenvolvimento Rural do
Paraná – IAPAR-EMATER – IDR Paraná

Dr. Anderson do Espírito Santo Pereira
Instituto de Ciências e Tecnologia de
Sorocaba – ICTS - UNESP

Londrina, 19 de abril de 2022.

À minha família

..

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pelas oportunidades concedidas.

Ao meu orientador, professor Halley Caixeta de Oliveira, pela disponibilidade, paciência, dedicação, oportunidades, amizade, exemplo de pessoa e profissional, o qual o apoio e ensinamentos foram essenciais para construção deste trabalho. Obrigado pela imensa contribuição para meu crescimento pessoal e profissional. Foi uma honra ser seu orientado ao longo destes anos de pós-graduação e serei eternamente grato a ti.

À minha mãe Albertina, pelo carinho e total dedicação que tem por mim. Pelos cuidados e por seu amor incondicional. Por me inspirar todos os dias a ser uma pessoa melhor. Obrigado por me dar todo o apoio necessário e ser uma das principais responsáveis por eu ter chegado até aqui. Obrigado por sempre estar ao meu lado, incentivando e vibrando com minhas conquistas. A você meu sincero e eterno amor.

À minha namorada, Bruna, a qual sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, me ajudando e incentivando. Obrigado por todo seu amor, paciência, companheirismo e por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis. Todos os dias agradeço a Deus por ter colocado você na minha vida. Eu amo você e tenho certeza que é ao seu lado que quero estar.

Às minhas tias Izabel e Madalena, meus primos Nathália e Samuel, por serem a minha família, torcendo pelo meu sucesso, vibrando com minhas conquistas e, apesar da distância física, sempre estarem ao meu lado. Ao meu amigo e irmão, Reinaldo, pelos anos de amizade e companheirismo. Obrigado pelo apoio e carinho de vocês comigo.

Aos colegas do Laboratório de Ecofisiologia Vegetal (LEFIV) pelos momentos compartilhados e, em especial, para Tatiane, Bruno, Lara, Patrícia, Karina Rafael e Anderson, pela amizade e ajuda oferecida ao longo destes anos de convivência.

Aos professores José Antonio Pimenta e Renata Stolf Moreira pelo suporte nas atividades do laboratório.

À professora Amedea Barozzi Seabra pelo suporte, orientação e

contribuições ao desenvolvimento dos trabalhos.

À Milena Trevisan Pelegrino, Joana Claudio Pieretti e Camila Neves Lange pela síntese das nanopartículas, instruções, auxílio no desenvolvimento técnico do trabalho e pela total disponibilidade e ajuda oferecida.

Ao professor Leonardo Fernandes Fraceto e ao pesquisador Anderson do Espírito Santo Pereira pelas contribuições no desenvolvimento de trabalhos realizado por mim e de coorientado ao longo dos anos de pós-graduação.

Ao professor Claudemir Zucareli pelos ensinamos em sala de aula, suporte oferecido ao longo dos anos como coordenador do programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina e pelas colaborações ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores André Sampaio Ferreira e José Henrique Bizzarri Bazzo pelos ensinamentos e pelas colaborações ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Paulo Sérgio Parreira pelas análises e colaborações ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Gustavo Hiroshi Sera e a pesquisadora Luciana Harumi Shigueoka pelo suporte técnico e pelas contribuições ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Marcelo Augusto Batista pelas sugestões feitas ao trabalho.

Aos alunos de iniciação científica Lucas Marçola e Bruno Figueiró Fregonezi, os quais tive oportunidade de coorientar e que contribuíram para o meu aprendizado e desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Gustavo Vaz da Costa e Renato Ribeiro Machado pela amizade ao longo dos anos de pós-graduação.

Ao programa de Pós-graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, por todo suporte oferecido durante a realização dos trabalhos.

Ao Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, incluindo o corpo docente e funcionários em geral, pelos ensinamentos em sala de aula e pelo suporte para condução do doutorado.

Ao Departamento de Estatística da Universidade Estadual de Londrina, incluindo o corpo docente e aos colegas da especialização, pelos ensinamentos em sala de aula e pela considerável contribuição para minha formação e desenvolvimento deste trabalho e, em especial, ao meu orientador da especialização professor Lucas Santana da Cunha.

Ao Departamento de Biologia Animal e Vegetal e funcionários em geral, pela cessão da estrutura necessária para o desenvolvimento dos trabalhos.

Ao Departamento de Física pela cessão da estrutura necessária para desenvolver parte do trabalho.

A Universidade Estadual de Londrina por ter garantido toda estrutura necessária para realização dos trabalhos ao longo dos cinco anos de pós-graduação e me proporcionar o mestrado, a especialização e o doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado.

E a todos que direta e indiretamente contribuíram para a conclusão dessa etapa, o meu muito obrigado!

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

GOMES, Diego Genuário. **Nanopartículas metálicas e poliméricas com cobre: promoção de crescimento e proteção contra estresses bióticos e abióticos em plantas.** 2022. 158 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2022.

RESUMO

O crescimento populacional acelerado e as adversidades climáticas cada vez mais frequentes pressionam a agricultura pela necessidade de atender à crescente demanda por alimentos. Neste contexto, a nanotecnologia vem sendo empregada na agricultura para aprimorar práticas convencionais de manejo, aliando maior eficiência com uma produção mais sustentável. O presente trabalho objetivou investigar o efeito das aplicações de nanopartículas metálicas e poliméricas contendo cobre na promoção do crescimento e proteção contra estresses bióticos e abióticos em plantas. Para isso, foram utilizadas três abordagens distintas: 1) avaliação do condicionamento fisiológico de sementes de milho (*Zea mays* cv. IPR 165) com nanopartículas poliméricas de quitosana contendo íons de Cu^{2+} sobre a germinação, crescimento e atividade fotossintética de mudas em condição de cultivo sem a incidência de estresse, bem como a resposta antioxidante de plântulas germinadas de sementes submetidas à deterioração controlada. 2) avaliação do condicionamento fisiológico de sementes de milho (*Zea mays* cv. Balu 787) com dois tipos diferentes de nanopartículas metálicas de óxido de cobre (CuO) obtidas via síntese verde (ácido ascórbico - ACuO ou extrato de chá verde - GTCuO), aplicadas em diferentes concentrações (0; 14,5; 29; 58 e 116 mg Cu L^{-1}) e, por meio de avaliações morfofisiológicas, verificar os efeitos na germinação e crescimento inicial, bem como a suscetibilidade das plantas ao déficit hídrico. 3) avaliação das respostas de defesa induzidas pela aplicação de nanopartículas poliméricas de quitosana contendo íons de Cu^{2+} em discos foliares (*Coffea arabica* cv. IPR 100) infectados com *H. vastatrix*, testando a hipótese de que o cobre nanoencapsulado propicie uma melhor defesa quando comparado aos demais tratamentos. Os resultados evidenciaram que: 1) o condicionamento fisiológico das sementes com íons de Cu^{2+} livre ou nanoencapsulado influenciou positivamente o desenvolvimento inicial, principalmente pelo aumento do crescimento da parte aérea e do transporte fotossintético de elétrons, em comparação com o controle. Além disso, o cobre nanoencapsulado destacou-se por aumentar a atividade das enzimas antioxidantes. Em contraste, nanopartículas sem cobre induziram estresse oxidativo. 2) o condicionamento fisiológico com nanopartículas metálicas proporciona efeitos dose-dependentes no crescimento inicial e na suscetibilidade ao déficit hídrico. As plantas tratadas com GTCuO apresentaram incremento da parte aérea em comparação aos demais tratamentos. Por outro lado, ACuO promoveu redução da parte aérea e aumento de raiz. A dose de 58 mg Cu L^{-1} proporcionou os melhores efeitos na atividade fotossintética das plantas para cada uma das nanopartículas, destacando-se ACuO por conferir a mesma atividade fotossintética promovida pelo GTCuO, além de induzir alterações morfológicas que atenuassem os efeitos deletérios do déficit hídrico. 3) os tratamentos protegeram as folhas de café; no entanto, as nanopartículas poliméricas de quitosana contendo íons de Cu^{2+} se destacaram pela redução do estresse inicial, diminuição da fitotoxicidade do cobre e manutenção da atividade fotossintética, além de aumentar as respostas antioxidantes, conferindo proteção significativa contra a ferrugem do cafeeiro. Além

disso, em baixas concentrações ($1,25 \text{ mmol L}^{-1}$), cobre nanoencapsulado apresentou maior bioatividade do que o cobre livre. No presente estudo, foi possível verificar respostas distintas entre os tratamentos com nanopartículas à base de cobre. Entretanto, esses efeitos foram dependentes de muitos fatores e, inevitavelmente, a interação entre eles. Portanto, da mesma forma que o uso da nanotecnologia pode promover uma gama de benefícios para agricultura, ela também pode prejudicar o pleno desenvolvimento das culturas, visto que nem sempre os efeitos conferidos pelos nanomateriais ao metabolismo vegetal são positivos

Palavras-chave: Quitosana; CuO; biopolímeros; síntese verde de nanopartículas; nanotecnologia.

GOMES, Diego Genuário. **Metallic and polymeric nanoparticles with copper: growth promotion and protection against biotic and abiotic stresses in plants.** 2022. 158 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2022.

ABSTRACT

Accelerated population growth and climate change put pressure on agriculture due to the need to meet the growing demand for food. In this context, agriculture uses nanotechnology to improve conventional management practices, combining greater efficiency with more sustainable production. The present work aimed to investigate the effect of applications of metallic and polymeric nanoparticles containing copper in promoting growth and protection against biotic and abiotic stresses in plants. For this, three different approaches were used: 1) evaluation of the priming of maize seeds (*Zea mays* cv. IPR 165) with chitosan polymeric nanoparticles containing Cu^{2+} ions on germination, growth and photosynthetic activity of seedlings in culture medium without the incidence of stress, as well as the antioxidant response of seedlings germinated from seeds subjected to controlled deterioration. 2) evaluation of the priming of maize seeds (*Zea mays* cv. Balu 787) with two different types of metallic nanoparticles of copper oxide (CuO) obtained via green synthesis (ascorbic acid - ACuO or green tea extract - GTCuO), applied at different concentrations (0; 14.5; 29; 58 and 116 mg Cu L^{-1}) and, through morphophysiological evaluations, verify the effects on germination and initial growth, as well as the susceptibility of plants to water deficit. 3) evaluation of the defense responses induced by the application of polymeric chitosan nanoparticles containing Cu^{2+} ions in leaf discs (*Coffea arabica* cv. IPR 100) infected with *H. vastatrix*, testing the hypothesis that nanoencapsulated copper provides better defense when compared to other treatments. The results showed that: 1) seed priming with free or nanoencapsulated Cu^{2+} ions positively influenced initial development, mainly by increasing shoot growth and photosynthetic electron transport compared to the control. In addition, nanoencapsulated copper increased the activity of antioxidant enzymes. In contrast, copper-free nanoparticles induced oxidative stress. 2) physiological conditioning with metallic nanoparticles provides dose-dependent effects on initial growth and susceptibility to water deficit. The plants treated with GTCuO showed an increase in shoot compared to the other treatments. On the other hand, ACuO promoted shoot reduction and root enlargement. The dose of 58 mg Cu L^{-1} provided the best effects on the photosynthetic activity of the plants for each of the nanoparticles, with ACuO standing out for conferring the same photosynthetic activity promoted by GTCuO, in addition to inducing morphological changes that attenuated the deleterious effects of the deficit water. 3) the treatments protected the coffee leaves; however, polymeric chitosan nanoparticles containing Cu^{2+} ions stood out for reducing initial stress, decreasing copper phytotoxicity, maintaining photosynthetic activity, and increasing antioxidant responses, providing significant protection against coffee leaf rust. Furthermore, at low concentrations (1.25 mmol L^{-1}), nanoencapsulated copper showed more significant bioactivity than free copper. In the present study, it was possible to verify different responses between treatments with copper-based nanoparticles. However, these effects depended on many factors and, inevitably, the interaction between them. Therefore, in the same way, that using nanotechnology can promote a range of benefits for agriculture, it can also harm the

full development of cultures since the effects conferred by nanomaterials on plant metabolism are not always positive.

Keywords: Chitosan; CuO; biopolymers; green synthesis of nanoparticles; nanotechnology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Curva de correlação de nanopartículas de quitosana contendo íons de Cu^{2+} , obtida por medição do espalhamento dinâmico de luz. A concentração de Cu^{2+} nas nanopartículas foi de 1 mmol L^{-1}68
- Figura 2** – Comprimento da parte aérea (CPA) de mudas de milho (*Zea mays* cv. IPR 165) desenvolvidas a partir de sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada, como controle (CONT); nanopartículas de quitosana/TPP contendo íons de Cu^{2+} (NPCu); nanopartículas de quitosana/TPP (NP) e íons de Cu^{2+} (Cu). O CPA foi medido aos 9, 16 e 23 dias após a semeadura (DAS). Os dados representam a média \pm SE ($n = 10$). Letras diferentes acima das colunas indicam valores significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ($p < 0,05$).69
- Figura 3** – Área foliar (AF) **(a)**, peso seco da parte aérea (MSPA) **(b)**, comprimento da raiz (CR) **(c)** e peso seco da raiz (MSR) **(d)** de mudas de milho (*Zea mays* cv. IPR 165) desenvolvidas a partir de sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada, como controle (CONT); nanopartículas de quitosana/TPP contendo íons de Cu^{2+} (NPCu); nanopartículas de quitosana/TPP (NP) e íons de Cu^{2+} (Cu). Os parâmetros foram medidos com 24 dias após a semeadura. Os dados representam a média \pm SE ($n = 10$). Letras diferentes acima das colunas indicam valores significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ($p < 0,05$).....70
- Figura 4** – Rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) **(a)** e taxa relativa de transporte linear de elétrons do fotossistema II (rETR) **(b)** de mudas de milho (*Zea mays* cv. IPR 165) desenvolvidas a partir de sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada, como controle (CONT); nanopartículas de quitosana/TPP contendo íons de Cu^{2+} (NPCu); nanopartículas de quitosana/TPP (NP) e íons de Cu^{2+} (Cu). Os parâmetros foram medidos com 24 dias após a semeadura. Os dados representam a média \pm SE ($n = 10$). Letras diferentes acima das colunas indicam valores significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ($p < 0,05$).....71

Figura 5 – Taxa fotossintética líquida (A) **(a)**, condutância estomática (g_s) **(b)** e eficiência intrínseca no uso da água (EIUA) **(c)** de mudas de milho (*Zea mays* cv. IPR 165) desenvolvidas a partir de sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada, como controle (CONT); nanopartículas de quitosana/TPP contendo íons de Cu^{2+} (NPCu); nanopartículas de quitosana/TPP (NP) e íons de Cu^{2+} (Cu). Os parâmetros foram medidos com 24 dias após a semeadura. Os dados representam a média \pm SE ($n = 10$). Letras diferentes acima das colunas indicam valores significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ($p < 0,05$).....72

Figura 6 – Germinação (%) **(a)** e peso seco de plântulas (MSP) **(b)** de milho (*Zea mays* cv. IPR 165) desenvolvidas a partir de sementes não submetidas ao condicionamento fisiológico e que não passaram pelo teste de envelhecimento acelerado (TEST), sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada, como controle (CONT); nanopartículas de quitosana/TPP contendo íons de Cu^{2+} (NPCu); nanopartículas de quitosana/TPP (NP) e íons de Cu^{2+} (Cu). Os parâmetros foram medidos sete dias após as sementes condicionadas terem sido submetidas ao envelhecimento acelerado sob alta umidade e temperatura. Os dados representam a média \pm SE ($n = 4$). Letras diferentes acima das colunas indicam valores significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ($p < 0,05$)74

Figura 7 – Teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) **(a)** e malondialdeído (MDA) **(b)** de mudas de milho (*Zea mays* cv. IPR 165) desenvolvidas a partir de sementes não submetidas ao condicionamento fisiológico e que não passaram pelo teste de envelhecimento acelerado (TEST), sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada, como controle (CONT); nanopartículas de quitosana/TPP contendo íons de Cu^{2+} (NPCu); nanopartículas de quitosana/TPP (NP) e íons de Cu^{2+} (Cu). Os parâmetros foram medidos sete dias após as sementes condicionadas terem sido submetidas ao envelhecimento acelerado sob alta umidade e temperatura. Os dados representam a média \pm SE ($n = 4$). Letras diferentes acima das colunas indicam valores significativamente diferentes de acordo

- com o teste LSD ($p < 0,05$)75
- Figura 8** – Atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) **(a)**, peroxidase (POD) **(b)**, ascorbato peroxidase (APX) **(c)** e catalase (CAT) **(d)** de mudas de milho (*Zea mays* cv. IPR 165) desenvolvidas a partir de sementes não submetidas ao condicionamento fisiológico e que não passaram pelo teste de envelhecimento acelerado (TEST), sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada, como controle (CONT); nanopartículas de quitosana/TPP contendo íons de Cu^{2+} (NPCu); nanopartículas de quitosana/TPP (NP) e íons de Cu^{2+} (Cu). Os parâmetros foram medidos sete dias após as sementes condicionadas terem sido submetidas ao envelhecimento acelerado sob alta umidade e temperatura. Os dados representam a média \pm SE ($n = 4$). Letras diferentes acima das colunas indicam valores significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ($p < 0,05$)76
- Figura 9** – Micrografia TEM de CuO NPs sintetizadas com extrato de chá verde (GTCuO) **(a)** e com ácido ascórbico (ACuO) **(b)**92
- Figura 10** – Massa seca de plântulas (MSP) de milho (*Zea mays* cv. Balu 787) provenientes de sementes germinadas em condição sem restrição hídrica **(a, b)** e com polietilenoglicol-6000 (PEG) **(c, d)**. As nanopartículas (ACuO; GTCuO) foram diluídas em água destilada, obtendo-se a concentração correspondente de cobre (0; 14,5; 29; 58 e 116 mg L^{-1}) nos tratamentos. O TEST é composto por sementes não submetidas ao condicionamento fisiológico. O CONT é composto por sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada (equivalente à concentração 0 mg L^{-1}). Os resultados são expressos como média ($n = 4$) \pm erro padrão. * = diferença significativa entre as nanopartículas dentro de cada dose de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$) e em relação ao TEST de acordo com o teste de Dunnett ($p < 0,05$). ns = não significativo94
- Figura 11** – Intensidade de fótons de raios-X do elemento cobre nas sementes de milho (*Zea mays* cv. Balu 787) **(a, b)**, nas plântulas de provenientes de sementes germinadas em condição sem restrição hídrica **(c, d)** e com polietilenoglicol-6000 (PEG) **(e, f)**. As

nanopartículas (ACuO; GTCuO) foram diluídas em água destilada, obtendo-se a concentração correspondente de cobre (0; 14,5; 29; 58 e 116 mg L⁻¹) nos tratamentos. O TEST é composto por sementes não submetidas ao condicionamento fisiológico. O CONT é composto por sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada (equivalente à concentração 0 mg L⁻¹). Os resultados são expressos como média ($n = 4$) ± erro padrão. * = diferença significativa entre as nanopartículas dentro de cada dose de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$) e em relação ao TEST de acordo com o teste de Dunnett ($p < 0,05$).....98

Figura 12 –Plantas de milho (*Zea mays* cv. Balu 787) com 13 **(a)** e 20 **(b)** dias após a semeadura (DAS)..... 101

Figura 13 –Massa seca da parte aérea **(a)**, massa seca de raiz **(b,c)** e razão raiz/parte aérea **(d)** de plantas de milho (*Zea mays* cv. Balu 787) com 24 dias após a semeadura (DAS). As nanopartículas (ACuO; GTCuO) foram diluídas em água destilada, obtendo-se a concentração correspondente de cobre (0; 14,5; 29; 58 e 116 mg L⁻¹) nos tratamentos. O TEST é composto por sementes não submetidas ao condicionamento fisiológico. O CONT é composto por sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada (equivalente à concentração 0 mg L⁻¹). Os resultados são expressos como média ($n = 4$) ± erro padrão. * = diferença significativa entre as nanopartículas dentro de cada dose e letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). ns = não significativo..... 103

Figura 14 –Taxa fotossintética líquida (A) **(a,b)**, condutância estomática (g_s) **(c,d)** e eficiência intrínseca no uso da água (EIUA) **(e,f)** das plantas de milho (*Zea mays* cv. Balu 787) com 13 dias após a semeadura (DAS) e cultivadas em condição sem restrição hídrica. As nanopartículas (ACuO; GTCuO) foram diluídas em água destilada, obtendo-se a concentração correspondente de cobre (0; 14,5; 29; 58 e 116 mg L⁻¹) nos tratamentos. A dose 0 (mg Cu L⁻¹) é composta por sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água

destilada. Os resultados são expressos como média ($n = 8$) \pm erro padrão. Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativa entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ($p < 0,05$). ns = não significativo.....104

Figura 15 –Taxa fotossintética líquida (A) (**a,b**), condutância estomática (g_s) (**c,d**) e eficiência intrínseca no uso da água (EIUA) (**e,f**) das plantas de milho (*Zea mays* cv. Balu 787) com 20 dias após a semeadura (DAS) e cultivadas em condição sem restrição hídrica. As nanopartículas (ACuO; GTCuO) foram diluídas em água destilada, obtendo-se a concentração correspondente de cobre (0; 14,5; 29; 58 e 116 mg L⁻¹) nos tratamentos. A dose 0 (mg Cu L⁻¹) é composta por sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada. Os resultados são expressos como média ($n = 8$) \pm erro padrão. Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativa entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ($p < 0,05$). ns = não significativo.....106

Figura 16 –Taxa fotossintética líquida (A) (**a**), condutância estomática (g_s) (**b**) e eficiência intrínseca no uso da água (EIUA) (**c,d**) das plantas de milho (*Zea mays* (L.) cv. Balu 787) com 24 dias após a semeadura (DAS) e cultivadas em condição com restrição hídrica por quadro dias. As nanopartículas (ACuO; GTCuO) foram diluídas em água destilada, obtendo-se a concentração correspondente de cobre (0; 14,5; 29; 58 e 116 mg L⁻¹) nos tratamentos. A dose 0 (mg Cu L⁻¹) é composta por sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada. Os resultados são expressos como média ($n = 8$) \pm erro padrão. * = diferença significativa entre as nanopartículas dentro de cada dose e letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). ns = não significativo.....108

Figura 17 –Comparação visual entre os tratamentos controle (CONT) e ACuO (**a**), comparação entre os tratamentos GTCuO e ACuO (**b**) e perda de água (**c**) das plantas de milho (*Zea mays* cv. Balu 787) com 24 dias após a semeadura (DAS) e cultivadas em condição com restrição hídrica por quatro dias. As nanopartículas (ACuO; GTCuO)

foram diluídas em água destilada, obtendo-se a concentração correspondente de cobre (0; 14,5; 29; 58 e 116 mg L⁻¹) nos tratamentos. A dose 0 (mg Cu L⁻¹) é composta por sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada. Os resultados são expressos como média ($n = 8$) \pm erro padrão. * = diferença significativa entre as nanopartículas dentro de cada dose e letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$) 109

Figura 18 –Clorofila (Chl) *a* (**a,b**), clorofila *b* (**c,d**) e relação clorofila *a*/clorofila *b* (**e,f**) dos discos foliares de *Coffea arabica* cv. IPR 100 aos 40 dias após o tratamento com água destilada, como controle (CONT), nanopartículas de quitosana sem íons Cu²⁺ (NP), nanopartículas de quitosana contendo íons Cu²⁺ (NPCu) e íons Cu²⁺ livres (Cu). As formulações foram diluídas em água destilada, obtendo-se as concentrações correspondentes de quitosana (CS) nos tratamentos NP e NPCu (0,25; 0,5; 1 g L⁻¹) e de íons Cu²⁺ (1,25; 2,5; 5 mmol L⁻¹) nos tratamentos NPCu e Cu. Os resultados são expressos como média ($n = 4$) \pm erro padrão. O modelo e coeficiente de determinação (R²) também são apresentados ($p < 0,05$). ns = não significativo 128

Figura 19 –Clorofila total (Chl total) (**a,b**), carotenoides (Car) (**c,d**) e razão clorofila total/carotenoides (**e,f**) dos discos foliares de *Coffea arabica* cv. IPR 100 aos 40 dias após o tratamento com água destilada, como controle (CONT), nanopartículas de quitosana sem íons Cu²⁺ (NP), nanopartículas de quitosana contendo íons Cu²⁺ (NPCu) e íons Cu²⁺ livres (Cu). As formulações foram diluídas em água destilada, obtendo-se as concentrações correspondentes de quitosana (CS) nos tratamentos NP e NPCu (0,25; 0,5; 1 g L⁻¹) e de íons Cu²⁺ (1,25; 2,5; 5 mmol L⁻¹) nos tratamentos NPCu e Cu. Os resultados são expressos como média ($n = 4$) \pm erro padrão. O modelo e coeficiente de determinação (R²) também são apresentados ($p < 0,05$). ns = não significativo 129

Figura 20 –Foto representativa da progressão da doença nos tratamentos CONT (**a**), NP0.25 (**b**), NP0.5 (**c**), NP1 (**d**) e NPCu1.25 (**e**) de discos (\varnothing 16 mm) de folhas de café (*Coffea arabica* cv. IPR 100) aos 10,

15, 20, 25, 30, 35 e 40 dias após a infecção (DAI) com *H. vastatrix*. Antes da infecção, os discos foram tratados com água destilada, como controle (CONT), nanopartículas de quitosana/tripolifosfato de sódio sem íons Cu^{2+} (NP); nanopartículas de quitosana /tripolifosfato de sódio contendo íons Cu^{2+} (NPCu), íons de Cu^{2+} em sua forma livre, não-encapsulado (Cu). As formulações foram diluídas em água destilada, obtendo-se a concentração correspondente de quitosana no tratamento NP (0,25; 0,5; 1 g L⁻¹) em relação a concentração de íons de Cu^{2+} (1,25; 2,5; 5 mmol L⁻¹) nos tratamentos NPCu e Cu..... 131

Figura 21 –Foto representativa da progressão da doença nos tratamentos NPCu2.5 (a), NPCu5 (b), Cu1.25 (c), Cu2.5 (d) e Cu5 (e) de discos (Ø 16 mm) de folhas de café (*Coffea arabica* cv. IPR 100) aos 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 dias após a infecção (DAI) com *H. vastatrix*. Antes da infecção, os discos foram tratados com água destilada, como controle (CONT), nanopartículas de quitosana/tripolifosfato de sódio sem íons Cu^{2+} (NP); nanopartículas de quitosana /tripolifosfato de sódio contendo íons Cu^{2+} (NPCu), íons de Cu^{2+} em sua forma livre, não-encapsulado (Cu). As formulações foram diluídas em água destilada, obtendo-se a concentração correspondente de quitosana no tratamento NP (0,25; 0,5; 1 g L⁻¹) em relação a concentração de íons de Cu^{2+} (1,25; 2,5; 5 mmol L⁻¹) nos tratamentos NPCu e Cu 132

Figura 22 –Incidência (a), esporulação (b) e severidade (c) da doença de *Hemileia vastatrix* em discos foliares de *Coffea arabica* cv. IPR 100 aos 15, 25 e 40 dias após a infecção (DAI). Antes da infecção, os discos foram tratados com água destilada como controle (CONT), nanopartículas de quitosana sem íons Cu^{2+} (NP), nanopartículas de quitosana contendo íons Cu^{2+} (NPCu) e íons Cu^{2+} livres (Cu). As formulações foram diluídas em água destilada, obtendo-se as concentrações correspondentes de quitosana (CS) nos tratamentos NP e NPCu (0,25; 0,5; 1 g L⁻¹) e de íons Cu^{2+} (1,25; 2,5; 5 mmol L⁻¹) nos tratamentos NPCu e Cu. Os resultados são expressos como média ($n = 4$) \pm erro padrão. Letras iguais nas colunas indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Dunn ($p < 0,05$) 134

Figura 23 –Clorofila (Chl) a (a,b), clorofila b (c,d) e relação clorofila a/clorofila b

(e,f) dos discos foliares de *Coffea arabica* cv. IPR 100 aos 40 dias após a infecção (DAI) com *H. vastatrix*, Antes da infecção, os discos foram tratados com água destilada como controle (CONT), nanopartículas de quitosana sem íons Cu^{2+} (NP), nanopartículas de quitosana contendo íons Cu^{2+} (NPCu), e íons Cu^{2+} livres (Cu). As formulações foram diluídas em água destilada, obtendo-se as concentrações correspondentes de quitosana (CS) nos tratamentos NP e NPCu (0,25; 0,5; 1 g L⁻¹) e de íons Cu^{2+} (1,25; 2,5; 5 mmol L⁻¹) nos tratamentos NPCu e Cu. Os resultados são expressos como média ($n = 4$) \pm erro padrão. O modelo e coeficiente de determinação (R^2) também são apresentados ($p < 0,05$). ns = não significativo 135

Figura 24 –Clorofila total (Chl total) (a,b), carotenoides (Car) (c,d) e razão clorofila total/carotenoides (e,f) dos discos foliares de *Coffea arabica* cv. IPR 100 dias após a infecção (DAI) com *H. vastatrix*. Antes da infecção, os discos foram tratados com água destilada como controle (CONT), nanopartículas de quitosana sem íons Cu^{2+} (NP), nanopartículas de quitosana contendo íons Cu^{2+} (NPCu) e íons Cu^{2+} livres (Cu). As formulações foram diluídas em água destilada, obtendo-se as concentrações correspondentes de quitosana (CS) nos tratamentos NP e NPCu (0,25; 0,5; 1 g L⁻¹) e de íons Cu^{2+} (1,25; 2,5; 5 mmol L⁻¹) nos tratamentos NPCu e Cu. Os resultados são expressos como média ($n = 4$) \pm erro padrão. O modelo e o coeficiente de determinação (R^2) também são mostrados ($p < 0,05$).... 136

Figura 25 –Teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (a) e malondialdeído (MDA) (b) de discos foliares de *Coffea arabica* cv. IPR 100 aos 5 e 15 dias após a infecção (DAI) com *H. vastatrix*. Antes da infecção, os discos foram tratados com água destilada como controle (CONT), nanopartículas de quitosana sem íons Cu^{2+} (NP), nanopartículas de quitosana contendo íons Cu^{2+} (NPCu) e íons Cu^{2+} livres (Cu). As formulações foram diluídas em água destilada, obtendo-se as concentrações correspondentes de quitosana (CS) nos tratamentos NP e NPCu (0,25; 0,5 g L⁻¹) e de íons Cu^{2+} (1,25; 2,5 mmol L⁻¹) nos tratamentos NPCu e Cu. Os resultados são expressos como média ($n = 4$) \pm erro padrão. Letras iguais nas colunas indicam que não

houve diferença significativa no teste Scott-Knott ($p < 0,05$) no mesmo ponto de tempo.....138

Figura 26 –A atividade da Superóxido dismutase (SOD) **(a)**, Catalase (CAT) **(b)**, Ascorbato peroxidase (APX) **(c)** e Peroxidase (POD) **(d)** dos discos foliares de *Coffea arabica* cv. IPR 100 aos 5 e 15 dias após a infecção (DAI) com *H. vastatrix*. Antes da infecção, os discos foram tratados com água destilada como controle (CONT), nanopartículas de quitosana sem íons Cu^{2+} (NP), nanopartículas de quitosana contendo íons Cu^{2+} (NPCu) e íons Cu^{2+} livres (Cu). As formulações foram diluídas em água destilada, obtendo-se as concentrações correspondentes de quitosana (CS) nos tratamentos NP e NPCu (0,25; 0,5 g L^{-1}) e de íons Cu^{2+} (1,25; 2,5 mmol L^{-1}) nos tratamentos NPCu e Cu. Os resultados são expressos como média ($n = 4$) \pm erro padrão. Letras iguais nas colunas indicam que não houve diferença significativa no teste Scott-Knott ($p < 0,05$) no mesmo ponto de tempo140

Figura 27 – F_0 **(a)**, F_v/F_m **(b)** e rETR **(c)** de discos foliares de *Coffea arabica* cv. IPR 100 aos 5 e 15 dias após a infecção (DAI) com *H. vastatrix*. Antes da infecção, os discos foram tratados com água destilada como controle (CONT), nanopartículas de quitosana sem íons Cu^{2+} (NP), nanopartículas de quitosana contendo íons Cu^{2+} (NPCu) e íons Cu^{2+} livres (Cu). As formulações foram diluídas em água destilada, obtendo-se as concentrações correspondentes de quitosana (CS) nos tratamentos NP e NPCu (0,25; 0,5 g L^{-1}) e de íons Cu^{2+} (1,25; 2,5 mmol L^{-1}) nos tratamentos NPCu e Cu. Os resultados são expressos como média ($n = 4$) \pm erro padrão. Letras iguais nas colunas indicam que não houve diferença significativa no teste Scott-Knott ($p < 0,05$) no mesmo ponto de tempo143

Figura 28 –A atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL) **(a)** e polifenol oxidase (PPO) **(b)** dos discos foliares de *Coffea arabica* cv. IPR 100 aos 5 e 15 dias após a infecção (DAI) com *H. vastatrix*. Antes da infecção, os discos foram tratados com água destilada como controle (CONT), nanopartículas de quitosana sem íons Cu^{2+} (NP), nanopartículas de quitosana contendo íons Cu^{2+} (NPCu) e íons

Cu²⁺ livres (Cu). As formulações foram diluídas em água destilada, obtendo-se as concentrações correspondentes de quitosana (CS) nos tratamentos NP e NPCu (0,25; 0,5 g L⁻¹) e de íons Cu²⁺ (1,25; 2,5 mmol L⁻¹) nos tratamentos NPCu e Cu. Os resultados são expressos como média ($n = 4$) \pm erro padrão. Letras iguais nas colunas indicam que não houve diferença significativa no teste Scott-Knott ($p < 0,05$) no mesmo ponto de tempo 144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração correspondente de cobre nas suspensões de nanopartículas de CuO sintetizadas com ácido ascórbico (ACuO) e extrato de chá verde (GTCuO)	88
Tabela 2 – Tratamentos aplicados aos discos foliares e concentração correspondente de quitosana nas suspensões de nanopartículas (NP) em relação à concentração de íons de Cu ²⁺ nas suspensões contendo cobre (NPCu; Cu)	121

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	26
2.	REVISÃO DE LITERATURA	30
2.1	ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DO MILHO	30
2.2	ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DO CAFEEIRO	32
2.3	MICRONUTRIENTES	34
2.3.1	Cobre	34
2.4	CONDICIONAMENTO FISIOLÓGICO DE SEMENTES	36
2.5	ESTRESSES ABIÓTICOS	37
2.5.1	Deterioração de Sementes	37
2.5.2	Déficit Hídrico	38
2.6	ESTRESSES BIÓTICOS	40
2.6.1	Ferrugem do Cafeeiro	40
2.7	PROTEÇÃO CONTRA ESTRESSES	41
2.8	NANOTECNOLOGIA NA AGRICULTURA	43
2.8.1	Nanotecnologia Verde	47
	REFERÊNCIAS	49
	CAPÍTULO I	59
3.	CONDICIONAMENTO FISIOLÓGICO DE SEMENTES COM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA CONTENDO COBRE PROMOVE O CRESCIMENTO INICIAL E DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA DE MUDAS DE MILHO (<i>Zea mays</i> L.)	59
3.1	RESUMO	59
3.2	INTRODUÇÃO	60
3.3	MATERIAL E MÉTODOS	62
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
3.5	CONCLUSÃO	77
3.6	REFERÊNCIAS	78

CAPÍTULO II	83
4. AVALIAÇÃO DO CONDICIONAMENTO FISIOLÓGICO DE SEMENTES DE MILHO COM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE E SUSCETIBILIDADE DAS PLANTAS AO DÉFICIT HÍDRICO	83
4.1 RESUMO	83
4.2 INTRODUÇÃO	84
4.3 MATERIAL E MÉTODOS	86
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
4.5 CONCLUSÃO.....	111
4.6 REFERÊNCIAS	112
CAPÍTULO III	116
5. NANOENCAPSULAÇÃO AUMENTA AS RESPOSTAS DE DEFESA INDUZIDAS PELO COBRE DE UMA CULTIVAR SUSCETÍVEL DE <i>Coffea arabica</i> CONTRA <i>Hemileia vastatrix</i>.....	116
5.1 RESUMO	116
5.2 INTRODUÇÃO	117
5.3 MATERIAL E MÉTODOS	119
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	126
5.5 CONCLUSÃO	146
5.6 REFERÊNCIAS	147
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	152
APÊNDICES	153
APÊNDICE A MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO II.....	153
APÊNDICE B MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO III.....	154
APÊNDICE C MATERIAL SUPLEMENTAR DO REFERENCIAL TEÓRICO.....	157

1 INTRODUÇÃO GERAL

As projeções realizadas pela Organização das Nações Unidas (ONU) sobre o crescimento populacional indicam um aumento acelerado e contínuo nas próximas décadas, impactando diretamente a demanda por alimentos em geral. De acordo com a ONU, a população mundial será de aproximadamente 10 bilhões de pessoas até 2050, com um aumento mais significativo em países subdesenvolvidos. Em contraste com o crescimento populacional, a expansão da fronteira agrícola é limitada. Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura (FAO), a disponibilidade de áreas agrícolas está concentrada em poucos países, de forma que 90% dessas áreas disponíveis para expansão agrícola se concentra em países da América Latina e África-Subsaariana. Ademais, países que figuram entre os maiores produtores agrícolas, como EUA e China, não têm muita disponibilidade de novas áreas para exploração agrícola.

Na América Latina, o Brasil é fundamental na produção de alimentos, uma vez que é uma das poucas regiões em que ainda é possível aumentar a área agrícola. No país, são utilizadas extensas áreas de terra para fins produtivos; entretanto, a demanda por novas terras também enfrenta os desafios da conservação ambiental, levando em consideração os efeitos do crescimento econômico sobre o meio ambiente e a necessidade de uma produção mais sustentável. Assim, a demanda por alimentos deve ser atendida não somente pela ampliação da oferta, como fora até algumas décadas atrás, mas também em conformidade com as preocupações socioambientais, tornando-se essencial a busca pelo equilíbrio entre a necessidade por recursos renováveis consumidos e o efeito dessas atividades humanas no meio ambiente. Diante das limitações, expandir a produtividade é o caminho para a ampliação da oferta sustentável de alimentos.

Este preocupante contexto social e econômico tem incentivado pesquisas em torno de tecnologias mais sustentáveis, que vêm demonstrando acarretar benefícios diversos aos sistemas de produção. Dentre as diferentes possibilidades, a aplicação da nanotecnologia pode ser uma maneira promissora de otimizar as práticas agrícolas tais como: redução das doses aplicadas de insumos, aumento do aproveitamento dos nutrientes pelas plantas; minimização dos efeitos adversos causados no ambiente e proteção das plantas contra estresses bióticos e abióticos.

A produção agrícola mundial é afetada por diversos fatores abióticos de estresse, como déficit hídrico, temperaturas extremas, salinidade e contaminação de áreas agrícolas por xenobióticos, além dos agentes bióticos, como insetos-pragas, fungos patogênicos, bactérias, vírus e nematoides. Estes agentes estressores são responsáveis por consideráveis perdas econômicas tanto para pequenos quanto para grandes produtores e, devido às recentes mudanças climáticas, os efeitos causados por estresses nas áreas agrícolas podem ser agravados. Neste cenário de problemas socioambientais, as diferentes possibilidades conferidas pela nanociência têm potencial de aliar inovação à sustentabilidade, conceitos essenciais para o desenvolvimento agrário do país.

A abordagem nanotecnológica pode revolucionar, por exemplo, as práticas de fertilização, que ao longo dos anos vêm sendo praticadas com baixo aproveitamento dos insumos aplicados. É grande o número de produtores rurais que usam fertilizantes de qualidade duvidosa e misturas desnecessárias, além de dispensar a assistência técnica de profissionais qualificados antes do plantio, ignorando as boas práticas agrícolas. Outra importante contribuição da nanotecnologia para agricultura é proporcionar redução na quantidade aplicada do ativo ou otimizar seu uso por meio de mecanismos de liberação controlada. Por exemplo, os micronutrientes. A adubação com micronutrientes envolve um risco técnico muito maior do que a adubação com macronutrientes, pois a linha entre corrigir o teor dos micronutrientes presentes no solo e a toxidez por excesso é muito sutil. Uma alternativa para evitar esse transtorno é a utilização de fertilizantes de liberação mais lenta em adubações preventivas para que não elevem os teores de micronutrientes no solo rapidamente.

Dentre os micronutrientes, encontra-se o cobre, o qual exerce influência sobre o metabolismo vegetal devido a sua presença em diversas biomoléculas e sua participação em inúmeras rotas metabólicas na planta. Além da sua essencialidade na nutrição vegetal, o cobre vem sendo comumente utilizado ao longo dos anos como ingrediente ativo de fungicidas para o controle de doenças em plantas causadas por fungos patogênicos, visando à melhoria da produtividade. Estes produtos fitossanitários à base de cobre possuem baixa penetração na planta, formando uma camada protetora da superfície do tecido vegetal. Isso torna necessária a aplicação de uma grande quantidade de produto para uma boa cobertura da superfície foliar e garantia da proteção das plantas.

Entretanto, o uso contínuo de fungicidas cúpricos e a baixa mobilidade do cobre no solo resulta em acúmulo deste metal nas camadas superficiais em regiões onde a espécie cultivada tem o cobre como um dos principais ingredientes ativos para o controle de doenças, como no caso da viticultura e citricultura.

Para mitigar esse tipo de problema, a nanotecnologia vem sendo estudada na agricultura com a finalidade de aumentar a eficiência de diferentes agroquímicos, como fertilizantes e defensivos agrícolas, além de diminuir a contaminação ambiental. Os nanomateriais podem ser utilizados para criação dos nanofertilizantes (nutrientes de tamanho nanométrico ou fertilizantes nanoencapsulados) e nanopesticidas (nanomateriais inorgânicos ou ingredientes ativos nanoencapsulados). Eles podem ser aplicados via tratamento de sementes, pulverização foliar e/ou através do solo para promover uma liberação direcionada/controlada de nutrientes ou defensivos, fornecendo de forma mais precisa a dosagem recomendada para as culturas e reduzindo os impactos ambientais. Ao otimizar a produção agrícola e mitigar estresses, a nanotecnologia viabiliza a obtenção de uma agricultura mais eficiente e sustentável, a fim de atender a demanda por alimentos de uma população em constante crescimento.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial de nanopartículas à base de cobre em plantas, incluindo a promoção do crescimento e a proteção contra estresses abióticos (na cultura do milho) e biótico (na cultura do cafeeiro). Mais especificamente, este estudo objetivou:

1) avaliação do condicionamento fisiológico de sementes de milho (*Zea mays* cv. IPR 165) com nanopartículas poliméricas de quitosana contendo íons de Cu^{2+} sobre a germinação, crescimento e atividade fotossintética de mudas em condição de cultivo sem a incidência de estresse, bem como a resposta antioxidante de plântulas germinadas de sementes submetidas à deterioração controlada (Capítulo I);

2) avaliação do condicionamento fisiológico de sementes de milho (*Zea mays* cv. Balu 787) com dois tipos diferentes de nanopartículas metálicas de óxido de cobre (CuO) obtidas via síntese verde (ácido ascórbico - ACuO ou extrato de chá verde - GTCuO), aplicadas em diferentes concentrações (0; 14,5; 29; 58 e 116 mg Cu L^{-1}) e, por meio de avaliações morfofisiológicas, verificar os efeitos na germinação e crescimento inicial, bem como a suscetibilidade das plantas ao déficit hídrico. (Capítulo II);

3) avaliação das respostas de defesa induzidas pela aplicação de nanopartículas poliméricas de quitosana contendo íons de Cu^{2+} em discos foliares (*Coffea arabica* cv. IPR 100) infectados com *Hemileia vastatrix* (Capítulo III).

Para todas as condições estudadas, foi testada a hipótese de que as nanopartículas à base de cobre propiciem um maior crescimento vegetal e/ou maior proteção contra estresses bióticos e abióticos nas culturas do milho ou cafeeiro, quando comparadas com os demais tratamentos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DO MILHO

O cereal é cultivado em todas as regiões do Brasil em diferentes épocas do ano, em virtude das condições climáticas das regiões. O cultivo de verão, também denominado 1ª safra, é o semeio concentrado na primavera/verão. O cultivo de milho semeado após a colheita da soja, com semeio concentrado no verão/outono, convencionalmente é denominado de safrinha ou milho de 2ª safra (CONTINI et al., 2019). O avanço tecnológico proporcionou para safrinha a utilização de cultivares de ciclos precoces e com alto potencial produtivo, adaptados às condições climáticas mais restritivas à cultura. Além disso, a intensificação do sistema de produção, construção da fertilidade do solo, adoção do sistema de plantio direto e a rotação de culturas, proporcionaram ganhos consideráveis na produção do milho ao longo dos anos, tanto na 1ª safra quanto na 2ª safra (PEIXOTO, 2022).

Embora as condições climáticas adversas durante o cultivo da 1ª safra impactaram o desempenho nas lavouras, estima-se colher 112,34 milhões de toneladas de milho, representando um aumento de 29% em relação a 2020/21. A previsão é de pouca diferença na 1ª safra, comparando-a com a safra passada, ficando em torno de 24 milhões de toneladas. Por outro lado, para 2ª safra, é esperado um incremento de 47% na colheita, podendo chegar a 86 milhões de toneladas. Em relação ao mercado, calcula-se que 35 milhões de toneladas serão exportadas e, além disso, baseando-se nas perspectivas otimistas para uma boa 2ª safra de milho no Brasil, o estoque final da safra 2021/22 é estimado em 10 milhões de toneladas (CONAB, 2022a).

No Brasil é possível a realização de uma 3ª safra acontecendo principalmente nos estados da região conhecida como Sealba, compreendendo áreas nos estados de Sergipe, Alagoas e áreas produtoras situadas no nordeste da Bahia, além de Pernambuco e Roraima. O Brasil cultivou 585,3 mil hectares com 3ª safra de milho no ano agrícola de 20/21, gerando uma produção de 1586,9 mil toneladas. A estimativa para o ano de 2021/22 é de uma área equivalente, com perspectiva de produzir 1856,1 mil toneladas. Quanto a produtividade para safra 2021/22, espera-se algo próximo de 5,37 t ha⁻¹ (- 5,5%) para o milho 1ª safra, 5,38 t ha⁻¹ (+ 32,94%) para o milho 2ª safra e 3,17 t ha⁻¹ (+16,97%) para o milho 3ª safra (CONAB, 2022a).

Todas as mudanças ocorridas nas práticas de cultivo do milho ao longo dos anos, vêm proporcionando um aumento considerável na produção. Entretanto, apesar desse aumento de produção, a média brasileira ainda é baixa (5,51 t ha⁻¹) quando comparada a dos Estados Unidos (10,51 t ha⁻¹) e a da China (6,32 t ha⁻¹), no ano safra de 2019/20, mas sendo esta uma tendência que se repete ao longo dos anos (USDA, 2022). Esta produtividade considerada baixa tem como justificativa a disparidade na utilização da tecnologia ao longo dos anos, não ocorrendo de maneira uniforme nas regiões produtoras. Embora exista regiões com alta tecnologia, ainda existem muitos núcleos ou regiões de baixa tecnologia e, conseqüentemente, influenciando a produtividade média (PEIXOTO, 2022).

A produção de milho se destina aos mais variados fins, atendendo uma grande e diversificada demanda mundial. Além da relevância no aspecto de segurança alimentar, na alimentação humana e, principalmente, animal, é possível produzir com o milho uma infinidade de produtos, tais como combustíveis, bebidas e polímeros (MIRANDA, 2018). Diante do aspecto social, o milho é considerado como alimento de baixo custo, pela viabilidade de cultivo tanto em grande quanto em pequena escala (GALVÃO et al., 2014). Deste modo, a cultura integra uma das mais importantes atividades do cenário agrícola brasileiro, com considerável importância socioeconômica (XAVIER et al., 2014). Embora o mercado brasileiro de milho venha apresentando crescimento ano após ano, o setor ainda precisa superar algumas adversidades que impedem um maior dinamismo, destacam-se a falta de clareza na formação de preços, entraves para conseguir financiamentos privados e empecilhos na comercialização (CONTINI et al., 2019).

2.2 ASPECTOS GERAIS DA CULTURA DO CAFEIEIRO

Com uma área total de 2,2 milhões de hectares destinadas à cafeicultura, em 2021 o Brasil apresentou 1,80 milhões destes hectares em produção, sendo os outros 391,557 mil hectares em formação, representando uma redução de 4,4% em relação ao período anterior. A expectativa é colher 46,87 milhões de sacas de café beneficiado, montante que sinaliza uma redução de 25,7% em comparação à safra passada. Embora 2021 tenha sido um ano de bienalidade negativa para a safra brasileira de café, reduzindo a área em produção, as condições climáticas adversas observadas em diferentes localidades produtoras contribuíram negativamente para impactar a área produtiva, bem como no rendimento médio. A área cultivada com café

arábica representa cerca de 80% do total destinado à cafeicultura nacional, sendo que 70% destas áreas estão concentradas no estado de Minas Gerais. Neste estado a produção foi estimada em 21,4 milhões de sacas, uma redução de 38,1% em comparação ao montante total colhido na safra de 2020. No Espírito Santo, a expectativa de produção foi de 14 milhões de sacas. O estado de São Paulo colheu aproximadamente 4 milhões de sacas de café, indicando também uma redução em comparação ao ano de 2020. Na Bahia a produção foi estimada em 3,5 milhões de sacas de café. Rondônia produziu 2,2 milhões de sacas, enquanto o Paraná, 873 mil sacas de café beneficiado. O Rio de Janeiro estimou algo próximo de 236 mil sacas, Goiás, 212 mil sacas e Mato Grosso, um volume de 194 mil sacas (CONAB, 2022b).

As exportações dos oito primeiros meses da safra 2021/22 chegaram a 26,491 milhões de sacas, representando um declínio de 18,2% na comparação com o período de julho de 2020 a fevereiro de 2021. Por outro lado, a receita cambial com embarques atuais aumentou 23,6%, atingindo o patamar de US\$ 4,998 bilhões, sendo o melhor desempenho das últimas cinco safras. No primeiro bimestre de 2022, o maior importador do café brasileiro foram os Estados Unidos com a aquisição de 1,350 milhões de sacas (- 5,4%), seguido da Alemanha, com 1,174 milhões de sacas (- 15,9%); Bélgica com 774.207 sacas (+ 17,6%); Itália com 565.154 sacas (- 4%) e o Japão com 344.582 sacas (-14,3%), com queda nas exportações para a maioria dos principais compradores do café brasileiro, em comparação com as exportações no mesmo período em 2021 (CECAFÉ, 2022).

O café possui uma ampla capacidade produtiva, diversificando a produção brasileira em relação a qualidade de grãos, permitindo o país atender as diferentes demandas mundiais referente ao paladar e aos preços, além de tornar o país o maior produtor e exportador do grão (MACHADO et al., 2020). No primeiro bimestre de 2022, o Brasil apresentou aumento de 9,2% na exportação de cafés diferenciados, exportando 1,120 milhões de sacas, com um preço médio de US\$ 300,54 por saca, gerando uma receita total de US\$ 336,5 milhões (+ 22,1% em comparação ao mesmo período de 2021). Em relação ao café verde, o café arábica foi o mais exportado, com envio de 5,985 milhões de sacas ao exterior, o que corresponde a 87,6% do total. O canéfora, considerando a soma do robusta mais conilon, o envio foi de 226.540 sacas ao exterior, representando 3,3% do total. Além disso, o seguimento de produto solúvel embarcou o equivalente a 611.686 sacas, com

9% das exportações, e o produto torrado e torrado moído, um equivalente a 6.154 sacas, representando 0,1% das exportações (CECAFÉ, 2022).

Entretanto, a bienalidade de produção é um fator presente na cafeicultura brasileira, podendo gerar diferenças expressivas na produção de frutos e nas safras colhidas. O ciclo bienal é uma característica inerente do cafeeiro e, anualmente, pode ocorrer entre talhões de lavouras, entre plantas da mesma lavoura e, ainda, dentro da mesma planta, uma parte com produção alta de frutos em um ano e a outra no ano seguinte. O diferencial produtivo pode ser provocado por condições de cultivo diferentes como, por exemplo, parte das plantas em condição de pleno sol, induzindo uma carga alta de frutos, resultando no carregamento de reversas para a frutificação, em detrimento do crescimento vegetativo dos ramos, diminuindo a área produtiva no ano seguinte. Além disso, fatores estressantes podem intensificar o efeito da bienalidade, gerando um diferencial produtivo entre plantas em um mesmo talhão ou, mesmo, dentro de cada planta (MATIELLO, 2021a).

A bienalidade do cafeeiro pode ser acentuada pelo cultivo intensivo, reduzindo o vigor das plantas após alguns ciclos de produção, sendo necessária a renovação dos ramos por meio da poda para retomar a capacidade produtiva da planta (THOMAZIELLO, 2021). Portanto, como o cafeeiro não consegue produzir reservas suficientes para frutificação e crescimento ao mesmo tempo, este fenômeno afeta a produtividade da cafeicultura, influenciando na oferta do produto e, conseqüentemente, provoca certa instabilidade de preços de mercado, exigindo planejamento de estocagem e carregamento de uma safra para outra para não prejudicar sua rentabilidade (SILVA & REIS, 2013).

Além dos fatores inerentes ao cafeeiro e das condições ambientais, a ferrugem alaranjada do cafeeiro causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk & Broome é um dos principais fatores limitantes da produção de café arábica, devido a intensa desfolha e seca dos ramos, causada de forma precoce pelo fungo e, conseqüentemente, diminuindo consideravelmente o rendimento das lavouras (SOARES et al., 2022; SILVA et al., 2022). Segundo Júnior et al. (2015), quando não controlada, a ferrugem alaranjada pode reduzir em até 50% a produtividade, dependendo das condições climáticas e do nível de resistência do genótipo.

2.3 MICRONUTRIENTES

As plantas são organismos sésseis cujo o crescimento e desenvolvimento são dependentes, substancialmente, de um fluxo contínuo de sais minerais que desempenham papel crucial em uma série de reações bioquímicas e estruturais. Dentre estes sais minerais, os micronutrientes são essenciais para garantir o pleno desenvolvimento do vegetal, sendo requeridos em menor quantidade quando comparados aos chamados macronutrientes. Por exemplo, ferro, cobre, zinco, manganês e molibdênio que são micronutrientes metálicos presentes em várias reações metabólicas das plantas. O boro, um metaloide, apresenta propriedades entre os metais e não-metais, destacando-se seus papéis estruturais dentro do metabolismo celular. O cloro, um ânion abundante e não tóxico que atua para o equilíbrio elétrico e osmótico (WILLIAMS, 2015).

Ainda tem os elementos como cobalto, níquel, silício, sódio e selênio que são considerados micronutrientes benéficos que estimulam o crescimento dos vegetais, mas que não são essenciais ou sua essencialidade é para somente algumas espécies de plantas ou sob determinadas condições. Apesar de serem exigidos em uma menor quantidade quando comparados com outros elementos como nitrogênio, fósforo e potássio por exemplo, os micronutrientes não podem ser negligenciados. A disponibilidade de micronutrientes para as plantas é regulada pelas características físico-químicas e biológicas do solo (MARSCHNER, 2012) e sua deficiência pode induzir várias disfunções fisiológicas comprometendo o metabolismo vegetal e, posteriormente, podendo reduzir a qualidade e rendimento das plantas cultivadas (TRIPATHI et al., 2015). Portanto, fontes de micronutrientes aprimoradas visando um melhor aproveitamento, mais seguras ao ambiente e, além de tudo, acessíveis ao produtor, são fundamentais para garantir uma suplementação adequada e eficiente destes elementos cruciais para o desenvolvimento pleno das plantas cultivadas (LIU & LAL, 2015; MONREAL et al., 2016; SERVIN et al., 2015).

2.3.1 Cobre

Assim como os demais elementos minerais essenciais, o cobre é pré-requisito para o crescimento e desenvolvimento das plantas superiores. Apesar de ser encontrado em abundância na crosta terrestre, a maior concentração do elemento está em sua forma mineral não disponível (YRUELA, 2013). Sendo metal de transição, possui dois estados de oxidação em condições fisiológicas, Cu^{2+} e Cu^+ , resultando em

participação como cofator de numerosas enzimas envolvidas em reações de transporte de elétrons na fotossíntese e respiração (BURKHEAD et al., 2009). O cobre atua ainda como constituinte e sinalizador da transcrição de proteínas, metabolismo da parede celular e sinalização hormonal, além de enzimas que atuam na proteção contra o estresse oxidativo (YRUELA, 2009).

Além de sua essencialidade como nutriente, o cobre vem sendo usado há anos como ingrediente ativo de fungicidas para o controle de fungos patogênicos. As formulações mais comuns de fungicidas a base de cobre contém sulfato de cobre, hidróxido de cobre, oxiclreto de cobre ou carbonato de cobre (HUSAK, 2015). Estes fungicidas cúpricos possuem baixa penetração na planta, formando uma camada protetora da superfície do tecido vegetal e, conseqüentemente, sendo necessário a aplicação de uma grande quantidade de produto para uma boa cobertura da superfície foliar para garantir a proteção das plantas (LAMICHHANE et al., 2018). Nessas condições, a junção da limitada mobilidade do elemento no solo, as características dos fungicidas cúpricos de alta taxa de aplicação, uso frequente aliado a uma tecnologia de aplicação ineficaz, resultou no acúmulo desse metal nas camadas superficiais do solo em regiões em que a espécie cultivada tem o cobre como um dos principais ingredientes ativo para o controle de doenças, como no caso da viticultura e citricultura. Esse acúmulo se deu em decorrência da aplicação direta, deriva, restos culturais ou escorrimento da superfície foliar (FAN et al., 2011; BRUNETTO et al., 2016; AMLAL et al., 2020).

Embora possua papel crucial no metabolismo vegetal, excesso de cobre nos solos causa efeitos tóxicos nas plantas (ADREES et al., 2015), comprometendo o crescimento e desenvolvimento em um todo, entretanto, com efeitos mais acentuados no sistema radicular (GOMES et al., 2020; 2021). Como um metal redox ativo, o cobre catalisa a superprodução de espécies reativas de oxigênio (ERO), induzindo ao estresse oxidativo e, potencialmente, promovendo danos ao DNA, membranas lipídicas e proteínas (HOSSAIN et al., 2020; NAZIR et al., 2019). Devido à sua persistência e estabilidade após a dispersão no meio ambiente (CHENG et al., 2017), o excesso de cobre representa uma séria ameaça à segurança alimentar, limitando o crescimento das culturas e com potencial de contaminar a cadeia alimentar humana (ALI et al., 2015; KELLER et al., 2015).

2.4 CONDICIONAMENTO FISIOLÓGICO DE SEMENTES

O condicionamento fisiológico de sementes (no inglês: *seed priming*) é um método que envolve a hidratação controlada e posterior secagem das sementes, suficiente para promover alterações metabólicas, sem permitir a protusão da raiz primária (WAQAS et al., 2019). Normalmente realizado com água, o condicionamento osmótico induz diferentes efeitos nas sementes (como aumento do potencial de síntese de proteínas e modificações pós-traducionais, maior capacidade de mobilização das reservas e alterações na parede celular), os quais promovem melhorias como uma germinação mais rápida e uniformidade do estande de plantas (PEREIRA et al., 2021). Diferentes relatos na literatura evidenciam que a utilização da técnica confere diversas vantagens econômicas e agronômicas. Além do favorecimento de um rápido e uniforme estabelecimento das culturas no campo e, com ele, todos os benefícios atrelados, também vem sendo observado uma maior resistência contra estresses (LUTTS et al., 2016). Essa proteção contra estresses está vinculada com as etapas de hidratação controlada e posterior secagem, as quais vão induzir um estresse moderado e, com ele, a ativação de diferentes mecanismos de defesa, como o antioxidante. Essas respostas resultam em proteção cruzada contra diferentes fatores estressantes, garantindo uma maior resistência contra estresses abióticos e bióticos, o que reflete em melhorias para o sistema produtivo (PEREIRA et al., 2021).

Frente aos desafios provocados pelas condições de estresse cada vez mais frequentes, o condicionamento fisiológico pode ser um aliado importante para mitigar os seus efeitos deletérios, por ser uma técnica viável e de baixo custo (MARTHANDAN et al., 2020). Existem diferentes variações do condicionamento osmótico de sementes, sendo divididos em métodos convencionais e avançados. Dentre as técnicas tradicionais, podem ser utilizados: água, uma solução contendo nutrientes, composto químico de interesse agrônômico, reguladores de crescimento e extratos vegetais. Por outro lado, os métodos avançados incluem o condicionamento osmótico com nanopartículas e aplicação de agentes físicos, como a radiação UV, radiação gama e raios X (WAQAS et al., 2019). Apesar das diferentes possibilidades, o tratamento ideal é dependente de vários fatores como, por exemplo, espécie de planta, cultivar e até mesmo lote de sementes, requerendo cuidados na escolha da melhor estratégia para cada situação (LUTTS et al., 2016).

2.5 ESTRESSES ABIÓTICOS

As condições ambientais exercem um papel importante no desempenho agrônomo das plantas cultivadas e, nos últimos anos, apesar dos avanços proporcionados pela biotecnologia no desenvolvimento de cultivares mais eficientes e produtivas, as plantas ainda continuam altamente suscetíveis aos diferentes tipos de estresses abióticos (BHUSAL et al., 2021), tornando o aumento da produção agrícola um verdadeiro desafio a ser superado, já que as previsões futuras indicam redução contínua de terras aráveis, escassez de recursos hídricos e temperaturas extremas provocadas pelas mudanças climáticas (LOBELL et al., 2011). As plantas frequentemente estão expostas as condições ambientais adversas, como salinidade, seca, contaminação por xenobióticos, entre outros e, atualmente, 90% das áreas cultivadas ao redor do mundo são suscetíveis a um fator isolado, ou mais comumente, a combinação de diferentes estresses abióticos, limitando o crescimento e desenvolvimento das plantas, além de promover perdas massivas na produção das plantas cultivadas (WAQAS et al., 2019).

A combinação de diferentes fatores abióticos que incidem simultaneamente sobre o vegetal pode ser sentida pelo mesmo órgão ou diferentes partes (ou tecidos) das plantas e, para suportar as condições desfavoráveis causadas pelos estresses, elas desenvolveram mecanismos robustos de percepção e sinalização até as respostas fisiológicas, permitindo-lhes sobreviver a diferentes condições estressantes (ZANDALINAS et al., 2020). Frente as dificuldades impostas pelas alterações climáticas, a seca se torna um dos estresses abióticos mais crítico, podendo reduzir severamente a produção agrícola (JEANDROZ & LAMOTTE, 2017).

2.5.1 Deterioração de Sementes

A genética é uma importante característica para determinar a viabilidade e a longevidade das sementes, entretanto, da colheita até a utilização na lavoura, a viabilidade e longevidade das sementes são substancialmente influenciadas por outros fatores importantes como danos mecânicos, incidência direta e prolongada de luz solar, teor de água, tratamento de semente, umidade relativa e temperatura (SELVI & SARASWATHY, 2017). Para alguns tipos de sementes, a deterioração por umidade pode ser oriunda da variação do grau de umidade nas sementes, decorrentes de chuvas, neblina e orvalho, principalmente quando associadas com temperaturas elevadas, provocando rugas no tegumento na região

oposta ao hilo. Esse enrugamento é proveniente de sucessivos ciclos de hidratação e desidratação do tegumento em proporções diferentes (FRANÇA-NETO et al., 2016). Em decorrência do processo de deterioração, ocorrem alterações citológicas, fisiológicas, bioquímicas e físicas nas sementes, diminuindo a germinação, vigor e, eventualmente, causando a morte das sementes (JYOTI & MALIK, 2013).

A deterioração é caracterizada pela autooxidação das sementes, causando a produção de ERO, resultando em peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos ao DNA, sendo estes, as principais reações bioquímicas envolvidas na deterioração associada ao envelhecimento das sementes (LÓPEZ-FERNÁNDEZ et al., 2018). Durante o armazenamento, a umidade relativa do ar e a temperatura são os fatores mais determinantes para a longevidade das sementes. Armazenamento sob umidade relativa do ar inadequada e temperaturas elevadas, aceleram o processo de deterioração das sementes (WANG et al., 2018). Entretanto, destaca-se que a intensidade e velocidade da deterioração variam com a espécie (KRZYZANOWSKI & FRANÇA-NETO, 2021). A taxa de deterioração também é dependente da capacidade da semente em resistir às mudanças de degradação e aos mecanismos de proteção, que são específicos para cada espécie de planta (LÓPEZ-FERNÁNDEZ et al., 2018). Apesar de ser um efeito natural e inevitável, as condições ambientais adversas aceleram o processo de deterioração das sementes e, sendo assim, a melhor estratégia é garantir um manejo adequado das sementes desde a colheita e em todas as etapas de armazenamento e transporte, visando controlar e diminuir o ritmo da degradação das sementes (JYOTI & MALIK, 2013).

2.5.2 Déficit Hídrico

Entre os diferentes fatores de estresse que podem incidir sobre os agrossistemas, a seca é uma das mais preocupantes, uma vez que, inevitavelmente, as mudanças climáticas agravadas pelo aquecimento global podem dobrar a escassez de água (MUNIA et al., 2020). Isso deve tornar o déficit hídrico cada vez mais frequente em todas as regiões produtoras, fazendo a seca deixar de ser um problema típico de regiões áridas e semiáridas (HOLMAN et al., 2021). A partir do momento em que exigência de água pela planta não pode ser totalmente suprida em função da quantidade reduzida de água disponível no solo, comprometendo a absorção normal pelas raízes, cria-se a situação em que a água perdida pelo processo de evapotranspiração excede a quantidade de água absorvida, caracterizando a

condição de déficit hídrico (KAPOOR et al., 2020). Em decorrência ao déficit hídrico, ocorre a redução do potencial hídrico da folha e da pressão de turgor, induzindo o fechamento estomático e gerando impactos em processos fisiológicos e bioquímicos importantes como fotossíntese, síntese de clorofilas, absorção e translocação de íons, respiração e metabolismo de carboidratos (HUSSAIN et al., 2018).

Como os demais estresses abióticos, a escassez de água também induz a superprodução de ERO, resultando no dano oxidativo e, conseqüentemente, afetando reações fisiológicas importantes, induzindo a diminuição do crescimento (SUN et al., 2020). Em virtude ao estresse induzido pelo déficit hídrico, as plantas exibem respostas morfo-anatômicas, fisiológicas e bioquímicas, visando tornar as plantas mais tolerantes à seca (KAPOOR et al., 2020).

As respostas das plantas ao estresse hídrico variam desde o nível molecular até o nível vegetal, que envolve meios para evitar, escapar e tolerar o estresse, criando as três principais estratégias de sobrevivência das plantas. Entre as estratégias de prevenção ao estresse pela escassez de água, as plantas adotam a redução da condutância estomática e o aumento da absorção de água através de sistemas radiciais bem estabelecidos, garantindo a manutenção do potencial hídrico das plantas. Para escapar dos danos causados pelo estresse hídrico, algumas plantas utilizam mecanismos que envolvem o rápido desenvolvimento, redução do ciclo de vida, auto-reprodução e crescimento sazonal evitando o período de seca. Dentre estes mecanismos, a antecipação do florescimento é um dos melhores mecanismos adaptativos de escape possível nas plantas, embora, possa implicar em uma redução considerável na duração do período de crescimento da planta e na produtividade final da planta em alguns casos (SELEIMAN et al., 2021).

Por outro lado, mecanismos de tolerância podem envolver redução na área foliar, limitação na expansão de novas folhas, produção de tricomas em ambos os lados das folhas que vão reduzir a temperatura foliar e aumentar a taxa de reflexão da luz no limbo foliar, além de ser mais uma camada de resistência à perda d'água. No entanto, alterações na arquitetura das raízes que incluem uma maior taxa de crescimento, bem como, uma maior proliferação, representam a principal estratégia para enfrentar as adversidades provocadas pela escassez de água. Outros mecanismos como ajuste osmótico e mecanismos de defesa antioxidante, também permitem às plantas tolerar o déficit hídrico (SELEIMAN et al., 2021).

Estresses abióticos interagem não apenas entre si, mas também com outros estresses bióticos, potencializando os efeitos dos fatores estressantes sob as plantas (MARIANI & FERRANTE, 2017). Inevitavelmente, devido as alterações climáticas potencializadas pela ação do aquecimento global, será cada vez mais frequente a combinação de múltiplos fatores estressantes que irão incidir sobre as lavouras, impactando negativamente a produtividade e produção agrícola. Por exemplo, temperaturas extremas e falta d'água prejudicando a fisiologia das culturas, acentuando a competição com plantas daninhas, já que muitas destas apresentam maior eficiência no uso da água em comparação com as plantas cultivadas, além de fatores que podem influenciar e comprometer diferentes mecanismos de defesa (PANDEY et al., 2017).

2.6 ESTRESSES BIÓTICOS

As plantas frequentemente estão sujeitas as condições de estresse desencadeadas por fatores bióticos, fazendo-as desenvolver mecanismos de proteção para superar os prejuízos e garantir sua sobrevivência contra o ataque de agentes fitopatogênicos (IQBAL et al., 2021). As plantas contam com um sistema de defesa avançado, conferindo diferentes formas de proteção. A primeira linha de defesa é constituída de barreiras físicas como as ceras, cutículas e tricomas, evitando que insetos ou patógenos se instalem no vegetal, bem como, sucessivos eventos e sinalização que se iniciam no reconhecimento pela planta do agente agressor, culminando com a ativação de barreiras químicas envolvidas no processo. Dentre as defesas utilizadas pelas plantas estão a resposta hipersensitiva, resistência sistêmica adquirida e indução de proteínas relacionadas à patogênese (GIMEZEZ et al., 2018).

2.6.1 Ferrugem do Cafeeiro

Causada por um fungo, a ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk & Broome) é considerada a doença mais importante da cafeicultura, uma vez que pode causar intensa desfolha na planta, condicionando a produtividade em todas as regiões produtoras de café no mundo (PEREIRA et al., 2019). O fungo infecta as folhas causando pústulas, que inicialmente diminuem a área foliar ativa e, em seguida, progredindo para queda das folhas atacadas. Com a desfolha, as plantas perdem suas reservas, prejudicando o desenvolvimento da parte nova dos ramos laterais, além de

influenciar negativamente no pegamento da flora futura, resultando em perdas produtivas na safra seguinte (MATIELLO, 2021b).

As condições climáticas que favorecem a ferrugem são temperaturas entre 20 e 22 °C e chuvas acima de 30 mm. Por outro lado, temperaturas máximas médias mensais acima de 30 °C e mínimas médias mensais abaixo de 15 °C, são desfavoráveis para o desenvolvimento da doença (PEREIRA et al., 2008). Nas condições da cafeicultura brasileira, a ferrugem tem um ciclo bem definido, repetindo-se a cada ano. De modo geral, o aumento da infecção ocorre a partir de novembro/dezembro até abril/maio e com pico da doença acontecendo em julho/agosto, posteriormente decaindo pela desfolha natural e pela colheita (MATIELLO, 2021b).

No Brasil, os métodos de controle são utilizados para atenuar as perdas econômicas decorrentes da doença, destacando-se o uso de variedades resistentes associados ou não à aplicação de fungicidas registrados para cultura do cafeeiro (VAN DER VOSSSEN et al., 2015). São utilizados fungicidas protetores cúpricos e sistêmicos para o controle químico da ferrugem do cafeeiro. A combinação ou uso alternado de fungicidas sistêmicos com protetores, é essencial para potencializar o controle sobre a doença, diminuindo o risco de ineficácia de controle por meio da seleção de populações resistentes aos fungicidas (ZAMBOLIM, 2016).

2.7 PROTEÇÃO CONTRA ESTRESSES

A condição de estresse prejudica o funcionamento normal das plantas e, no caso das culturas, afetam o crescimento e desenvolvimento impactando negativamente a produtividade e qualidade da colheita. Estresses ambientais induzem a superprodução de ERO dentro das células, comprometendo o equilíbrio entre a síntese e remoção de ERO devido ao rápido acúmulo destas espécies reativas e/ou redução na atividade antioxidante. Quando a produção de ERO excede a capacidade da planta de eliminar o excesso produzido, cria-se a condição caracterizada como estresse oxidativo, prejudicando processos morfológicos, fisiológicos e metabólicos das células, podendo acarretar em morte celular (QAMER et al., 2021). Os principais locais de produção das ERO em células vegetais são os cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radicais superóxidos ($\cdot O_2^-$), radical hidroxila ($\cdot OH$) e oxigênio singlete (1O_2) são exemplos de ERO que podem causar

danos em membranas lipídicas, ácidos nucleicos, carboidratos e proteínas por causa de sua natureza altamente reativa (APEL & HIRT, 2004).

As plantas lidam principalmente com o estresse oxidativo através de um mecanismo de defesa que é constituído por diferentes enzimas, tais como: superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT); ascorbato peroxidase (APX); glutathione redutase (GR), peroxidase (POD), dentre outras. Ainda na proteção contra o estresse, as plantas contam com mecanismos não enzimáticos, utilizando substâncias oxidáveis com alto poder redutor como por exemplo α -tocoferol, β -caroteno, ascorbato, glutathione reduzida (GSH) e compostos fenólicos, que vão reagir rapidamente com ERO, antes que possam danificar as células (HASANUZZAMAN et al., 2020).

A SOD é a primeira a agir entre as enzimas antioxidantes, catalisando a formação de oxigênio e H_2O_2 a partir de $\cdot O_2^-$. Em seguida, as moléculas de H_2O_2 produzidas pela ação da SOD, são removidas pela CAT e APX. A enzima APX ainda atua dentro do ciclo ascorbato-glutathione juntamente com a GR e diversos outros componentes enzimáticos, onde são responsáveis pela regeneração do ascorbato e da GSH (GILL & TUTEJA, 2010), que ambos são metabólitos importantes para eliminação dos radicais $\cdot OH$, considerados as mais reativas e danosas formas das ERO (FOYER & NOCTOR, 2011). Além disso, a remoção em baixas concentrações de H_2O_2 é executada pela APX, permitindo o controle dessa ERO na ordem de μM e em locais mais específicos que a CAT (MITTLER, 2002). Além de também neutralizar o H_2O_2 convertido pela SOD, em plantas, a POD possui várias isoformas envolvidas em diversos processos celulares, algumas sendo constitutivamente expressas, enquanto outras são induzidas por estresses ambientais, estando localizada principalmente na parede celular e no vacúolo das células (TIECHER, 2016a e 2016b).

Portanto, a sobrevivência do sistema sob condições de estresse depende do equilíbrio entre a geração e a desintoxicação de ERO, executado pelo sistema de defesa antioxidante. A fenilalanina-amônia-liase (PAL), além de contribuir para desintoxicação de ERO (ASTANEH et al., 2018), é fundamental na biossíntese de fenilpropanóides, catalisando a transformação, por desaminação, do aminoácido L-fenilalanina, em ácido trans-cinâmico e amônia, sendo o primeiro passo para biossíntese de compostos como lignina, suberina, fitoalexinas, estilbenos e cumarinas, dentre outros fenólicos dependentes da atividade da PAL (ZHANG et al., 2017). Dessa forma, a atividade PAL tem uma função chave nas plantas por canalizar

o carbono do metabolismo primário para o secundário (BARNABY et al., 2017). A PAL está relacionada com a resistência de plantas a patógenos, notoriamente, por estar envolvida no primeiro passo da síntese de compostos como fitoalexinas e, principalmente, lignina, que confere maior resistência à parede celular das plantas aos patógenos (NAKAZAWA et al., 2001).

Outra enzima envolvida na defesa contra patógenos são as polifenoloxidasas (PPO), que são um grupo de enzimas que contêm cobre em seu centro ativo. Elas atuam sobre uma grande quantidade de substratos, catalisando dois tipos de reações envolvendo oxigênio. A PPO promove a hidroxilação de monofenóis formando *orto*-difenóis e também à oxidação de *orto*-difenóis formando *orto*-quinonas (GOMES et al., 2001). A PPO está relacionada à deterioração dos tecidos vegetais durante processos como senescência, danos mecânicos, interação com pragas e patógenos manuseio durante o processamento e armazenamento pós-colheita, levando ao escurecimento dos tecidos. Estando presente nos cloroplastos, as enzimas estão separadas de seus substratos fenólicos (localizados no vacúolo), de modo que o escurecimento enzimático ocorre apenas quando as células são danificadas e a compartimentação subcelular é perdida. Além disso, a PPO normalmente está presente em maiores concentrações em tecidos infectados. Após a infecção por patógenos, o aumento da concentração de compostos fenólicos oxidados, resultantes da atividade da enzima, podem servir como barreira física e/ou causar toxicidade ao patógeno, inibindo sua proliferação nos tecidos vegetais (TARANTO et al., 2017)

2.8 NANOTECNOLOGIA NA AGRICULTURA

Uma população mundial em constante crescimento e, juntamente com as mudanças climáticas, desafiam diariamente o setor agrário a incrementar a produção agrícola para atender à crescente demanda por alimentos. Este cenário impulsiona o consumo de agroquímicos e, conseqüentemente, a potencial liberação de compostos tóxicos no ambiente (PRASAD et al., 2017; PANDEY, 2018; ACHARYA & PAL, 2020). A situação comumente encontrada em diversas regiões produtoras ao redor do mundo é a presença de solos com baixa concentração de um ou mais nutrientes ou apresentando problemas que vão impossibilitar ou restringir a disponibilidade dos nutrientes como os casos de acidez, salinidade, além da possibilidade dos nutrientes serem perdidos por lixiviação, erosão ou até mesmo pela

prática incorreta da incorporação de fertilizantes e corretivos agrícolas (MARSCHNER, 2012). Entretanto, apesar do passo primordial ser a correção da deficiência, às práticas de adubação e correção de solos realizada de forma inadequada, provocam a baixa eficiência de uso dos fertilizantes convencionais e, normalmente, acabam não suprindo de forma apropriada a demanda das plantas, comprometendo todo o sistema produtivo (VOORTMAN & BINDRABAN, 2105; MONREAL et al., 2016). Neste cenário, a nanotecnologia vem contribuindo com uma agricultura mais sustentável, visando conciliar melhorias nos sistemas produtivos com uma maior produção agrícola, criando por exemplo, nanofertilizantes e nanopesticidas que possuem como característica uma maior eficácia de uso e a redução na quantidade aplicada, quando comparados com as fontes convencionais (USMAN et al., 2020).

Os nanofertilizantes são a forma sintetizadas ou modificadas de fertilizantes tradicionais (LEÓN-SILVA et al., 2018), podendo ser: (i) fertilizantes em nanoescala (nanopartículas que contêm nutrientes); (ii) aditivos em nanoescala (fertilizantes tradicionais com aditivos em nanoescala) e (iii) revestimento em nanoescala (fertilizantes tradicionais revestidos ou carregados com nanopartículas) (MIKKELSEN, 2018; CHHIPA, 2017), apresentando vantagens em relação as fontes convencionais, como uma absorção mais rápida e, além disso, um risco menor de perdas por fatores ambientais como a lixiviação (MORALES-DÍAZ et al., 2017). Ademais, nanofertilizantes dotados de mecanismos com liberação lenta, podem liberar o nutriente com maior precisão (MANJUNATHA et al., 2016) e com desempenho superior, melhorando a nutrição e, conseqüentemente, o desenvolvimento das plantas de forma mais efetiva que os fertilizantes convencionais (SIDDIQUI et al., 2015).

Em nanoescala o micronutriente tem a sua biodisponibilidade para as plantas melhorada, incrementando o crescimento e a qualidade nutricional. Pradhan et al. (2015) avaliaram as respostas de plantas de feijão moyashi (*Vigna radiata* cv. Sonali) submetidas a aplicação de nanopartículas de cobre, comparando-a com o tratamento de uma formulação comercial de sulfato de cobre. Em condições de laboratório, obtiveram resultados que mostraram um aumento da atividade fotossintética, fotofosforilação, cadeia transportadora de elétrons e assimilação de carbono. As nanopartículas ainda promoveram um maior crescimento, conteúdo de pigmentos e maior atividade antioxidante quando comparadas ao sulfato. Em adição,

doses elevadas de sulfato de cobre foram tóxicas para as plantas enquanto que, as nanopartículas na mesma concentração não apresentaram efeito toxicológico.

Hafeez et al. (2015) avaliaram o potencial de nanopartículas de cobre em aumentar o crescimento e o rendimento de cultivares de trigo (*Triticum aestivum* cv. Millat-2011) em condições controladas. Em um experimento *in vitro*, o meio de cultura enriquecido com concentrações até 1,0 ppm, proporcionaram incremento no crescimento das plântulas, conferindo um maior conteúdo de clorofilas, uma maior área foliar e um maior acúmulo de massa seca. Por outro lado, a concentração de 2,0 ppm desencadeou efeitos deletérios no trigo, inibindo o crescimento. Aplicações via substrato das nanopartículas de cobre não causaram efeitos fitotóxicos nas plantas, sendo possível observar que a concentração de 30 ppm aumentou significativamente o conteúdo de clorofilas, área foliar e, principalmente, a produção de grãos nas condições estudadas.

Saharan et al. (2016) e Choudhary et al. (2017a) investigaram os efeitos de nanopartículas de quitosana contendo cobre no processo germinativo e posterior desenvolvimento de plântulas de milho. Em condição de laboratório, ambos trabalhos realizaram um tratamento de sementes na concentração de 0,01 a 0,16%. As sementes foram colocadas para germinar em placas de petri com papel filtro umedecido com 5 mL de água destilada e foram alocadas em câmara escura a 28°C por 10 dias. Foi detectado incremento nos parâmetros morfológicos das plântulas e aumento da atividade das enzimas α -amilase e proteases. Os autores sugerem que o maior crescimento das plântulas está relacionado com a mobilização das reservas, principalmente amido, através do incremento da atividade da α -amilase.

A associação entre a nanotecnologia e a bioatividade do cobre vem demonstrando resultados promissores na síntese de nanofertilizantes que tem como objetivo conferir uma melhor eficiência de uso deste micronutriente pelas plantas, promovendo o crescimento e desenvolvimento das mesmas (CHOUDHARY et al., 2017b; LEONARDI et al., 2021). Além disso, esta associação também vem sendo explorada para o desenvolvimento de nanopesticidas para o controle de patógenos de plantas. Li et al. (2020) avaliaram a proteção conferida pela aplicação foliar de um nanocompósito de cobre e dissulfeto de molibdênio (MoS_2) na proteção de uma cultivar de arroz (*Oryza sativa* cv. Huanghuazhan) contra o patógeno *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Os autores reportaram que a severidade da doença diminuiu de 86,25% para 7,5%, além de aumentar o conteúdo de molibdênio e clorofilas, promove

a indução da atividade de enzimas antioxidantes e a melhoria no crescimento das plantas.

Quiterio-Gutiérrez et al. (2019) investigaram o efeito protetor combinado da aplicação foliar de nanopartículas de cobre e selênio em uma variedade de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. El Cid F1) contra ação do patógeno *Alternaria solani*. Foi constatado que a combinação das nanopartículas diminuiu a severidade da doença, sendo que as doses mais altas (cobre 50 mg L⁻¹ + selênio 20 mg L⁻¹) induziram a atividade de enzimas antioxidantes e o conteúdo de clorofilas nas folhas, além de aumentar a concentração nos frutos de compostos antioxidantes não enzimáticos como ascorbato, glutatona, fenóis e flavonoides.

Saharan et al. (2015) observaram que o tratamento de sementes de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Suverna navodhya) com nanopartículas de quitosana contendo cobre influenciou positivamente a germinação das sementes e o crescimento inicial das plântulas, além de inibir a germinação de esporos e o crescimento micelial dos fungos *Alternaria solani* e *Fusarium oxysporum*, em modelo *in vitro*. Sathiyabama e Manikandan (2018) avaliaram os efeitos do tratamento de sementes, bem como a combinação do tratamento de sementes com a aplicação foliar de nanopartículas de quitosana contendo cobre no controle da brunose (*Pyricularia grisea*) em plantas de milho (*Eleusine coracana*). Para ambas as formas de tratamento, observaram alterações no perfil de crescimento das plantas tratadas como maior número de folhas, área foliar e acúmulo de massa seca, sendo a combinação do tratamento de sementes com a aplicação foliar mais efetiva no aumento do desenvolvimento das plantas. Ainda, as plantas tratadas com as nanopartículas apresentaram supressão no desenvolvimento da doença quando comparadas ao controle, estando este efeito correlacionado a uma maior atividade de enzimas relacionadas com a proteção contra patógenos.

A quitosana vem sendo utilizada na agricultura devido sua capacidade de induzir o crescimento de plantas, bem como pela resposta de defesa vegetal contra patógenos, além da sua versatilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. A quitosana possui também propriedades mucoadesivas, facilitando o transporte desses compostos ativos através das membranas celulares, o que implica um grande potencial para uso na indústria agroquímica, além de ser considerada um excelente biopolímero para preparação de micro e nanopartículas (KUMARASWAMY et al., 2018). Na associação do cobre com a quitosana para síntese de nanopartículas, é a

arquitetura porosa da quitosana a responsável pela liberação gradual do cobre da nanoestrutura, sendo observado a deposição do cobre na superfície dos poros, tornando o contato das células vegetais com o cobre duradouro. Esta característica estrutural faz a quitosana possuir uma grande afinidade com o cobre, quando comparado a outros metais, o que permite a obtenção de uma alta eficiência de encapsulação (SAHARAN et al., 2015).

Apesar do potencial em melhorar consideravelmente diferentes processos fisiológicos das plantas, nem sempre os efeitos conferidos pelos nanomateriais ao metabolismo vegetal são positivos, sendo muitas vezes observados efeitos negativos, comprometendo todo o crescimento e desenvolvimento de diferentes espécies vegetais (AHMAD et al., 2022). Portanto, os efeitos induzidos pelos nanomateriais são dependentes de muitos fatores e, por consequência, a interação entre eles. Fatores inerentes ao nanomaterial como, propriedades físico-químicas, tamanho, forma e concentração, interagindo com a espécie vegetal, local e/ou forma de aplicação das nanopartículas, tempo de exposição aos nanomateriais e com o ambiente de cultivo ou crescimento das plantas (AHMAD et al., 2022).

2.8.1 Nanotecnologia Verde

As aplicações de nanomateriais na agricultura precisam ser ecologicamente corretas, não gerando danos ao meio ambiente (MAHAKHAM et al., 2017). Neste sentido, a síntese de nanopartículas metálicas utilizando extratos biológicos de plantas, fungos ou bactérias pode ser uma alternativa para a preparação destes nanomateriais de uma maneira mais viável ecologicamente em comparação com os métodos químicos convencionais, proporcionando uma maior biocompatibilidade e bioatividade, além da redução ou ausência de fitotoxicidade e do uso de compostos agressivos ao ambiente (PEREIRA et al., 2021). A síntese verde de nanomateriais baseia-se em rotas de síntese que tem como fonte primária ou iniciador da rota um organismo biológico ou partes dele (órgãos, tecidos, células, biomoléculas ou metabólitos), por meio de processos de oxirredução em meio aquoso. As biomoléculas presentes nos organismos (ex: polissacarídeos, proteínas, peptídeos, aminoácidos, ácidos nucleicos e vitaminas) atuam como agentes redutores do composto de interesse (íons metálicos, por exemplo), resultando na formação das nanopartículas. Em alguns casos, quando se visa à obtenção de uma suspensão coloidal, esses compostos podem formar uma camada estabilizante (chamada de

capping), servindo como uma espécie de cobertura na superfície das nanopartículas metálica, evitando que as mesmas se agreguem (SILVA et al., 2017).

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, A.; PAL, P.K. Agriculture nanotechnology: Translating research outcome to field applications by influencing environmental sustainability. **NanoImpact**, Amesterdã, v. 19, n. 100232, jul. 2020.
- ADREES, M.; ALI, S.; RIZWAN, M.; IBRAHIM, M.; ABBAS, F.; FARID, M.; ZIA-UR-REHMAN, M.; IRSHAD M.K.; BHARWANA, S.A. The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: A review. **Environmental Science and Pollution Research International**, Berlim, v. 22, n. 11, p. 8148-8162, jun. 2015.
- AHMAD, A.; HASHMI, S. S.; PALMA, J. M.; CORPAS, F. J. Influence of metallic, metallic oxide, and organic nanoparticles on plant physiology. **Chemosphere**, Oxford, v. 290, n. 133329, mar. 2022.
- ALI, S.; CHAUDHARY, A.; RIZWAN, M.; ANWAR, H.T.; ADREES, M.; FARID, M.; IRSHAD, M.K.; HAYAT, T.; ANJUM, A.S. Alleviation of chromium toxicity by glycinebetaine is related to elevated antioxidant enzymes and suppressed chromium uptake and oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Environmental Science and Pollution Research**, Landsberg, v. 22, p. 10669-10678, mar. 2015.
- AMLAL, F.; DRISSI, S.; MAKROUM, K.; DHASSI, K.; ER-REZZA, H.; HOUSSA, A.A. Influence of soil characteristics and leaching rate on copper migration: column test. **Heliyon**, Cambridge, v.6, e03375, fev. 2020.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, jan. 2004.
- ASTANEH, R. K.; BOLANDNAZAR, S.; NAHANDI, F. Z.; OUSTAN, S. Effect of selenium application on phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity, phenol leakage and total phenolic content in garlic (*Allium sativum* L.) under NaCl stress. **Information Processing in Agriculture**. Beijing, v. 5, n. 3, p. 339-344, set. 2018.
- BARNABY, A. G.; REID, R.; WARREN, D. Phenylalanine ammonia lyase activity, antioxidant properties, fatty acid profile, mineral content and physiochemical analyses of *Cissus sicyoides* berries. **Journal of Berry Research**, v. 7, n. 2, p. 117-127, mai. 2017.
- BHUSAL, B.; POUDEL, M.R.; PANDIT, R.; REGMI, R.; NEUPANE, P.; BHATTARAI K.; MAHARJAN, B.; BIGYAN, K.C.; ACHARYA, S. A review on abiotic stress resistance in maize (*Zea mays* L.): effects, resistance mechanisms and management. **Journal of Biology and Today's World**, Brussels, v. 10, n. 2, p. 001-003, fev. 2021.
- BRUNETTO, G.; MELO, G.W.B.; TERZANO, R.; BUONO, D.D.; ASTOLFI, S.; TOMASI, N.; PII, Y.; MIMMO, T.; CESCO, S. Copper accumulation in vineyard soils: rhizosphere processes and agronomic practices to limit its toxicity. **Chemosphere**, Oxford, v.162, p. 293-307, nov. 2016.

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

CECAFÉ – Conselho dos Exportadores de Café do Brasil. **Relatório mensal de exportações**. São Paulo, SP, 2022. Disponível em: <<https://www.cecafe.com.br/publicacoes/relatorio-de-exportacoes/>>. Acessado em 17 mar. 2022.

CHENG, J.; ZHANG, X.; TANG, Z.; YANG, Y.; NIE, Z.; HUANG, Q. Concentrations and human health implications of heavy metals in market foods from a Chinese coal-mining city. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amesterdã, v. 50, p. 37-44, mar. 2017.

CHHIPA, H. Nanofertilizers and nanopesticides for agriculture. **Environmental Chemistry Letters**, Secaucus, v. 15, n. 1, p. 15–22, mar. 2017.

CHOUDHARY R. C.; JOSHI, A.; KUMARI, S.; KUMARASWAMY, R.V.; SAHARAN, V. Preparation of Cu-chitosan nanoparticle and its effect on growth and enzyme activity during seed germination in maize. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, New Delhi, v. 6, n. 4, p. 669-673, 2017a.

CHOUDHARY, R.C., KUMARASWAMY, R.V., KUMARI, S., SHARMA S.S, PAL, A., RALIYA R., BISWAS, P.; SAHARAN V. Cu-chitosan nanoparticle boost defense responses and plant growth in maize (*Zea mays* L.). **Scientific Reports**, Londres, v. 7, n. 9754, ago. 2017b.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Nova estimativa aponta para uma produção de grãos na safra 2021/22 em 268,2 milhões de toneladas**. Brasília, DF, 2022. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4494-nova-estimativa-aponta-para-uma-producao-de-graos-na-safra-2021-22-em-268-2-milhoes-de-toneladas>>. Acessado em: 17 mar. 2022a.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Novo levantamento da safra de café nacional estima produção de 46,9 milhões de sacas**. Brasília, DF, 2022. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4275-novo-levantamento-da-safra-de-cafenacional-estima-producao-de-quase-47-milhoes-de-sacas>>. Acessado em: 17 mar. 2022b.

CONTINI, E.; MOTA, M. M.; MARRA, R.; BORGHI, E.; MIRANDA, R. A.; SILVA, A. F.; SILVA, D. D.; MACHADO, J. R. A.; COTA, L. V.; COSTA, R. V.; MENDES, S. M. **Série Desafios do Agronegócio Brasileiro (NT2). Milho – Caracterização e Desafios Tecnológicos**. Brasília, DF, Embrapa, 2019, 45p. Nota técnica. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/195075/1/Milhocaracterizacao.pdf>>. Acessado em: 02 mai. 2019.

FAN, J.; HE, Z.; MA, L.Q.; STOFFELLA, P.J. Accumulation and availability of copper in citrus grove soils as affected by fungicide application. **Journal of Soils and Sediments**, Berlim, v.11, p. 639-648, mar. 2011.

FRANÇA NETO, J. de B.; KRZYŻANOWSKI, F.C.; HENNING, A.A.; PADUA, G.P.; LORINI, I.; HENNING, F.A. **Tecnologia da produção de semente de soja de alta qualidade**. Londrina: Embrapa Soja, 2016. 82p. (Embrapa Soja. Documentos, 380).

GALVÃO, J. C. C.; GLAUCO, V. M.; TROGELLO, E.; FRITSCHÉ-NETO, R. Sete décadas de evolução do sistema produtivo da cultura do milho. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, p. 819-828, dez. 2014.

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

GIMENEZ, E.; SALINAS, M.; MANZANO-AGUGLIARO, F. Worldwide research on plant defense against biotic stresses as improvement for sustainable agriculture. **Sustainability**, Basel, v. 10, n. 391, fev. 2018.

GOMES, D. G.; da CUNHA, L. S.; OLIVEIRA, H. C. Dose-dependent dual effect of soil copper on the initial development of *Glycine max* (L.) Merr. cv. BRS 257 seedlings. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 105, p. 553-558, set. 2020.

GOMES, D. G.; LOPES-OLIVEIRA, P. J.; DEBIASI, T. V.; da CUNHA, L. S.; OLIVEIRA, H. C. Regression models to stratify the copper toxicity responses and tolerance mechanisms of *Glycine max* (L.) Merr. plants. **Planta**, Berlim, v. 253, n. 43, jan. 2021.

GOMES, M. R.A.; OLIVEIRA, M. G. de A.; CARNEIRO, G. E. S.; BARROS, E. G. de; MOREIRA, M. A. Propriedades físico-químicas de polifenoloxidase de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Science and Technology**, Campinas, v. 21, n. 1, jan. 2001.

HAFEEZ, A.; RAZZAQ, A.; MAHMOOD, T.; JHANZAB, H.M. Potential of Copper Nanoparticles to Increase Growth and Yield of Wheat. **Journal of Nanoscience with Advanced Technology**, Londres, v. 1, n. 1, p. 6-11, mai. 2015.

HASANUZZAMAN, M.; BHUYAN, M.H.M.B.; ZULFIQAR, F.; RAZA, A.; MOHSIN, S.M.; MAHMUD, J.A.; FUJITA, M.; FOTOPOULOS, V. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: revisiting the crucial role of a universal defense regulator. **Antioxidants**, Basel, v. 9, n. 681, jul. 2020.

HOLMAN, I.P.; HESS, T.M.; REY, D.; KNOX, J.W. A multi-level framework of adaptation to drought within temperate agriculture. **Frontiers in Environmental Science**. Lausanne, v. 8, n. 589871, jan. 2021

HOSSAIN, M.D.S.; ABDELRAHMAN, M.; TRAN, C.D.; NGUYEN, K.H.; CHU, H.D.; WATANABE, Y.; HASANUZZAMAN, M.; MOHSIN, S.M.; FUJITA, M.; TRAN, L.S.P. Insights into acetate-mediated copper homeostasis and antioxidant defense in lentil under excessive copper stress. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 258, n. 113544, mar. 2020.

HUSAK, V. Copper and copper-containing pesticides: metabolism, toxicity and oxidative stress. **Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University**, Ivano-Frankivsk, v. 2, n. 1, p.38-50, abr. 2015.

HUSSAIN, H. A.; HUSSAIN, S.; KHALIQ, A.; ASHRAF, U.; ANJUM, S.A.; MEN, S.; WANG, L. Chilling and drought stresses in crop plants: implications, cross talk, and potential management opportunities. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 9, n. 393, abr. 2018.

IQBAL, Z.; IQBAL, M.S.; HASHEM, A.; ABD-ALLAH, E.F.; ANSARI, M.I. Plant defense responses to biotic stress and its interplay with fluctuating dark/light conditions. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 12, n. 631810, mar. 2021.

JEANDROZ, S.; LAMOTTE, O. Editorial: plant responses to biotic and abiotic stresses: lessons from cell signaling. **Frontiers in plant science**, Lausanne, v. 8, n. 1772, out. 2017

JÚNIOR HONORATO, J.; ZAMBOLIM, L.; AUCIQUE-PÉREZ, C. E.; RESENDE, R. S.; RODRIGUES, F. A. Photosynthetic and antioxidative alterations in coffee leaves caused by epoxiconazole and pyraclostrobin sprays and *Hemileia vastatrix* infection. **Pesticide biochemistry and physiology**, Amesterdã v. 123, p. 31–39, set. 2015.

JYOTI; MALIK, C.P. Seed deterioration: a review. **International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research**, Hyderabad, v. 2, n. 3, p. 375-385, jul. 2013.

KAPOOR, D.; BHARDWAJ, S.; LANDI, M.; SHARMA, A.; RAMAKRISHNAN, M.; SHARMA, A. The impact of drought in plant metabolism: how to exploit tolerance mechanisms to increase crop production. **Applied Sciences**, Basel, v. 10, n. 5692, ago. 2020.

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

KRZYZANOWSKI, Francisco Carlos; FRANÇA-NETO, José de Barros. **Deterioração e vigor da semente**. 2021. Disponível em: <<https://seednews.com.br/artigos/3451-deterioracao-e-vigor-da-semente-edicao-janeiro-2021>>. Acessado em: 27 ago. 2021.

KUMARASWAMY, R.V.; KUMARI, S.; CHOUDHARY, R.C.; PAL, A.; RALIYA, R.; BISWAS, P.; SAHARAN, V. Engineered chitosan-based nanomaterials: Bioactivities, mechanisms and perspectives in plant protection and growth. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amesterdã, v. 113, p. 494-506, jul. 2018.

LAMICHHANE, J.R.; OSDAGHI, E.; BEHLAU, F.; KÖHL, J.; JONES, J.B.; AUBERTOT, J.N. Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 38, n. 28, mai. 2018

LEONARDI, M.; CARUSO, G.M.; CARROCCIO, S.C.; BONINELLI, S.; CURCURUTO, G.; ZIMBONE, M.; ALLEGRA, M.; TORRISI, B.; FERLITO, F.; MIRITELLO, M. Smart nanocomposites of chitosan/alginate nanoparticles loaded with copper oxide as alternative nanofertilizers. **Environmental Science: Nano**, Londres, v. 8, p. 174-187, jan. 2021

LEÓN-SILVA, S.; ARRIETA-CORTES, R.; FERNÁNDEZ-LUQUEÑO, F.; LÓPEZ-VALDEZ, F. Design and Production of Nanofertilizers. In: LÓPEZ-VALDEZ, F.; FERNÁNDEZ-LUQUEÑO, F (eds), **Agricultural Nanobiotechnology**. Switzerland: Springer International Publishing, 2018, p. 17-31.

LI, Y.; LIU, Y.; YANG, D.; JIN, Q.; WU, C.; CUI, J. Multifunctional molybdenum disulfide-copper nanocomposites that enhance the antibacterial activity, promotes rice growth and induces rice resistance. **Journal of Hazardous Materials**, Amesterdã, v. 394, n. 122551, jul. 2020.

LIU, R.; LAL, R. Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions. **The Science of The Total Environment**, Amesterdã, v. 514, p. 131–139, mai. 2015.

LOBELL, D.B.; SCHLENKER, W.; COSTA-ROBERTS, J. Climate trends and global crop production since 1980. **Science**, Washington, v. 333, n. 6042, p. 616-620, jul. 2011.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, M.P.; MOYANO, L.; CORREA, M.D.; VASILE, F.; BURRIEZA, H.P.; MALDONADO, S. Deterioration of willow seeds during storage. **Scientific Reports**, Londres, v. 8, n. 17207, nov. 2018.

LUTTS, S.; BENINCASA, P.; WOJTYLA, L.; KUBALA, S. S.; PACE, R.; LECHOWSKA, K.; QUINET, M.; GARNCZARSKA, M. Seed Priming: New comprehensive approaches for an old empirical technique. In: Araujo S and Balestrazzi A (eds.) **New challenges in seed biology – Basic and translational research driving seed technology**. Londres, United Kingdom, IntechOpen Limited; 2016. p. 1-46.

MACHADO, A.H.R.; PUJA, J.D.; MENEZES, K.C.; MACHADO, W. A cultura do café (*Coffea arabica*) em sistema agroflorestal. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, Curitiba, v. 3, n. 3, p. 1357-1369, set. 2020.

MAHAKHAM, W.; SARMAH, A. K.; MAENSIRI, S.; THEERAKULPISUT, P. Nanopriming technology for enhancing germination and starch metabolism of aged rice seeds using phytosynthesized silver nanoparticles. **Scientific Reports**, Londres, v. 7, n. 8263, ago. 2017.

MANJUNATHA, S. B.; BIRADAR, D. P.; ALADAKATTI, Y. R. Nanotechnology and its applications in agriculture: A review. **Journal of Farm Science**, Karnataka, v. 29, n. 1, p. 1-13, jan. 2016.

MARIANI, L.; FERRANTE, A. Agronomic management for enhancing plant tolerance to abiotic stresses—drought, salinity, hypoxia, and lodging. **Horticulturae**, Basel, v. 3, n. 52, p. 1-18, dez. 2017.

MARSCHNER, P. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3 ed. Londres: Academic Press, 2012. 651p.

MARTHANDAN, V.; GEETHA, R.; KUMUTHA, K.; RENGANATHAN, V. G.; KARTHIKEYAN, A.; RAMALINGAM, J. Seed priming: A feasible strategy to enhance drought tolerance in crop plants. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 21, n. 8258, nov. 2020.

MATIELLO, José Braz. **A bienalidade do cafeeiro pode ocorrer até mesmo dentro da planta; veja**. 2017. Disponível em: <<https://www.cafepoint.com.br/noticias/tecnicas-de-producao/a-bienalidade-do-cafeeiro-pode-ocorrer-ate-mesmo-dentro-da-planta-veja-105859n.aspx>>. Acessado em: 25 ago. 2021a.

MATIELLO, José Braz. **Avaliação da ferrugem do cafeeiro – diferenças entre a prática e a academia**. 2019. Disponível em: <<https://www.cafepoint.com.br/noticias/tecnicas-de-producao/avaliacao-da-ferrugem-do-cafeeiro-diferencas-entre-a-pratica-e-a-academia-212307/>>. Acessado em: 25 ago. 2021b.

MIKKELSEN, R. Nanofertilizer and Nanotechnology: A quick look. **Better Crops**, Norcross, v. 102, n. 3, p. 18-19, 2018

MIRANDA, R. A. de. Uma história de sucesso da civilização. **A Granja**, Porto Alegre, v. 74, n. 829, p. 24-27, jan. 2018.

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

MONREAL, C. M.; DEROSA, M.; MALLUBHOTLA, S. C.; BINDRABAN, P. S.; DIMKPA, C. O. Nanotechnologies for increasing the crop use efficiency of fertilizer-micronutrients. **Biology and Fertility of Soils**, Heidelberg, v. 52, n. 3, p. 423-237, abr. 2016.

MORALES-DÍAZ, A.B.; ORTEGA-ORTÍZ, H.; JUÁREZ-MALDONADO, A.; CADENAS-PLIEGO, G.; GONZÁLEZ-MORALES, S.; BENAVIDES-MENDOZA, A. Application of nanoelements in plant nutrition and its impact in ecosystems. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, Bristol, v. 8, n. 013001, fev. 2017.

MUNIA, H.A.; GUILLAUME, J. H. A.; WADA, Y.; VELDKAMP, T., VIRKKI, V.; KUMMU, M. Future transboundary water stress and its drivers under climate change: A global study. **Earth's Future**, Washington, v. 8, n. e2019EF001321, mai. 2020.

NAKAZAWA, A.; NOZUE, M.; YASUDA, H. Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Pharbitis nil*. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v. 114, n. 2, p. 323-328, abr. 2001.

NAZIR, F.; HUSSAIN, A.; FARIDUDDIN, Q. Hydrogen peroxide modulate photosynthesis and antioxidant systems in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants under copper stress. **Chemosphere**, Oxford, v. 230, p. 544-558, set. 2019.

PANDEY, G. Challenges and future prospects of agri-nanotechnology for sustainable agriculture in India. **Environmental Technology & Innovation**, Amesterdã, v. 11, p. 299-307, ago. 2018.

PANDEY, P.; IRULAPPAN, V.; BAGAVATHIANNAN, M.V.; SENTHIL-KUMAR, M. Impact of combined abiotic and biotic stresses on plant growth and avenues for crop improvement by exploiting physio-morphological traits. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 8, n. 537, abr. 2017.

PEIXOTO, Claudio de Miranda. **O milho no Brasil, sua importância e evolução**. 2014. Disponível em: < <https://www.pioneersementes.com.br/media-center/artigos/165/o-milho-no-brasil-sua-importancia-e-evolucao>>. Acessado em: 18 mar. 2022.

PEREIRA, A.A.; ALMEIDA, S.R.; MATIELLO, J.B.; BARTHOLO, G.F.; SERA, T.; MOURA, W.M.; MENDES, A.N.G.; REZENDE, J.C.; FONSECA, A.F.A.; FERRÃO, M.A.G.; FERRÃO, R.G.; NACIF, A.P.; SILVAROLLA, M.B.; BRAGHINI, M.T. **Cultivares de Café Arábica de Porte Baixo**. In: CARVALHO, C. H. S. 24 Cultivares de café: origem, características e recomendações. Brasília: Embrapa Café, 2008, p. 157-226.

PEREIRA, A.E.S.; OLIVEIRA, H. C.; FRACETO, L. F.; SANTAELLA, C. Nanotechnology potential in seed priming for sustainable agriculture. **Nanomaterials**, Basel, v. 11, n. 267, jan 2021.

PEREIRA, I.S.; ROSALINO, R.C.; NEVES, F.O.B.C.; PEREIRA, M.T.; BRAGA, J.G.S. Diferentes fungicidas no controle da ferrugem do cafeeiro. **Revista Inova Ciência & Tecnologia**, Uberaba, v. 5, n. 1, p. 25-29, jun. 2019.

PRADHAN, S.; PATRA, P.; MITRA, S.; DEY, K. K.; BASU, S.; CHANDRA, S.; PALIT, P.; GOSWAMI, A. Copper nanoparticle (CuNP) nanochain arrays with a reduced toxicity response: a biophysical and biochemical outlook on *Vigna radiata*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 63, n. 10, p. 2606–2617, mar. 2015.

PRASAD, R.; BHATTACHARYYA, A.; NGUYEN, Q.D. Nanotechnology in Sustainable Agriculture: Recent Developments, Challenges, and Perspectives. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, n. 1014, jun. 2017.

QAMER, Z.; CHAUDHARY, M.T.; DU, X.; HINZE, L.; AZHAR, M.T. Review of oxidative stress and antioxidative defense mechanisms in *Gossypium hirsutum* L. in response to extreme abiotic conditions. **Journal of Cotton Research**, New York, v. 4, n. 9, p. 1-9, abr. 2021.

QUITERIO-GUTIÉRREZ, T.; ORTEGA-ORTIZ, H.; CADENAS-PLIEGO, G.; HERNÁNDEZ-FUENTES, A.D.; SANDOVAL-RANGEL, A.; BENAVIDES-MENDOZA, A.; CABRERA-DE LA FUENTE, M.; JUÁREZ-MALDONADO, A. The application of selenium and copper nanoparticles modifies the biochemical responses of tomato plants under stress by *alternaria solani*. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 20, n. 1950, abr. 2019

SAHARAN, V.; KUMARASWAMY, R.V.; CHOUDHARY, R.C.; KUMARI, S.; PAL, A.; RALIYA, R.; BISWAS, P. Cu-Chitosan nanoparticle mediated sustainable approach to enhance seedling growth in maize by mobilizing reserved food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 64, n. 31, p. 6148–6155, ago. 2016.

SAHARAN, V.; SHARMA, G.; YADAV, M.; CHOUDHARY, M.K.; SHARMA, S.S.; PAL, A.; RALIYA, R.; BISWAS, P. Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu–chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amesterdã, v. 75, p. 346-353, abr. 2015.

SATHIYABAMA, M.; MANIKANDAN, A. Application of copper-chitosan nanoparticles stimulate growth and induce resistance in finger millet (*eleusine coracana gaertn.*) plants against blast disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Oxfordshire, v. 66, n. 8, p. 1784-1790, fev. 2018.

SELEIMAN, M.F.; AL-SUHAIBANI, N.; ALI, N.; AKMAL, M.; ALOTAIBI, M.; REFAY, Y.; DINDAROGLU, T.; ABDUL-WAJID, H. H.; BATTAGLIA, M. L. Drought stress impacts on plants and different approaches to alleviate its adverse effects. **Plants**, Basel, v. 10, n. 259, jan. 2021.

SELVI, D.T.; SARASWATHY, S. Seed viability, seed deterioration and seed quality improvements in stored onion seeds: a review. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, Oxforshire, v. 93, n. 1, p 1-7, jun. 2017.

SERVIN, A.; ELMER, W.; MUKHERJEE, A.; DE LA TORRE-ROCHE, R.; HAMDY, H.; WHITE, J. C.; DIMKPA, C. Nanoscale micronutrients suppress disease. **VFRC Report 2015/2**. Virtual Fertilizer Research Center, Washington, DC, USA, 2015, 33p.

SIDDIQUI, M. H.; AL-WHAIBI, M. H.; MOHAMMAD, F.; ALKHAISHANY, M. Y. Role of nanoparticles in plants. In: SIDDIQUI, M. H.; AL-WHAIBI, M. H.; MOHAMMAD, F (eds.), **Nanotechnology and Plant Sciences: Nanoparticles and Their Impact on Plants**. Switzerland: Springer International Publishing, 2015, p. 19–35.

SILVA, B.A.O.; REIS, E.A. A bienalidade da cafeicultura e o resultado econômico da estocagem. **Custos e @agronegócios**, Recife, v. 9, n. 3, p. 2-26, set. 2013.

SILVA, L. P.; BONATTO, C. C.; PEREIRA, F. D. E. S.; SILVA, L. D.; ALBERNAZ, V. L.; POLEZ, V. L. P. Nanotecnologia verde para síntese de nanopartículas metálicas. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria – Vol. 4**. São Paulo: Blucher, 2017, p. 967-1012.

SILVA, M. C.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; DINIZ, I.; LOUREIRO, A.; AZINHEIRA, H.; PEREIRA, A. P.; TAVARES, S.; BATISTA, D.; VÁRZEA, V. An overview of the mechanisms involved in coffee-*Hemileia vastatrix* interactions: Plant and pathogen perspectives. **Agronomy**, Basel, v. 12, n. 2, p. 326, jan. 2022.

SOARES, A. S.; VIEIRA, B. S.; BEZERRA, T. A.; MARTINS, G. D.; SIQUIEROLI, A. C. S. Early detection of coffee leaf rust caused by *Hemileia vastatrix* using multispectral images. **Agronomy**, Basel, v. 12, n. 12, p. 2911, nov. 2022.

SUN, Y.; WANG, C.; CHEN, H.Y.H.; RUAN, H. Response of plants to water stress: a meta-analysis. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 11, n. 978, jun. 2020.

THOMAZIELLO, Roberto Antonio. **Uso da poda no cafeeiro: por que, quando e tipos utilizados.** 2013. Disponível em: <<https://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/va12-conducao-da-lavoura01.pdf>>. Acessado em: 25 ago. 2021.

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

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

TRIPATHI, D. K.; SINGH, S.; SINGH, S.; MISHRA, S.; CHAUHAN, D. K.; DUBEY, N. K. Micronutrients and their diverse role in agricultural crops: advances and future prospective. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 37, n. 139, p. 1-14, jul. 2015.

USDA - United States Department of Agriculture. **World Agricultural Production.** Whashington D.C: Foreign Agricultural Service/USDA, office of global analysis, 2022. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>>. Acessado em: 18 mar. 2022.

USMAN, M.; FAROOQ, M.; WAKEEL, A.; NAWAZ, A.; CHEEMA, S.A.; REHMAN, H.U.; ASHRAF, I.; SANAUULLAH, M. Nanotechnology in agriculture: Current status, challenges and future opportunities. **Science of the Total Environment**, Amesterdã, v. 721, n. 137778, jun. 2020.

VAN DER VOSSEN, H.; BERTRAND, B.; CHARRIER, A. Next generation variety development for sustainable production of arabica coffee (*Coffea arabica* L.): a review. **Euphytica**, Wageningen, v. 204, n. 2, p. 243– 256, fev. 2015.

VOORTMAN, R.; BINDRABAN, P. S. Beyond N and P: toward a land resource ecology perspective and impactful fertilizer interventions in Sub-Saharan Africa. **VFRC Report 2015/1**. Virtual Fertilizer Research Center, Washington, DC, USA, 2015, 59p.

WANG, W.; HE, A.; PENG, S.; HUANG, J.; CUI, K.; NIE, L. The effect of storage condition and duration on the deterioration of primed rice seeds. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 9, n. 172, fev. 2018.

WAQAS, M.A.; KAYA, C.; RIAZ, A.; LI, Y.E. Potential mechanisms of abiotic stress tolerance in crop plants induced by thiourea. **Frontiers in plant science**, Lausanne, v. 10, n. 1336, out. 2019.

WAQAS, M.; KORRES, N. E.; KHAN, M. D.; NIZAMI, A. S.; DEEBA, F., ALI, I.; HUSSAIN, H. Advances in the concept and methods of seed priming. In: Hasanuzzaman M and Fotopoulos V (eds.) **Priming and Pretreatment of seeds and seedlings**. The Gateway West, Singapore, Springer; 2019. p. 11-41.

WILLIAMS, M. E. Plant Nutrition 3: Micronutrients and metals. **The Plant Cell**, Rockville, v. 27, n. 5, p. 1-20, 2015.

XAVIER, D. A.; FURTADO, G. D. F.; SOUSA JÚNIOR, J. R.; SOUSA, J. R. M.; ANDRADE, E. M. G. Produção de fitomassa do milho sob lâminas de irrigação e adubação nitrogenada. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. Pombal, v. 9, n. 3, p. 144-148, set. 2014.

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

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

ZAMBOLIM, L. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 41, n. 1, p. 1-8, fev. 2016.

ZANDALINAS, S.I.; FICHMAN, Y.; DEVIREDDY, A.R.; SENGUPTA, S.; AZAD, R.K.; MITTLER R. Systemic signaling during abiotic stress combination in plants. **PNAS**, Washington, v. 117, n. 24, jun. 2020.

ZHANG, C.; WANG, X.; ZHANG, F.; DONG, L.; WU, J.; CHENG, Q.; QI, D.; YAN, X.; JIANG, L.; FAN, S.; LI, N.; LI, D.; XU, P.; ZHANG, S. Phenylalanine ammonia-lyase2.1 contributes to the soybean response towards *Phytophthora sojae* infection. **Scientific Reports**, Londres, v. 7, n. 7242, ago. 2017.

CAPÍTULO I

3. CONDICIONAMENTO FISIOLÓGICO DE SEMENTES COM NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA CONTENDO COBRE PROMOVE O CRESCIMENTO INICIAL E DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA DE MUDAS DE MILHO (*Zea mays* L.)¹

RESUMO

As características únicas das nanopartículas podem melhorar a eficácia do condicionamento de sementes com íons metálicos, estimulando o crescimento da planta e a resposta de defesa. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do condicionamento de sementes de milho (*Zea mays* cv. IPR 165) com nanopartículas de quitosana contendo íons cobre (NPCu) no crescimento e na atividade fotossintética de mudas não estressadas, bem como na germinação e resposta antioxidante de sementes sofrendo deterioração causada por alta umidade relativa e temperatura. O condicionamento de sementes com íons de Cu^{2+} ou nanoencapsulado influenciou o desenvolvimento inicial de mudas de milho cultivadas em casa de vegetação, principalmente por aumentar o crescimento da parte aérea e a taxa relativa de transporte linear de elétrons do fotossistema II, comparados ao controle. Nanopartículas de quitosana sem cobre (NP) induziram respostas morfofisiológicas menores. No ensaio de laboratório com sementes submetidas ao estresse, NPCu se destacou por aumentar fortemente a atividade de enzimas antioxidantes. Por outro lado, o condicionamento fisiológico com NP induziu estresse oxidativo nas mudas de milho. Em condições normais de crescimento, íons de Cu^{2+} promoveram o crescimento inicial de mudas de milho independentemente do nanoencapsulamento. Na condição de estresse causada pelo processo de deterioração, o NPCu combinou as propriedades da quitosana com a essencialidade do Cu^{2+} , promovendo a resposta antioxidante enzimática.

Palavras-chave: bioquímica; biodegradável; metais pesados; fisiologia; planta; pré-tratamento.

¹ Artigo publicado. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. <https://doi.org/10.1002/jctb.6738>

INTRODUÇÃO

Espera-se que a demanda por alimentos cresça substancialmente nos próximos 30 anos devido ao aumento constante da população mundial. Os sistemas convencionais de produção agrícola com alto consumo de recursos não podem fornecer alimentos por meio da produção sustentável, portanto, a criação de práticas agrícolas inovadoras que protegem a base de recursos naturais e aumentam a produtividade é de extrema importância (USMAN et al., 2020). Nesse contexto, a nanotecnologia tem sido aplicada na agricultura para aumentar a eficiência de diferentes agroquímicos, visando melhorar a produtividade e a qualidade das lavouras (KUMARASWAMY et al., 2018). Os nanomateriais podem ser utilizados em diferentes etapas da produção agrícola, como armazenamento de sementes (proteção contra patógenos), condicionamento de sementes (melhor viabilidade e envelhecimento controlado), germinação (aumento da velocidade e uniformidade), desenvolvimento inicial (promoção do crescimento), proteção de plantas (controlado liberação e maior eficiência de agrotóxicos) e pós-colheita (aumento da vida útil dos produtos agrícolas) (SHUKLA et al., 2019).

O condicionamento fisiológico das sementes é um tratamento pré-semeadura com hidratação-desidratação das sementes sem permitir a emergência e tem se mostrado uma ferramenta útil para promover uma germinação rápida e uniforme, resultando em melhor qualidade das sementes, estabelecimento de mudas e rendimento da cultura, bem como no aumento da tolerância a estresses ambientais (LUTTS et al., 2016). Atualmente, existem diversas técnicas de condicionamento fisiológico de sementes, amplamente divididas em métodos convencionais e avançados. As técnicas convencionais compreendem hidrocondicionamento, osmocondicionamento, condicionamento nutricional, condicionamento químico, biocondicionamento, preparo com reguladores de crescimento vegetal e preparo com extratos vegetais, enquanto as técnicas avançadas incluem preparo de sementes com nanopartículas e agentes físicos (WAQAS et al., 2019).

O nanopriming é uma abordagem baseada na combinação do condicionamento fisiológico e tratamento com nanopartículas, representando uma técnica eficiente para aumentar a germinação e o crescimento de mudas (MAHAKHAM et al., 2017; ACHARYA et al., 2020). Os mecanismos por trás dessa

combinação estão relacionados às propriedades únicas das nanopartículas, que podem permitir maior penetração no tegumento para liberação de princípios ativos e melhoria na absorção de nutrientes e água pela semente (DUTTA et al., 2018). Várias nanopartículas de metal (FeNPs, AgNPs, TiO₂NPs, AuNPs, CuNPs, FeS₂NPs, ZnNPs, ZnONPs) e à base de carbono (nanotubos de carbono e fulereno) têm sido usadas como agentes de nanopriming, aumentando a germinação de sementes, o crescimento de mudas e a tolerância a condições ambientais adversas (SHUKLA et al., 2019).

Outra possibilidade que tem sido explorada nos últimos anos é o uso de nanopartículas poliméricas contendo nutrientes como agentes do condicionamento fisiológico de sementes. Dentre a grande variedade de materiais, a quitosana é um dos principais polímeros utilizados para sintetizar nanopartículas devido à sua versatilidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade (MINCEA et al., 2012). A quitosana também atua como agente promotor do crescimento vegetal, apresenta propriedades antimicrobianas e pode induzir a resposta de defesa da planta contra o estresse biótico e abiótico (HIDANGMAYUM et al., 2019). Além disso, a quitosana pode facilitar o transporte de compostos ativos através das membranas celulares devido às suas propriedades mucoadesivas (HARISH PRASHANTH & THARANATHAN, 2007).

A quitosana possui alta afinidade pelos íons cobre (Cu²⁺) quando comparada a outros metais, o que permite a obtenção de alta eficiência de encapsulamento (SAHARAN et al., 2015). Além disso, as nanopartículas de quitosana poderiam distribuir melhor o cobre nos tecidos vegetais (PÉREZ-DE-LUQUE, 2017), aumentando a eficácia desse micronutriente no metabolismo vegetal. Alguns estudos relataram que o tratamento de sementes de tomate e milho com nanopartículas de quitosana contendo íons de Cu²⁺ melhorou o crescimento das mudas por induzir a mobilização de reservas de sementes, bem como aumentar a resposta de defesa contra fungos patogênicos (SAHARAN et al., 2015; SAHARAN et al., 2016; CHOUDHARY et al., 2017a; 2017b). No entanto, a adequação das nanopartículas de quitosana contendo íons de Cu²⁺ como agentes do condicionamento fisiológico de sementes para promover a tolerância ao estresse abiótico não foi abordada. Isso é particularmente relevante, pois o processo de condicionamento em si, induz estresse,

que não pode ser eliminado mesmo quando as sementes são secas até a umidade original (CHEN et al., 2013).

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do condicionamento fisiológico de sementes com nanopartículas de quitosana contendo íons de Cu^{2+} sobre o crescimento inicial e a atividade fotossintética de mudas de milho não estressadas em comparação com íons de Cu^{2+} livre e nanopartículas de quitosana sem conter íons de Cu^{2+} . Também analisamos o ganho proporcionado pela nanoencapsulação de Cu^{2+} em melhorar a germinação e a resposta antioxidante de sementes de milho submetidas à deterioração sob alta umidade relativa e temperatura.

MATERIAL E MÉTODOS

Síntese de nanopartículas de quitosana contendo íons Cu^{2+}

Nanopartículas de quitosana contendo Cu^{2+} (NPCu) foram preparadas pelo processo de gelificação ionotrópica (PELEGRINO et al., 2017). Resumidamente, a solução de quitosana (3 mL, 1 mg mL⁻¹) foi preparada em ácido acético a 1% e misturada com uma solução aquosa de CuCl_2 (3 mL, 2,7 mol L⁻¹) em agitação magnética por 90 min à temperatura ambiente (pH ~ 4). Uma solução de TPP (2 mL, 2,4 mg mL⁻¹) foi transferida para um tubo conectado a uma unidade controladora de bomba automática (Marte, MPV-500) e precipitada na solução de quitosana/ CuCl_2 (a uma taxa de fluxo fixa de 132 µL min⁻¹). O volume da solução de TPP seguiu a proporção volumétrica de 3 para 1 (quitosana/ CuCl_2 :TPP). A mistura final foi agitada por 60 min à temperatura ambiente para permitir a formação de NPCu (1000 µg de quitosana mL⁻¹) contendo CuCl_2 em uma concentração final de 1 mmol L⁻¹. Nanopartículas de quitosana sem íons de Cu^{2+} (NP) foram sintetizadas seguindo o mesmo procedimento descrito, sem a adição de CuCl_2 .

Medições do espalhamento dinâmico de luz (DLS)

O diâmetro hidrodinâmico médio (% por intensidade), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta das NPCu foram obtidos por DLS (Nano ZS Zetasizer, Malvern Instruments Co, Reino Unido). As medições foram realizadas em triplicata para dois experimentos independentes (n=6) a 25 °C, usando um ângulo fixo de 173° em células zeta capilares dobradas, descartáveis e com comprimento de caminho de 10 mm em suspensão aquosa (LOPES-OLIVEIRA et al., 2019).

Determinação da eficiência de encapsulamento das nanopartículas de quitosana contendo íons de Cu²⁺

A eficiência de encapsulamento dos íons de Cu²⁺ em nanopartículas de quitosana foi quantificada usando espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) (Agilent 7900, Hachioji, Japão). Os íons Cu²⁺ livres (não encapsulados) foram separados das nanopartículas por ultracentrifugação usando um dispositivo de filtro centrífugo Microcon (MWCO 10.000, Millipore). Para análise de ICP-MS, alíquotas de 50 µL das amostras foram diluídas em 1 mL de solução aquosa de ácido nítrico a 2% (HNO₃). As análises foram realizadas em triplicata, e a porcentagem de íons Cu²⁺ encapsulados foi determinada pela equação (1) (PELEGRINO et al., 2017; ROLIM et al., 2019):

$$\text{Eficiência de encapsulamento (\%)} = 100 \times (\text{Cu}^{2+} \text{ total} - \text{Cu}^{2+} \text{ livre}) / \text{Cu}^{2+} \text{ total} \quad (1)$$

Material biológico e tratamentos

O Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná (IDR, Londrina, PR, Brasil) forneceu as sementes de *Zea mays* cv. IPR 165 usado neste estudo. Os tratamentos foram: água deionizada como controle (CONT), nanopartículas de quitosana/TPP contendo íons de Cu²⁺ (NPCu), nanopartículas de quitosana/TPP sem íons de Cu²⁺ (NP) e íons de Cu²⁺ livre (Cu). Antes do início dos tratamentos nas sementes destinadas aos testes de laboratório, o tegumento foi esterilizado com hipoclorito de sódio 2% por 3 min sob imersão e agitação, e em seguida lavado cinco

vezes com água deionizada para evitar a proliferação de microrganismos no tegumento durante o processo de envelhecimento acelerado.

Com base nos resultados de um teste dose-resposta anterior, as formulações de NPCu e Cu foram diluídas com água para obter $0,0625 \text{ mmol L}^{-1}$ de íons de Cu^{2+} . Seguindo a mesma diluição no caso do tratamento NP. As sementes foram tratadas por imersão, sendo a proporção do volume da formulação calculada em função da umidade inicial da semente (12%). No total, 50 sementes foram acondicionadas em potes plásticos herméticos de 60 mL, e cada tratamento foi aplicado com 2,5 mL da formulação, elevando a umidade das sementes para 22%. Os potes plásticos contendo as sementes foram agitados continuamente a 200 rpm em um agitador circular horizontal TS-2000A (Benchmark, Edison, NJ, EUA). Após a absorção das formulações, as sementes foram secas em temperatura ambiente por 12 h.

Experimento de casa de vegetação

Foi conduzido um experimento em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Biologia Animal e Vegetal (Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil), para avaliar o desenvolvimento inicial de mudas de milho provenientes das sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com os tratamentos anteriormente descritos. Copos de isopor de 946 mL (15,2 cm de altura x 12,2 cm de diâmetro) preenchidos com areia e, contendo duas mudas de milho, foram usados como unidade experimental (10 repetições). Imediatamente após a semeadura das sementes nos copos, foram adicionados 50 mL de água. Posteriormente, 50 mL de água foram aplicados quando necessário para evitar a dessecação (quase a cada dois dias). As plantas foram mantidas em condições de sombreamento parcial (50%) e temperatura natural. A temperatura média do ar e a umidade relativa do ar durante o experimento foram $24,6 \pm 2,81 \text{ }^\circ\text{C}$ e 59,1%, respectivamente (dados cedidos pela estação meteorológica do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná – IDR, Londrina, PR, Brasil). As temperaturas médias mínimas e máximas diárias foram de $18,6 \pm 1,82 \text{ }^\circ\text{C}$ e $31,6 \pm 3,95 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Aos 12 dias após a semeadura (DAS), as mudas receberam 50 mL de solução nutritiva ($1,6 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KNO}_3$, $0,8 \text{ mmol L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $0,4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $0,8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}_2\text{SO}_4$, $0,8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,

0,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 92 $\mu\text{mol L}^{-1}$ H_3BO_3 , 18 $\mu\text{mol L}^{-1}$ $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 42 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ZnCl_2 e 0,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), em vez de água.

As variáveis de trocas gasosas foram medidas aos 24 DAS, quando as mudas estavam no estágio V3 e, a folha mais jovem totalmente expandida, preenchia a câmara de medição 6400-02B de um analisador de gás infravermelho portátil LI-6400 XT (LI-COR[®] Biosciences, Lincoln, NE, EUA). As medições foram realizadas das 9:00 h às 11:30 h, utilizando radiação fotossinteticamente ativa saturante ($\text{PAR} = 1.500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e a taxa de fluxo de 500 mL min^{-1} . A taxa fotossintética líquida (A) e a condutância estomática (g_s) foram determinadas, e a eficiência intrínseca do uso da água (EIUA) foi calculada como A/g_s .

Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* foram medidos em folhas intactas usando um fluorômetro portátil OS1p (Opti-Sciences, Hudson, NY, EUA). O rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) foi medido ao amanhecer em folhas adaptadas ao escuro (BAKER, 2008). O rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\Delta F/F_m'$) foi medido às 10h30 em folhas adaptadas à luz ($\text{PAR} = 1.050 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no momento das análises) e taxa relativa de transporte linear de elétrons do fotossistema II (rETR) foi calculado como (BAKER, 2008):

$$\text{rETR} = \Delta F/F_m' \times \text{PAR} \times 0,5 \times 0,84 \quad (2)$$

Para as variáveis biométricas, foi utilizada a média das duas mudas como valor de cada repetição. Aos 24 DAS foram obtidos o peso seco da parte aérea (MSPA), comprimento de raiz (CR), peso seco de raiz (MSR) e área foliar (AF). Para o comprimento da parte aérea (CPA), os valores foram obtidos aos 9, 16 e 23 DAS em escala (desde o nível do substrato até a junção da última folha expandida). A AF foi medida com um medidor portátil de área foliar LI-3000C (LI-COR[®] Biosciences, Lincoln, NE, EUA). Para determinação do peso seco, o material vegetal foi separado em parte aérea e raízes e mantido a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ até atingir peso constante.

Experimento de laboratório

Foi conduzido um experimento no Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Agronomia (Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil) para avaliar o efeito protetor do condicionamento fisiológico contra a

deterioração das sementes. Para isso, sementes previamente submetidas ao condicionamento fisiológico com os tratamentos descritos anteriormente, foram utilizadas no teste de envelhecimento acelerado (MARCOS FILHO, 1999). Durante esse processo, as sementes são expostas a alta temperatura (42 °C) e umidade relativa do ar (próxima a 100%), o que aumenta consideravelmente o índice de deterioração (MONTEIRO et al., 2017; SILVA et al., 2020). As sementes foram distribuídas em camada única pelo método da caixa plástica (Gerbox[®]; 11 x 11 x 3 cm). Após a adição de água deionizada (40 mL) ao fundo das caixas plásticas, elas foram mantidas em câmara de envelhecimento acelerado a 42 °C por 72 h. Quatro repetições de 25 sementes envelhecidas foram então distribuídas em papéis de germinação (Germitest) umedecidos com água destilada (2,5 vezes a massa do papel seco). Um tratamento extra com sementes não condicionadas que não passaram pelo envelhecimento acelerado (TEST) foi adicionado para comparação. Os rolos de papel foram mantidos em câmara de germinação Mangelsdorf (5500-6J.Prolab, Dsylab, Paraná, Brasil) na posição vertical a 25 °C por sete dias.

Ao final do experimento, foram avaliados o percentual de germinação e a massa seca de plântulas (MSP). Foram coletados 0,1 g de material vegetal por repetição, selecionando a muda ao acaso e imediatamente imergindo o material em nitrogênio líquido. O material ficou armazenado a -80 °C até a utilização para as avaliações bioquímicas. Parâmetros que indicam a ocorrência de estresse oxidativo foram medidos por meio da determinação do teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malondialdeído (MDA), seguindo as metodologias descritas por Alexieva et al. (2001) e Camejo et al. (1998), respectivamente.

Para determinar as atividades das enzimas antioxidantes, as amostras foram homogeneizadas em 1 mL de tampão de extração (1 mmol L⁻¹ EDTA, tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,5, 2% polivinil-polipirrolidona, g L⁻¹) seguido de centrifugação a 15.645x g (4 °C por 20 minutos). A atividade da ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) foi determinada de acordo com Nakano e Asada (1981), monitorando o consumo de ascorbato a 290 nm na presença de H₂O₂. A atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi determinada segundo Aebi (1984), Anderson et al. (1995) e Peixoto et al. (1999), acompanhando a diminuição da absorvância de H₂O₂ em 240 nm. A atividade da peroxidase (POD, EC 1.11.1.7) foi determinada segundo Peixoto et al. (1999), acompanhando o aumento da absorvância em 420 nm

decorrente da oxidação do pirogalol na presença de H_2O_2 . A atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) foi determinada de acordo com Giannopolitis e Ries (1977), medindo a capacidade do extrato em inibir a fotorredução do cloreto de azul nitro de tetrazólio.

Análises estatísticas

Para ambas as condições, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Primeiramente, aplicamos testes e análises gráficas dos resíduos para verificar normalidade, homogeneidade de variância e independência. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F e, quando significativos, as médias foram comparadas pelo teste LSD ($p < 0,05$). As análises foram realizadas com auxílio do programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2020), utilizando o pacote estatístico ExpDes.pt.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

DLS e eficiência de encapsulamento das nanopartículas de quitosana contendo íons de Cu^{2+}

As análises de DLS mostraram que NPCu tem um tamanho hidrodinâmico de $174,2 \pm 1,5$ nm, PDI de $0,43 \pm 0,01$ e potencial zeta de $28,8 \pm 2,0$ mV. A Figura 1 mostra a curva de correlação obtida por medições de DLS, na qual decai em *ca.* 10^3 μ s. A ausência de distúrbios sugere uma boa correlação para esta medida. O ICP-MS revelou uma eficiência de encapsulamento de íons de Cu^{2+} em nanopartículas de quitosana de $97,6 \pm 0,2\%$.

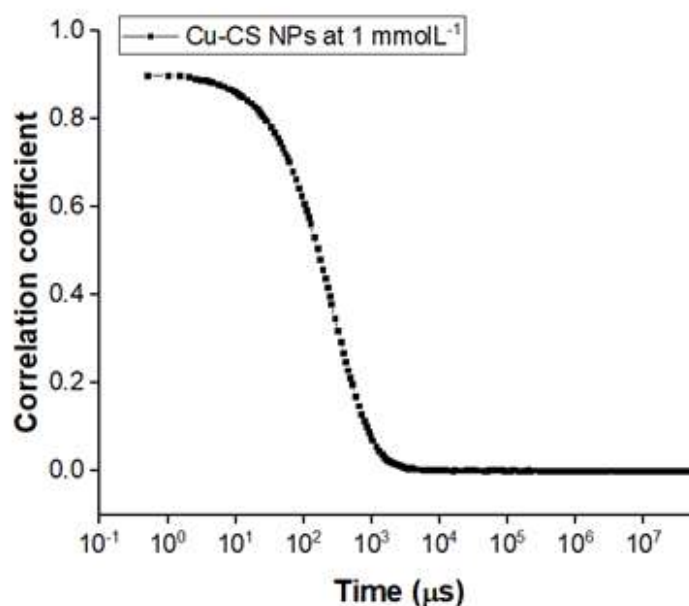


Figura 1 Curva de correlação de nanopartículas de quitosana contendo íons de Cu²⁺, obtida por medição do espalhamento dinâmico de luz. A concentração de Cu²⁺ nas nanopartículas foi de 1 mmol L⁻¹.

Esses resultados indicam a formação de partículas em nanoescala com PDI moderado a baixo e valor de potencial zeta positivo devido aos grupos amino da quitosana. A magnitude do valor do potencial zeta sugere estabilidade considerável da suspensão coloidal. Além disso, observamos alta eficiência de encapsulamento de Cu²⁺ em nanopartículas de quitosana. Essas nanopartículas são formadas por interações eletrostáticas de quitosana, TPP e Cu²⁺, e a alta eficiência de encapsulamento dos íons pode ser atribuída a suas interações positivas. A quitosana é conhecida por ter uma alta afinidade por metais, incluindo cobre (INOUE et al., 1993; NGAH et al., 2002), e a deposição de cobre na superfície porosa das nanopartículas de quitosana tem sido observada (SAHARAN et al., 2015; CHOUDHARY et al., 2017b). Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores que descrevem a preparação de nanopartículas de quitosana carregadas com Cu²⁺ para aplicações agrícolas (CHOUDHARY et al., 2017b).

Experimento de casa de vegetação

Para o desenvolvimento inicial de mudas de milho em casa de vegetação, detectamos diferenças significativas no CPA a partir de 9 DAS (Fig. 2). Ambos os tratamentos com cobre (NPCu; Cu) apresentaram maior CPA do que NP e

CONT aos 9 e 16 DAS. No entanto, apenas NPCu resultou em maior CPA do que CONT aos 23 DAS.

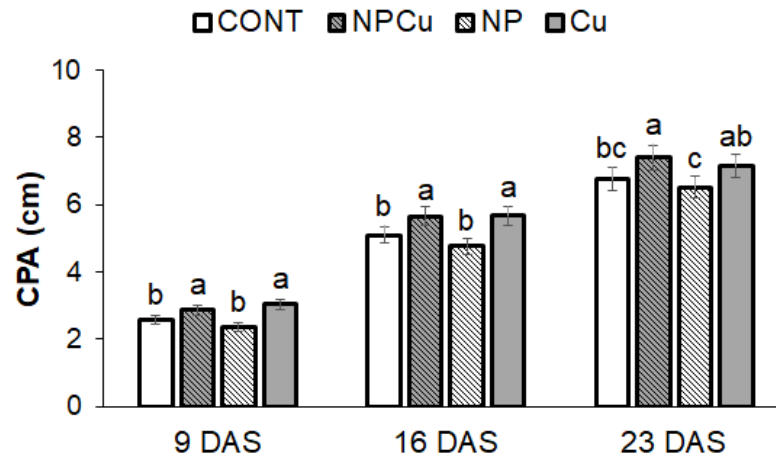


Figura 2 Comprimento da parte aérea (CPA) de mudas de milho (*Zea mays* cv. IPR 165) desenvolvidas a partir de sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada, como controle (CONT); nanopartículas de quitosana/TPP contendo íons de Cu^{2+} (NPCu); nanopartículas de quitosana/TPP (NP) e íons de Cu^{2+} (Cu). O CPA foi medido aos 9, 16 e 23 dias após a semeadura (DAS). Os dados representam a média \pm SE ($n = 10$). Letras diferentes acima das colunas indicam valores significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ($p < 0,05$).

NPCu também aumentou AF em 15% em comparação com CONT, enquanto NP diminuiu esse parâmetro (Fig. 3a). NPCu e Cu apresentaram maior MSPA do que NP (cerca de 22%), mas apenas Cu levou a aumento de MSPA em comparação com CONT (Fig. 3b). O CR foi 9% maior em plantas NP do que em CONT (Fig. 3c). Em relação ao MSR, não houve diferenças significativas entre os tratamentos (Fig. 3d).

Esses resultados sugerem que o condicionamento fisiológico de sementes com íons de Cu^{2+} livre ou nanoencapsulado, impactaram positivamente o crescimento inicial de mudas de milho, mesmo que o meio de cultivo incluísse esse elemento. Pode-se supor que esses tratamentos aumentaram a disponibilidade de Cu em locais de alta demanda por esse micronutriente. Corroborando, foi observado que o condicionamento de sementes com sulfato de cobre (CuSO_4) melhora o estabelecimento do estande de milho, o rendimento de grãos de trigo e a germinação de *Brassica rapa* (MONDAL & BOSE, 2019).

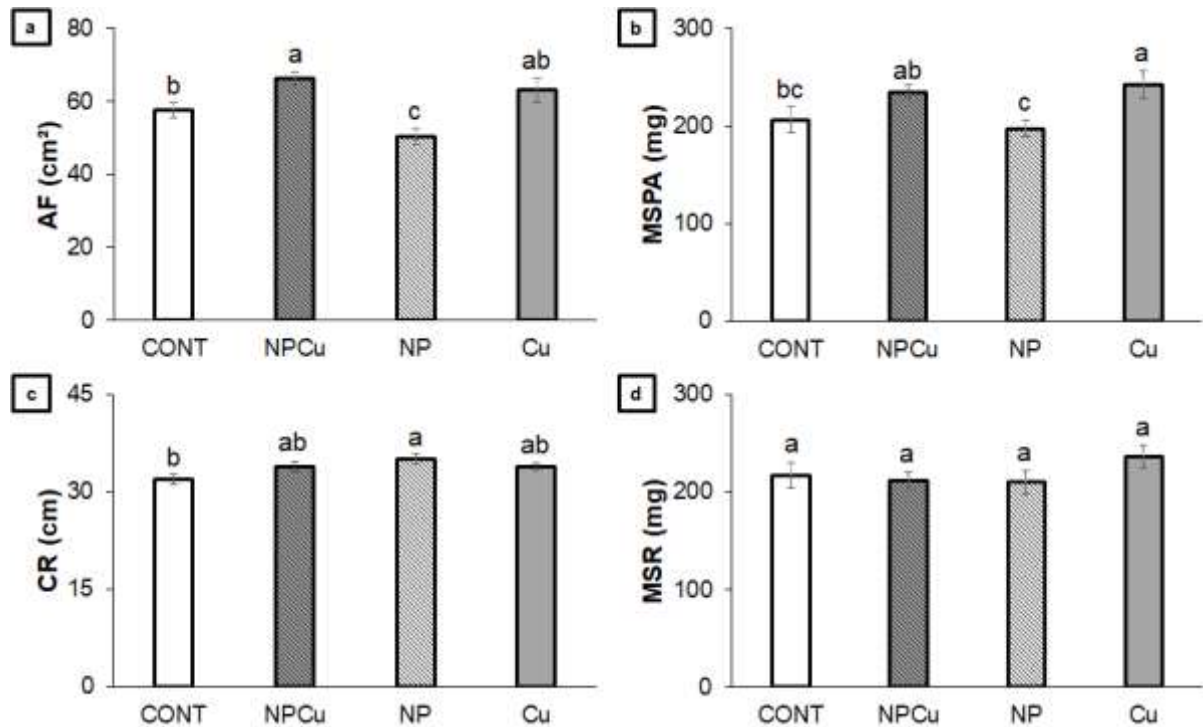


Figura 3 Área foliar (AF) (a), peso seco da parte aérea (MSPA) (b), comprimento da raiz (CR) (c) e peso seco da raiz (MSR) (d) de mudas de milho (*Zea mays* cv. IPR 165) desenvolvidas a partir de sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada, como controle (CONT); nanopartículas de quitosana/TPP contendo íons de Cu^{2+} (NPCu); nanopartículas de quitosana/TPP (NP) e íons de Cu^{2+} (Cu). Os parâmetros foram medidos com 24 dias após a semeadura. Os dados representam a média \pm SE ($n = 10$). Letras diferentes acima das colunas indicam valores significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ($p < 0,05$).

Neto et al. (2020) verificaram que nanopartículas de CuO promoveram maior acúmulo de biomassa em mudas de milho do que CuO e CuCl_2 , sugerindo que o nanopriming é uma alternativa mais eficiente para a entrega de micronutrientes. Além disso, Choudhary et al. (2017a) demonstraram que as sementes tratadas com nanopartículas de quitosana contendo íons de Cu^{2+} proporcionaram maior crescimento das plantas em comparação com tratamentos com CuSO_4 e quitosana. Este efeito foi relacionado à estimulação das atividades de α -amilase e protease, levando a uma mobilização mais significativa das reservas das sementes. Em contraste com esses estudos anteriores (nos quais o crescimento das mudas ocorreu *in vitro* em um meio sem cobre), aqui, íons de Cu^{2+} livre e nanoencapsulado melhoraram de forma semelhante o crescimento da parte aérea das mudas de milho. Em outro estudo *in vivo*, o nanopriming de sementes com nanopartículas de quitosana contendo íons de Cu^{2+} combinadas com uma pulverização foliar do mesmo tratamento, foi mais eficiente do que o Cu^{2+} livre em melhorar o crescimento e rendimento do milho (Choudhary et al. 2017b). No entanto, não está claro se o ganho

proporcionado pela nanoencapsulação foi mais relacionado ao nanopriming da semente ou do tratamento foliar.

Apesar de possuir atividade promotora do crescimento vegetal, as respostas biológicas desencadeadas pela quitosana dependem de sua concentração, da espécie vegetal e do estágio de desenvolvimento (HIDANGMAYUM et al., 2019). Foi detectado apenas efeitos menores proporcionado pelo NP aos parâmetros biométricos avaliados, sugerindo que a concentração de quitosana aplicada não foi ideal para o milho. Assim, os efeitos do NPCu no crescimento do milho provavelmente estão relacionados à nanoencapsulação de Cu^{2+} e não à quitosana em si.

Alguns parâmetros fisiológicos das mudas de milho foram avaliados para verificar se estes, poderiam estar relacionados ao crescimento melhorado induzido pelo condicionamento fisiológico das sementes. Enquanto F_v/F_m não mostrou mudanças significativas entre os tratamentos (Fig. 4a), NPCu e Cu aumentaram a rETR de mudas de milho em comparação com NP (Fig. 4b).

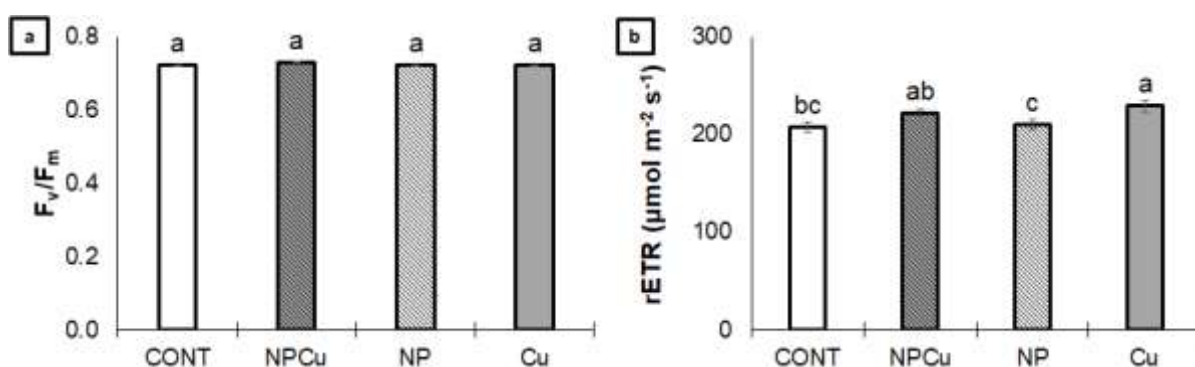


Figura 4 Rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) (a) e taxa relativa de transporte linear de elétrons do fotossistema II (rETR) (b) de mudas de milho (*Zea mays* cv. IPR 165) desenvolvidas a partir de sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada, como controle (CONT); nanopartículas de quitosana/TPP contendo íons de Cu^{2+} (NPCu); nanopartículas de quitosana/TPP (NP) e íons de Cu^{2+} (Cu). Os parâmetros foram medidos com 24 dias após a semeadura. Os dados representam a média \pm SE ($n = 10$). Letras diferentes acima das colunas indicam valores significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ($p < 0,05$).

Além disso, o Cu se destacou por promover um aumento de 10% no rETR em relação ao CONT. Essa estimulação da rETR está de acordo com a alta demanda de cobre pela cadeia de transporte de elétrons no fotossistema II (YRUELA, 2013). O cobre é um componente da plastocianina, que é a proteína contendo cobre mais abundante nos cloroplastos e desempenha um papel vital na transferência de elétrons durante as reações fotossintéticas de luz (YRUELA, 2009). De fato, Pradhan

et al. (2015) demonstraram os efeitos positivos das nanopartículas de Cu na cadeia de transporte de elétrons e na fotofosforilação de plantas de feijão moyashi (*Vigna radiata*), associados a um melhor crescimento.

Ao avaliar os parâmetros de trocas gasosas, foi observado que A e EIUA não diferiram entre os tratamentos, mas houve reduções significativas na g_s induzida por NPCu e NP (11 e 13%, respectivamente, em relação ao CONT) (Fig. 5).

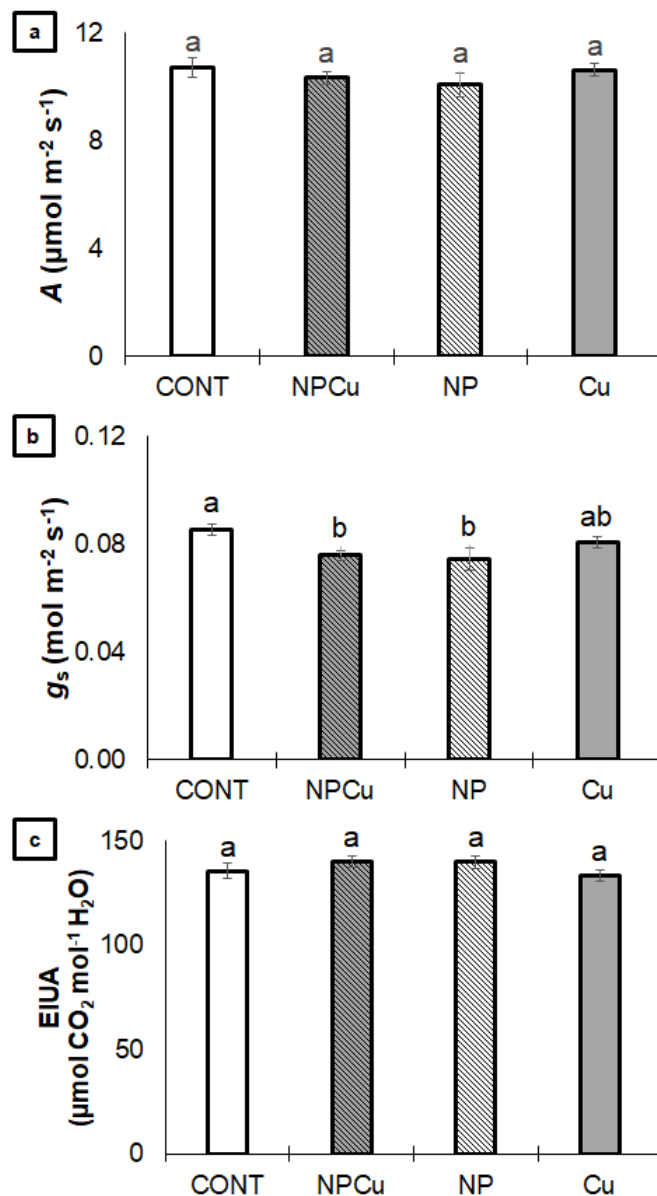


Figura 5 Taxa fotossintética líquida (A) (a), condutância estomática (g_s) (b) e eficiência intrínseca no uso da água (EIUA) (c) de mudas de milho (*Zea mays* cv. IPR 165) desenvolvidas a partir de sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada, como controle (CONT); nanopartículas de quitosana/TPP contendo íons de Cu^{2+} (NPCu); nanopartículas de quitosana/TPP (NP) e íons de Cu^{2+} (Cu). Os parâmetros foram medidos com 24 dias após a semeadura. Os dados representam a média \pm SE ($n = 10$). Letras diferentes acima das colunas indicam valores significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ($p < 0,05$).

Embora os tratamentos não tenham alterado a assimilação de CO₂ por área foliar, o NPCu foi o único a aumentar a AF (Fig. 3a), o que significa maior fotossíntese total por planta. A diminuição de g_s em plantas tratadas com NPCu e NP está de acordo com os efeitos antitranspirantes da quitosana (KUMARASWAMY et al., 2018; HIDANGMAYUM et al., 2019). Em condições normais e de estresse, o teor de ácido abscísico aumenta nas folhas pulverizadas com quitosana, levando ao fechamento dos estômatos. No entanto, a quantidade de quitosana fornecida pelo condicionamento fisiológico das sementes não induziu ao fechamento drástico dos estômatos nas mudas de milho, mantendo o EIUA inalterado em comparação com o controle.

Experimento de laboratório

O teste de envelhecimento acelerado sob alta umidade relativa e temperatura é amplamente utilizado para avaliar o vigor de sementes. Essa técnica induz estresse severo em diferentes espécies vegetais, impondo redução significativa na germinação das sementes (SANTOS et al., 2003; DE MORAIS & ROSSETTO, 2013; PEREIRA et al., 2015). Utilizando sementes de milho, Zucareli et al. (2011) obtiveram redução média de 60% na germinação após o teste de envelhecimento acelerado. No presente estudo, aplicamos os tratamentos de condicionamento fisiológico das sementes antes do teste de envelhecimento acelerado para avaliar se os tratamentos poderiam proteger as sementes do processo de deterioração. Como esperado, a porcentagem de germinação foi baixa em todos os tratamentos em comparação com as sementes que não passaram pelo processo de envelhecimento acelerado (tratamento TEST) (Fig. 6a). Embora não sendo possível detectar diferenças significativas entre as sementes envelhecidas, NPCu e Cu tenderam a aumentar a porcentagem de germinação e, NP, a de redução em relação ao CONT. NPCu e Cu também apresentaram maior MSP do que NP (cerca de 40%), mas não diferiram de CONT e TEST (Fig. 6b).

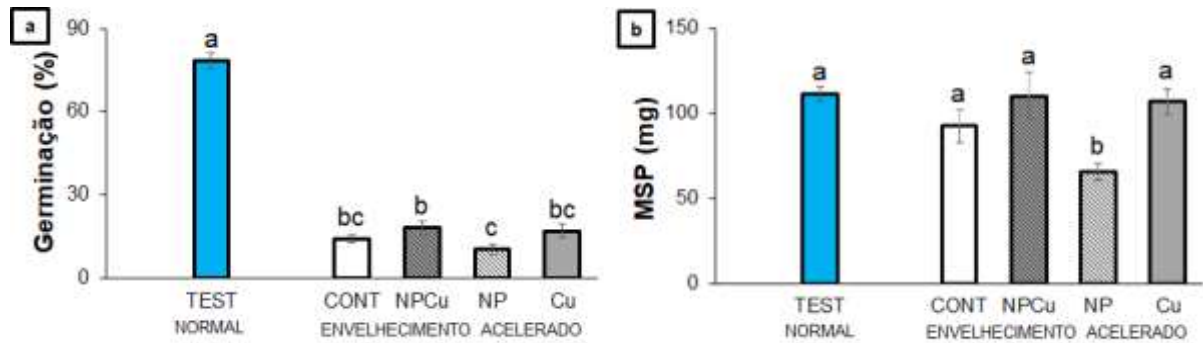


Figura 6 Germinação (%) (a) e peso seco de plântulas (MSP) (b) de milho (*Zea mays* cv. IPR 165) desenvolvidas a partir de sementes não submetidas ao condicionamento fisiológico e que não passaram pelo teste de envelhecimento acelerado (TEST), sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada, como controle (CONT); nanopartículas de quitosana/TPP contendo íons de Cu^{2+} (NPCu); nanopartículas de quitosana/TPP (NP) e íons de Cu^{2+} (Cu). Os parâmetros foram medidos sete dias após as sementes condicionadas terem sido submetidas ao envelhecimento acelerado sob alta umidade e temperatura. Os dados representam a média \pm SE ($n = 4$). Letras diferentes acima das colunas indicam valores significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ($p < 0,05$).

Além de apresentar o menor MSP, NP quase dobrou os níveis de H_2O_2 e MDA de mudas de milho em comparação com os outros tratamentos (Fig. 7a, 7b). NPCu e Cu não alteraram essas variáveis em comparação com CONT e TEST. Embora o H_2O_2 possa atuar como uma molécula sinalizadora que regula a expressão de vários genes envolvidos no processo germinativo (EL-MAAROUF-BOUTEAU et al., 2013), o aumento acentuado de seu conteúdo induzido pela NP provavelmente está associado ao estresse oxidativo, como sugerido pelo aumento do conteúdo de MDA (um marcador de peroxidação lipídica). Geralmente, o nanopriming induz o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) após a internalização das nanopartículas através do revestimento da semente, levando a várias reações em cascata (GUHA et al., 2018). O tratamento com quitosana pode induzir a produção de diferentes mensageiros intracelulares, como H_2O_2 , Ca^{2+} e óxido nítrico, que atuam nas respostas de sinalização de estresse (HIDANGMAYUM et al., 2019). No entanto, o estresse severo aplicado provavelmente excedeu a capacidade de sinalização da quitosana, resultando em dano oxidativo, o que não ocorreu no tratamento com NPCu.

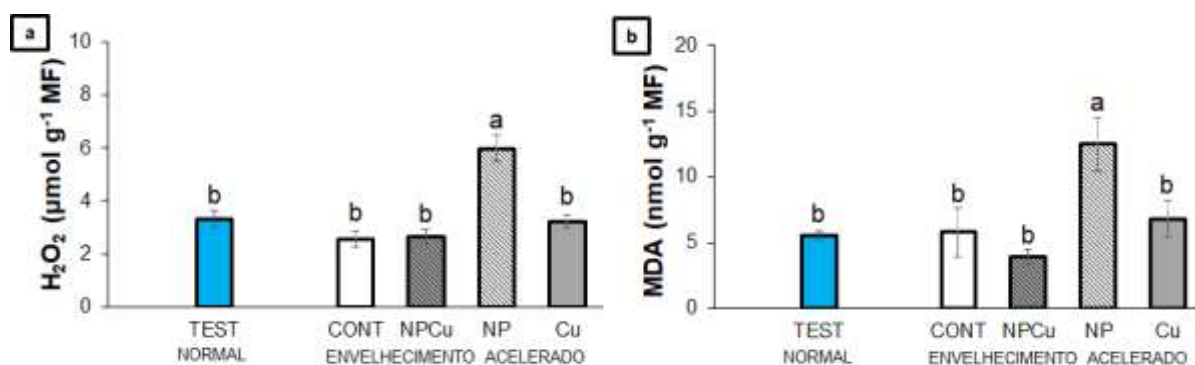


Figura 7 Teores de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (a) e malondialdeído (MDA) (b) de mudas de milho (*Zea mays* cv. IPR 165) desenvolvidas a partir de sementes não submetidas ao condicionamento fisiológico e que não passaram pelo teste de envelhecimento acelerado (TEST), sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada, como controle (CONT); nanopartículas de quitosana/TPP contendo íons de Cu²⁺ (NPCu); nanopartículas de quitosana/TPP (NP) e íons de Cu²⁺ (Cu). Os parâmetros foram medidos sete dias após as sementes condicionadas terem sido submetidas ao envelhecimento acelerado sob alta umidade e temperatura. Os dados representam a média ± SE (*n* = 4). Letras diferentes acima das colunas indicam valores significativamente diferentes de acordo com o teste LSD (*p* < 0,05).

O envelhecimento acelerado reduziu a atividade de SOD em comparação com TEST, com exceção das sementes tratadas com NPCu, que mostraram maior atividade de SOD (Fig. 8a). Da mesma forma, NPCu estimulou a atividade de POD em cerca de 1,4 vezes em comparação com TEST, 2,6 vezes em comparação com CONT e Cu e 6 vezes em comparação com NP (Fig. 8b). Exceto para NPCu, todas as outras sementes envelhecidas (CONT, Cu e NP) apresentaram menor atividade da POD em relação ao tratamento TEST. O Cu foi o único tratamento que diminuiu a atividade de APX (25%) em comparação com TEST (Fig. 8c). NP e Cu reduziram a atividade de APX em relação a CONT (29 e 33%, respectivamente), enquanto NPCu não diferiu de CONT. O CONT aumentou a atividade da CAT (30%) em comparação ao TEST (Fig. 8d). Em contraste, os tratamentos NPCu e Cu diminuiram a atividade de CAT em comparação com CONT (37 e 41%, respectivamente).

No geral, esses resultados sugerem que a associação de nanopartículas de quitosana com íons de Cu²⁺ otimizou a maquinaria enzimática antioxidante das mudas de milho desenvolvidas sob estresse. Da mesma forma, Choudhary et al. (2017b) relataram que o nanoprimering de sementes juntamente com a pulverização foliar com nanopartículas de quitosana contendo íons de Cu²⁺ induziram maiores atividades de SOD e POD do que o tratamento somente com quitosana, quando pulverizados nas folhas de milho. Ambas as enzimas têm papéis

importantes nas respostas das plantas a estresses bióticos e abióticos. A SOD é uma enzima chave que remove o ânion superóxido, enquanto a POD remove os peróxidos (incluindo H_2O_2) (HIDANGMAYUM et al., 2019). Vale ressaltar que a isoforma SOD estromal possui Cu em sua constituição (YRUELA, 2009).

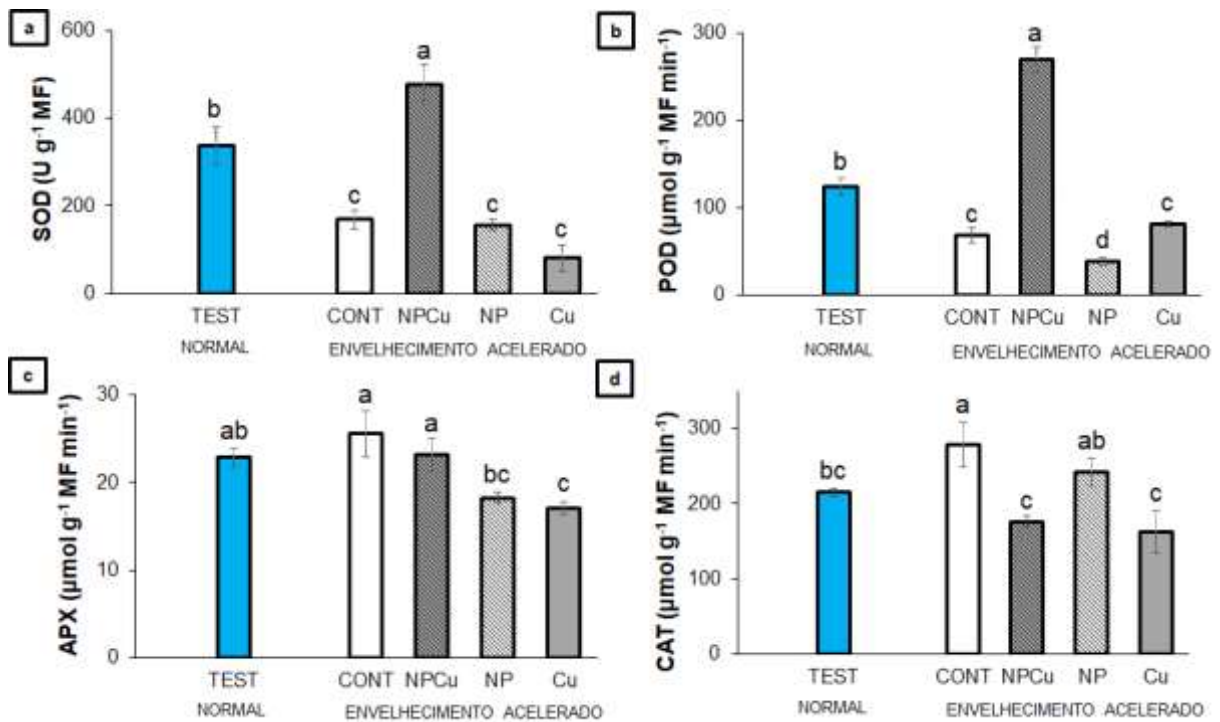


Figura 8 Atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) (a), peroxidase (POD) (b), ascorbato peroxidase (APX) (c) e catalase (CAT) (d) de mudas de milho (*Zea mays* cv. IPR 165) desenvolvidas a partir de sementes não submetidas ao condicionamento fisiológico e que não passaram pelo teste de envelhecimento acelerado (TEST), sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada, como controle (CONT); nanopartículas de quitosana/TPP contendo íons de Cu^{2+} (NPCu); nanopartículas de quitosana/TPP (NP) e íons de Cu^{2+} (Cu). Os parâmetros foram medidos sete dias após as sementes condicionadas terem sido submetidas ao envelhecimento acelerado sob alta umidade e temperatura. Os dados representam a média \pm SE ($n = 4$). Letras diferentes acima das colunas indicam valores significativamente diferentes de acordo com o teste LSD ($p < 0,05$).

Alguns estudos anteriores demonstraram a ativação da SOD e CAT em diversas sementes submetidas ao nanopriming e cultivadas em condição sem estresse (CHANDRASEKARAN et al., 2020). No presente estudo, a diminuição da atividade da CAT pode ser explicada pela alteração na síntese ou montagem das subunidades enzimáticas em condições estressantes (VERMA & DUBEY, 2003; SRIVASTAVA et al., 2006). Além disso, a concentração de cobre contida nos tratamentos NPCu e Cu pode ter sido suficiente para inibir a atividade da CAT. Ye et al. (2014) demonstraram que o excesso de cobre inibe a atividade da CAT em sementes descascadas de arroz (*Oryza sativa* L. cv. Yangdao 6) devido à supressão

da expressão do gene *OsCATa*. Apesar de diminuir a atividade CAT, NPCu permitiu a manutenção da atividade APX semelhante ao visualizado no tratamento CONT. A APX também desempenha um papel crucial na desintoxicação de ROS durante condições estressantes, tendo maior afinidade por H₂O₂ do que a CAT (TIWARI & SARANGI, 2015). Em contraste, o Cu inibiu as atividades de CAT e APX.

Em conjunto, esses resultados demonstram os benefícios da nanoencapsulação dos íons de Cu²⁺ na regulação de enzimas antioxidantes em sementes de milho submetidas a estresse abiótico. No tratamento NPCu, a associação entre íons de Cu²⁺ e quitosana garantiu maior bioatividade do que os compostos separados, quando submetidos a condição de estresse severo. Saharan et al. (2015) demonstraram que as nanopartículas de quitosana possuem poros nos quais os íons de Cu²⁺ adere, prolongando o contato das células vegetais com o Cu²⁺. A quitosana também possui propriedades mucoadesivas, melhorando o transporte de compostos ativos através das membranas celulares e sua distribuição nos tecidos vegetais (HARISH PRASHANTH & THARANATHAN, 2007).

CONCLUSÃO

Sob condições favoráveis, o condicionamento fisiológico de sementes com íons de Cu²⁺ livre ou nanoencapsulado influenciou positivamente o desenvolvimento inicial de mudas de milho, principalmente promovendo o crescimento da parte aérea e maior taxa relativa de transporte linear de elétrons do fotossistema II. Na condição estressante causada pelo processo de deterioração das sementes, as nanopartículas de quitosana contendo íons de Cu²⁺ se destacaram em relação aos íons de Cu²⁺ livre na ativação da resposta antioxidante enzimática. Nanopartículas de quitosana/TPP sem cobre promoveram apenas efeitos morfofisiológicos menores em condições normais e, sob condição de estressante, induziram ainda mais estresse oxidativo nas sementes de milho submetidas à deterioração acelerada.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, P.; JAYAPRAKASHA, G. K.; CROSBY, K. M.; JIFON, J. L.; PATIL, B.S. Nanoparticle-mediated seed priming improves germination, growth, yield, and quality of watermelons (*Citrullus lanatus*) at multi-locations in Texas. **Scientific Reports**, Londres, v. 10, n. 5037, mar. 2020.
- AEBI H. In: Catalase *in vitro*. In: Colowick, S. P.; Kaplan, N. O. (eds.). **Methods in Enzymology**, Florida, USA, Acad. Press, 1984. p. 114–121.
- ALEXIEVA, V; SERGIEV, I; MAPELLI, S; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 1337-1344, dez. 2001.
- ANDERSON, M. D.; PRASAD, T. K. STEWART, C. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology**, Lancaster v. 109, n. 4, p. 1247-1257, dez. 1995.
- BAKER, N. R. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of photosynthesis *in vivo*. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 89–113, jun. 2008.
- CAMEJO, G.; WALLIN, B.; ENOJÄRVI, M. Analyses of oxidation and antioxidants using microtiter plates. In: AMSTRONG, D. (ed.). **Free Radical and Antioxidants Protocols**. Mölndal, Sweden, Humana Press, 1998. p. 377–387.
- CHANDRASEKARAN, U.; LUO, X.; WANG, Q.; SHU, K. Are There Unidentified Factors Involved in the Germination of Nanoprimered Seeds? **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 11, n. 832, jun. 2020.
- CHEN, K.; ARORA, R. Priming memory invokes seed stress-tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, Amesterdã, v. 94, p. 33-45, out. 2013.
- CHOUDHARY R. C.; JOSHI, A.; KUMARI, S.; KUMARASWAMY, R. V.; SAHARAN, V. Preparation of Cu-chitosan nanoparticle and its effect on growth and enzyme activity during seed germination in maize. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, New Delhi, v. 6, n. 4, p. 669-673, 2017a.
- CHOUDHARY, R. C., KUMARASWAMY, R. V., KUMARI, S., SHARMA S. S, PAL, A., RALIYA R., BISWAS, P.; SAHARAN V. Cu-chitosan nanoparticle boost defense responses and plant growth in maize (*Zea mays* L.). **Scientific Reports**, Londres, v. 7, n. 9754, ago. 2017b.
- de MORAIS, C. S. B.; ROSSETTO, C. A. V. Tests of controlled deterioration and accelerated ageing to assess vigour in the wild radish. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 44, n. 4, p. 703-713, dez. 2013.

DUTTA, P. Seed priming: New vistas and contemporary perspectives. In: RAKSHIT, A.; Singh, H. B. (eds.). **Advances in seed priming**. The Gateway West, Singapore, Springer, 2018. p. 3-22.

EL-MAAROUF-BOU TEAU, H.; MEIMOUN, P.; JOB, C.; JOB, D.; BAILLY, C. Role of protein and mRNA oxidation in seed dormancy and germination. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, n. 77, abr. 2013.

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

GUHA, T.; RAVIKUMAR, K. V. G.; MUKHERJEE, A.; MUKHERJEE, A.; KUNDU, R. Nanopriming with zero valent iron (nZVI) enhances germination and growth in aromatic rice cultivar (*Oryza sativa* cv. Gobindabhog L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, Amesterdã, v. 127, p. 403-413, jun. 2018.

HARISH PRASHANTH, K. V.; THARANATHAN, R. N. Chitin/chitosan: Modifications and their unlimited application potential: An overview. **Trends in Food Science & Technology**, Amesterdã, v. 18, n. 3, p. 117-131, mar. 2007.

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

INOUE, K.; BABA, Y.; YOSHIZUKA, K. Adsorption of metal ions on chitosan and crosslinked copper (II)-complexed chitosan. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, Tokyo, v. 66, n. 10, p. 2915-2921, ago. 1993.

KUMARASWAMY, R. V.; KUMARI, S.; CHOUDHARY, R. C.; PAL, A.; RALIYA, R.; BISWAS, P.; SAHARAN, V. Engineered chitosan-based nanomaterials: Bioactivities, mechanisms and perspectives in plant protection and growth. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amesterdã, v. 113, p. 494-506, jul. 2018.

LOPES-OLIVEIRA, P. J.; GOMES, D. G.; PELEGRINO, M. T.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; STOLF-MOREIRA, R.; SEABRA, A. B.; OLIVEIRA, H. C. Effects of nitric oxide-releasing nanoparticles on neotropical tree seedlings submitted to acclimation under full sun in the nursery. **Scientific Reports**, Londres, v. 9, n. 17371, nov. 2019.

LUTTS, S.; BENINCASA, P.; WOJTYLA, L.; KUBALA, S. S.; PACE, R.; LECHOWSKA, K.; QUINET, M.; GARNCZARSKA, M. Seed Priming: New comprehensive approaches for an old empirical technique. In: ARAUJO, S.; BALESTRAZZI A. (eds.) **New challenges in seed biology – Basic and translational research driving seed technology**. Londres, United Kingdom, IntechOpen Limited, 2016. p. 1-46.

MAHAKHAM, W.; SARMAH, A. K.; MAENSIRI, S.; THEERAKULPISUT, P. Nanopriming technology for enhancing germination and starch metabolism of aged rice seeds using phytosynthesized silver nanoparticles. **Scientific Reports**, Londres, v. 7, n. 8263, ago. 2017.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; Vieira, R. D.; França Neto, J. B. (eds.). **Vigor de sementes: Conceitos e testes**. Londrina, Brasil, Abrates, 1999. p. 1-24.

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

MONDAL, S.; BOSE, B. Impact of micronutrient seed priming on germination, growth, development, nutritional status and yield aspects of plants. **Journal of Plant Nutrition**, Abingdon, v. 42, n. 19, p. 2577-2599, ago. 2019.

MONTEIRO, D. T.; TUNES, L. M.; PACHECO, C.; LEMES, E. S.; ALMEIDA, A. S.; MUNIZ, M. F. B. Accelerated aging and occurrence of fungi for evaluation of seed rice physiological potential. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 40, p. 94-104, 2017.

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

NETO, M. E.; BRITT, D. W.; JACKSON, K. A.; BRACCINI, A. L.; INOUE, T. T.; BATISTA, M. A. Early development of corn seedlings primed with synthetic tenorite nanofertilizer. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 42, n. e202042040, dez. 2020.

NGAH, W. W.; ENDUD, C.; MAYANAR, R. Removal of copper (II) ions from aqueous solution onto chitosan and cross-linked chitosan beads. **Reactive and Functional Polymers**, Amesterdã, v. 50, n. 2, p. 181-190. 2002.

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

PELEGRINO, M. T.; SILVA, L. C.; WATASHI, C. M.; HADDAD, P. S.; RODRIGUES, T.; SEABRA, A. B. Nitric oxide-releasing nanoparticles: Synthesis, characterization, and cytotoxicity to tumorigenic cells. **Journal of Nanoparticle Research**, Dordrecht, v. 19, n. 57, fev. 2017.

PEREIRA, M. F. S.; TORRES, S. B.; LINHARES, P. C. F. Accelerated aging test to evaluate of physiological potential in coriander seeds. **Semina Ciências Agrárias**, Londrina, v. 36, n. 2, p. 595-606, abr. 2015.

PÉREZ-DE-LUQUE, A. Interaction of nanomaterials with plants: What do we need for real applications in agriculture. **Frontiers in Environmental Science**, Lausanne, v. 5, n. 12, abr. 2017.

PRADHAN, S.; PATRA, P.; MITRA, S.; DEY, K. K.; BASU, S.; CHANDRA, S.; PALIT, P.; GOSWAMI, A. Copper nanoparticle (CuNP) nanochain arrays with a reduced toxicity response: A biophysical and biochemical outlook on *Vigna radiata*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington D.C., v. 63, n.10, fev. 2015.

ROLIM, W. R.; PIERETTI, J. C.; RENO, D. L. S.; LIMA, B. A.; NASCIMENTO, M. H. M.; AMBROSIO, F. N.; LOMBELLO, C. B.; BROCCHI, M.; SOUZA, A. C. S.; SEABRA, A. B. Antimicrobial activity and cytotoxicity to tumor cells of nitric oxide donor and silver nanoparticles containing PVA/PEG films for topical applications. **Applied Materials & Interfaces**, Washington D.C., v. 11, p. 6589-6604, jan. 2019.

SAHARAN, V.; KUMARASWAMY, R. V.; CHOUDHARY, R. C.; KUMARI, S.; PAL, A.; RALIYA, R.; BISWAS, P. Cu-Chitosan nanoparticle mediated sustainable approach to enhance seedling growth in maize by mobilizing reserved food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington D.C., v. 64, n. 31, p. 6148-6155, ago. 2016.

SAHARAN, V.; SHARMA, G.; YADAV, M.; CHOUDHARY, M. K.; SHARMA, S. S.; PAL, A.; RALIYA, R.; BISWAS, P. Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amesterdã, v. 75, p. 346-353, abr. 2015.

SANTOS, C. M. R.; DE MENEZES, N. L.; VILLELA, F. A. Controlled deterioration test to evaluation of vigour in bean seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 25, n. 2, p. 28-35, dez. 2003.

SHUKLA, P.; CHAURASIA, P.; YOUNIS, K.; QADRI, O. S.; FARIDI, S. A.; SRIVASTAVA, G. Nanotechnology in sustainable agriculture: Studies from seed priming to post-harvest management. **Nanotechnology for Environmental Engineering**, Cham, v. 4, n. 11, fev. 2019.

SILVA, G. P.; SALES, J. F.; NASCIMENTO, K. J. T.; RODRIGUES, A. A.; CAMELO, G. N.; BORGES, E. E. D. L. Biochemical and physiological changes in *Dipteryx alata* Vog. seeds during germination and accelerated aging. **South African Journal of Botany**, Amesterdã, v. 131, p. 84-92, jul. 2020.

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

TIWARI, S.; SARANGI, B. K. Arsenic and chromium-induced oxidative stress in metal accumulator and non-accumulator plants and detoxification mechanisms. In: GUPTA, D. K.; PALMA, J. M.; CORPAS, F. J. (eds). **Reactive oxygen species and oxidative damage in plants under stress**. Cham, Switzerland, Springer, 2015. p. 165-189.

USMAN, M.; FAROOQ, M.; WAKEEL, A.; NAWAZ, A.; CHEEMA, S. A.; REHMAN, H. U.; ASHRAF, I.; SANAUULLAH, M. Nanotechnology in agriculture: Current status, challenges and future opportunities. **Science of the Total Environment**, Amesterdã, v. 721, n. 137778, jun. 2020.

VERMA, S.; DUBEY, R. S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Science**, Amesterdã, v. 164, n. 4, abr. 2003.

WAQAS, M.; KORRES, N. E.; KHAN, M. D.; NIZAMI, A. S.; DEEBA, F., ALI, I.; HUSSAIN, H. Advances in the concept and methods of seed priming. In: HASANUZZAMAN, M.; FOTOPOULOS V. (eds.). **Priming and Pretreatment of seeds and seedlings**. The Gateway West, Singapore, Springer, 2019. p. 11-41.

YE, N.; LI, H.; ZHU, G.; LIU, Y.; LIU, R.; XU, W.; JING, Y.; PENG, X.; ZHANG, J. Copper suppresses abscisic acid catabolism and catalase activity, and inhibits seed germination of rice. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 55, n. 11, p. 2008-2016, nov. 2014.

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

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

ZUCARELI, C.; CAVARIANI, C.; SBRUSSI, C. A. G.; NAKAGAWA, J. Controlled deterioration test to evaluate maize seed vigor. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 4, p. 732-742, jan. 2011.

CAPÍTULO II

4. AVALIAÇÃO DO CONDICIONAMENTO FISIOLÓGICO DE SEMENTES DE MILHO COM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE E SUSCETIBILIDADE DAS PLANTAS AO DÉFICIT HÍDRICO

RESUMO

O condicionamento fisiológico de sementes com nanopartículas tem emergido como ferramenta para aumentar a tolerância de plantas aos estresses ambientais, contribuindo para uma agricultura mais eficiente e sustentável. Neste contexto, objetivou-se avaliar os efeitos do condicionamento fisiológico de sementes de milho (*Zea mays* cv. Balu 787) com duas nanopartículas de CuO obtidas via síntese verde (ácido ascórbico - ACuO ou extrato de chá verde - GTCuO) no desenvolvimento inicial das plântulas e na suscetibilidade ao déficit hídrico. Tanto no experimento de laboratório quanto no de casa de vegetação, foi seguido o delineamento inteiramente casualizado, com os tratamentos sendo constituídos por doses de ambas nanopartículas (0; 14,5; 29; 58 e 116 mg Cu L⁻¹). A dose 0 mg Cu L⁻¹ foi o tratamento controle, sendo feito o condicionamento fisiológico das sementes com água deionizada. Em laboratório, por espectrometria de fluorescência de raio-X dispersiva em energia (EDXRF), foi detectada a intensidade de fótons de raio-X do cobre nas sementes tratadas e nas plântulas crescidas em condição sem restrição hídrica ou sob déficit hídrico simulado com solução de polietilenoglicol-6000, visando à obtenção de um potencial osmótico de -0,3 MPa (a 25 °C). Já no experimento em casa de vegetação, foram avaliados parâmetros fisiológicos das plantas com 13, 20 e 24 dias após semeadura. Do 20.º ao 24.º dia após a semeadura, as plantas foram submetidas ao déficit hídrico severo, com interrupção total da irrigação. Ao final do experimento, foi obtido os valores do crescimento em massa seca (parte aérea e raiz) e a razão entre a massa seca da raiz e da parte aérea. Os resultados evidenciaram efeitos dose-dependentes das nanopartículas no crescimento inicial e na suscetibilidade ao déficit hídrico. Nas sementes tratadas, a maior dose de ACuO (116 mg Cu L⁻¹) promoveu uma intensidade de cobre 77% maior que a promovida pela GTCuO na mesma concentração. As plantas tratadas com GTCuO apresentaram incremento da parte aérea em comparação aos demais tratamentos. Por outro lado, ACuO promoveu redução da parte aérea e aumento de raiz. A dose de 58 mg Cu L⁻¹ proporcionou os melhores efeitos na atividade fotossintética das plantas para cada uma das nanopartículas, destacando-se ACuO por conferir a mesma atividade fotossintética promovida pelo GTCuO, além de induzir alterações morfológicas que atenuassem os efeitos deletérios do déficit hídrico. Entretanto, ambas nanopartículas de óxido de cobre (CuO NPs) apresentaram potencial para alterar o crescimento das plantas oriundas das sementes tratadas, podendo resultar em diferentes efeitos ao desenvolvimento subsequente e, em resposta as condições do meio de cultivo, impactar de forma positiva ou negativa todo o metabolismo vegetal.

Palavras-chave: *Zea mays*; restrição hídrica; CuO; síntese verde de nanopartículas; nanotecnologia.

INTRODUÇÃO

O déficit hídrico deixou de ser um problema típico de regiões áridas e semiáridas, passando a ocorrer também em outras regiões produtoras (HOLMAN et al., 2021). Sendo o setor da economia mais vulnerável às mudanças climáticas, a agricultura constantemente lida com situações adversas que comprometem todo o processo produtivo e, inevitavelmente, elevam os custos de produção, além de diminuir a quantidade e qualidade dos produtos ofertados (KUWAYAMA, 2022). Embora os avanços tecnológicos ao longo dos anos tenham possibilitado melhorias consideráveis na agricultura, a água ainda continua sendo o fator crítico que limita a produção global de alimentos (D'ODORICO et al., 2018).

Este cenário vem incentivando o desenvolvimento de nanomateriais para agricultura, visando a obtenção de novos produtos, otimização dos antigos, práticas agrícolas mais sustentáveis e maior tolerância das culturas aos variados tipos de estresses, conciliando produtividade com uma agricultura mais eficiente (USMAN et al., 2020). Os nanomateriais podem ser incorporados ao agrossistema por intermédio de diferentes técnicas e para distintas funções. Dentre as técnicas possíveis, a utilização de nanopartículas para a realização do condicionamento fisiológico de sementes se mostra uma promissora maneira de uso desses materiais, fazendo com que as propriedades dos nanomateriais potencializem os benefícios do condicionamento fisiológico de sementes convencional (LUTTS et al., 2016; WAQAS et al., 2019).

Por exemplo, a associação entre a nanotecnologia e a bioatividade do cobre, vem demonstrando resultados significativos como nanofertilizante e nanopesticida (MALANDRAKIS et al., 2019; PARIONA et al., 2019; QUITERIO-GUTIÉRREZ et al., 2019; SAFAEI et al., 2019; MA et al., 2020; SATHIYABAMA et al., 2020; LEONARDI et al., 2021; GOMES et al., 2021). No geral, os nanofertilizantes fornecem o nutriente com maior precisão e desempenho (MANJUNATHA et al., 2016), melhorando o aproveitamento do elemento e, conseqüentemente, o desenvolvimento das plantas de forma mais efetiva que os fertilizantes convencionais (SIDDIQUI et al., 2015). Outra vantagem enaltecida da aplicação da nanotecnologia na agricultura é reduzir as perdas do bioativo por fatores ambientais como a lixiviação (MORALES-DÍAZ et al., 2017), mitigando os impactos da produção agrícola ao meio ambiente.

As nanopartículas à base de cobre também demonstram potencial para mitigar os efeitos de estresses abióticos, mediante a modulação da expressão gênica e de alterações morfológicas que proporcionam benefícios diante desta condição estressante (LINH et al., 2020). Yang et al. (2018) verificaram que nanopartículas de óxido de cobre e de zinco (CuO NPs; ZnO NPs) não prejudicaram a tolerância à seca conferida pela colonização das raízes com bactéria *Pseudomonas chlororaphis* O6, em mudas de trigo (*Triticum aestivum* cv. Doloris). As nanopartículas proporcionaram alterações morfológicas benéficas, além de aumentar a expressão de genes relacionados à tolerância ao déficit hídrico e aos metais pesados, evidenciando que as nanopartículas podem conferir, simultaneamente, proteção contra múltiplos estresses. No entanto, Potter et al. (2018) verificaram que, apesar de CuO NPs e outras nanopartículas de óxido de metal aplicadas no meio de cultivo (nutricionalmente balanceado) não terem interferido na colonização das raízes pela *Pseudomonas chlororaphis* O6, as nanopartículas não proporcionaram nenhuma melhoria na resposta à seca de uma cultivar de trigo já tolerante (*Triticum aestivum* cv. Juniper).

Da mesma forma que o uso da nanotecnologia pode promover uma gama de benefícios para agricultura, ela também pode prejudicar o pleno desenvolvimento das culturas, visto que nem sempre os efeitos conferidos pelos nanomateriais ao metabolismo vegetal são positivos. Portanto, os efeitos induzidos são dependentes de muitos fatores e, por consequência, a interação entre eles. Podem ser citados fatores inerentes ao nanomaterial (como tipo, tamanho, forma, carga e concentração), e fatores como a espécie vegetal utilizada, método de aplicação, tempo de exposição aos nanomateriais e o ambiente de cultivo da planta (AHMAD et al., 2022).

Uma das maneiras de atenuar os potenciais impactos ambientais causados pelo uso de nanomateriais na agricultura, é por meio da síntese de nanopartículas metálicas utilizando os princípios da síntese verde de nanomateriais. A nanotecnologia verde baseia-se em rotas de síntese que tem como fonte primária ou iniciador da rota um organismo biológico ou partes dele (órgãos, tecidos, células, biomoléculas ou metabólitos), por meio de processos de oxirredução em meio aquoso. As biomoléculas presentes nos organismos (ex: polissacarídeos, proteínas, peptídeos, aminoácidos, ácidos nucleicos e vitaminas) atuam como agentes redutores

que promovem a redução do composto de interesse (íons metálicos, por exemplo), resultando na formação das nanopartículas (SILVA et al., 2017). Além de atuar como agentes redutores, esses materiais também podem ser usados como “capping” (recobrimento) e dispersantes ao mesmo tempo, evitando o uso de reagentes tóxicos e nocivos (YING et al., 2022).

Neste contexto, o presente estudo objetivou averiguar as implicações do condicionamento fisiológico de sementes com diferentes doses de CuO NPs obtidas seguindo os preceitos da síntese verde, avaliando as sementes tratadas e as plântulas formadas após a germinação. Objetivou-se ainda avaliar o impacto do condicionamento fisiológico das sementes com as respectivas CuO NPs, no crescimento inicial e processos fisiológicos plantas de milho em condições sem e com restrição hídrica.

MATERIAL E MÉTODOS

Síntese das CuO NPs

CuO NPs foram sintetizadas por duas rotas diferentes: (i) extrato de chá verde e (ii) ácido ascórbico/amido. O extrato de chá verde foi preparado na concentração de 2,5 mg mL⁻¹. Uma solução aquosa de CuCl₂ (93,0 mmol L⁻¹) foi adicionada gota a gota ao extrato de chá verde na proporção de 2:1, respectivamente. Após a adição, o pH da solução foi ajustado para 5,5 com NaOH (1 mol L⁻¹) e agitado por 15 min. A síntese via ácido ascórbico/amido foi baseada na metodologia proposta por Khan et al. (2016) com algumas modificações. Uma solução aquosa de CuSO₄ (157 mmol L⁻¹) foi preparada em 30 mL de amido (3%) sob agitação vigorosa por 30 min a 90 °C. Em seguida, adicionou-se rapidamente à solução 7,5 mL de ácido ascórbico 2,57 mol L⁻¹. Posteriormente, 12,5 mL de solução de hidróxido de sódio 0,524 mol L⁻¹ foram adicionados lentamente à síntese com agitação e aquecimento de 80 a 90 °C por 2 horas. As CuO NPs foram separadas por centrifugação e liofilizadas (PELEGRINO et al., 2020).

Caracterização das CuO NPs

O tamanho hidrodinâmico e o potencial zeta das CuO NPs foram avaliados por espalhamento dinâmico de luz (DLS). Foi utilizada uma nano série (Nano ZS Zetasizer, Malvern Instruments Co, Reino Unido) acoplada a um laser de 633 nm e ajustada com um ângulo de retro espalhamento de 173°. Todas as medições foram realizadas em triplicata, a 25 °C, em cubetas de plástico e células zeta capilares dobradas, descartáveis e com comprimento de caminho de 10 mm. O tamanho do estado sólido foi avaliado por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). CuO NPs foram dispersas, gotejadas em uma grade revestida com carbono e secas à temperatura ambiente. As imagens foram obtidas usando um microscópio eletrônico de transmissão a 20 kV (JEM-2100 TEM, Jeol Ltd.). A análise de tamanho foi realizada com o software ImageJ. A concentração de cobre nas CuO NPs foi determinada por espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) (Agilent 7900, Hachioji, Japão). Inicialmente, 50 mg de CuO NPs foram colocadas em tubos de Teflon de 50 mL, 1,5 mL de HNO₃ (65% v v⁻¹) foi adicionado e os tubos foram fechados e mantidos por 2 h em temperatura ambiente (25 °C). O volume foi completado para 50 mL com água tipo 1. Finalmente, a solução foi diluída 25.000 vezes e a concentração de Cu foi determinada por ICP-MS em triplicata. (KOHATSU et al., 2021).

Material biológico e tratamentos

As sementes de milho híbrido (*Zea mays* cv. Balu 787) utilizadas neste estudo foram fornecidas pela empresa de sementes Balu (Arapongas, Paraná, BR). As sementes foram tratadas com as suspensões de CuO NPs sintetizadas a partir de ácido ascórbico (ACuO) e de extrato de chá verde (GTCuO). Para isso, cada uma das CuO NPs foram dissolvidas em 50 mL de água destilada por meio do processo de sonicação (Elmasonic P, Elma, Gottlieb-Daimler-Straße, DE), operando a 37 kHz, no modo *sweep*, com uma potência de ultrassom de 30% e temperatura aproximada de 33 °C por 60 minutos. Em sequência, as soluções estoques de ACuO e GTCuO foram diluídas em diferentes concentrações de acordo com a Tabela 1,

baseando-se no teor de cobre contido em cada uma delas ($72,5\% \pm 2\%$ para ACuO e $52 \pm 5\%$ para GTCuO), obtidos seguindo a metodologia anteriormente descrita.

Tabela 1 Concentração correspondente de cobre nas suspensões de nanopartículas de CuO sintetizadas com ácido ascórbico (ACuO) e extrato de chá verde (GTCuO).

ACuO	GTCuO	Cu
-----mg L ⁻¹ -----		
0	0	0
20	27,8	14,5
40	55,6	29
80	111,2	58
160	222,4	116

Ao todo, 150 sementes por tratamento foram colocadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL e, após a aplicação de 50 mL das nanopartículas previamente diluídas, os frascos foram vedados com parafilme e mantidos sob agitação constante a 200 rpm em um agitador circular horizontal (TS-2000A, Benchmark, Edison, EUA). Durante o processo de tratamento, o equipamento foi coberto com um saco plástico preto, mantendo as sementes no escuro e em temperatura ambiente. Após oito horas de tratamento, as sementes foram colocadas em placas de petri e secas à temperatura ambiente por no mínimo 12 horas até a realização dos experimentos. Para os experimentos laboratoriais, além das concentrações previamente descritas, foi adicionado um tratamento controle em que as sementes não foram submetidas ao condicionamento fisiológico (TEST). A concentração de 0 mg L⁻¹ é um tratamento em que as sementes foram submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada, também servindo como tratamento controle (CONT) para averiguar e comparar os diferentes efeitos induzidos pelo tratamento com água, em comparação aos demais tratamentos.

Experimento de laboratório

No Laboratório de Análise de Sementes do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina (UEL, Londrina, Paraná, BR), foram realizados os procedimentos para obtenção de material vegetal para as análises de espectrometria de fluorescência de raios-X dispersiva em energia (EDXRF). Para isso, uma porção das sementes tratadas foram selecionadas ao acaso após o período de

secagem, constituindo cinco sementes por repetição e um total de quatro repetições por tratamento. Cada repetição foi acondicionada em sacos de papel e mantidas sob temperatura ambiente.

Além disso, um total de 100 sementes tratadas, foram colocadas para germinar em condições de laboratório. Para isso, 25 sementes referente a cada um dos tratamentos foram distribuídas em papéis de germinação (Germitest), umedecidos com água destilada ou solução de polietilenoglicol-6000 (PEG) para indução do estresse hídrico, a qual foi preparada na concentração de 151 g L^{-1} visando à obtenção de um potencial osmótico de $-0,3 \text{ MPa}$ (a $25 \text{ }^\circ\text{C}$). Tanto para condição sem restrição hídrica (água) quanto para condição com restrição hídrica (PEG), os papéis germitest foram umedecidos com um volume em mL das respectivas soluções na proporção de 2,5 vezes a massa de papel seco. Para cada tratamento, foram montados quatro rolos de papel com 25 sementes cada um, sendo dois rolos destinados para condição sem restrição hídrica e outros dois rolos de papel com 25 sementes cada para condição com restrição hídrica. Os rolos de papel, acondicionados em sacos plásticos e fechados com elástico, foram mantidos em câmara incubadora (BOD), regulada a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, por sete dias. Após o período de germinação, as plântulas também foram selecionadas ao acaso para formar as unidades experimentais, totalizando dez repetições de cinco plântulas por tratamento.

Para proceder com as avaliações, os sacos de papel contendo as plântulas e as sementes que haviam sido tratadas, foram para secagem em estufa a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ até massa constante. A massa seca de plântulas (MSP) foi determinada e, posteriormente, quatro das dez repetições por tratamento foram selecionadas ao acaso com a finalidade de serem usadas nas medições de EDXRF. As amostras foram preparadas para análise de EDXRF da seguinte maneira: as cinco plântulas referente a cada repetição foram trituradas com nitrogênio líquido em cadinho de porcelana; as sementes tratadas para cada repetição foram trituradas separadamente por ação mecânica. Os dois tipos de amostras (sementes e plântulas) foram acondicionados em sacos plásticos de polietileno incolores de $5 \times 7 \text{ cm}$, com fecho hermético para posterior análise.

As medições de EDXRF foram realizadas no Laboratório de Análises por Técnicas de Raios-X (UEL, Londrina, Paraná, BR). Para as análises, foi utilizado o espectrômetro EDX-720 (Shimadzu Co, Kyoto, JP). O sistema é equipado com um

tubo de raios-X com ânodo de ródio (Rh) e um detector de silício-lítio Si (Li). As condições de operação do sistema foram: 50 kV de tensão e correntes ajustadas automaticamente pelo equipamento, para um tempo morto compreendido entre 38 a 40%, colimador de 10 mm de diâmetro e tempo de medida de 100 s. Os sacos plásticos de polietileno incolor que serviram para armazenar o material vegetal foram previamente analisados no EDX-720, demonstrando serem isentos de qualquer composto que interferisse nas análises dos elementos de interesse. Para a análise dos espectros de energia foi utilizado o modelo *easy* do *software* de aquisição que acompanha o equipamento.

Experimento de casa de vegetação

O experimento foi realizado em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Biologia Animal e Vegetal da Universidade Estadual de Londrina (UEL, Londrina, Paraná, BR) para avaliar o impacto do condicionamento fisiológico das sementes com as nanopartículas de ACuO e GTCuO, no crescimento inicial e processos fisiológicos de plantas de milho em condições sem e com restrição hídrica. Foi utilizado o substrato comercial Carolina Soil Classe XVI (turfa de *Sphagnum*, vermiculita expandida, resíduo orgânico, calcário dolomítico, gesso agrícola, NPK) e as unidades experimentais foram copos de isopor de 400 mL preenchidos com o substrato. Foram semeadas duas sementes por copo e, após a emergência, foi realizado o desbaste para permanecer apenas uma planta por unidade experimental, totalizando oito unidades experimentais por tratamento. Para a condição sem restrição hídrica, os copos de isopor foram irrigados com 50 mL de água quando necessário (aproximadamente a cada 2 dias). Com a duração de 24 dias após a semeadura (DAS), o experimento foi mantido em casa de vegetação com sombreamento parcial (50%) e sem controle da temperatura ambiente. O período de condução do experimento foi de 11 de novembro até 05 de dezembro de 2021.

As variáveis fisiológicas foram avaliadas com 13 e 20 DAS, mantendo-se a irrigação constante durante esse período. Após o 20° dia, a rega das unidades experimentais foi completamente interrompida para o estabelecimento do déficit hídrico. Ao 4° dia após o início do déficit hídrico (24 DAS), as variáveis fisiológicas foram novamente avaliadas. Em média, as plantas de milho se encontravam no

estádio fenológico V3 (com três das folhas visíveis completamente expandidas) aos 13 DAS e entre o estágio fenológico V4 e V5 (quatro a cinco folhas visíveis completamente expandidas) aos 20 e 24 DAS. Para as avaliações fisiológicas, foi selecionada a folha mais jovem completamente expandida. As avaliações das trocas gasosas foram feitas das 8:00 às 11:00 horas, utilizando-se um analisador portátil de gás por infravermelho (Irga), (*LI-COR® Biosciences, Lincoln, EUA*), modelo LI-6400 XT, conectado a uma câmara de 6 cm², ajustada para uma densidade de fluxo de fótons saturante (1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Foram determinadas a taxa de fotossíntese líquida (*A*) e a condutância estomática (*g_s*). Posteriormente, foi calculada a eficiência intrínseca do uso da água (EIUA) pela razão *A/g_s*. As avaliações fisiológicas de todos os tratamentos foram realizadas por repetição, evitando a influência do tempo de análise.

Ao longo dos quatro dias com restrição hídrica, a transpiração das plantas foi estimada pela perda de água diária, quantificada em massa de água perdida (g). O peso das unidades experimentais foi medido diariamente e no mesmo horário, bem como os copos de isopor contendo somente substrato. A diferença de peso da unidade experimental entre o início e término do período de restrição hídrica, foi dividida pelo número de dias recorrentes nesta condição. Realizando-se o mesmo cálculo para os copos de isopor somente com substrato e, posteriormente, subtraindo-o do peso das unidades experimentais, foi obtido a massa de água perdida pelas plantas de milho ao longo do período de restrição hídrica. Após a realização das medições, as plantas foram retiradas dos copos de isopor e individualmente colocadas sobre uma peneira de malha fina, sendo as raízes lavadas sob água corrente até que todo substrato aderido fosse removido. Para determinação da massa seca de raiz (MSR) e da parte aérea (MSPA), o material foi acondicionado individualmente em sacos de papel, sendo mantidos em estufa a 60 °C até massa constante.

Análises estatísticas

Tanto para condição de laboratório quanto para condição de casa de vegetação, os experimentos foram conduzidos seguindo o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x5, sendo o fator tratamento constituído por duas diferentes nanopartículas de CuO (ACuO e GTCuO) e o fator dose composto por cinco diferentes níveis de nanopartículas (0; 14.5; 29; 58 e 116 mg Cu L⁻¹). Inicialmente,

foram feitos testes e análises gráficas dos resíduos para verificar a normalidade e homogeneidade de variância. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F e, quando constatado interação significativa entre os fatores dose e tratamento ou efeito dose significativo, foi realizada análise de regressão para os níveis de dose. Para complementar as análises dos experimentos em condição de laboratório, os níveis do fator dose foram comparados qualitativamente com outros dois tratamentos controle (TEST e CONT), sendo as médias dos tratamentos submetidas ao teste de Dunnett. Todas as análises foram feitas utilizando o programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2022), empregando o uso dos pacotes stats, easyanova, ExpDes.pt, asbio, biotools, RColorBrewer, FactoMineR, and factoextra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização das CuO NPs

As análises de DLS mostraram que o tamanho hidrodinâmico obtido para CuO NPs foi de 83,2 nm quando sintetizadas com extrato de chá verde (GTCuO) e 322,5 nm para CuO NPs sintetizadas com ácido ascórbico (ACuO). O índice de polidispersidade (PDI) foi de 0,590 e 0,375, respectivamente, e o potencial zeta foi de -20,2 mV e -0,91 mV. As micrografias de TEM indicaram tamanho de estado sólido de 8,2 nm e 68,8 nm, respectivamente (Fig. 9). As GTCuO demonstraram forma esférica, enquanto as ACuO exibiram padrão polimórfico. O teor total de cobre medido por ICP-MS foi de $52 \pm 5\%$ para GTCuO e $72,5 \pm 2\%$ para ACuO.

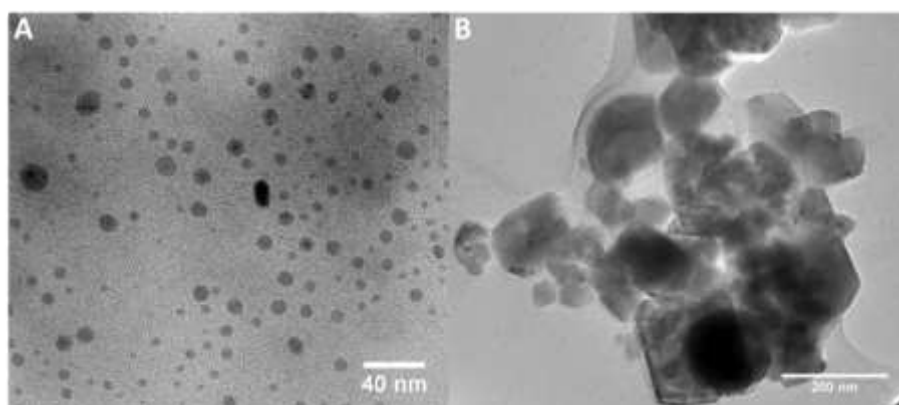


Figura 9 Micrografia TEM de CuO NPs sintetizadas com extrato de chá verde (GTCuO) (a) e com ácido ascórbico (ACuO) (b).

Os resultados obtidos pelas análises de DLS para GTCuO são similares aos valores reportados para esse tipo de CuO NPs sintetizadas a partir de extrato de chá verde (*Camellia sinensis*), em trabalhos previamente publicados (PELEGRINO et al., 2020; PELEGRINO et al., 2021; KOHATSU et al., 2021). Entretanto, verificam-se diferenças nos valores das análises DLS entre a GTCuO e ACuO, principalmente em relação ao tamanho, potencial zeta e forma. Segundo Pelegrino et al. (2020), o valor negativo do potencial zeta para GTCuO é atribuído à presença de polifenóis carregados negativamente (catequinas) na superfície das nanopartículas e sua magnitude está indicando a estabilidade térmica da suspensão coloidal de nanopartículas devido à força eletrostática. Além disso, as catequinas atuam como agente redutor e “capping” (recobrimento) das nanopartículas (ROLIM et al., 2019).

Para ACuO, o ácido ascórbico atua como agente redutor e, juntamente com o amido, forma o capping das nanopartículas. Na figura característica das nanopartículas, é possível observar a película formada pelo amido sobre as ACuO. Segundo Khan et al. (2016), o recobrimento com amido serve para estabilizar, controlar o crescimento das nanopartículas, protegê-las contra a oxidação e evitar a sua agregação. Portanto, além das nanopartículas provenientes da síntese com ácido ascórbico serem naturalmente maiores, o capping formado com ácido ascórbico e amido contribui para carga próxima da neutralidade e para o maior tamanho em relação às nanopartículas obtidas pela síntese com chá verde. Uma característica em comum para ambas as nanopartículas foi as diferenças de tamanho médio hidrodinâmico e estado sólido. De acordo com Pelegrino et al. (2021), essa diferença de tamanho é comum, uma vez que nas análises de DLS é considerada a presença de camadas de solvatação de água, em contraste com o tamanho das nanopartículas em estado sólido (obtidas por microscopia TEM). Além disso, valores mais altos de tamanho médio hidrodinâmico das nanopartículas, comparando-o ao seu tamanho no estado sólido, podem sugerir um grau de aglomeração de nanopartículas na suspensão.

Experimento de laboratório

Sem restrição hídrica, ACuO na dose de 58 mg Cu L⁻¹ proporcionou os maiores valores de MSP (0,116 g), diminuindo o valor da massa seca com doses

superiores (Fig. 10a). As doses de GTCuO não proporcionaram incremento significativo na MSP, entretanto, não apresentaram efeitos restritivos no acúmulo de massa seca das plântulas, proporcionando valores semelhantes às ACuO na maioria das doses e, na dose mais alta, um valor 8% superior para MSP. Apenas as doses de 58 (ACuO58) e 14,5 mg Cu L⁻¹ (GTCuO14.5) aumentaram MSP em comparação ao TEST (7% e 6%, respectivamente) (Fig. 10b). Na germinação com PEG, ambas nanopartículas promoveram efeitos semelhantes (Fig. 10c), diminuindo o acúmulo de massa das plântulas concomitante com o aumento das doses. Por outro lado, todos os tratamentos apresentaram valores superiores para MSP em comparação ao TEST (Fig. 10d).

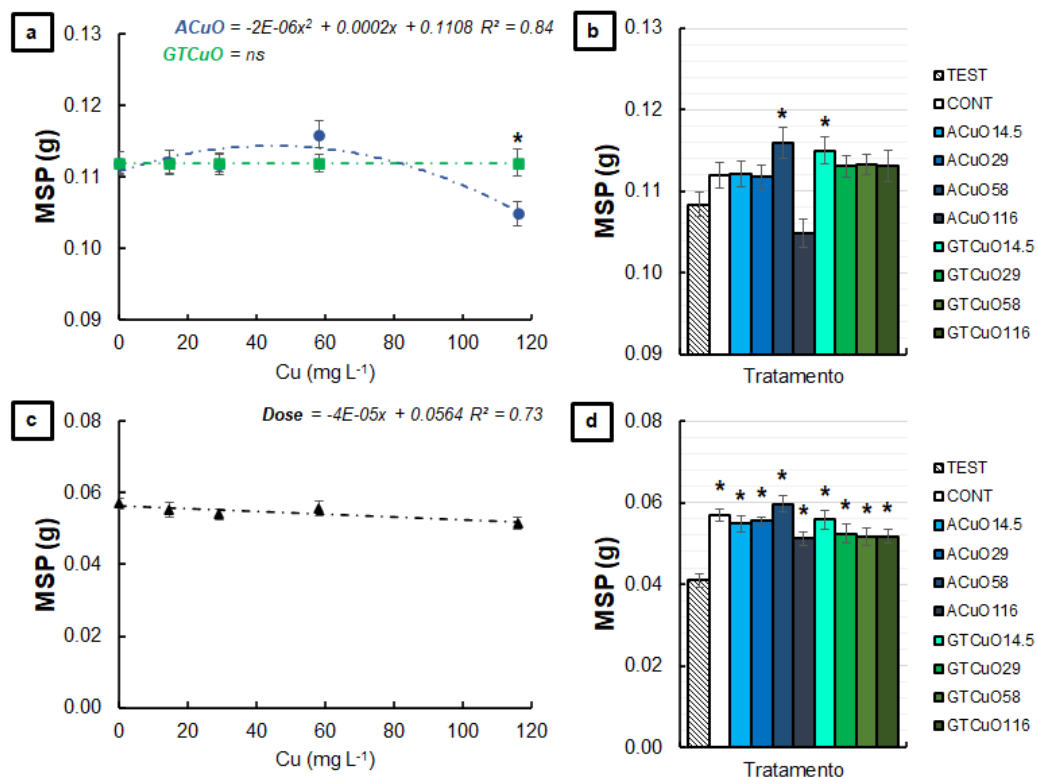


Figura 10 Massa seca de plântulas (MSP) de milho (*Zea mays* cv. Balu 787) provenientes de sementes germinadas em condição sem restrição hídrica (a, b) e com polietilenoglicol-6000 (PEG) (c, d). As nanopartículas (ACuO; GTCuO) foram diluídas em água destilada, obtendo-se a concentração correspondente de cobre (0; 14,5; 29; 58 e 116 mg L⁻¹) nos tratamentos. O TEST é composto por sementes não submetidas ao condicionamento fisiológico. O CONT é composto por sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada (equivalente à concentração 0 mg L⁻¹). Os resultados são expressos como média ($n = 4$) \pm erro padrão. * = diferença significativa entre as nanopartículas dentro de cada dose de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$) e em relação ao TEST de acordo com o teste de Dunnett ($p < 0,05$). ns = não significativo.

Na condição sem restrição hídrica, as diferenças entre ACuO e GTCuO foram mínimas, diferindo apenas na última dose aplicada. Entretanto, na

germinação com PEG, os efeitos proporcionados por elas foram semelhantes. Sementes sob restrição hídrica tem sua eficiência de conversão de reservas em massa seca de plântula comprometida (OLIVEIRA et al., 2020). Tanto ACuO quanto GTCuO, não mitigaram os efeitos induzidos pelo PEG nas sementes sob restrição hídrica. Além disso, para ambas nanopartículas, foi constatado que o aumento das doses intensificou a limitação da conversão de reservas em massa seca. Por outro lado, na comparação com TEST, foi possível verificar que, mesmo reduzindo a massa seca em função do aumento das doses, as nanopartículas não comprometeram os benefícios conferido pela técnica do condicionamento fisiológico, que dentre eles, está maior resistência ao estresse, maior mobilização das reservas e, com ela, maior massa seca de plântula (LUTTS et al., 2016), estando de acordo com os resultados do presente estudo.

Em condição de cultivo, semelhante a sem restrição hídrica avaliada no presente estudo, Neto et al. (2020) verificaram o efeito do condicionamento fisiológico de um híbrido de milho (*Zea mays* cv. IAC 8046) com nanopartículas de CuO obtidas por meio da síntese clássica. Aplicando o método de tratamento similar ao presente trabalho, avaliaram o efeito de diferentes doses (0; 20; 40; 80 e 160 mg Cu L⁻¹), comparando-as com concentrações iguais de CuO “bulk” e sal de CuCl₂, nos parâmetros relacionados à germinação e massa seca de plântulas. As nanopartículas não promoveram nenhum efeito tóxico na germinação e crescimento das plântulas e, apesar de não promoverem ganhos significativos em comprimento, acarretaram maior acúmulo de massa seca em comparação com as outras fontes de cobre. Por outro lado, o condicionamento fisiológico com CuCl₂ promoveu fitotoxicidade nas raízes e parte aérea das plântulas para todas as concentrações testadas.

A promoção do crescimento, bem como o efeito fitotóxico, são dependentes dos fatores inerentes das nanopartículas e, principalmente, a interação com o tipo de aplicação e tempo de exposição. Kadri et al. (2022) utilizando metodologia de tratamento diferente ao presente estudo, avaliaram os efeitos do tratamento com nanopartículas de Cu e CuO (síntese clássica) na germinação de sementes de cevada (*Hordeum vulgare* cv. Ardhaoui), avaliando os parâmetros relacionados ao crescimento inicial. Testando faixa de doses ampla (10-2000 mg L⁻¹), esses autores aplicaram os tratamentos via embebição do papel filtro, mantendo as sementes em contato direto com o substrato e em câmara escura por 6 dias. Observaram-se diferentes respostas dose-dependentes entre os tratamentos, com a

dose de 250 mg L⁻¹, para ambas nanopartículas, promovendo efeitos positivos na germinação e crescimento. A partir de 500 mg L⁻¹, foram observados efeitos fitotóxicos. Por outro lado, com metodologia de tratamento semelhante, Pelegrino et al. (2020) testaram o efeito de diferentes doses (0,2; 2; 20; 40; 80; 150 e 300 mg L⁻¹) de CuO nanopartículas obtidas via síntese verde (extrato de chá verde) do desenvolvimento inicial da alface (*Lactuca sativa* cv. Vanda), aplicando os tratamentos via embebição do papel filtro, mantendo as sementes em contato direto com substrato e em câmara escura por 5 dias. Os autores verificaram que doses acima de 40 mg L⁻¹ causaram efeitos fitotóxicos, desencadeando estresse oxidativo e comprometendo o crescimento das plântulas e, em contrapartida, doses até 20 mg L⁻¹ proporcionaram efeitos benéficos. Corroborando esses resultados, a aplicação de dose de 20 mg de CuO por planta via foliar ou via substrato (tratamento semanal em um período de quatro semanas) (KOHATSU et al., 2021) ou 50 mg L⁻¹ via foliar (PELEGRINO et al., 2021) de CuO NPs (obtida via extrato de chá verde), não induziu efeitos fitotóxicos nas plantas de alface (*Lactuca sativa* cv. Vanda), aumentado o crescimento e atividade fotossintética das plantas tratadas. Mesmo alterando os níveis de cobre e outros nutrientes nas plantas, não foram alcançados níveis que impedissem o consumo humano.

Os trabalhos previamente relatados evidenciam que os efeitos induzidos pelas nanopartículas são bastante influenciados pelas interações entre os fatores, inerentes das nanopartículas, material vegetal e os fatores relacionados as condições de tratamento e meio de cultivo, influenciando significativamente o metabolismo vegetal e, conseqüentemente, no tipo de resposta induzida. Além disso, verifica-se que nanopartículas provenientes da síntese verde costumam induzir efeitos positivos com doses menores, quando comparadas com as nanopartículas de síntese convencional. De acordo com Pereira et al. (2021), isso é possível pelo fato de que, são nanomateriais que contêm outros bioativos (provenientes de extratos biológicos), conferindo maior biocompatibilidade e bioatividade, além da síntese não envolver compostos tóxicos.

Na Figura 11 é apresentado as intensidades de fótons de raios-X do cobre, quantificado nas sementes e nas plântulas por meio das análises de EDXRF. Em função da concentração, constatou-se diferenças significativas entre as CuO NPs nas análises das sementes (Fig. 11a, 11b). Com exceção da menor concentração, foi verificado maior intensidade do cobre proporcionado pela ACuO, comparando-as com

GTCuO. Na maior concentração, ACuO promoveu uma intensidade do cobre 74% superior em comparação com GTCuO na mesma concentração (Fig. 11a). Em comparação ao TEST, CONT e GTCuO na dose 14,5 mg Cu L⁻¹ (GTCuO14.5) não apresentaram diferenças (Fig. 11b).

Sem restrição hídrica e, para ambas nanopartículas, a intensidade do cobre nas plântulas é menor ao que foi observado nas sementes (Fig. 11c, 11d), mas com um comportamento semelhante entre as nanopartículas. ACuO promoveu uma intensidade de cobre maior em comparação as GTCuO em quase todas as concentrações aplicadas, exceto para dose 14,5 mg Cu L⁻¹ (Fig. 11c). Na dose de 116 mg Cu L⁻¹, ACuO proporcionou 15% mais intensidade de cobre em comparação com GTCuO. Em relação ao TEST, ACuO amplia a intensidade de cobre nas plântulas a partir do tratamento com 58 mg Cu L⁻¹ (ACuO58). Por outro lado, GTCuO eleva significativamente a intensidade do cobre nas plântulas somente com dose de 116 mg Cu L⁻¹ (GTCuO116) (Fig. 11d).

Tanto para ACuO quanto para GTCuO, a intensidade de cobre nas plântulas desenvolvidas sob restrição hídrica é maior ao que foi observado nas plântulas crescidas na condição sem limitação hídrica (Fig. 11e, 11f). Além disso, o comportamento de ACuO é modificado pela restrição hídrica. ACuO apresentou aumento mais acentuado na intensidade do cobre nas plântulas, diferindo-se das GTCuO a partir das concentrações de 58 e 116 mg Cu L⁻¹. Embora GTCuO também tenha aumentado a intensidade de cobre nas plântulas, a elevação ocorreu de forma linear e semelhante ao que foi constatado na condição sem restrição hídrica (Fig. 11e). Desta maneira, as diferenças de intensidade entre ACuO e GTCuO aumentaram, fazendo com que ACuO apresentasse 40% mais intensidade de cobre em comparação com GTCuO na dose de 116 mg Cu L⁻¹. Em comparação com TEST, ambas nanopartículas elevaram a intensidade de cobre nas plântulas a partir do tratamento das sementes com a concentração de 29 mg Cu L⁻¹ ou superior (Fig. 11f).

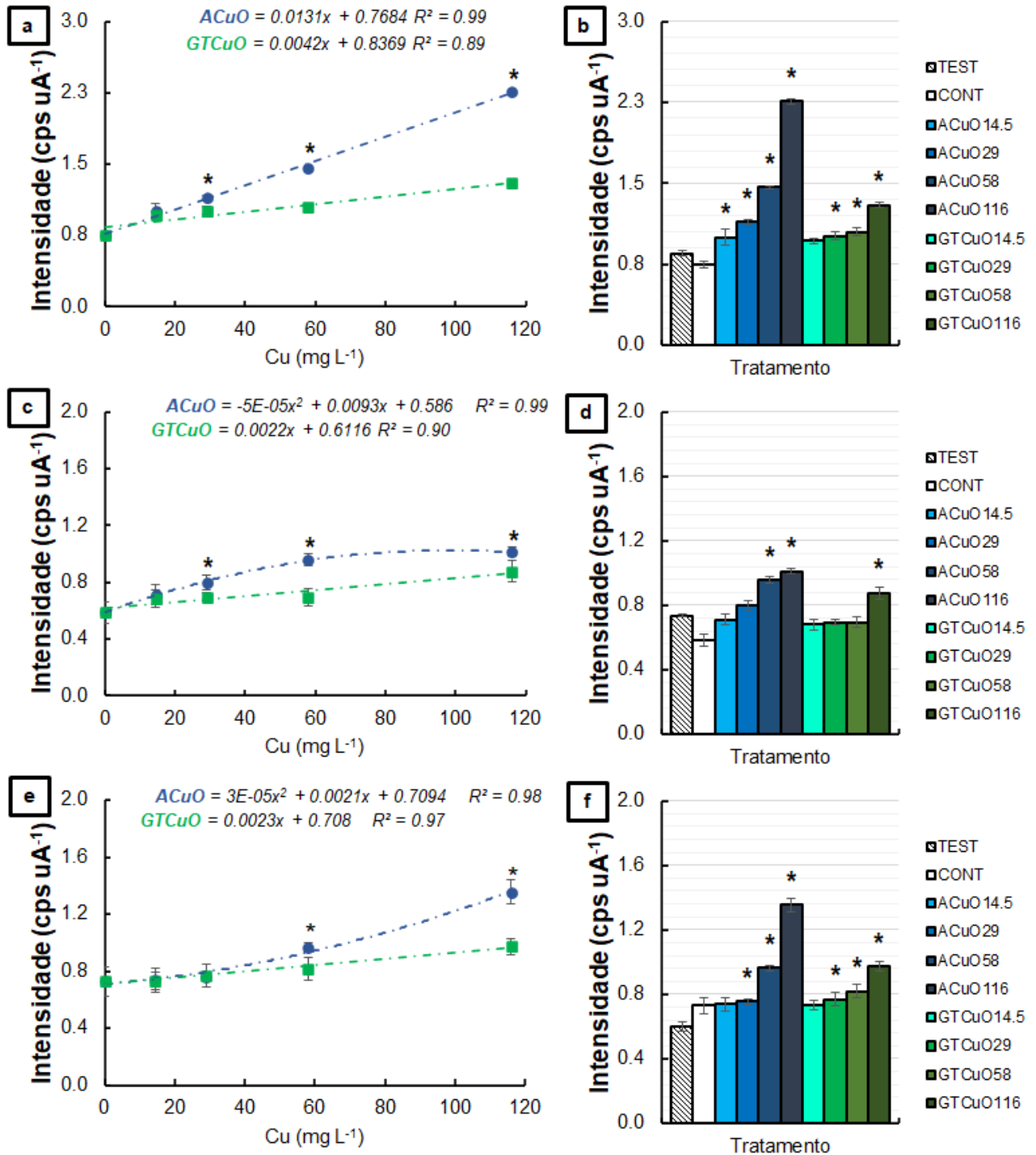


Figura 11 Intensidade de fótons de raios-X do elemento cobre nas sementes de milho (*Zea mays* cv. Balu 787) (a, b), nas plântulas de provenientes de sementes germinadas em condição sem restrição hídrica (c, d) e com polietilenoglicol-6000 (PEG) (e, f). As nanopartículas (ACuO; GTCuO) foram diluídas em água destilada, obtendo-se a concentração correspondente de cobre (0; 14,5; 29; 58 e 116 mg L⁻¹) nos tratamentos. O TEST é composto por sementes não submetidas ao condicionamento fisiológico. O CONT é composto por sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada (equivalente à concentração 0 mg L⁻¹). Os resultados são expressos como média (n = 4) ± erro padrão. * = diferença significativa entre as nanopartículas dentro de cada dose de acordo com o teste de Tukey (p < 0,05) e em relação ao TEST de acordo com o teste de Dunnett (p < 0,05).

A técnica de EDXRF permite a análise direta de materiais sólidos, apresentando como características a possibilidade de análise multielementar e simultânea com baixo custo de determinação, além de ser não-destrutiva (ALEXANDRE & BUENO, 2006) e as amostras podendo ser analisadas sem ou com o mínimo de pré-tratamento (WASTOWSKI et al., 2010). No presente estudo, sementes tratadas e plântulas provenientes da germinação dessas sementes foram analisadas mediante ao uso de EDXRF, com a finalidade de verificar as alterações no perfil do cobre no material analisado e, conseqüentemente, os impactos causados pelo tratamento com CuO NPs. Foi empregado o método de análise direta do material biológico, tendo como vantagens, a ausência de um pré-tratamento e o mínimo processamento das amostras antes de proceder as análises. Entretanto, segundo Guerra et al. (2015), apesar da análise direta reduzir as várias etapas da preparação das amostras, o método direto gera determinações de caráter qualitativo ou semiquantitativo dos elementos constituintes, quando comparado com as técnicas que envolvem um pré-tratamento. No presente estudo, EDXRF foi utilizada para quantificar a intensidade de cobre presente nas sementes tratadas e nas plântulas, por meio da contagem de fótons de raios-X do elemento, detectado nas condições do experimento.

Foi possível verificar interação significativa entre as nanopartículas, com efeitos distintos dentre os tipos de amostra analisada. Nas sementes, o aumento linear na intensidade de cobre proporcionado pela ACuO e, em comparação com o aumento em menor magnitude desencadeado pela GTCuO, pode ser um indicativo de diferentes mecanismos de interação com as sementes. Em comparação com TEST, ACuO aumentou a intensidade de cobre nas sementes a partir da dose de 14.5 mg Cu L⁻¹, enquanto GTCuO a partir de 29 mg Cu L⁻¹ e, na maior dose aplicada, a diferença de intensidade entre as duas nanopartículas foi de 74%. Levando em consideração a forma de tratamento e as características das nanopartículas de ACuO, possivelmente, os fatores intrínsecos do amido (gelatinização e gelificação), podem estar associados a maior adesão nas sementes em tratamento. Essa condição poderia disponibilizar o cobre de forma mais gradual, via translocação direta para plântula ou pela dissolução no meio de cultivo e posterior absorção. Por outro lado, GTCuO é menor (8,2 nm em estado sólido), com um capping constituído de composto fenólico que confere carga negativa. Assim, o aumento na intensidade de cobre pode estar relacionado com a entrada mais facilitada da nanopartícula na semente e/ou liberação mais rápida do cobre, sendo mais rapidamente absorvido pelas sementes

em comparação com a ACuO. De acordo com Paes (2022), o pericarpo da semente de milho é constituído de hemicelulose (67%) e celulose (23%), dentre outros compostos de natureza polar, que podem favorecer a repulsão das nanopartículas e evitar sua adsorção.

Duran et al. (2017) avaliaram através da espectrometria de raios-X os efeitos de diferentes concentrações de nanopartículas com cobre (nos tamanhos 25; 40; < 80 nm) na germinação e desenvolvimento das mudas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* cv. Cometa). Eles constataram que as nanopartículas não afetaram a germinação com doses de até 100 mg L⁻¹, promovendo efeitos positivos no crescimento das plântulas. Por outro lado, a dose de 1000 mg L⁻¹ conferiu inibição do crescimento. Além disso, através do EDXRF e microfluorescência de raio X (μ -XRF), os autores encontraram evidências de que o principal mecanismo de absorção de cobre ocorre através da difusão impulsionada pelo gradiente de concentração. A região de entrada principal foi o tecido esponjoso do hilo. A presença de CuO e Cu₂O indicou que as nanopartículas de CuO foram incorporadas como partículas inteiras e não apenas o cobre iônico em solução. Além disso, a presença do cobre no endosperma, em região distante do hilo, implica na possibilidade de o cobre ter atravessado o tegumento da semente. Ahmed et al. (2019), aplicando metodologia de tratamento de sementes semelhantes ao presente estudo e com análises por EDXRF, avaliaram a aplicação de diferentes doses (50, 500, 2000 e 5000 mg L⁻¹) de nanopartículas de óxido de metal e bulk na germinação, crescimento, bioacumulação e a produção de metalotioneína em diferentes plantas (*Raphanus sativus* cv. Meena; *Crocus sativus* cv. Karina; *Solanum lycopersicon* cv. NP-7715 e *Medicago sativa* cv. Chetak S-244). Além das respostas dose-dependentes de fitotoxicidade, foi possível constatar deposição de todos os tipos de nanopartículas de óxido de metal na superfície dos diferentes tipos de sementes avaliadas. A internalização das nanopartículas de óxido de metais e a respectiva concentração dos elementos nas sementes e plântulas variaram de acordo com a espécie e tipo de nanopartículas. Além disso, nanopartículas de ZnO, seguidas pelas CuO, promoveram os maiores efeitos inibitórios ao crescimento das plântulas, em virtude da bioatividade destas nanopartículas quando comparadas com as de titânio e alumínio, que são compartimentalizadas nas organelas especializadas da célula.

As análises de EDXRF nas plântulas, evidenciaram distinção dos efeitos das nanopartículas, principalmente em função da condição hídrica do meio de

cultivo. Comparando as duas condições, o resultado é um indicativo de que tenha ocorrido restrição na translocação do cobre e/ou nanopartículas para plântula formada, quando a mesma cresceu em meio sem restrição hídrica. Por outro lado, com PEG, observa-se aumento nas doses de nanopartículas que ampliaram a intensidade do cobre na plântula, em comparação ao TEST. Além disso, a intensidade de cobre promovida pela ACuO, foi superior ao observado para GTCuO. Igualmente ao que foi visualizado e discutido para massa seca de plântulas, as doses de ambas nanopartículas não comprometeram a mitigação dos efeitos induzidos pelo PEG na conversão das reservas em massa seca, conferido pela técnica de condicionamento fisiológico.

Experimento de casa de vegetação

As fotos características das plantas de milho aos 13 e 20 DAS são apresentadas na Figura 12.

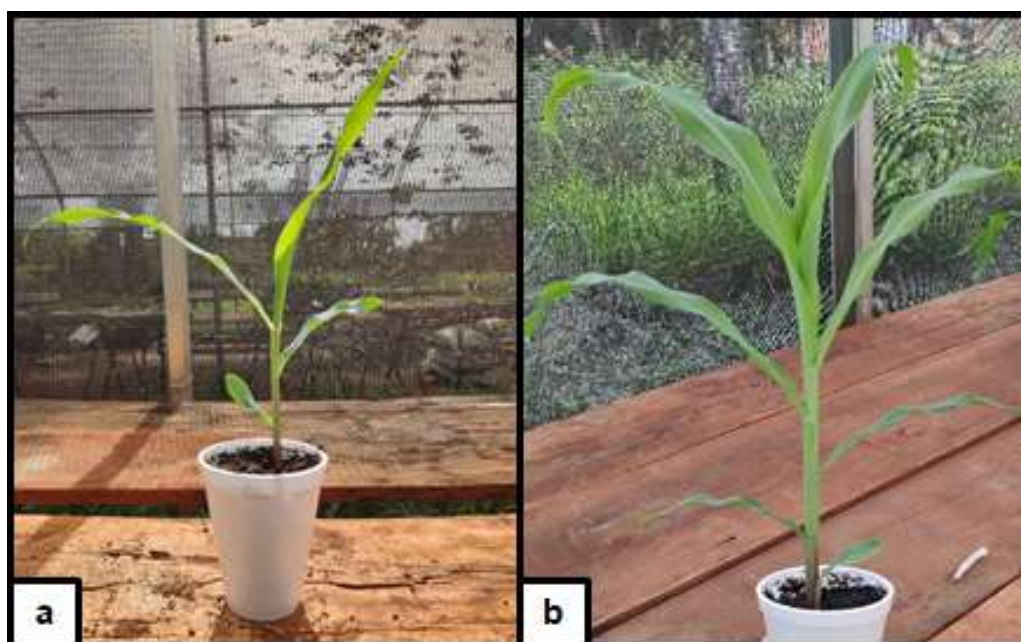


Figura 12 Plantas de milho (*Zea mays* cv. Balu 787) com 13 (a) e 20 (b) dias após a semeadura (DAS).

As massas seca das plantas ao longo de todo período de condução do experimento são apresentadas na Figura 13. GTCuO proporcionou mais MSPA do que ACuO, sendo uma diferença 16% superior comparando-as na dose de 58 mg Cu L⁻¹ (Fig. 13a). Para MSR, ambas nanopartículas desencadearam um efeito similar no

acúmulo de massa seca, aumentando em função do acréscimo das concentrações até um limiar próximo de 58 mg Cu L^{-1} . Posteriormente, MSR passou a ser influenciada negativamente pelo tratamento com as maiores concentrações de ambas as nanopartículas (Fig. 13b). Por outro lado, comparando a média geral de cada nanopartícula, ACuO proporcionou 5% a mais de MSR do que GTCuO (Fig. 13c). Quanto a razão raiz/parte aérea, somente ACuO afetou de forma significativa. Nas doses de 58 e 116 mg Cu L^{-1} , a diferença para GTCuO foi de 21 e 32%, respectivamente (Fig. 13d).

O tratamento das sementes com as nanopartículas, modificaram o acúmulo de massa seca nos órgãos das plantas e, conseqüentemente, a tolerância à seca. Com efeitos dose-dependentes, GTCuO promoveu mais MSPA que ACuO. Por sua vez, ambas nanopartículas promoveram mais MSR, principalmente ACuO na dose de 58 mg Cu L^{-1} , favorecendo as plantas provenientes das sementes tratadas com ACuO a ter maior razão raiz/parte aérea e, com isso, maior capacidade em absorção de água e de tolerar o estresse hídrico subsequente. Corroborando os resultados apresentados para ACuO, diferentes relatos na literatura evidenciam o efeito protetor contra a seca conferido pelo tratamento com CuO NPs, associado a alterações na expressão gênica e morfológicas, como um maior crescimento de raiz, proliferação de pelos radiculares e redução da parte aérea (YANG et al., 2018; LINH et al., 2020). Em acordo com os efeitos constatados para GTCuO, Kohatsu et al. (2021) verificaram que GTCuO na concentração de 20 mg CuO L^{-1} aumentou a área foliar das plantas tratadas com as nanopartículas.

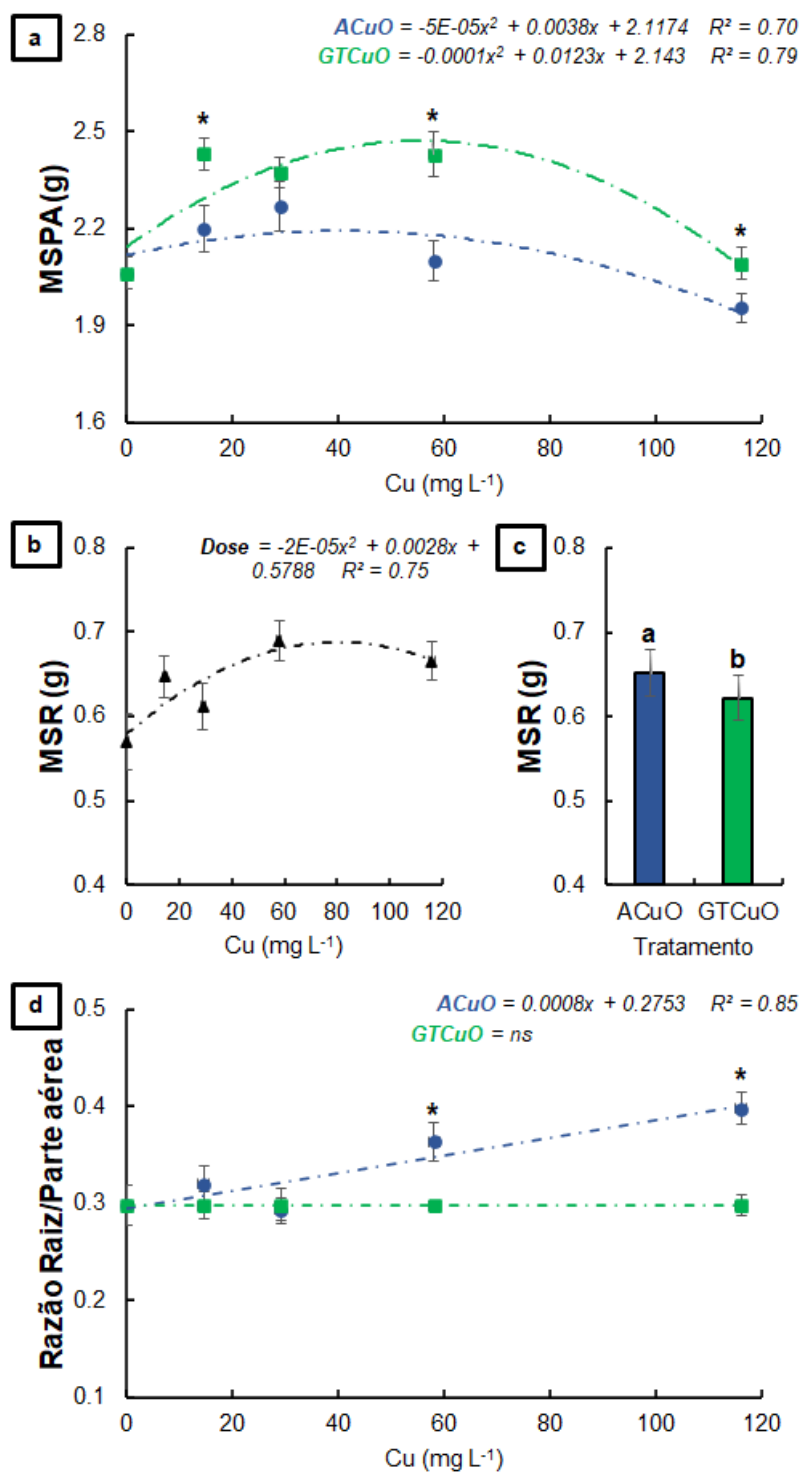


Figura 13 Massa seca da parte aérea (a), massa seca de raiz (b,c) e razão raiz/parte aérea (d) de plantas de milho (*Zea mays* cv. Balu 787) com 24 dias após a semeadura (DAS). As nanopartículas (ACuO; GTCuO) foram diluídas em água destilada, obtendo-se a concentração correspondente de cobre (0; 14,5; 29; 58 e 116 mg L⁻¹) nos tratamentos. O TEST é composto por sementes não submetidas ao condicionamento fisiológico. O CONT é composto por sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada (equivalente à concentração 0 mg L⁻¹). Os resultados são expressos como média ($n = 4$) \pm erro padrão. * = diferença significativa entre as nanopartículas dentro de cada dose e letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). ns = não significativo.

As variáveis fisiológicas das plantas com 13 DAS e cultivadas sem restrição hídrica são apresentadas na Figura 14.

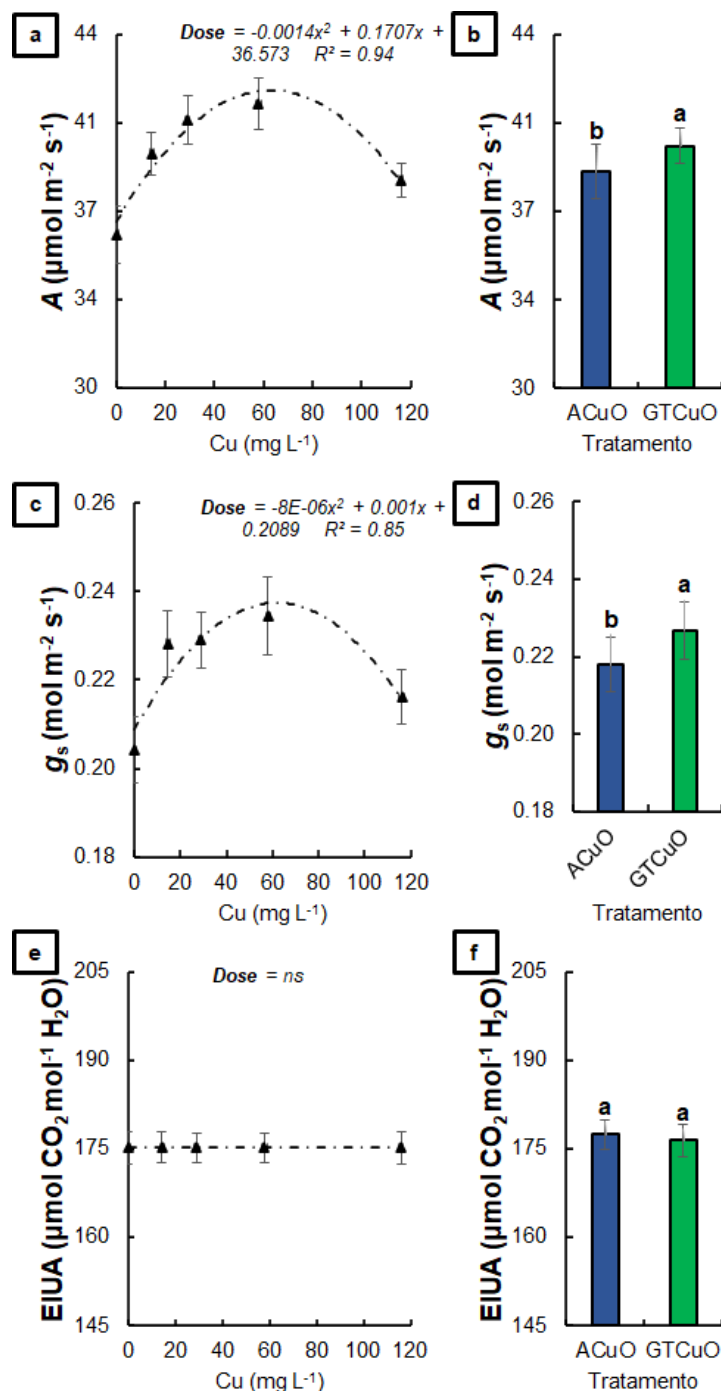


Figura 14 Taxa fotossintética líquida (A) (a,b), condutância estomática (g_s) (c,d) e eficiência intrínseca no uso da água (EIUA) (e,f) das plantas de milho (*Zea mays* cv. Balu 787) com 13 dias após a semeadura (DAS) e cultivadas em condição sem restrição hídrica. As nanopartículas (ACuO; GTCuO) foram diluídas em água destilada, obtendo-se a concentração correspondente de cobre (0; 14,5; 29; 58 e 116 mg L^{-1}) nos tratamentos. A dose 0 (mg Cu L^{-1}) é composta por sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada. Os resultados são expressos como média ($n = 8$) \pm erro padrão. Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativa entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ($p < 0,05$). ns = não significativo.

Foi possível observar que os efeitos desencadeados pelas concentrações de ACuO e GTCuO nas plantas foram iguais para todos os parâmetros avaliados. Tanto ACuO quanto GTCuO, aumentaram A e g_s , concomitante com o aumento das concentrações até o limite de 58 mg Cu L^{-1} e, conseqüentemente, induzindo queda com a aplicação de doses superiores (Fig. 14a, 14c). Por outro lado, nenhuma das das nanopartículas proporcionaram alterações na EIUA das plantas cultivadas sem restrição hídrica (Fig. 14e). Na comparação das médias gerais de cada nanopartícula, GTCuO proporcionou ganhos de 3 e 4% para A e g_s , respectivamente, quando comparada com ACuO (Fig. 14b, 14d). Além disso, não foi verificada diferença significativa entre as nanopartículas para EIUA (Fig. 14f).

Apesar dos efeitos induzidos pelas doses de ambas nanopartículas terem sido semelhante, GTCuO destacou-se proporcionando maior atividade fotossintética das plantas aos 13 DAS. Diferentes indícios indicam que, a GTCuO demonstra exercer um efeito positivo na parte área das plantas tratadas com as nanopartículas, sendo este efeito, independente da forma de tratamento. Kohatsu et al. (2021) verificaram ação positiva da GTCuO no tratamento via pulverização foliar e por substrato, beneficiando a fisiologia de plantas de alface, com maior área foliar e assimilação de CO_2 . Corroborando, Pelegrino et al. (2021) constataram um incremento na eficiência instantânea de carboxilação das plantas de alface tratadas com dose de 50 mg CuO L^{-1} . Por outro lado, utilizando alface como planta modelo, Xiong et al. (2021) observaram redução de A nas doses de 100 e $1000 \text{ mg CuO L}^{-1}$ de CuO NPs adquiridas comercialmente. Esses resultados evidenciam o efeito dose-dependente das CuO NPs, bem como a influência da interação de todos os fatores envolvidos na relação das nanopartículas e suas propriedades, com tempo de exposição ao nanomaterial, planta e ambiente de cultivo. Além disso, a toxicidade das nanopartículas à base de metal para as plantas pode envolver ao menos três mecanismos diferentes: efeitos fitotóxicos dos íons liberados pelas nanopartículas, geração de radicais químicos capazes de induzir o estresse oxidativo a partir da interação das nanopartículas com o meio de cultivo e a interação direta das nanopartículas com as plantas, provocando efeitos deletérios ao metabolismo vegetal (CHEN et al., 2018).

As variáveis fisiológicas das plantas com 20 DAS e cultivadas sem restrição hídrica são apresentadas na Figura 15. Tanto ACuO quanto GTCuO, não proporcionaram aumento de A aos 20 DAS (Fig. 15a). De maneira semelhante, as

nanopartículas diminuíram 8% da g_s (Fig. 15c) e, conseqüentemente, promoveram aumento de 6% da EIUA das plantas (Fig. 15e). Comparando a média geral dos tratamentos, não existe diferenças significativas entre as nanopartículas (Fig. 15b, 15d, 15f).

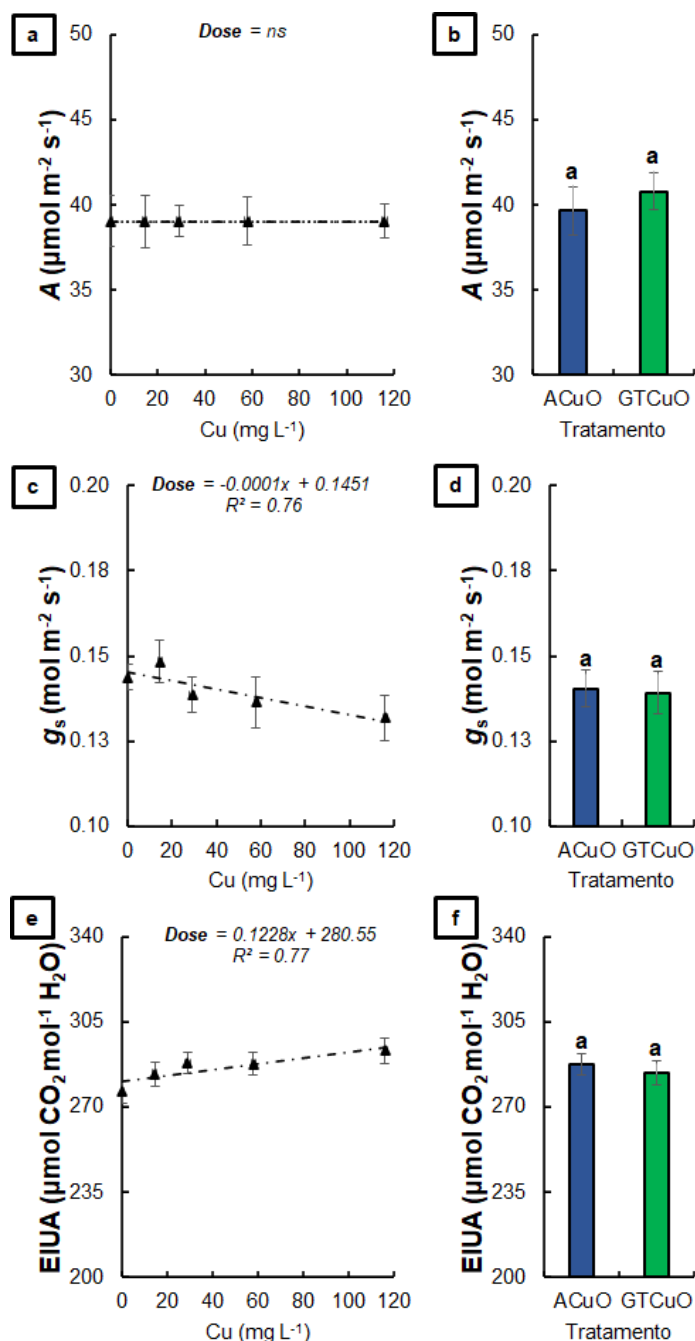


Figura 15 Taxa fotossintética líquida (A) (a,b), condutância estomática (g_s) (c,d) e eficiência intrínseca no uso da água (EIUA) (e,f) das plantas de milho (*Zea mays* cv. Balu 787) com 20 dias após a semeadura (DAS) e cultivadas em condição sem restrição hídrica. As nanopartículas (ACuO; GTCuO) foram diluídas em água destilada, obtendo-se a concentração correspondente de cobre (0; 14,5; 29; 58 e 116 mg L^{-1}) nos tratamentos. A dose 0 (mg Cu L^{-1}) é composta por sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada. Os resultados são expressos como média ($n = 8$) \pm erro padrão. Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativa entre os tratamentos de acordo com teste de Tukey ($p < 0,05$). ns = não significativo.

Com 20 DAS, verifica-se igualdade entre as nanopartículas de ACuO e GTCuO em todas as variáveis fisiológicas avaliadas, seja pelo tipo de efeito induzido com as doses aplicadas ou pelo incremento proporcionado na atividade fotossintética das plantas. Avaliando conjuntamente os dados de 13 DAS e 20 DAS, são apresentadas evidências de que, a ação das nanopartículas nas variáveis fisiológicas foi iniciada em tempos diferentes. GTCuO induziu maior atividade fotossintética das plantas até 13 DAS, em comparação com ACuO e, com 20 DAS, os efeitos se igualaram, evidenciando influência posterior de ACuO na A , g_s e EIUA das plantas. Com 20 DAS, destacou-se o efeito provocado por ambas nanopartículas em reduzir g_s sem provocar queda em A e, assim, aumentar EIUA, proporcionando maior tolerância ao estresse subsequente.

As variáveis fisiológicas das plantas com 24 DAS (sendo quatro deles sob restrição hídrica), são apresentadas na Figura 16. Tanto para A quanto para g_s , GTCuO não apresentou diferenças entre as doses aplicadas (Fig. 16a, 16b). Em compensação, ACuO manteve em média, um valor de A e g_s quase três vezes maior ao que foi visualizado para GTCuO. Além disso, as doses de 58 e 116 mg Cu L⁻¹, proporcionaram em média, 38 e 63% mais A e g_s , respectivamente, em comparação com as doses de 0 a 29 mg Cu L⁻¹. De forma semelhante e, em ambas nanopartículas, foi visualizado queda da EIUA concomitante com a elevação das doses aplicadas (Fig. 16c). De acordo com a média geral das nanopartículas, ACuO proporcionou menor redução de EIUA, mantendo um valor superior ao que foi observado para GTCuO (Fig. 16d). Além dos sintomas visuais (Fig. 17a, 17b), foi possível observar o mesmo padrão de perda de água entre as plantas tratadas com as nanopartículas, entretanto, a perda de água foi mais intensa com ACuO (Fig. 17c). Para GTCuO, as doses de 58 e 116 mg Cu L⁻¹ proporcionaram diminuição da perda de água em comparação com doses iniciais. Por outro lado, para ACuO, as doses de 58 e 116 mg Cu L⁻¹ apresentaram as maiores perdas de água, em comparação com as demais doses.

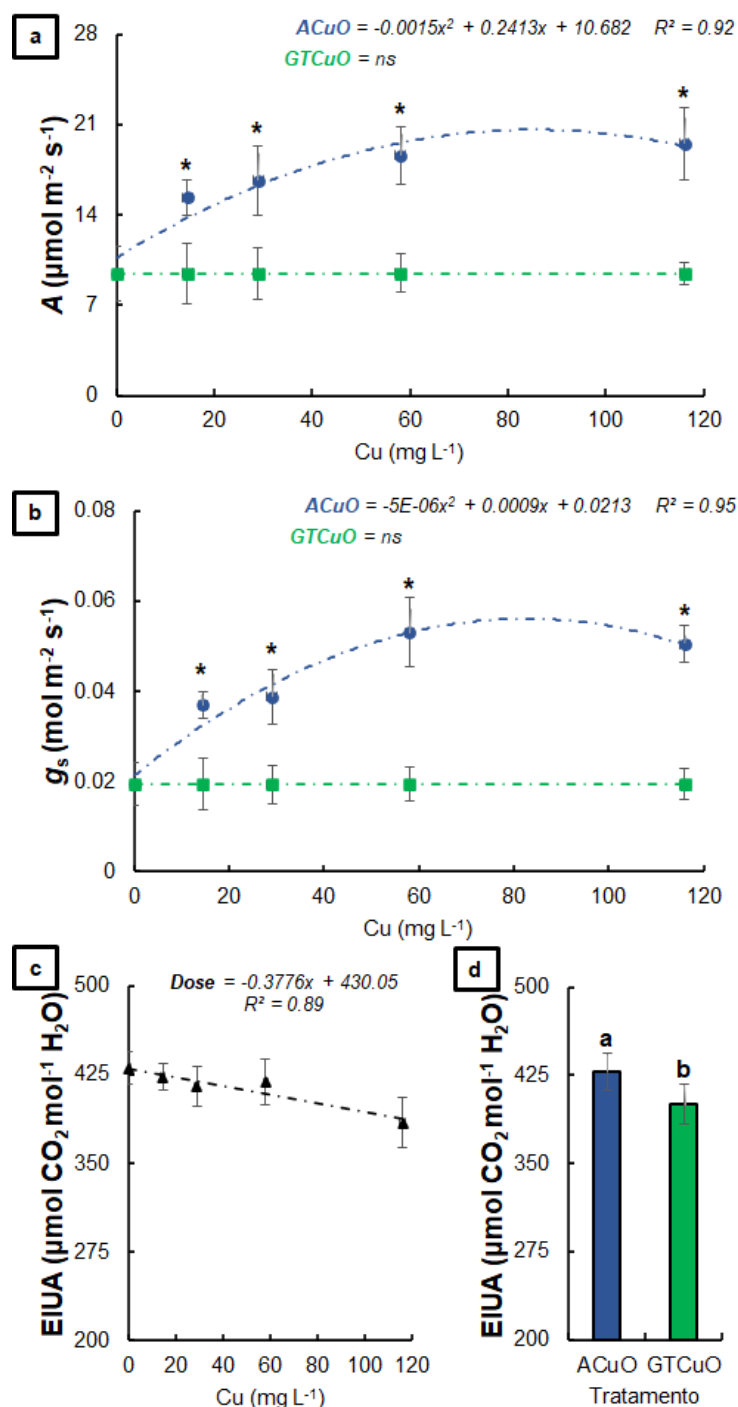


Figura 16 Taxa fotossintética líquida (**A**) (**a**), condutância estomática (g_s) (**b**) e eficiência intrínseca no uso da água (EIUA) (**c,d**) das plantas de milho (*Zea mays* (L.) cv. Balu 787) com 24 dias após a semeadura (DAS) e cultivadas em condição com restrição hídrica por quadro dias. As nanopartículas (ACuO; GTCuO) foram diluídas em água destilada, obtendo-se a concentração correspondente de cobre (0; 14,5; 29; 58 e 116 mg L⁻¹) nos tratamentos. A dose 0 (mg Cu L⁻¹) é composta por sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada. Os resultados são expressos como média ($n = 8$) \pm erro padrão. * = diferença significativa entre as nanopartículas dentro de cada dose e letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$). ns = não significativo.

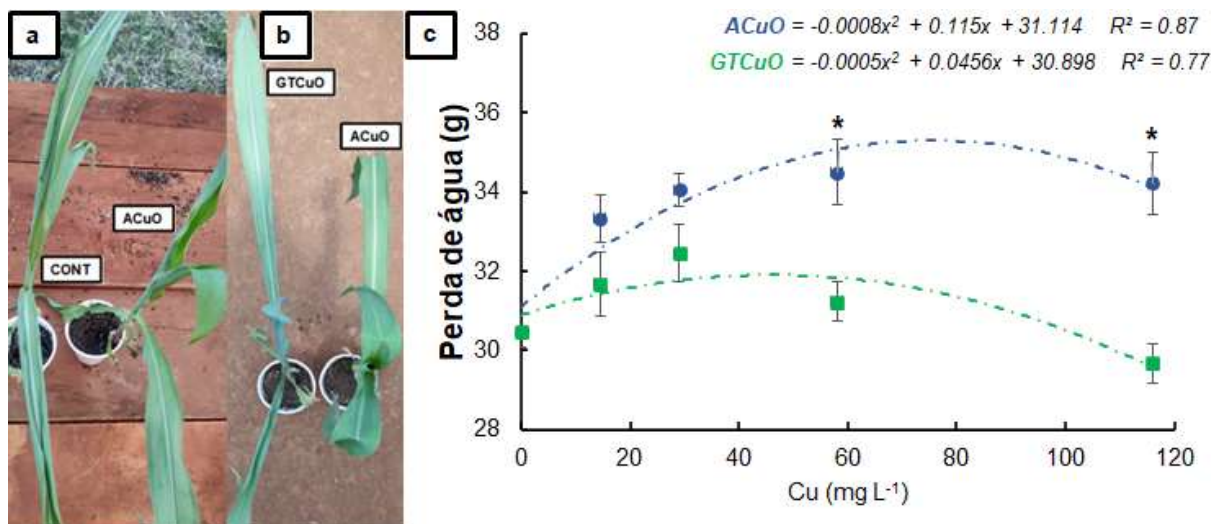


Figura 17 Comparação visual entre os tratamentos controle (CONT) e ACuO (a), comparação entre os tratamentos GTCuO e ACuO (b) e perda de água (c) das plantas de milho (*Zea mays* cv. Balu 787) com 24 dias após a semeadura (DAS) e cultivadas em condição com restrição hídrica por quatro dias. As nanopartículas (ACuO; GTCuO) foram diluídas em água destilada, obtendo-se a concentração correspondente de cobre (0; 14,5; 29; 58 e 116 mg L⁻¹) nos tratamentos. A dose 0 (mg Cu L⁻¹) é composta por sementes submetidas ao condicionamento fisiológico com água destilada. Os resultados são expressos como média ($n = 8$) \pm erro padrão. * = diferença significativa entre as nanopartículas dentro de cada dose e letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas entre os tratamentos de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Com 24 DAS e após a imposição da restrição hídrica, o comportamento das plantas de milho foi distinto em função do tratamento das sementes com as respectivas nanopartículas. Nas avaliações após o período de seca, não é constatado diferenças significativas entre as doses de GTCuO tanto para A quanto para g_s . Por sua vez, ACuO ainda manteve valores superiores para ambas variáveis em todas as doses aplicadas, principalmente nas concentrações de 58 e 116 mg Cu L⁻¹, além de maior EIUA, quando comparado com GTCuO. Quanto a perda de água, após quatro dias de restrição hídrica, a perda proporcionada por ACuO era superior ao constatado para GTCuO, principalmente nas doses com 58 e 116 mg Cu L⁻¹. Por outro lado, GTCuO apresentava menor perda de água nas doses com 58 e 116 mg Cu L⁻¹.

A perda de água ao longo do período de restrição hídrica, é um dado que somado às outras variáveis medidas aos 24 DAS, evidenciam a diferença entre as nanopartículas. GTCuO proporciona um maior investimento de parte área, podendo ser bom ou ruim, dependendo da condição em que a planta se encontra. Entretanto, na eminência de uma situação de restrição hídrica, o efeito desencadeado foi negativo, fazendo com que mais parte área, fosse também maior superfície de perda de água. Possivelmente, as plantas provenientes do tratamento com GTCuO tenham

perdido água de forma mais rápido, indo além da sua capacidade reposição em virtude do menor investimento de raiz. Situação que impactou a atividade fotossintética das plantas mais rapidamente, provocando redução g_s e, conseqüentemente, de A concomitante com a redução da perda de água restante em todas as doses de GTCuO. Por outro lado, as características conferidas pela ACuO de menor parte aérea e maior quantidade de raiz, fez com que a planta mesmo perdendo essa quantidade de água, mantivesse a fotossíntese funcionando e os estômatos abertos. A quantidade de raiz desenvolvida permitiu suprir água perdida por transpiração mais eficientemente, comparando-a com GTCuO.

Pode-se hipotetizar que os diferentes efeitos na condição de estresse possam estar relacionados ao fato de ACuO ser, possivelmente, mais adsorvida na semente, promovendo a liberação gradual do cobre e estendendo o seu efeito na fisiologia planta. Pode-se supor também que as ACuO, por permanecerem em contato com o substrato, liberem os íons cobre gradualmente pela interação com o meio de cultivo, induzindo efeitos positivos nas raízes. Por outro lado, pelas características das nanopartículas de GTCuO, o condicionamento fisiológico de sementes com essas nanopartículas favoreça um maior acúmulo internalizado na semente, acumulando-se nos tecidos que originaram a parte aérea, conferindo um maior crescimento desse órgão na planta.

Os métodos físico e químicos para síntese de metais em nanoescala estão sendo gradualmente substituídos pelos métodos da síntese verde, muito em função dos benefícios e facilidades proporcionados como: redução do alto consumo de energia empregado em alguns métodos de síntese clássica; substituição de compostos tóxicos e prejudiciais aos seres vivos e ao ambiente, além da redução do uso de equipamentos e condições de síntese complexas. Além da gama de possibilidades de fonte para síntese verde de metais em nanoescala, o método apresenta como principais vantagens a síntese não tóxica, livre de poluição, *eco-friendly* e econômica (YING et al., 2022). A nanotecnologia verde contribui para diminuir os impactos causados pelos nanomateriais desde a síntese e, principalmente, nos seguimentos do setor agrário que vêm encontrando benefícios conferidos pela nanotecnologia na transformação das práticas agrícolas convencionais e, fazendo da nanotecnologia verde, aliada para mitigar as condições adversas, cada vez mais frequentes ao agroecossistema em virtude das mudanças climáticas.

CONCLUSÃO

O condicionamento fisiológico de sementes com CuO NPs provenientes da síntese verde promoveu alterações dose-dependentes no crescimento inicial do milho. A dose de 58 mg Cu L⁻¹ proporcionou o melhor efeito na atividade fotossintética da planta para cada uma das CuO NPs. Quanto a suscetibilidade ao déficit hídrico, ACuO destacou-se por induzir alterações morfológicas que atenuaram os efeitos deletérios da restrição hídrica. Entretanto, ambas CuO NPs apresentaram potencial para alterar o crescimento das plantas oriundas das sementes tratadas, podendo resultar em diferentes efeitos ao desenvolvimento subsequente e, em resposta as condições de cultivo, impactar de forma positiva ou negativa todo o metabolismo vegetal.

REFERÊNCIAS

AHMAD, A.; HASHMI, S. S.; PALMA, J. M.; CORPAS, F. J. Influence of metallic, metallic oxide, and organic nanoparticles on plant physiology. **Chemosphere**, Oxford, v. 290, n. 133329, mar. 2022.

AHMED, B.; RIZVI, A.; ZAIDI, A.; KHAN, M.S.; MUSARRAT, J. Understanding the phyto-interaction of heavy metal oxide bulk and nanoparticles: evaluation of seed germination, growth, bioaccumulation, and metallothionein production. **RSC advances**, Londres, v. 9, n. 8, p. 4210–4225, fev. 2019

ALEXANDRE, T. L.; BUENO, M. I. M. S. Classification of some species, genera and families of plants by x-ray spectrometry. **X-ray Spectrometry**, Weinheim, v. 35, n. 4, ago. 2006.

D'ODORICO, P.; DAVIS, K. F.; ROSA, L.; CARR, J. A.; CHIARELLI, D.; DELL'ANGELO, J.; GEPHART, J.; MACDONALD, G. K.; SEEKELL, D. A.; SUWEIS, S.; RULLI, M. C. The global food-energy-water nexus. **Reviews of geophysics**. Washington, v. 56, n. 3, p. 456–531, abr. 2018.

DURAN, N.M.; SAVASSA, S.M.; DE LIMA, R.G.; DE ALMEIDA, E.; LINHARES, F.S.; VAN GESTEL, C.A.M.; DE CARVALHO, H.W.P. X-ray spectroscopy uncovering the effects of Cu based nanoparticle concentration and structure on *Phaseolus vulgaris* germination and seedling development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 36, p. 7874-7884, ago. 2017.

GOMES, D. G.; LOPES-OLIVEIRA, P. J.; DEBIASI, T. V.; da CUNHA, L. S.; OLIVEIRA, H. C. Regression models to stratify the copper toxicity responses and tolerance mechanisms of *Glycine max* (L.) Merr. plants. **Planta**, Berlim, v. 253, n. 43, jan. 2021.

GUERRA, M. B. B.; ADAME, A.; DE ALMEIDA, E.; DE CARVALHO, G. G. A.; BRASIL, M. A. S.; JUNIOR, D. S.; KRUG, F. J. Direct analysis of plant leaves by EDXRF and LIBS: microsampling strategies and cross-validation. **Journal of analytical atomic spectrometry**, Londres, v. 30, n. 7, p. 1646–1654, mai. 2015.

HOLMAN, I.P; HESS, T.M.; REY, D.; KNOX, J.W. A multi-level framework of adaptation to drought within temperate agriculture. **Frontiers in Environmental Science**. Lausanne, v. 8, n. 589871, jan. 2021.

KADRI, O.; KARMOUS, I.; KHARBECH, O.; ARFAOUI, H.; CHAOUI, A. Cu and CuO nanoparticles affected the germination and the growth of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedling. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, Berlim, v. 108, n. 3, p. 585–593, jan. 2022.

KHAN, A.; RASHID, A.; YOUNAS, R.; CHONG, R. A chemical reduction approach to the synthesis of copper nanoparticles. **International nano letters**, Berlim, v. 6, n. 1, p. 21–26, jan. 2016.

KOHATSU, M. Y.; PELEGRINO, M. T.; MONTEIRO, L. R.; FREIRE, B. M.; PEREIRA, R. M.; FINCHEIRA, P.; RUBILAR, O.; TORTELLA, G.; BATISTA, B. L.; DE JESUS, T. A.; SEABRA, A. B.; LANGE, C. N. Comparison of foliar spray and soil irrigation of biogenic CuO nanoparticles (NPs) on elemental uptake and accumulation in lettuce. **Environmental science and pollution research international**, Berlim, v. 28, n. 13, p. 16350–16367, jan. 2021.

KUWAYAMA, Yusuke. The economic impacts of drought on us agriculture. **Resources**, 13 mar. 2019. Disponível em: <https://www.resources.org/archives/economic-impacts-drought-us-agriculture/>. Acessado em 06 abr. 2022.

LEONARDI, M.; CARUSO, G.M.; CARROCCIO, S.C.; BONINELLI, S.; CURCURUTO, G.; ZIMBONE, M.; ALLEGRA, M.; TORRISI, B.; FERLITO, F.; MIRITELLO, M. Smart nanocomposites of chitosan/alginate nanoparticles loaded with copper oxide as alternative nanofertilizers. **Environmental Science: Nano**, Londres, v. 8, p. 174-187, jan. 2021

LINH, T. M.; MAI, N. C.; HOE, P. T.; LIEN, L. Q.; BAN, N. K.; HIEN, L. T. T.; CHAU, N. H.; VAN, N. T. Metal-based nanoparticles enhance drought tolerance in soybean. **Journal of nanomaterials**, Londres, v. 2020, n. 4056563, p. 1–13, jun. 2020.

LUTTS, S.; BENINCASA, P.; WOJTYLA, L.; KUBALA, S. S.; PACE, R.; LECHOWSKA, K.; QUINET, M.; GARNCZARSKA, M. Seed Priming: New comprehensive approaches for an old empirical technique. In: Araujo S and Balestrazzi A (eds.) **New challenges in seed biology – Basic and translational research driving seed technology**. Londres, United Kingdom, IntechOpen Limited; 2016. p. 1-46.

MA, C.; BORGATTA, J.; HUDSON, B. G.; TAMIJANI, A. A.; DE LA TORRE-ROCHA, R.; ZUVERZA-MENA, N.; SHEN, Y.; ELMER, W.; XING, B.; MASON, S. E.; HAMERS, R. J.; WHITE, J. C. Advanced material modulation of nutritional and phytohormone status alleviates damage from soybean sudden death syndrome. **Nature nanotechnology**, Londres, v. 15, n. 12, p. 1033–1042, out. 2020.

MALANDRAKIS, A. A.; KAVROULAKIS, N.; CHRYSIKOPOULOS, C. V. Use of copper, silver and zinc nanoparticles against foliar and soil-borne plant pathogens. **The Science of the total environment**, Amesterdã, v. 670, p. 292–299, jun. 2019.

MANJUNATHA, S. B.; BIRADAR, D. P.; ALADAKATTI, Y. R. Nanotechnology and its applications in agriculture: A review. **Journal of Farm Science**, Karnataka, v. 29, n. 1, p. 1-13, jan. 2016.

MORALES-DÍAZ, A.B.; ORTEGA-ORTÍZ, H.; JUÁREZ-MALDONADO, A.; CADENAS-PLIEGO, G.; GONZÁLEZ-MORALES, S.; BENAVIDES-MENDOZA, A. Application of nanoelements in plant nutrition and its impact in ecosystems. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, Bristol, v. 8, n. 013001, fev. 2017.

NETO, M. E.; BRITT, D. W.; JACKSON, K. A.; BRACCINI, A. L.; INOUE, T. T.; BATISTA, M. A. Early development of corn seedlings primed with synthetic tenorite nanofertilizer. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 42, dez. 2020.

OLIVEIRA, T. F.; DOS SANTOS, H. O.; DE CARVALHO, R. A.; DA SILVA, H. W.; PIRES, R. M. O.; CARVALHO, E. R. Reserve mobilization in soybean seeds under water restriction after storage. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 42, ago. 2020.

PAES, Maria Cristina Dias. Manipulação da composição química do milho: impacto na indústria e na saúde humana. **Infobibos**, 18 out 2008. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/milho/index.htm. Acessado em 05 abr 2022.

PARIONA, N.; MTZ-ENRIQUEZ, A.; SÁNCHEZ-RANGEL, D.; CARRIÓN, G.; PARAGUAY-DELGADO, F.; ROSAS-SAITO, G. Green-synthesized copper nanoparticles as a potential antifungal against plant pathogens. **RSC advances**, Londres, v. 9, n. 33, p. 18835–18843, jun. 2019.

PELEGRINO, M. T.; KOHATSU, M. Y.; SEABRA, A. B.; MONTEIRO, L. R.; GOMES, D. G.; OLIVEIRA, H. C.; ROLIM, W. R.; DE JESUS, T. A.; BATISTA, B. L.; LANGE, C. N. Effects of copper oxide nanoparticles on growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings and possible implications of nitric oxide in their antioxidative defense. **Environmental monitoring and assessment**, Berlim, v. 192, n. 4, p. 232, mar. 2020.

PELEGRINO, M. T.; PIERETTI, J. C.; LANGE, C. N.; KOHATSU, M. Y.; FREIRE, B. M.; BATISTA, B. L.; FINCHEIRA, P.; TORTELLA, G. R.; RUBILAR, O.; SEABRA, A. B. Foliar spray application of CuO nanoparticles (NPs) and S-nitrosoglutathione enhances productivity, physiological and biochemical parameters of lettuce plants. **Journal of chemical technology and biotechnology**, Oxford, v. 96, n. 8, p. 2185–2196, jan. 2021.

PEREIRA, A.E.S.; OLIVEIRA, H. C.; FRACETO, L. F.; SANTAELLA, C. Nanotechnology potential in seed priming for sustainable agriculture. **Nanomaterials**, Basel, v. 11, n. 267, jan 2021.

POTTER, M.; DEAKIN, J.; CARTWRIGHT, A.; HORTIN, J.; SPARKS, D.; ANDERSON, A. J.; MCLEAN, J. E.; JACOBSON, A.; BRITT, D. W. Absence of nanoparticle-induced drought tolerance in nutrient sufficient wheat seedlings. **Environmental science & technology**, Whashington, v. 55, n. 20, p. 13541–13550, mai. 2021.

QUITERIO-GUTIÉRREZ, T.; ORTEGA-ORTIZ, H.; CADENAS-PLIEGO, G.; HERNÁNDEZ-FUENTES, A. D.; SANDOVAL-RANGEL, A.; BENAVIDES-MENDOZA, A.; de LA FUENTE, M. C.; JUÁREZ-MALDONADO. The application of selenium and copper nanoparticles modifies the biochemical responses of tomato plants under stress by *Alternaria solani*. **International journal of molecular sciences**, Basel, v. 20, n. 8, p. 1950, abr. 2019.

R, development core team, 2020. **R: A language and environment for statistical computing**. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. Acessado em 06 abr. 2022.

ROLIM, W. R.; PELEGRINO, M. T.; LIMA, B. A.; FERRAZ, L. S.; COSTA, F. N.; BERNARDES, J. S.; RODIGUES, T.; BROCCCHI, M.; SEABRA, A. B. Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles: Characterization, cytotoxicity

evaluation and antibacterial activity. **Applied surface science**, Amesterdã, v. 463, p. 66–74, jan. 2019.

SAFAEI, M.; TARAN, M.; IMANI, M. M. Preparation, structural characterization, thermal properties and antifungal activity of alginate-CuO bionanocomposite. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, Amesterdã, v. 101, p. 323–329, ago. 2019.

SATHIYABAMA, M.; INDHUMATHI, M.; AMUTHA, T. Preparation and characterization of curcumin functionalized copper nanoparticles and their application enhances disease resistance in chickpea against wilt pathogen. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, Amesterdã, v. 29, n. 101823, p. 101823, out. 2020.

SIDDIQUI, M. H.; AL-WHAIBI, M. H.; MOHAMMAD, F.; ALKHAISHANY, M. Y. Role of nanoparticles in plants. In: SIDDIQUI, M. H.; AL-WHAIBI, M. H.; MOHAMMAD, F. (eds.), **Nanotechnology and Plant Sciences: Nanoparticles and Their Impact on Plants**. Switzerland: Springer International Publishing, 2015, p. 19–35.

SILVA, L. P.; BONATTO, C. C.; PEREIRA, F. D. E. S.; SILVA, L. D.; ALBERNAZ, V. L.; POLEZ, V. L. P. Nanotecnologia verde para síntese de nanopartículas metálicas. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria – Vol. 4**. São Paulo: Blucher, 2017, p. 967-1012.

USMAN, M.; FAROOQ, M.; WAKEEL, A.; NAWAZ, A.; CHEEMA, S.A.; REHMAN, H.U.; ASHRAF, I.; SANAYULLAH, M. Nanotechnology in agriculture: Current status, challenges and future opportunities. **Science of the Total Environment**, Amesterdã, v. 721, n. 137778, jun. 2020.

WAQAS, M.A.; KAYA, C.; RIAZ, A.; LI, Y.E. Potential mechanisms of abiotic stress tolerance in crop plants induced by thiourea. **Frontiers in plant science**, Lausanne, v. 10, n. 1336, out. 2019.

WASTOWSKI, A. D.; DA ROSA, G. M.; CHERUBIN, M. R.; RIGON, J. P. G. Caracterização dos níveis de elementos químicos em solo, submetido a diferentes sistemas de uso e manejo, utilizando espectrometria de fluorescência de raios-x por energia dispersiva (EDXRF). **Química Nova**, São Pauo, v. 33, n. 7, set. 2010.

XIONG, T.; ZHANG, S.; JANG, Z.; ZHANG, T.; LI, S. Dose-dependent physiological and transcriptomic responses of lettuce (*Lactuca sativa* L.) to copper oxide nanoparticles-insights into the phytotoxicity mechanisms. **International journal of molecular sciences**, Basel, v. 22, n. 7, p. 3688, 2021.

YANG, K.-Y.; DOXEY, S.; MCLEAN, J. E.; BRITT, D.; WATSON, A.; QASSY, D. A.; JACOBSON, A.; ANDERSON, A. J. Remodeling of root morphology by CuO and ZnO nanoparticles: effects on drought tolerance for plants colonized by a beneficial *Pseudomonas*. **Botany**, Ottawa, v. 96, n. 3, p. 175–186, dez. 2018.

YING, S.; GUAN, Z.; OFOEGBU, P. C.; CLUBB, P.; RICO, C.; HE, F.; HONG, J. Green synthesis of nanoparticles: Current developments and limitations. **Environmental Technology & Innovation**, Amesterdã, v. 26, n. 102336, mai. 2022.

CAPÍTULO III

5. NANOENCAPSULAÇÃO AUMENTA AS RESPOSTAS DE DEFESA INDUZIDAS PELO COBRE DE UMA CULTIVAR SUSCETÍVEL DE *Coffea arabica* CONTRA *Hemileia vastatrix*

RESUMO

Devido aos riscos ambientais dos fungicidas convencionais à base de Cu, as nanopartículas de quitosana carregadas com cobre foram desenvolvidas como nanopesticidas, com o objetivo de proteger as plantas contra diversas doenças. Nesse sentido, objetivou-se verificar os efeitos de nanopartículas de quitosana contendo íons Cu^{2+} sobre discos foliares de *Coffea arabica* cv. IPR 100 infectado com *Hemileia vastatrix*. Os tratamentos foram água como controle (CONT), nanopartículas de quitosana sem íons de Cu^{2+} (NP), nanopartículas de quitosana contendo íons Cu^{2+} (NPCu) e íons Cu^{2+} livres (Cu). Diferentes concentrações de NP (0,25; 0,5; 1 g L⁻¹) e íons Cu^{2+} (1,25; 2,5; 5 mmol L⁻¹) foram testadas. A severidade da ferrugem do café foi de 42% no tratamento CONT, 22% no NP e 2% no NPCu e Cu. Os tratamentos protegeram as folhas de café; no entanto, o NPCu se destacou pela redução do estresse inicial, diminuindo a fitotoxicidade do cobre, promovendo a manutenção da atividade fotossintética e aumentando as respostas antioxidantes, conferindo proteção significativa contra a ferrugem do cafeeiro. Em baixas concentrações (1,25 mmol L⁻¹), o NPCu apresentou maior bioatividade do que o Cu. Esses resultados sugerem que as nanopartículas de quitosana carregadas com cobre podem induzir uma resposta de defesa da planta mais significativa à infecção de *Hemileia vastatrix* do que o cobre convencional, evitando os efeitos tóxicos de altas concentrações de cobre. Assim, este nanomaterial tem grande potencial para ser usado como nano-pesticidas para o manejo de doenças.

Palavras-chave: Ferrugem do cafeeiro; nanopartículas de quitosana; biopolímeros; manejo de doenças; íons de Cu^{2+} .

INTRODUÇÃO

Com distribuição mundial, a ferrugem alaranjada do cafeeiro, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berk & Broome é a doença mais importante da cafeicultura (CUI et al., 2020; GICHURU et al., 2021). Sendo um dos principais fatores limitantes da produção de café arábica, a doença causa de forma precoce, a intensa desfolha na planta e a seca dos ramos, diminuindo significativamente o rendimento das lavouras (SOARES et al., 2022; SILVA et al., 2022). Quando não são adotadas medidas de controle pelos produtores, a produtividade pode ser reduzida em até 50% dependendo das condições ambientais e do nível de resistência do genótipo (JÚNIOR et al., 2015a). Na cafeicultura brasileira, o uso de cultivares resistentes ao fungo e o tratamento químico são as principais formas de controlar a doença (ZAMBOLIM, 2016; SERA et al., 2022).

Os fungicidas sistêmicos possuem ação protetora, curativa e erradicante, permitindo em alguns casos a sua aplicação com índices de ferrugem mais elevados (CUNHA et al., 2004). Entretanto, por possuírem mecanismo de ação específico, a combinação ou uso alternado de fungicidas sistêmicos com os fungicidas de ação não sistêmica (como por exemplo aqueles à base de cobre), é fundamental para minimizar a pressão de seleção dentro da população do patógeno, evitando a resistência múltipla aos fungicidas sistêmicos (SILVA et al., 2019). Os fungicidas cúpricos possuem ação em multissítios, podendo inibir simultaneamente mais de um processo na célula do fungo, em diferentes locais ou organelas (ALVES & JULIATTI, 2018). Fungicidas multissítios desenvolvidos na década de 1950-60 ainda são recomendados para o manejo da doença (ZAMBOLIM, 2016). Levando em consideração os impactos nocivos ao meio ambiente dos fungicidas cúpricos e o risco da resistência aos fungicidas sistêmicos, novas estratégias para a proteção das plantas tornam-se cada vez mais necessárias mediante as limitações e desafios recorrentes, além de serem essenciais para que se possamos atingir uma produção mais sustentável (POSSA et al., 2020).

Neste contexto, a nanotecnologia vem sendo estudada na agricultura com o objetivo de aumentar a eficácia e a eficiência de diferentes agroquímicos atualmente existentes no mercado, bem como a criação de novas ferramentas, visando conciliar uma maior eficácia de uso e a redução na quantidade aplicada, não criando ou diminuindo os efeitos negativos ao agrossistema (KUMARASWAMY et al.,

2018). O desenvolvimento de nanopartículas poliméricas como sistemas carreadores de ingredientes ativos vem se demonstrando uma ferramenta eficiente, conferindo uma melhoria na estabilidade físico-química dos ativos. Ainda, propiciam a liberação modificada para tais ingredientes, auxiliando a fornecê-los no momento e lugar certo, minimizando a ação de agentes externos e diminuindo as perdas por degradação, lixiviação e volatilização, além das ações indesejadas sobre os organismos não-alvo (USMAN et al., 2020).

Dentre a diversidade de materiais para síntese de nanopartículas, a quitosana é um polímero derivado da quitina, sendo considerada um biomaterial muito versátil, biocompatível, biodegradável e não tóxico. Ela possui propriedades mucoadesivas, facilitando o transporte desses compostos ativos através das membranas celulares, o que implica um grande potencial para uso na indústria agroquímica (KUMARASWAMY et al., 2018), como via tratamento de sementes para liberação de ácido giberélico para promoção do crescimento (PEREIRA et al., 2019) e via substrato para a liberação controlada de óxido nítrico para proteção de estresses abióticos (OLIVEIRA et al., 2016; LOPES-OLIVEIRA et al., 2019; DO CARMO et al., 2021; SEABRA et al., 2022; GOMES et al., 2022).

Além de atuar como agente promotor de crescimento de plantas, a quitosana apresenta propriedades antimicrobianas, sendo capaz de induzir a resposta de defesa vegetal contra patógenos (KUMARASWAMY et al., 2018). Outra característica importante da quitosana é possuir uma grande afinidade com o cobre, quando comparado a outros metais, o que permite a obtenção de uma alta eficiência de encapsulação (SAHARAN et al., 2015). O uso de nanopartículas de quitosana contendo íons cobre vem sendo demonstrado com sucesso em espécies vegetais como tomate (SAHARAN et al., 2015), milho (SAHARAN et al., 2016; CHOUDHARY et al., 2017a; 2017b) e milho (SATHIYABAMA & MANIKANDAN, 2018), seja como agente promotor do crescimento de plantas e/ou pela sua ação imunomoduladora e pela ativação de mecanismos de defesa contra estresses bióticos e abióticos.

Neste sentido, o presente estudo objetivou avaliar as respostas de defesa induzidas pela aplicação de nanopartículas de quitosana contendo íons de Cu^{2+} em discos foliares (*Coffea arabica* cv. IPR 100) infectados com *H. vastatrix*, testando a hipótese de que o cobre nanoencapsulado propicie uma melhor defesa quando comparado aos demais tratamentos.

MATERIAL E MÉTODOS

Síntese de CS NPs contendo íons Cu^{2+}

Nanopartículas de quitosana (CS NPs) contendo íons Cu^{2+} foram sintetizadas pelo método de gelificação ionotrópica, conforme relatado anteriormente (GOMES et al., 2021). Resumidamente, quitosana (1 mg mL^{-1}) e CuCl_2 foram dissolvidos em solução de ácido acético (1%) sob agitação vigorosa por 1,5 h. Posteriormente, uma solução de TPP ($0,6 \text{ mg mL}^{-1}$) foi adicionada gota a gota na solução de quitosana/ Cu^{2+} para obtenção das CS NPs. O processo levou à formação de CS NPs contendo 5 mmol L^{-1} de Cu^{2+} . Para CS NPs vazias, um procedimento semelhante foi realizado sem a adição de CuCl_2 .

Caracterização das nanopartículas e eficiência de encapsulamento de íons Cu^{2+} nas CS NPs

Tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta das CS NPs contendo Cu^{2+} foram analisados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), empregando um Nano ZS Zetasizer (Malvern Instruments Co, Malvern, Reino Unido), em células zeta capilares dobradas com comprimento de caminho de 10 mm e utilizando um ângulo fixo de 173° (SILVEIRA et al., 2021). As análises foram realizadas em triplicata.

A eficiência de encapsulamento dos íons Cu^{2+} em CS NPs foi avaliada de forma semelhante ao relatado anteriormente por Gomes et al. 2021. Resumidamente, íons Cu^{2+} livres (não encapsulados) foram separados dos íons Cu^{2+} encapsulados usando filtros ultracentrífugos Amicon (peso molecular de corte de 10 kDa, Millipore, Darmstadt, Alemanha). Os íons Cu^{2+} livres foram quantificados por espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) (Agilent 7900, Hachioji, Japão). As alíquotas de íons Cu^{2+} livres foram acidificadas com HNO_3 (65% v v⁻¹) e o volume completado com água tipo 1. A solução final foi analisada por ICP-MS. As análises foram realizadas em triplicata, e a porcentagem de íons Cu^{2+} encapsulados em CS NPs foi determinada usando a Equação (1):

Eficiência de encapsulamento (%) = $100 \times (\text{Cu}^{2+} \text{ total} - \text{Cu}^{2+} \text{ livre}) / \text{Cu}^{2+} \text{ total}$ (1)

Material biológico e tratamentos

O estudo foi realizado pelo método de discos foliares (ESKES & TOMA-BRAGHINI, 1981), utilizando-se urediniósporos de *H. vastatrix* obtidos em folhas de café infectadas naturalmente no campo, coletados no Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná – IAPAR-EMATER (IDR-Paraná, Londrina, Paraná, BR). As folhas contendo a ferrugem foram coletadas e armazenadas em sacos de papel durante todo o procedimento de coleta (material suplementar) e, posteriormente, encaminhadas para o Laboratório de Ecofisiologia Vegetal do Departamento de Biologia Animal e Vegetal da Universidade Estadual de Londrina (UEL, Londrina, Paraná, BR). Previamente, pipetas Pasteur de 1 mL foram adaptadas, retirando e descartando a parte graduada, mantendo-se apenas a base da pipeta, servindo como recipiente coletor dos urediniósporos. Com auxílio das pipetas, os urediniósporos de *H. vastatrix* foram destacados da superfície abaxial das folhas através de um movimento de raspagem do limbo foliar. Imediatamente após a coleta, os urediniósporos foram colocados em tubos do tipo falcon de 15 mL e armazenados em -80°C até o momento de sua utilização.

Os discos foliares foram obtidos de mudas de café (*Coffea arabica* cv. IPR 100), que é cultivar suscetível à ferrugem alaranjada (SERA et al., 2017). Mudas com seis pares de folhas foram transplantadas dos tubetes para sacos plásticos de formação de mudas de 20 x 26 cm, preenchidos com um solo de textura argilosa previamente esterilizado. Durante o desenvolvimento em viveiro (sombreamento de 50% e sem controle de temperatura ambiente) no Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná – IAPAR-EMATER, foi realizada a manutenção das mudas com produtos fitossanitários recomendados para cultura (de acordo com a necessidade), além da adubação via substrato com Osmocote Plus® (15% de N; 9% de P_2O_5 ; 12% de K_2O ; 1,3% de Mg; 6% de S; 0,05% de Cu; 0,46% de Fe; 0,06% de Mn e 0,02% de Mo). Seis meses antes do início dos experimentos, as mudas foram transferidas para a casa de vegetação pertencente ao Departamento de Biologia Animal e Vegetal da Universidade Estadual de Londrina (UEL, Londrina, Paraná, BR), a qual não possui controle de temperatura ambiente. Foi mantida a adubação para manutenção das

mudas e o controle sanitário feito mediante o monitoramento e remoção manual de plantas e/ou partes afetadas.

Foram feitos diferentes experimentos em condições de laboratório. Para cada um deles, foram coletadas aleatoriamente folhas saudáveis, jovens e completamente expandidas das mudas na casa de vegetação, destacando-as dos ramos mais novos de 60 mudas de café. Os discos foliares foram retirados com auxílio de um perfurador de EVA e papel de 16 mm de diâmetro (5/8"). Posteriormente, os discos foliares foram tratados com: água destilada como tratamento controle (CONT); suspensão de CS NPs vazias (NP); suspensão de CS NPs contendo íons de Cu^{2+} (NPCu) e solução de íons de Cu^{2+} (Cu). A solução estoque de cada grupo de tratamento foi diluída em três diferentes concentrações, baseando-se na concentração correspondente de quitosana nas suspensões de nanopartículas (NP) em relação à concentração de íons de Cu^{2+} nas suspensões contendo cobre (NPCu; Cu), totalizando 10 tratamentos e expressos de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 Tratamentos aplicados aos discos foliares e concentração correspondente de quitosana nas suspensões de nanopartículas (NP) em relação à concentração de íons de Cu^{2+} nas suspensões contendo cobre (NPCu; Cu).

Tratamentos	CS (g L^{-1})	Cu^{2+} (mmol L^{-1})
CONT	0,00	0,00
NP0.25	0,25	0,00
NP0.5	0,50	0,00
NP1	1,00	0,00
NPCu1.25	0,25	1,25
NPCu2.5	0,50	2,50
NPCu5	1,00	5,00
Cu1.25	0,00	1,25
Cu2.5	0,00	2,50
Cu5	0,00	5,00

O procedimento para tratar e inocular os discos foliares foi o mesmo para todos os ensaios que envolveram as respostas à infecção com *H. vastatrix*, mudando apenas o tipo de unidade experimental e o número de tratamentos. Individualmente e com auxílio de uma pinça metálica, os discos foliares cortados foram submergidos por 5 segundos em um béquer de vidro contendo 30 mL do respectivo tratamento. Após os tratamentos, os discos foliares foram colocados sobre espuma (2 cm de espessura) previamente saturada com água destilada e acomodada em caixas plásticas de poliestireno cristal transparente (Gerbox®) de dimensão 11 cm

(largura) x 11 cm (comprimento) x 3 cm (altura). A inoculação foi feita 24 horas após o tratamento dos discos foliares, sendo os urediniósporos previamente retirados do -80°C . A quantidade necessária foi separada em microtubos de 0,6 mL, que foram, logo em seguida, incubados em banho maria a 40°C por 10 minutos. Após o período de incubação, os microtubos foram mantidos em temperatura ambiente por duas horas. Para o inóculo, foi preparada uma suspensão de urediniósporos viáveis na concentração de 1 mg mL^{-1} em água destilada. Sob agitação constante, coletou-se com auxílio de uma micropipeta automática 0,025 mL do inóculo, adicionando-o em seguida no centro da face abaxial de cada disco foliar (material suplementar). As caixas plásticas com os discos foliares inoculados foram mantidos no escuro por 48 horas e com controle de temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). Após o período de câmara escura, as tampas das caixas foram abertas por um tempo para reduzir o tamanho das gotas antes de manter a luminosidade alta. Em seguida, as caixas foram fechadas e colocadas sob radiação fotossinteticamente ativa de $102\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ e fotoperíodo de 12 horas.

Experimento para avaliação da fitotoxicidade

O experimento foi composto com os grupos e concentrações descritas na Tabela 2, totalizando 10 tratamentos. Os discos foliares não foram inoculados após o tratamento e ficaram sob luz natural do ambiente e controle de temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). A análise visual e os conteúdos de pigmentos dos discos foliares foram determinados aos 40 dias após os tratamentos, como forma de avaliação da fitotoxicidade. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento. Cinco discos foliares por repetição foram coletados e incubados em 5 mL de solução de acetona 80% (v/v) em tampão fosfato de sódio 2,5 mM (pH 7,8). Posteriormente, os extratos foram centrifugados a $1800\times g$ por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e a leitura da absorbância nos comprimentos de onda 663,2; 646,8 e 470 nm. As concentrações de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides foram calculadas utilizando-se as fórmulas propostas por Lichtenthaler e Buschmann (2001). Foram calculados o teor de clorofila total (somando as clorofilas *a* e *b*), a razão clorofila *a*/clorofila *b* e a razão clorofila total/carotenoides.

Experimento para avaliação da infecção com Hemileia vastatrix

O experimento foi composto com os grupos e concentrações descritas na Tabela 1, totalizando 10 tratamentos. Os discos foliares foram inoculados seguindo a metodologia descrita anteriormente. Para analisar a infecção dos discos foliares com *H. vastatrix*, as unidades experimentais foram constituídas por caixas plásticas com 15 discos foliares, utilizando-se cinco caixas por tratamento. O valor da variável em cada repetição é a média dos discos foliares. A avaliação da doença foi realizada por meio de registro fotográfico aos 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 dias após a infecção (DAI), sendo as fotos utilizadas para acompanhar a progressão da doença e para apoiar as avaliações subsequentes. Foram avaliadas no experimento:

Incidência (aos 15 DAI) – definida como a porcentagem de discos foliares de cada repetição com sintomas da doença;

Esporulação (aos 25 DAI) – definida como a porcentagem de discos foliares contendo lesões com esporulação;

Severidade (aos 40 DAI) – definida como a porcentagem da área foliar lesionada, ao final do experimento. Para obtenção dessa variável foram utilizadas as fotos caixas e o software ImageJ (SCHNEIDER et al., 2012) para determinação da área lesionada em cada disco.

Os conteúdos de pigmentos dos discos foliares foram determinados aos 40 DAI. Para isso, a superfície dos discos foliares utilizados foi limpa com água deionizada e, em seguida, seca com papel antes dos discos foliares serem incubados em solução de acetona 80 % (v/v) em tampão fosfato de sódio 2,5 mM (pH 7,8), seguindo a metodologia anteriormente descrita.

Experimento para avaliação de dano oxidativo e atividade de enzimas antioxidantes

O experimento foi constituído de forma semelhante ao experimento destinado para avaliação da infecção com *H. vastatrix*. Entretanto, baseado nos resultados dos experimentos anteriores, as maiores concentrações de NP (1 g L⁻¹), NPCu e Cu (5 mmol L⁻¹) foram removidas dos experimentos subsequentes para avaliação de dano oxidativo e atividade enzimática, totalizando sete tratamentos.

Para cada análise bioquímica, foram utilizadas 4 repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por 3 discos foliares de cada caixa plástica, selecionados aleatoriamente em cada caixa. Os discos foliares foram coletados, pesados e acondicionados separadamente por repetição em envelopes de alumínio previamente identificados, imediatamente imersos em nitrogênio líquido e armazenados em -80°C até o momento das análises. As avaliações foram feitas com 5 e 15 DAI. O conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e malondialdeído (MDA) foram determinados como marcadores de dano oxidativo, seguindo a metodologia descritas por Alexieva et al. (2001) e Camejo et al. (1998), respectivamente.

Para quantificar a atividade das enzimas antioxidantes, as amostras foram homogeneizadas em 1,5 mL de tampão de extração, constituído de EDTA 1 mM em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,5), suplementado com polivinil-pirolidona (PVPP) 2% (p/v), seguido da centrifugação a $15.645 \times g$ (4°C por 20 min). A atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) foi determinada de acordo com o método proposto por Nakano e Asada (1981), monitorando o consumo de ascorbato a 290 nm na presença de H_2O_2 . A atividade da enzima catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi determinada segundo Aebi et al. (1974), Anderson et al. (1995) e Peixoto et al. (1999), seguindo a redução da absorbância do H_2O_2 em 240 nm. A atividade da enzima peroxidase (POD, EC 1.11.1.7) foi determinada pela metodologia proposta por Peixoto et al. (1999), monitorando o aumento da absorbância a 420 nm resultante da oxidação do pirogalol na presença de H_2O_2 . A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) foi determinada de acordo com Giannopolitis e Ries (1977), medindo a capacidade do extrato enzimático em inibir a fotorredução do cloreto de tetrazólio-nitroazul (NBT).

Experimento para avaliação da fluorescência da clorofila a e atividade das enzimas PAL e PPO

O experimento foi constituído de forma semelhante ao experimento destinado para avaliação de dano oxidativo e atividade de enzimas antioxidantes, totalizando os mesmos sete tratamentos, seguindo o mesmo procedimento para coleta e armazenamento dos discos foliares até o momento das análises. As avaliações foram feitas com 5 e 15 DAI.

As variáveis de fluorescência da clorofila *a* foram medidas em discos foliares usando um fluorômetro portátil OS1p (Opti-Sciences, Hudson, NY, EUA). Os discos de folhas foram adaptados ao escuro por 15 minutos usando cliques FL-DC, e a fluorescência basal (F_0) foi medida usando uma luz fraca modulada por 0,1 s (10% de intensidade). Em seguida, as folhas foram expostas a um pulso de saturação de luz ($8250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 0,8 s para medir o rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) (BAKER, 2008). A taxa relativa de transporte de elétrons do fotossistema II (rETR) foi determinada em discos foliares adaptados à luz expostos à radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de $102 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A fluorescência basal (F') e a fluorescência máxima (F_m') dos discos foliares adaptados à luz foram determinadas antes e depois da exposição ao pulso de saturação de luz, respectivamente, e ΔF foi calculado como a diferença entre F_m' e F' . O rETR foi calculado de acordo com a equação indicada por Baker (2008):

$$\text{rETR} = \Delta F / F_m' \times \text{PAR} \times 0,5 \times 0,84 \quad (2)$$

Para quantificar a atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL, EC 4.3.1.5) e polifenoloxidase (PPO, EC 1.10.3.1), as amostras foram homogeneizadas em 1,5 mL de tampão de extração, constituído de EDTA 1 mM em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,5), suplementado com polivinil-poli-pirrolidona (PVPP) 2% (p/v) e ditioneitol (DTT) 10 mM, seguido da centrifugação a $15.645x g$ (4°C por 20 min). A atividade enzimática da PAL foi determinada monitorando o aumento da absorbância na faixa de 290 nm resultante da desaminação não-oxidativa da L-fenilalanina para formar ácido transcinâmico e um íon amônio livre. A atividade enzimática da PPO foi quantificada monitorando o aumento da absorbância a 420 nm resultante da reação de oxidação dependente de oxigênio de monofenóis. Ambas as atividades foram determinadas de acordo com a metodologia proposta por Peixoto et al. (1999).

Análises estatísticas

Para todos os experimentos conduzidos, o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado. Primeiramente, foram feitos testes e análises gráficas dos resíduos para verificar a normalidade, homogeneidade de variância e independência. No experimento para avaliação da fitotoxicidade, os resultados foram submetidos à análise de regressão ($p < 0.05$). No experimento para avaliação da infecção com *H.*

vastatrix, devido a impossibilidade de serem analisadas por estatística paramétrica, as variáveis incidência, esporulação e severidade foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis, aplicando-se posteriormente o teste de Dunn ($p < 0.05$) para comparação múltipla dos postos médios. A concentração de pigmentos foi submetida à análise de regressão ($p < 0.05$). Nos demais experimentos para avaliação de dano oxidativo, atividade enzimática e fluorescência da clorofila *a*, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F e, quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott ($p < 0.05$). Todas as análises foram feitas utilizando o programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2022), empregando o uso dos pacotes *easynova*, *ExpDes.pt*, *asbio*, *PMCMR* e *agricolae*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização das nanopartículas e eficiência de encapsulamento de íons Cu^{2+} nas CS NPs

CS NPs contendo íons Cu^{2+} foram sintetizados com sucesso pelo método de gelificação ionotrópica, no qual as cadeias de quitosana carregadas positivamente foram reticuladas com o poliânion TPP. CS NPs contendo Cu^{2+} (na concentração de 5 mmol L^{-1}) demonstraram um tamanho hidrodinâmico médio de $173,0 \pm 8,4 \text{ nm}$, PDI de $0,40 \pm 0,02$ e um potencial zeta positivo de $27,4 \pm 1,6 \text{ mV}$. A eficiência de encapsulação de Cu^{2+} foi de $57,8 \%$, indicando que $2,9 \text{ mmol L}^{-1}$ de Cu^{2+} foi incorporado às CS NPs.

CS NPs contendo Cu^{2+} foram encontradas em nanoescala com moderada polidispersão e um potencial zeta positivo devido à natureza catiônica da quitosana. A magnitude do potencial zeta sugere a formação de uma dispersão coloidal estável. Esses resultados estão de acordo com a publicação anterior (GOMES et al., 2021). A eficiência de encapsulação de Cu^{2+} (concentração inicial 5 mmol L^{-1}) foi menor ($57,8\%$) em comparação com a eficiência de encapsulação de Cu^{2+} na concentração inicial de 1 mmol L^{-1} (97%) relatada por Gomes et al. 2021. Como esperado, essas nanopartículas, contendo íons Cu^{2+} são formadas espontaneamente pelas interações eletrostáticas de Cu^{2+} , cadeia de quitosana e TPP, com uma concentração ótima para cada componente. Ressalta-se que para plantas tratadas com íons Cu^{2+} livres, foi selecionado a concentração de 5 mmol L^{-1} e, no caso do

tratamento NPCu, leva-se em consideração ambas quantidades de íons (encapsulados e não encapsulados).

Experimento para avaliação da fitotoxicidade

Em relação ao aspecto visual dos discos de folhas, não foram observados sintomas de fitotoxicidade 40 dias após os tratamentos em nenhuma das concentrações testadas. Em relação ao conteúdo de clorofila *a*, foi possível verificar aumentos proporcionados pelos tratamentos NP e NPCu, destacando-se ganhos de 33% (NP 0,25 g L⁻¹) e 50% (NPCu 2,5 mmol L⁻¹), em comparação ao CONT (0 g L⁻¹ ou mmol L⁻¹) (Fig. 18a). Por outro lado, em nenhuma das concentrações testadas, o tratamento Cu influenciou no conteúdo do pigmento (Fig. 18b). Para o conteúdo de clorofila *b*, todos os tratamentos proporcionaram aumento no conteúdo do pigmento em comparação ao CONT, destacando-se ganhos de 23% (NP 0,25 g L⁻¹), 26% (Cu 5 mmol L⁻¹) e 42% (NPCu 2,5 mmol L⁻¹) (Fig. 18c, 18d). Em relação a razão clorofila *a*/clorofila *b*, é possível verificar uma redução proporcionada pelo aumento das concentrações dos tratamentos, destacando-se a redução provocada pelo tratamento Cu (Fig. 18e, 18f).

Os tratamentos NP e NPCu proporcionaram ganhos significativos no conteúdo total de clorofilas, destacando-se aumento de 28% (NP 0,25 g L⁻¹) e 46% (NPCu 2,5 mmol L⁻¹) em relação ao CONT (Fig. 19a). Por outro lado, em nenhuma das concentrações testadas, o tratamento Cu influenciou significativamente na quantidade total de clorofilas (Fig. 19b). Em relação ao conteúdo de carotenoides, constatou-se aumento de 13% (NP 0,5 g L⁻¹) e 17% (NPCu 2,5 mmol L⁻¹), seguida de uma redução nas maiores concentrações de NP e NPCu em comparação ao CONT (Fig. 19c). Em contrapartida, o tratamento Cu promoveu redução do conteúdo de carotenoides em todas as concentrações testadas, com uma redução de 23% provocada pela maior concentração (Cu 5 mmol L⁻¹) (Fig. 19d). Para a razão entre o total de clorofilas/carotenoides, o tratamento NPCu proporcionou aumento significativo em todas as concentrações testadas em comparação ao CONT, destacando-se ganho de 55% na maior concentração (NPCu 5 mmol L⁻¹). Em compensação, apesar do aumento de 22% (NP 0,25 g L⁻¹) e 52% (Cu 2,5 mmol L⁻¹), verificou-se redução em função do aumento das concentrações dos tratamentos NP e Cu (Fig. 19e, 19f).

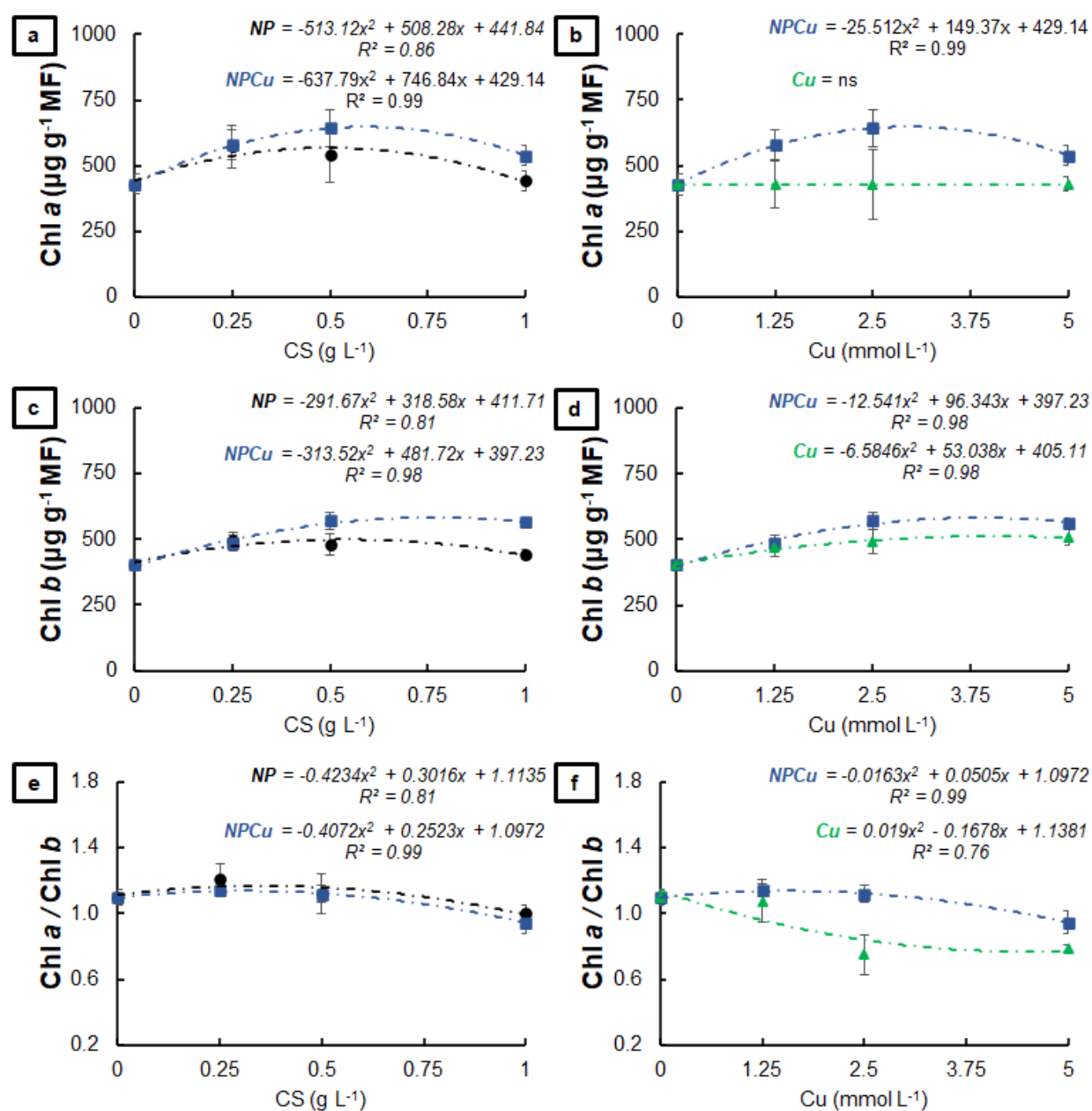


Figura 18 Clorofila (Chl) a (a,b), clorofila b (c,d) e relação clorofila a/clorofila b (e,f) dos discos foliares de *Coffea arabica* cv. IPR 100 aos 40 dias após o tratamento com água destilada, como controle (CONT), nanopartículas de quitosana sem íons Cu^{2+} (NP), nanopartículas de quitosana contendo íons Cu^{2+} (NPCu) e íons Cu^{2+} livres (Cu). As formulações foram diluídas em água destilada, obtendo-se as concentrações correspondentes de quitosana (CS) nos tratamentos NP e NPCu (0,25; 0,5; 1 g L^{-1}) e de íons Cu^{2+} (1,25; 2,5; 5 mmol L^{-1}) nos tratamentos NPCu e Cu. Os resultados são expressos como média ($n = 4$) \pm erro padrão. O modelo e coeficiente de determinação (R^2) também são apresentados ($p < 0,05$). ns = não significativo.

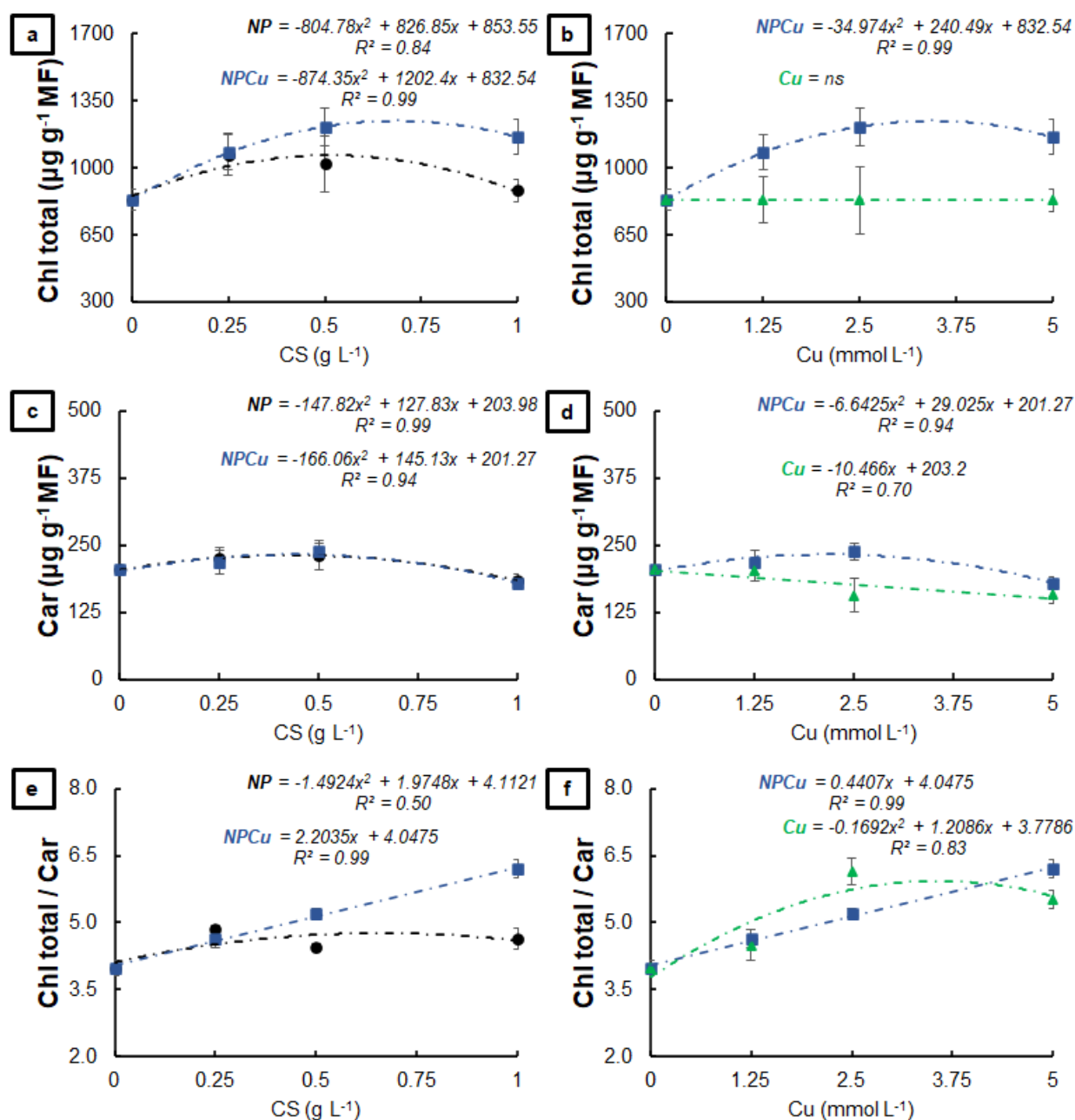


Figura 19 Clorofila total (Chl total) (a,b), carotenoides (Car) (c,d) e razão clorofila total/carotenoides (e,f) dos discos foliares de *Coffea arabica* cv. IPR 100 aos 40 dias após o tratamento com água destilada, como controle (CONT), nanopartículas de quitosana sem íons Cu^{2+} (NP), nanopartículas de quitosana contendo íons Cu^{2+} (NPCu) e íons Cu^{2+} livres (Cu). As formulações foram diluídas em água destilada, obtendo-se as concentrações correspondentes de quitosana (CS) nos tratamentos NP e NPCu (0,25; 0,5; 1 g L^{-1}) e de íons Cu^{2+} (1,25; 2,5; 5 mmol L^{-1}) nos tratamentos NPCu e Cu. Os resultados são expressos como média ($n = 4$) \pm erro padrão. O modelo e coeficiente de determinação (R^2) também são apresentados ($p < 0,05$). ns = não significativo.

As formulações contendo CS NPs (NP e NPCu) promoveram efeito dose-dependente, destacando-se o aumento do teor de clorofilas e carotenoides na concentração intermediária. Em contraste, os tratamentos com Cu diminuíram o teor de carotenoides em todas as concentrações testadas, o que indicou fitotoxicidade. Choudhary et al (2017b) relataram que CS NPs contendo Cu^{2+} reduziram o conteúdo de clorofilas *a* e *b* em folhas de milho à medida que a concentração de nanopartículas aumentava. No presente estudo, o incremento nos níveis de clorofila pelos tratamentos com NP e NPCu pode estar ligado à ativação de genes relacionados à síntese desse pigmento, promovido pela quitosana (KUMARASWAMY et al., 2018). As alterações nas proporções de pigmentos (diminuição de clorofila *a*/clorofila *b* e aumento de clorofila/carotenóide) indicam uma maximização da captura de luz sob o ambiente de pouca luz do experimento (RUBERTI et al., 2012). Com relação ao teor dos pigmentos avaliados, o NPCu proporcionou os ganhos mais significativos, que podem estar relacionados aos efeitos bioestimulantes da quitosana e à mitigação da fitotoxicidade do excesso de cobre por meio da liberação controlada do elemento pelas nanopartículas.

Experimento para avaliação da infecção com Hemileia vastatrix

No aspecto visual, foi possível constatar uma alta incidência da doença nos tratamentos CONT e NP (0,25 e 0,5 g L⁻¹) aos 15 DAI (Fig. 20). Nos outros tratamentos, a incidência da doença nos discos foliares aos 15 DAI foi consideravelmente inferior (Fig. 21). No geral, a esporulação iniciou aos 20 DAI, intensificando-se aos 25 DAI nos tratamentos CONT, NP e nos tratamentos NPCu e Cu (1,25 mmol L⁻¹). Por outro lado, é visível o efeito protetor conferido pelos tratamentos NPCu e Cu (2,5 e 5 mmol L⁻¹) ao longo dos 40 DAI, comparando-os com os tratamentos CONT e NP (Fig. 20, 21).



Figura 20 Foto representativa da progressão da doença nos tratamentos CONT (a), NP0.25 (b), NP0.5 (c), NP1 (d) e NPCu1.25 (e) de discos (\varnothing 16 mm) de folhas de café (*Coffea arabica* cv. IPR 100) aos 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 dias após a infecção (DAI) com *H. vastatrix*. Antes da infecção, os discos foram tratados com água destilada, como controle (CONT), nanopartículas de quitosana/tripolifosfato de sódio sem íons Cu^{2+} (NP); nanopartículas de quitosana /tripolifosfato de sódio contendo íons Cu^{2+} (NPCu), íons de Cu^{2+} em sua forma livre, não-encapsulado (Cu). As formulações foram diluídas em água destilada, obtendo-se a concentração correspondente de quitosana no tratamento NP (0,25; 0,5; 1 g L^{-1}) em relação a concentração de íons de Cu^{2+} (1,25; 2,5; 5 mmol L^{-1}) nos tratamentos NPCu e Cu.

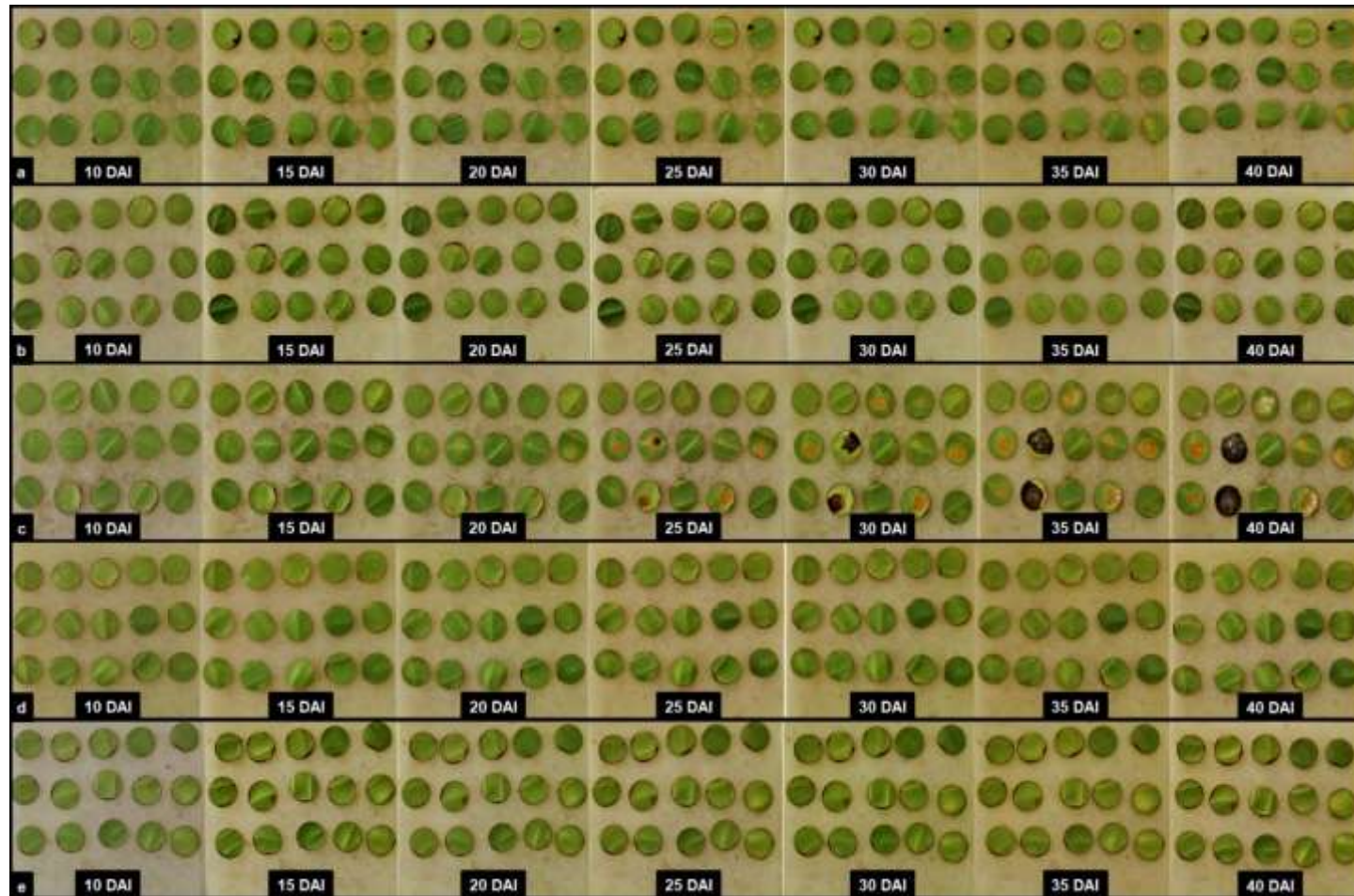


Figura 21 Foto representativa da progressão da doença nos tratamentos NPCu2.5 (a), NPCu5 (b), Cu1.25 (c), Cu2.5 (d) e Cu5 (e) de discos (\varnothing 16 mm) de folhas de café (*Coffea arabica* cv. IPR 100) aos 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 dias após a infecção (DAI) com *H. vastatrix*. Antes da infecção, os discos foram tratados com água destilada, como controle (CONT), nanopartículas de quitosana/tripolifosfato de sódio sem íons Cu^{2+} (NP); nanopartículas de quitosana /tripolifosfato de sódio contendo íons Cu^{2+} (NPCu), íons de Cu^{2+} em sua forma livre, não-encapsulado (Cu). As formulações foram diluídas em água destilada, obtendo-se a concentração correspondente de quitosana no tratamento NP (0,25; 0,5; 1 g L^{-1}) em relação a concentração de íons de Cu^{2+} (1,25; 2,5; 5 mmol L^{-1}) nos tratamentos NPCu e Cu.

Nos tratamentos CONT e NP (0,25 e 0,5 g L⁻¹), 97% dos discos foliares apresentavam os primeiros sintomas da infecção por *H. vastatrix*. Por outro lado, NP (1 g L⁻¹) e Cu (1,25 mmol L⁻¹) apresentaram 44% dos discos foliares com a incidência da doença, enquanto no tratamento NPCu (1,25 mmol L⁻¹), a incidência foi em 28% dos discos foliares. Os tratamentos NPCu e Cu (2,5 e 5 mmol L⁻¹) apresentaram a menor incidência da doença (inferior a 2% dos discos foliares) (Fig. 22a). A esporulação nos tratamentos CONT e NP (0,25 e 0,5 g L⁻¹) foi em 94% dos discos foliares. Os tratamentos NP (1 g L⁻¹), NPCu e Cu (1,25 mmol L⁻¹) não diferiram entre si, apresentando esporulação em 25% dos discos foliares. Nos tratamentos NPCu e Cu (2,5 e 5 mmol L⁻¹), a esporulação foi praticamente nula, com menos de 1% dos discos foliares apresentando esporulação aos 25 DAI (Fig. 22b). Em relação a severidade da doença aos 40 DAI, o padrão observado foi o mesmo. Em média, os tratamentos CONT e NP (0,25 e 0,5 g L⁻¹) apresentaram 35% da área do disco foliar lesionada. Os tratamentos NP (1 g L⁻¹), NPCu e Cu (1,25 mmol L⁻¹) não diferiram entre si, apresentando próximo de 5% da área do disco lesionada. Nos tratamentos NPCu e Cu (2,5 e 5 mmol L⁻¹) a área foliar lesionada foi menos de 1% (Fig. 22c).

Os tratamentos NP, NPCu e Cu foram eficientes na proteção dos discos foliares, reduzindo a incidência, esporulação e severidade da *H. vastatrix*. Entretanto, é facilmente constatado a superioridade dos tratamentos NPCu e Cu em comparação ao NP e CONT (Fig. 20, 21, 22). O cobre em sua forma convencional vem sendo usado há anos como ingrediente ativo de fungicidas de contato para o controle de fungos patogênicos, sendo estes produtos compostos por sulfato de cobre, hidróxido de cobre, oxiclreto de cobre ou carbonato de cobre (HUSAK, 2015).

Os tratamentos NPCu e Cu afetaram positivamente o conteúdo de clorofila *a*, com aumentos de 107% (Cu 2,5 mmol L⁻¹) e 133% (NPCu 2,5 mmol L⁻¹) em comparação ao CONT, enquanto NP não afetou este parâmetro (Fig. 23a, 23b). Todos os tratamentos proporcionaram maiores conteúdos de clorofila *b* do que o CONT, destacando-se aumentos de 95% (NP 1 g L⁻¹), 129% (Cu 2,5 mmol L⁻¹) e 215% (NPCu 2,5 mmol L⁻¹) (Fig. 23c, 23d). Em relação a razão clorofila *a*/clorofila *b*, é possível verificar uma redução proporcionada pelo aumento das concentrações dos tratamentos NPCu e Cu (Fig. 23e, 23f).

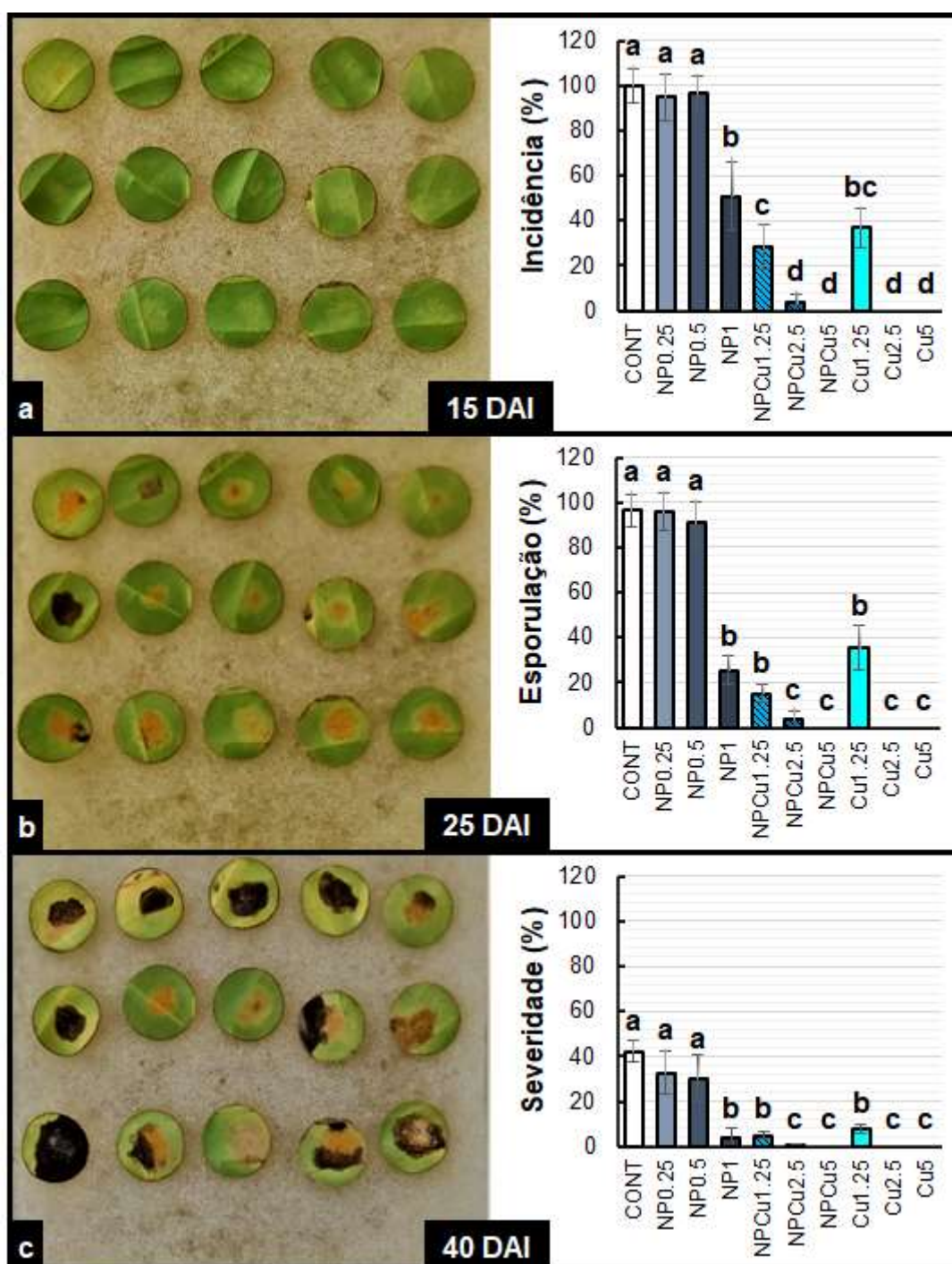


Figura 22 Incidência (a), esporulação (b) e severidade (c) da doença de *Hemileia vastatrix* em discos foliares de *Coffea arabica* cv. IPR 100 aos 15, 25 e 40 dias após a infecção (DAI). Antes da infecção, os discos foram tratados com água destilada como controle (CONT), nanopartículas de quitosana sem íons Cu^{2+} (NP), nanopartículas de quitosana contendo íons Cu^{2+} (NPCu) e íons Cu^{2+} livres (Cu). As formulações foram diluídas em água destilada, obtendo-se as concentrações correspondentes de quitosana (CS) nos tratamentos NP e NPCu (0,25; 0,5; 1 g L^{-1}) e de íons Cu^{2+} (1,25; 2,5; 5 mmol L^{-1}) nos tratamentos NPCu e Cu. Os resultados são expressos como média ($n = 4$) \pm erro padrão. Letras iguais nas colunas indicam que não houve diferença significativa pelo teste de Dunn ($p < 0,05$).

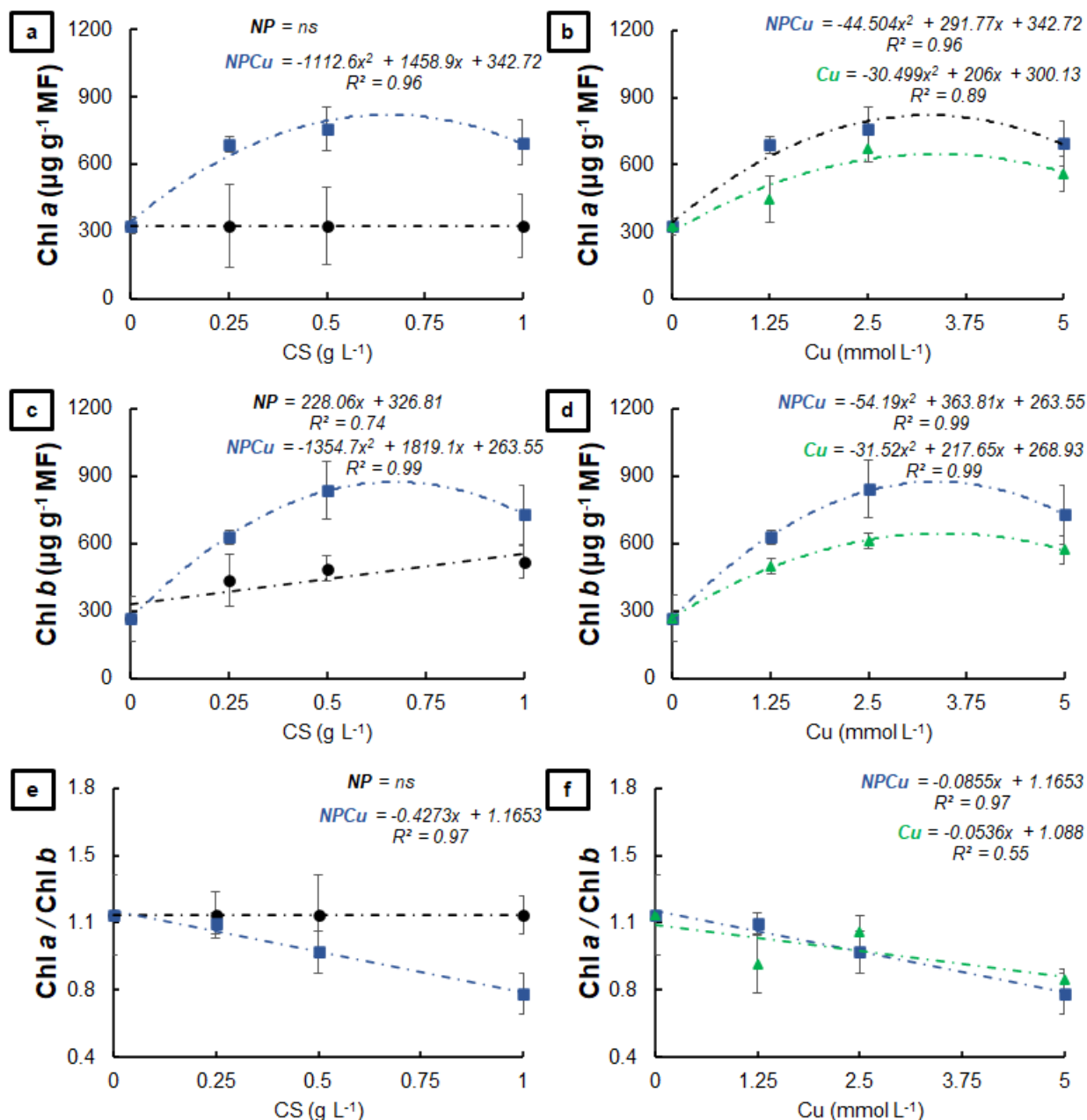


Figura 23 Clorofila (Chl) a (a,b), clorofila b (c,d) e relação clorofila a/clorofila b (e,f) dos discos foliares de *Coffea arabica* cv. IPR 100 aos 40 dias após a infecção (DAI) com *H. vastatrix*. Antes da infecção, os discos foram tratados com água destilada como controle (CONT), nanopartículas de quitosana sem íons Cu^{2+} (NP), nanopartículas de quitosana contendo íons Cu^{2+} (NPCu), e íons Cu^{2+} livres (Cu). As formulações foram diluídas em água destilada, obtendo-se as concentrações correspondentes de quitosana (CS) nos tratamentos NP e NPCu (0,25; 0,5; 1 $g L^{-1}$) e de íons Cu^{2+} (1,25; 2,5; 5 $mmol L^{-1}$) nos tratamentos NPCu e Cu. Os resultados são expressos como média ($n = 4$) \pm erro padrão. O modelo e coeficiente de determinação (R^2) também são apresentados ($p < 0,05$). ns = não significativo.

Todos os tratamentos promoveram maior quantidade total de clorofilas do que o CONT, destacando-se aumentos de 82% (NP 1 $g L^{-1}$), 113% (Cu 2,5 $mmol L^{-1}$) e 170% (NPCu 2,5 $mmol L^{-1}$) (Fig. 24a, 24b). Igualmente, todos os tratamentos proporcionaram aumento no conteúdo de carotenoides em comparação

ao CONT (Fig. 24c, 24d), assim como a razão entre o total de clorofilas/carotenoides, com aumentos de 55% (NP 1 g L⁻¹), 142% (Cu 5 mmol L⁻¹) e 155% (NPCu 5 mmol L⁻¹) (Fig. 24e, 24f).

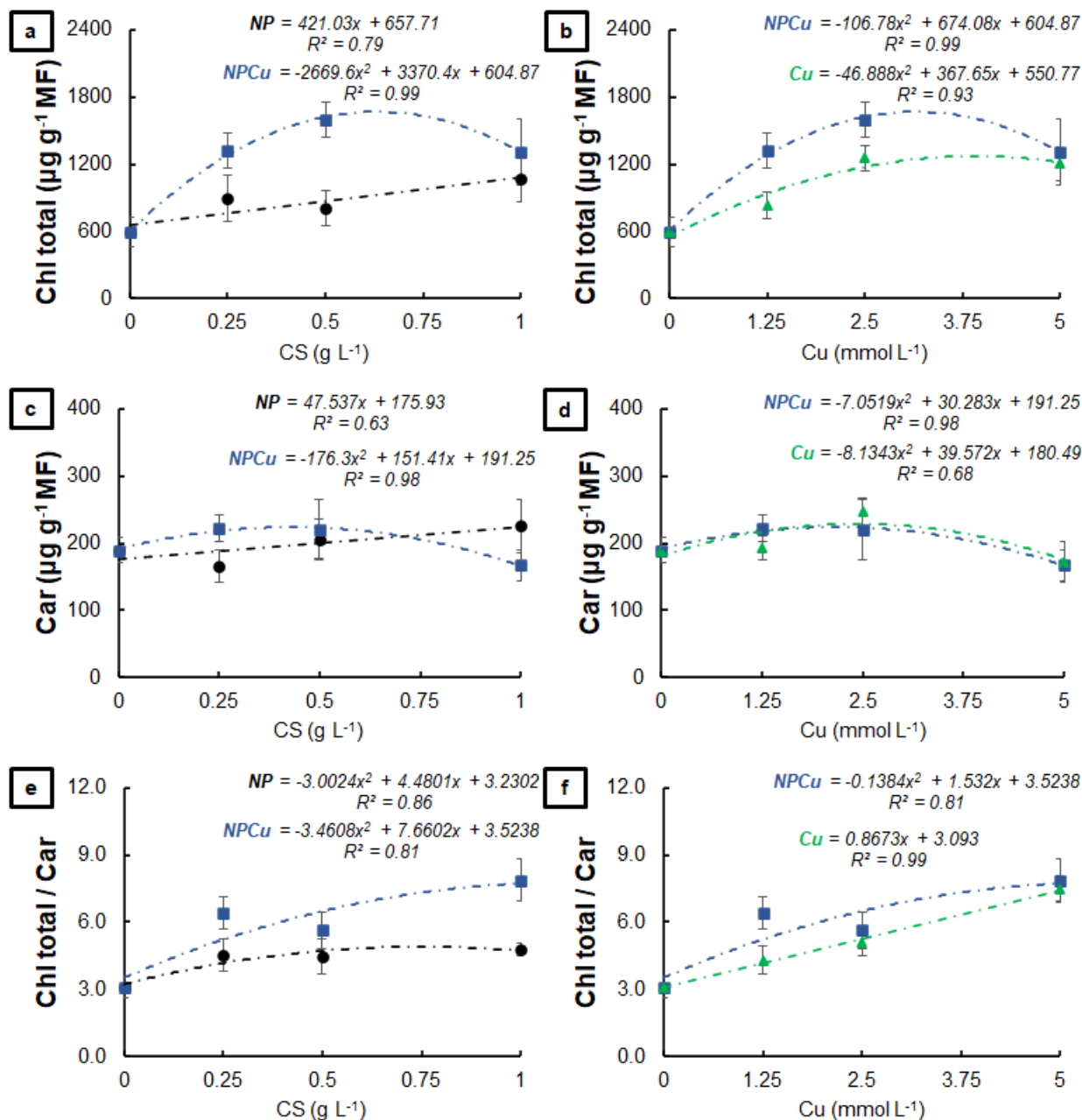


Figura 24 Clorofila total (Chl total) (a,b), carotenoides (Car) (c,d) e razão clorofila total/carotenoides (e,f) dos discos foliares de *Coffea arabica* cv. IPR 100 dias após a infecção (DAI) com *H. vastatrix*. Antes da infecção, os discos foram tratados com água destilada como controle (CONT), nanopartículas de quitosana sem íons Cu²⁺ (NP), nanopartículas de quitosana contendo íons Cu²⁺ (NPCu) e íons Cu²⁺ livres (Cu). As formulações foram diluídas em água destilada, obtendo-se as concentrações correspondentes de quitosana (CS) nos tratamentos NP e NPCu (0,25; 0,5; 1 g L⁻¹) e de íons Cu²⁺ (1,25; 2,5; 5 mmol L⁻¹) nos tratamentos NPCu e Cu. Os resultados são expressos como média ($n = 4$) \pm erro padrão. O modelo e o coeficiente de determinação (R^2) também são mostrados ($p < 0,05$).

NPCu proporcionou as maiores concentrações de clorofila nos discos foliares e, tanto NPCu quanto Cu, promoveram um efeito duplo semelhante em relação ao conteúdo de carotenoides. Para as clorofilas, houve um efeito protetor mais significativo que foi conferido pela nanoencapsulação de cobre em todas as concentrações testadas, o que indica uma melhor bioatividade resultante da associação entre quitosana e cobre. Saharan et al. (2015) demonstraram que as CS NPs possuem porosidade, o que permite a adesão do cobre. A arquitetura porosa é responsável pela liberação gradual do cobre da nanoestrutura, tornando duradouro o contato das células vegetais com o cobre. Esta característica estrutural confere à quitosana uma maior afinidade com o cobre do que com outros metais. CS NPs contendo cobre mostraram alta atividade antifúngica contra *Alternaria alternata*; *Macrophomia phaseolina* e *Rhizoctonia solani* (SAHARAN et al., 2013), *Alternaria solani* e *Fusarium oxysporum* (SAHARAN et al., 2015), *Curvularia lunata* (CHOUDHARY et al., 2017b) e *Pyricularia grisea* (SATHIYABAMA & MANIKANDAN, 2018). Nos tratamentos NP, a proteção está associada às características naturais da quitosana. Além de atuar como agente promotor do crescimento vegetal, a quitosana possui propriedades antimicrobianas e pode induzir uma resposta de defesa da planta contra patógenos. Além da versatilidade, a quitosana é biocompatível, biodegradável e pode ser mucoadesiva (KUMARASWAMY et al., 2018).

Os efeitos adversos do aumento das concentrações de todas as formulações foram observados nos experimentos, especialmente nos tratamentos contendo cobre (NPCu e Cu). Assim, as maiores concentrações dos tratamentos NP (1 g L^{-1}), NPCu (5 mmol L^{-1}) e Cu (5 mmol L^{-1}) foram removidas em experimentos subsequentes para avaliar dano oxidativo, atividade enzimática e fluorescência da clorofila *a*.

Experimento para avaliação de dano oxidativo e atividade de enzimas antioxidantes

Mudanças significativas no conteúdo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e malondialdeído (MDA) foram induzidas pelos tratamentos aplicados (Fig. 25). Aos 5 DAI, os tratamentos NP ($0,25$ e $0,5 \text{ g L}^{-1}$) apresentaram, em média, 13% a mais de H_2O_2 em relação ao CONT, enquanto os tratamentos Cu ($1,25$ e $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$) não afetaram este parâmetro. Por outro lado, os tratamentos com NPCu ($1,25$ e $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$) reduziram o teor de H_2O_2 nos discos foliares infectados em 20%. Aos 15 DAI,

apenas NP (0,5 g L⁻¹) diferiu do CONT, mantendo o maior teor de H₂O₂ (Figura 25a). Com relação ao teor de MDA, apenas o tratamento Cu (2,5 mmol L⁻¹) não diferiu do CONT, com maiores concentrações de MDA observadas nos demais tratamentos aos 5 DAI. Aos 15 DAI, os tratamentos Cu (1,25 e 2,5 mmol L⁻¹) e NP (0,5 g L⁻¹) não apresentaram diferenças significativas para o CONT, enquanto o tratamento NP (0,25 g L⁻¹) induziu um aumento de 46% no conteúdo do MDA. Já os tratamentos com NPCu (1,25 e 2,5 mmol L⁻¹) promoveram uma redução média de 37% no teor de MDA em relação ao CONT (Figura 25b).

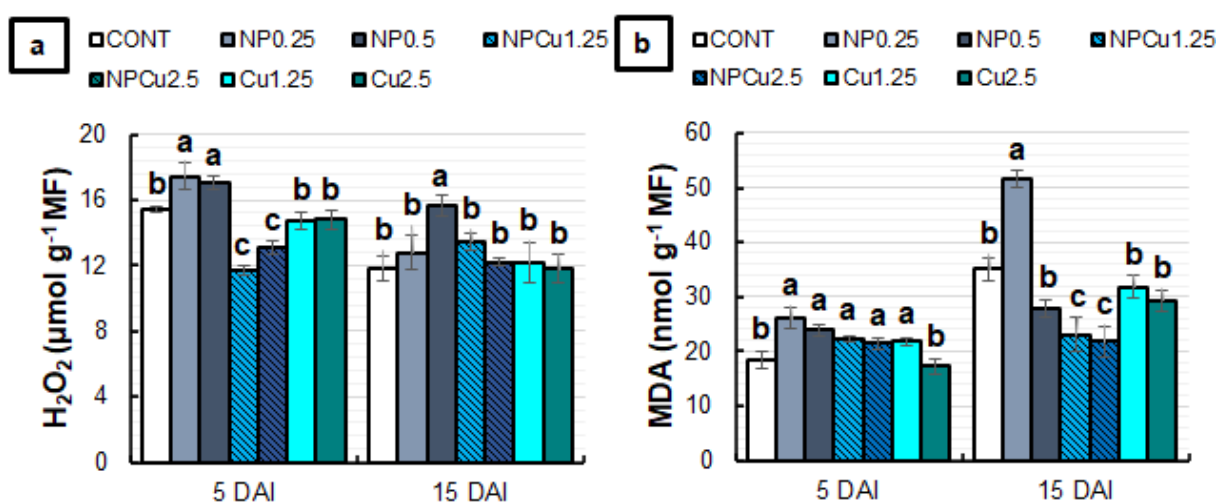


Figura 25 Teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (a) e malondialdeído (MDA) (b) de discos foliares de *Coffea arabica* cv. IPR 100 aos 5 e 15 dias após a infecção (DAI) com *H. vastatrix*. Antes da infecção, os discos foram tratados com água destilada como controle (CONT), nanopartículas de quitosana sem íons Cu²⁺ (NP), nanopartículas de quitosana contendo íons Cu²⁺ (NPCu) e íons Cu²⁺ livres (Cu). As formulações foram diluídas em água destilada, obtendo-se as concentrações correspondentes de quitosana (CS) nos tratamentos NP e NPCu (0,25; 0,5 g L⁻¹) e de íons Cu²⁺ (1,25; 2,5 mmol L⁻¹) nos tratamentos NPCu e Cu. Os resultados são expressos como média ($n = 4$) \pm erro padrão. Letras iguais nas colunas indicam que não houve diferença significativa no teste Scott-Knott ($p < 0,05$) no mesmo ponto de tempo.

O leve aumento no teor de MDA aos 5 DAI indica a indução inicial do estresse oxidativo pela maioria dos tratamentos. No entanto, os níveis de H₂O₂ foram normais ou mesmo reduzidos em comparação com CONT nos tratamentos NPCu e Cu, sugerindo que mecanismos protetores foram induzidos a partir de 5 DAI ou antes. Eles podem ter contribuído para diminuir o teor de MDA nesses tratamentos aos 15 DAI.

Em contraste, níveis aumentados de H₂O₂ nos tratamentos com NP indicam uma indução mais significativa de estresse oxidativo. Também pode estar associado à função de sinalização do H₂O₂ desencadeada pelas CS NPs. De fato, a manutenção de níveis elevados de H₂O₂ no tratamento com NP (0,5 g L⁻¹) aos 15 DAI,

concomitante com níveis normais de MDA, evidencia a função sinalizadora do H_2O_2 . Além de possuir características bioestimulantes, a quitosana provoca respostas de defesa da planta contra o estresse. Sua aplicação pode induzir a síntese de diferentes mensageiros intracelulares que atuam nas sinalizações de estresse, como H_2O_2 e óxido nítrico. Além disso, a quitosana é capaz de formar complexos com metais (HIDANGMAYUM et al., 2019). Essa capacidade pode ter contribuído para a indução de estresse oxidativo mais significativo nos tratamentos NP, causando desequilíbrio iônico e comprometendo a funcionalidade de outros compostos no metabolismo vegetal. Em estudo anterior, Gomes et al. (2021) observaram que o condicionamento de sementes com CS NPs contendo íons Cu^{2+} não aumentou significativamente os níveis de H_2O_2 e MDA em mudas de milho. No entanto, o tratamento com CS NPs sem cobre praticamente dobrou os níveis de ambos os marcadores de estresse oxidativo.

Em relação à atividade das enzimas antioxidantes, apenas o tratamento com NP ($0,25\text{ g L}^{-1}$) induziu uma redução de 27% na atividade da superóxido dismutase (SOD) aos 5 DAI. Aos 15 DAI, os tratamentos NP ($0,25$ e $0,5\text{ g L}^{-1}$) não apresentaram diferenças significativas em relação ao CONT, enquanto os tratamentos NPCu e Cu ($1,25$ e $2,5\text{ mmol L}^{-1}$) induziram um aumento médio de 22% na atividade SOD (Fig. 26a). Aos 5 DAI, todos os tratamentos diferiram do CONT, apresentando redução da atividade da catalase (CAT). Aos 15 DAI, houve uma redução média de 20% na atividade da CAT nos tratamentos NPCu ($1,25\text{ mmol L}^{-1}$) e Cu ($1,25$ e $2,5\text{ mmol L}^{-1}$) em comparação com o CONT (Fig. 26b). Os tratamentos NP ($0,25$ e $0,5\text{ g L}^{-1}$) e Cu ($1,25\text{ mmol L}^{-1}$) induziram um aumento na atividade da ascorbato peroxidase (APX) em relação ao CONT aos 5 DAI. Em contraste, o tratamento com NPCu ($2,5\text{ mmol L}^{-1}$) promoveu uma redução de 54% na atividade enzimática. Aos 15 DAI, apenas o tratamento NPCu ($1,25\text{ mmol L}^{-1}$) não apresentou diferenças significativas em relação ao CONT, com aumento da atividade APX observado nos demais tratamentos (Fig. 26c). Para a atividade da peroxidase (POD), aos 5 DAI, foi possível observar um aumento médio de 211% nos tratamentos NPCu ($1,25\text{ mmol L}^{-1}$) e Cu ($2,5\text{ mmol L}^{-1}$) em relação ao CONT. Aos 15 DAI, um aumento de 60% na atividade da POD foi induzido pelo tratamento Cu ($1,25\text{ mmol L}^{-1}$), 160% por NPCu ($1,25\text{ mmol L}^{-1}$), 180% por NP ($0,25\text{ g L}^{-1}$), 250% por NPCu ($2,5\text{ mmol L}^{-1}$) e 310% por Cu ($2,5\text{ mmol L}^{-1}$), em comparação com o CONT (Fig. 26d).

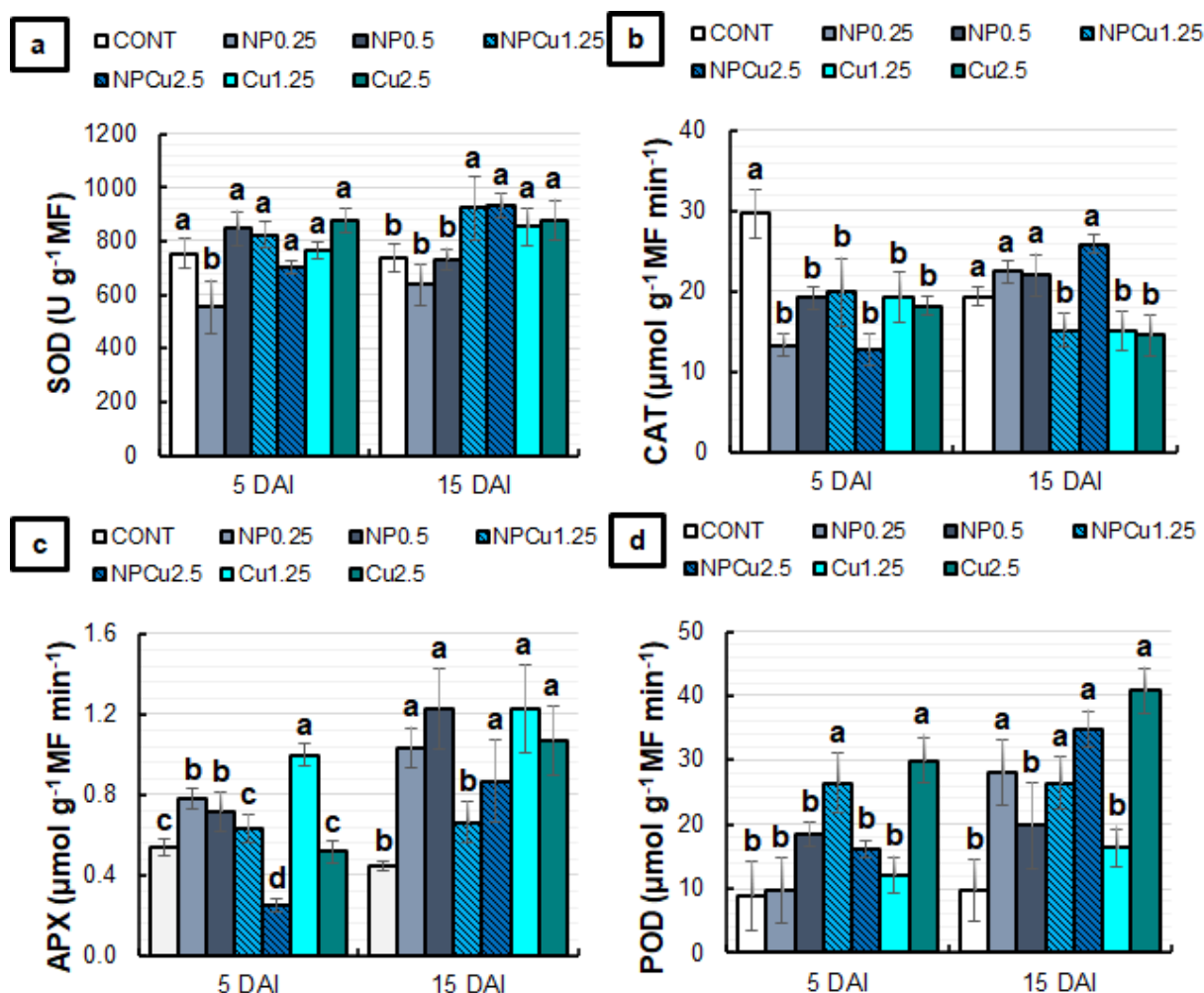


Figura 26 A atividade da Superóxido dismutase (SOD) (a), Catalase (CAT) (b), Ascorbato peroxidase (APX) (c) e Peroxidase (POD) (d) dos discos foliares de *Coffea arabica* cv. IPR 100 aos 5 e 15 dias após a infecção (DAI) com *H. vastatrix*. Antes da infecção, os discos foram tratados com água destilada como controle (CONT), nanopartículas de quitosana sem íons Cu²⁺ (NP), nanopartículas de quitosana contendo íons Cu²⁺ (NPCu) e íons Cu²⁺ livres (Cu). As formulações foram diluídas em água destilada, obtendo-se as concentrações correspondentes de quitosana (CS) nos tratamentos NP e NPCu (0,25; 0,5 g L⁻¹) e de íons Cu²⁺ (1,25; 2,5 mmol L⁻¹) nos tratamentos NPCu e Cu. Os resultados são expressos como média ($n = 4$) \pm erro padrão. Letras iguais nas colunas indicam que não houve diferença significativa no teste Scott-Knott ($p < 0,05$) no mesmo ponto de tempo.

Quanto à atividade das enzimas antioxidantes, houve diferenças nas respostas de defesa induzidas por cada tratamento. Para SOD, todas as formulações contendo cobre aumentaram a atividade enzimática aos 15 DAI em comparação com CONT e NP, o que pode estar relacionado ao fato de SOD ser uma metaloenzima que possui cobre na composição de uma de suas isoformas (GILL & TUTEJA, 2010). Corroborando, o tratamento com CS NPs contendo Cu²⁺ também demonstrou induzir atividade de SOD plantas de milho (Choudhary et al., 2017b; Gomes et al., 2021). Além disso, avaliando o efeito de um nanocompósito de selênio e cobre em tomateiros infectados por *Alternaria solani*, Quiterio-Gutiérrez et al. (2019) verificaram um

aumento na atividade da SOD nas folhas que foi concomitante com o aumento na concentração de cobre.

Embora o H₂O₂ formado pela ação do SOD durante a neutralização do ânion superóxido possa ser metabolizado pela ação do CAT e do APX (Gill e Tuteja, 2010), a modulação fina do H₂O₂ foi realizada principalmente pelo APX, permitindo o controle dessa molécula em a faixa de µM e outros compartimentos além dos peroxissomos (MITTILER, 2002). De fato, a atividade APX tendeu a ser induzida pela maioria dos tratamentos, enquanto a atividade CAT foi mantida ou inibida. Além disso, a baixa atividade da CAT nos tratamentos com Cu e NPCu pode estar relacionada à inibição da enzima por íons metálicos, conforme observado por Gomes et al. (2021).

Curiosamente, houve um aumento na atividade de POD nos tratamentos que apresentaram baixa atividade de CAT e APX aos 5 DAI, o que fornece evidências para a indução de diferentes enzimas antioxidantes pelos tratamentos aplicados. Aos 15 DAI, a atividade de POD aumentou significativamente em quase todos os tratamentos contendo cobre, especialmente na concentração mais alta. Em cafeeiros, a indução de enzimas relacionadas à lignificação da parede celular, como a POD, é uma das principais formas de proteção contra a infecção por *H. vastatrix* (SILVA et al., 2008; SILVA et al., 2008; MONTEIRO et al., 2016). Aos 5 DAI, o tratamento NPCu (1,25 mmol L⁻¹) induziu maior atividade de POD do que os tratamentos NP (0,25 e 0,5 g L⁻¹) e Cu (1,25 mmol L⁻¹). Aos 15 DAI, o NPCu (1,25 e 2,5 mmol L⁻¹) também promoveu um aumento significativo na atividade da POD em relação ao CONT, enquanto o Cu potencializou a atividade enzimática apenas na concentração mais elevada (2,5 mmol L⁻¹). Esses resultados reforçam o fato de que NPCu apresenta maior eficiência na indução de proteção contra a infecção por *H. vastatrix* em comparação com a aplicação de quitosana e cobre separadamente, como observado para a proteção de mudas de milho contra estresse abiótico (Gomes et al., 2021) e biótico (Choudhary et al., 2017b).

Experimento para avaliação da fluorescência da clorofila a e atividade das enzimas PAL e PPO

Em relação à fluorescência da clorofila *a*, todos os tratamentos apresentaram valores de fluorescência basal (F₀) inferiores ao CONT aos 5 DAI. A

redução de F_0 foi mais intensa (cerca de 18%) nos tratamentos NPCu (2,5 mmol L⁻¹) e Cu (1,25 mmol L⁻¹). Aos 15 DAI, os tratamentos NP (0,25 g L⁻¹) e NPCu (1,25 mmol L⁻¹) não afetaram a F_0 , enquanto os demais tratamentos apresentaram maior F_0 , principalmente no NP (0,5 g L⁻¹) e Cu (2,5 mmol L⁻¹), com aumento médio de 21% em relação ao CONT (Fig. 27a). Os tratamentos NP (0,25 g L⁻¹) e NPCu (1,25 e 2,5 mmol L⁻¹) promoveram maiores valores de atividade máxima do fotossistema II (F_v/F_m) do que CONT aos 5 DAI. Por outro lado, os tratamentos com Cu (1,25 e 2,5 mmol L⁻¹) apresentaram menor F_v/F_m . Aos 15 DAI, um aumento na F_v/F_m foi induzido pelos tratamentos NP (0,25 e 0,5 g L⁻¹) e NPCu (1,25 mmol L⁻¹), enquanto Cu (2,5 mmol L⁻¹) continuou a promover uma redução na F_v/F_m em relação ao CONT (Fig. 27b). Para a taxa relativa de transporte de elétrons do fotossistema II (rETR), apenas os tratamentos NPCu (1,25 e 2,5 mmol L⁻¹) foram significativamente aumentados aos 5 DAI em comparação com o CONT. Aos 15 DAI, as menores concentrações de NP e NPCu induziram maiores valores de rETR do que o CONT. Por outro lado, uma redução de 18% no rETR foi observada no tratamento Cu (2,5 mmol L⁻¹) em comparação com o CONT (Fig. 27c).

A fluorescência da clorofila *a* é uma técnica amplamente utilizada para estudar os efeitos de diferentes tipos de estresse na atividade fotossintética (GUIDI et al., 2019). Aos 5 DAI, os menores valores de F_0 fornecidos por todos os tratamentos em relação ao CONT indicaram a redução dos danos ao fotossistema II. Além disso, os maiores valores de F_v/F_m e rETR sugerem que os tratamentos com NPCu até 5 DAI melhoraram a atividade do fotossistema II em comparação com todos os outros tratamentos. Por outro lado, a redução de F_v/F_m induzida pelos tratamentos com Cu indica limitação do fotossistema II causada pela ação de *H. vastatrix* e/ou alta concentração de Cu²⁺.

Aos 15 DAI, o aumento da F_0 foi induzido principalmente pelo tratamento com Cu (2,5 mmol L⁻¹). Além disso, Cu (2,5 mmol L⁻¹) foi o único tratamento que apresentou redução significativa de F_v/F_m e rETR em relação ao CONT, o que corrobora o efeito fitotóxico causado por altas concentrações de Cu²⁺. A diminuição da relação F_v/F_m , concomitante ao aumento de F_0 , indica dano ao fotossistema II, que tem sido observado em plantas sob diferentes tipos de estresse, incluindo café sob alto teor de alumínio (KONRAD et al., 2005) e seca (CINTRA et al., 2020).

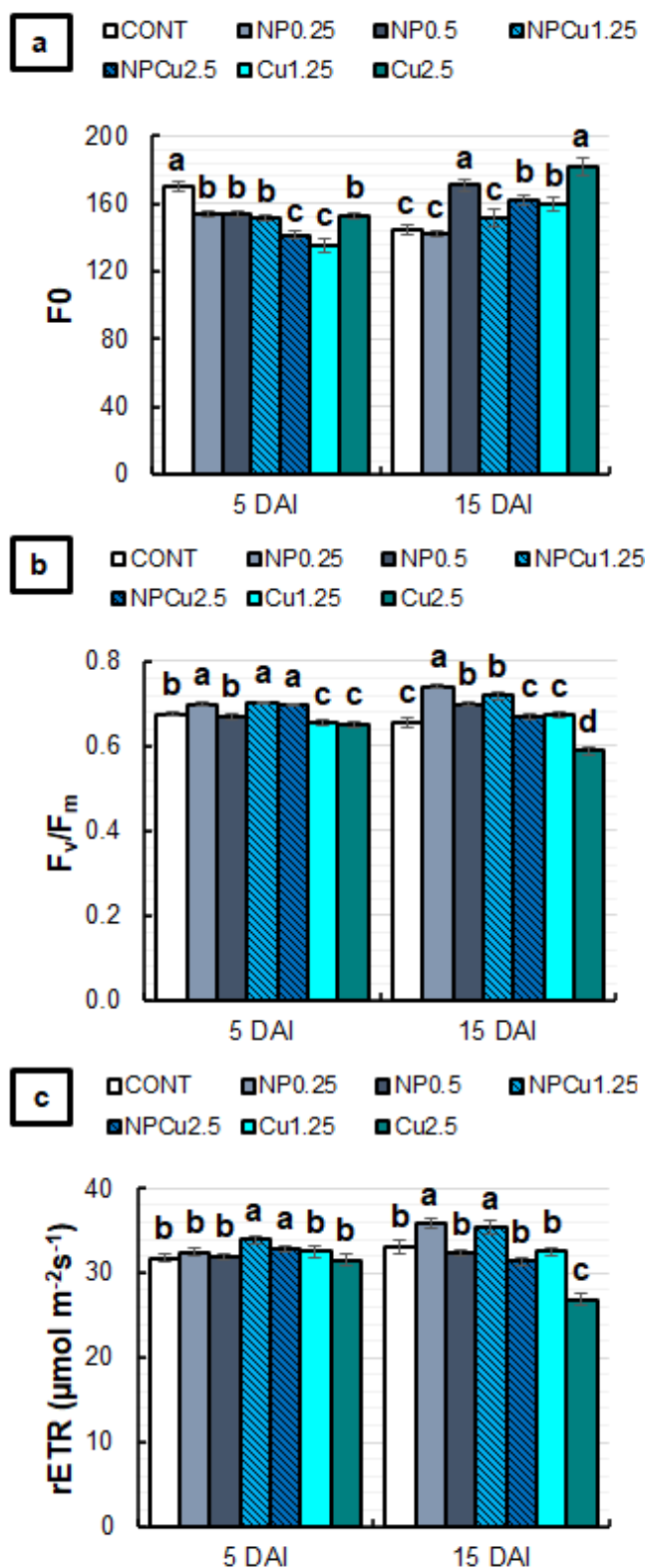


Figura 27 F₀ (a), F_v/F_m (b) e rETR (c) de discos foliares de *Coffea arabica* cv. IPR 100 aos 5 e 15 dias após a infecção (DAI) com *H. vastatrix*. Antes da infecção, os discos foram tratados com água destilada como controle (CONT), nanopartículas de quitosana sem íons Cu²⁺ (NP), nanopartículas de quitosana contendo íons Cu²⁺ (NPCu) e íons Cu²⁺ livres (Cu). As formulações foram diluídas em água destilada, obtendo-se as concentrações correspondentes de quitosana (CS) nos tratamentos NP e NPCu (0,25; 0,5 g L⁻¹) e de íons Cu²⁺ (1,25; 2,5 mmol L⁻¹) nos tratamentos NPCu e Cu. Os resultados são expressos como média ($n = 4$) \pm erro padrão. Letras iguais nas colunas indicam que não houve diferença significativa no teste Scott-Knott ($p < 0,05$) no mesmo ponto de tempo.

Aos 5 DAI, todas as formulações nas concentrações mais baixas (0,25 g L⁻¹ ou 1,25 mmol L⁻¹) e o tratamento NP (0,5 g L⁻¹) aumentaram a atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL) em quase 100% em comparação com o CONT. Aos 15 DAI, os tratamentos NPCu (2,5 mmol L⁻¹) e Cu (1,25 mmol L⁻¹) mantiveram a atividade da PAL igual à CONT, enquanto as outras formulações reduziram a atividade enzimática (Fig. 28a). Com relação à atividade da polifenol oxidase (PPO) aos 5 DAI, observou-se um aumento médio de 40% nos tratamentos NP (0,5 g L⁻¹) e NPCu (1,25 mmol L⁻¹) em relação ao CONT. Além disso, um incremento de 14% foi induzido pelo tratamento com Cu (1,25 mmol L⁻¹). Aos 15 DAI, não houve diferenças significativas entre os tratamentos na atividade de PPO (Fig. 28b).

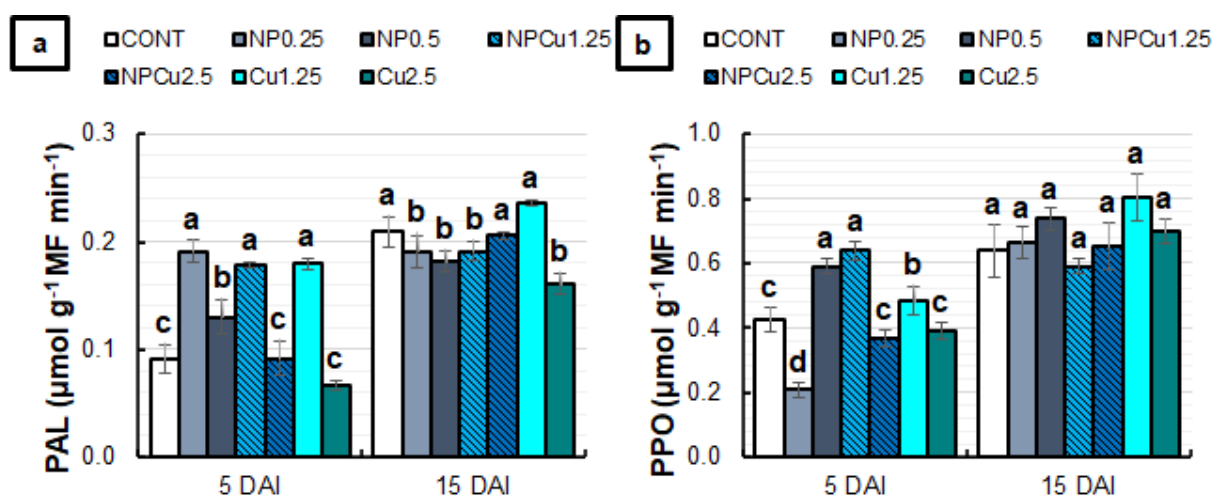


Figura 28 A atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL) (a) e polifenol oxidase (PPO) (b) dos discos foliares de *Coffea arabica* cv. IPR 100 aos 5 e 15 dias após a infecção (DAI) com *H. vastatrix*. Antes da infecção, os discos foram tratados com água destilada como controle (CONT), nanopartículas de quitosana sem íons Cu²⁺ (NP), nanopartículas de quitosana contendo íons Cu²⁺ (NPCu) e íons Cu²⁺ livres (Cu). As formulações foram diluídas em água destilada, obtendo-se as concentrações correspondentes de quitosana (CS) nos tratamentos NP e NPCu (0,25; 0,5 g L⁻¹) e de íons Cu²⁺ (1,25; 2,5 mmol L⁻¹) nos tratamentos NPCu e Cu. Os resultados são expressos como média ($n = 4$) \pm erro padrão. Letras iguais nas colunas indicam que não houve diferença significativa no teste Scott-Knott ($p < 0,05$) no mesmo ponto de tempo.

A atividade da PAL foi induzida durante o estabelecimento do patógeno nos tecidos do hospedeiro (SILVA et al., 2008). No presente estudo, todas as formulações na menor concentração promoveram um aumento na atividade da PAL aos 5 DAI. Da mesma forma, os efeitos mais significativos na atividade da PPO foram observados aos 5 DAI, destacando o aumento das atividades nos tratamentos NP (0,5 g L⁻¹), NPCu (1,25 mmol L⁻¹) e Cu (1,25 mmol L⁻¹). Choudhary et al. (2017b) avaliaram as atividades PAL e PPO em folhas de milho infectadas com *Curvularia lunata* 24 h após o tratamento com as formulações. Os autores verificaram que os tratamentos

com NPCu e Cu induziram a atividade de PPO, enquanto apenas NPCu promoveu aumento da atividade de PAL.

O presente estudo foi o primeiro a mostrar o efeito da nanoencapsulação de íons Cu^{2+} como estratégia para prolongar/intensificar a proteção conferida pelo cobre contra a infecção de *H. vastatrix* em uma cultivar de café suscetível (*Coffea arabica* cv. IPR 100). De acordo com os resultados obtidos, foi possível verificar que as respostas induzidas são dose-dependentes, com efeitos nocivos causados pelas maiores concentrações testadas. No entanto, os tratamentos com NPCu diminuíram a fitotoxicidade do cobre e mostraram respostas mais positivas nas folhas pela associação entre quitosana e cobre, especialmente em baixas concentrações ($1,25 \text{ mmol L}^{-1}$). Sem a infecção de *H. vastatrix*, os tratamentos contendo CS NPs (NP e NPCu) estimularam o acúmulo de clorofila nos discos foliares. Por outro lado, os tratamentos com íons Cu^{2+} livres não promoveram ganhos significativos de clorofila e reduziram o teor de carotenoides.

Embora todos os tratamentos tenham diminuído efetivamente a incidência, esporulação e severidade da doença causada por *H. vastatrix*, os tratamentos contendo cobre (NPCu e Cu) promoveram um efeito protetor mais eficaz. Dentre eles, NPCu ($2,5 \text{ mmol L}^{-1}$) foi o mais eficaz em aumentar as concentrações de clorofila em discos foliares infectados. Em geral, os tratamentos promoveram a ativação de mecanismos antioxidantes enzimáticos, mas os tratamentos NPCu foram mais eficazes na mitigação do estresse oxidativo e na manutenção da atividade fotossintética ao longo dos dias após a infecção. Embora os tratamentos Cu sejam eficientes na proteção das folhas de cafeeiro contra *H. vastatrix*, eles promovem efeitos adversos no fotossistema II. Além disso, os resultados mostraram a bioatividade mais significativa da associação entre quitosana e cobre em comparação com a aplicação de quitosana e cobre separadamente, principalmente ao avaliar as menores concentrações da formulação.

No geral, esses resultados sugerem que as CS NPs contendo Cu^{2+} são nanomateriais capazes de induzir uma resposta de defesa vegetal mais significativa à infecção de *H. vastatrix*, evitando os efeitos tóxicos de altas concentrações de cobre. Assim, esta formulação tem grande potencial para ser utilizada como nanopesticida para outras doenças fúngicas de diferentes espécies vegetais que são controladas pela aplicação de produtos à base de cobre. O uso de nanopartículas à base de cobre para controlar a ferrugem do cafeeiro também pode

reduzir a quantidade de cobre metálico liberado por hectare devido à melhor entrega e maior área de contato das nanopartículas com as folhas, proporcionando melhor cobertura. Seria uma estratégia de controle químico da ferrugem do cafeeiro em consonância com a nova legislação implementada em vários países, que visa reduzir os impactos causados por compostos metálicos na agricultura (SERA et al., 2022).

CONCLUSÃO

A fitotoxicidade dos tratamentos está diretamente relacionada à dose aplicada, sendo que as maiores concentrações de todos os tratamentos são prejudiciais ao metabolismo da planta. Enquanto os tratamentos contendo CS NPs (especialmente NPCu) estimularam a síntese de clorofila ao mesmo tempo em que aumentaram significativamente o teor de clorofila total nos discos foliares, o tratamento Cu reduziu o teor de carotenoides em todas as concentrações aplicadas. Os tratamentos NP (1 g L^{-1}), NPCu ($1,25$, $2,5$ e 5 mmol L^{-1}) e Cu ($1,25$, $2,5$ e 5 mmol L^{-1}) reduziram efetivamente a incidência, esporulação e severidade induzida por *H vastatrix*. No entanto, os tratamentos NPCu se destacaram por manter os maiores níveis de pigmentos em comparação com Cu, NP e o controle. Embora ambas as concentrações ($1,25$ e $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$) dos tratamentos NPCu e Cu tenham aumentado as respostas antioxidantes nos discos foliares, apenas os tratamentos NPCu conseguiram mitigar o dano oxidativo ao longo dos dias de infecção. Além disso, o tratamento com Cu ($2,5 \text{ mmol L}^{-1}$) comprometeu ainda mais a atividade do fotossistema II dos discos foliares, evidenciando o efeito fitotóxico causado pelas altas concentrações do íon Cu^{2+} . Em baixas concentrações ($1,25 \text{ mmol L}^{-1}$), o NPCu também apresentou maior bioatividade que o Cu, reforçando a maior eficiência da nanoformulação.

REFERÊNCIAS

- AEBI H. In: Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**. Colowick, S,P; Kaplan, N. O. editors. Vol. 105. Florida: Acad. Press; 1984. pp. 114–121.
- ALEXIEVA, V; SERGIEV, I; MAPELLI, S; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 1337-1344, dez. 2001.
- ALVES, V. M.; JULIATTI, F. C. Fungicidas no manejo da ferrugem da soja, processos fisiológicos e produtividade da cultura. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 44, n. 3, p. 245-251, set. 2018
- ANDERSON, M. D.; PRASAD, T. K. STEWART, C. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology**, Lancaster v. 109, n. 4, p. 1247-1257, dez. 1995
- BAKER, N. R. Chlorophyll Fluorescence: A Probe of photosynthesis *in vivo*. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 89–113, jun. 2008.
- CAMEJO, G.; WALLIN, B.; ENOJÄRVI, M. Analyses of oxidation and antioxidants using microtiter plates. In: Amstrong D (ed.) **Free Radical and Antioxidants Protocols**. Mölndal, Sweden, Humana Press; 1998. p. 377–387.
- CHOUDHARY R. C.; JOSHI, A.; KUMARI, S.; KUMARASWAMY, R.V.; SAHARAN, V. Preparation of Cu-chitosan nanoparticle and its effect on growth and enzyme activity during seed germination in maize. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, New Delhi, v. 6, n. 4, p. 669-673, 2017a.
- CHOUDHARY, R.C., KUMARASWAMY, R.V., KUMARI, S., SHARMA S.S, PAL, A., RALIYA R., BISWAS, P.; SAHARAN V. Cu-chitosan nanoparticle boost defense responses and plant growth in maize (*Zea mays* L.). **Scientific Reports**, Londres, v. 7, n. 9754, ago. 2017b.
- CINTRA, P. H. N.; MELO, O. F. P.; DE MENEZES, J. O. S.; PADILHA, R. C.; REZENDE, A. G.; MATOS, E. R. Análise de fluorescência da clorofila a em mudas de cafeeiro sob estresse hídrico. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 5, p. 27006–27014, mai. 2020.
- CUI, L.; HANIKA, K.; VISSER, R. G. F.; BAI, Y. Improving pathogen resistance by exploiting plant susceptibility genes in coffee (*Coffea* spp.). **Agronomy**, Basel, v. 10, n. 12, p. 1928, dez. 2020.
- CUNHA, R.L.; MENDES, A.N.G.; CHALFOUN, S.M. Controle químico da ferrugem do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) e seus efeitos na produção e preservação do enfolhamento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 990-996, out. 2004.

do CARMO, G.C.; IASTRENSKI, L. F.; DEBIASI, T. V.; da SILVA, R. C.; GOMES, D.G.; PELEGRINO, M.T.; BIANCHINI, E.; STOLF-MOREIRA, R.; PIMENTA, J.A.; SEABRA, A.B.; OLIVEIRA, H.C. Nanoencapsulation improves the protective effects of a nitric oxide donor on drought-stressed *Heliocarpus popayanensis* seedlings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amesterdã, v. 225, n. 112713, ago. 2021.

ESKES, A.B.; TOMA-BRAGHINI, M. Assessment methods for resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk. & Br.). **FAO Plant Protection Bulletin**, Rome, v. 29, p. 56-66, 1981.

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

GICHURU, E.; ALWORA, G.; GIMASE, J.; KATHURIMA, C. Coffee Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*) in Kenya—A Review. **Agronomy**, Basel, v. 11, n. 12, p. 2590, dez. 2021.

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

GOMES, D. G.; DEBIASI, T. V.; PELEGRINO, M. T.; PEREIRA, R. M.; ONDRASEK, G.; BATISTA, B. L.; SEABRA, A. B.; OLIVEIRA, H. C. Soil treatment with nitric oxide-releasing chitosan nanoparticles protects the root system and promotes the growth of soybean plants under copper stress. **Plants**, Basel, v. 11, n. 23, p. 3245, nov. 2022.

GOMES, D. G.; PELEGRINO, M. T.; FERREIRA, A. S.; BAZZO, J. H. B.; ZUCARELI, C.; SEABRA, A. B.; OLIVEIRA, H. C. Seed priming with copper-loaded chitosan nanoparticles promotes early growth and enzymatic antioxidant defense of maize (*Zea mays* L.) seedlings. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Lancaster, v. 96, n. 8, ago. 2021.

GUIDI, L.; LO PICCOLO, E.; LANDI, M. Chlorophyll fluorescence, photoinhibition and abiotic stress: Does it make any difference the fact to be a C3 or C4 species? **Frontiers in plant science**, Lausanne, v. 10, n. 174, fev. 2019.

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

HUSAK, V. Copper and copper-containing pesticides: Metabolism, toxicity and oxidative stress. **Journal of Vasyl Stefanyk Precarpathian National University**, Ivano-Frankivsk, v. 2, n. 1, p. 38–50, abr. 2015.

JÚNIOR HONORATO, J.; ZAMBOLIM, L.; AUCIQUE-PÉREZ, C. E.; RESENDE, R. S.; RODRIGUES, F. A. Photosynthetic and antioxidative alterations in coffee leaves caused by epoxiconazole and pyraclostrobin sprays and *Hemileia vastatrix* infection. **Pesticide biochemistry and physiology**, Amesterdã v. 123, p. 31–39, set. 2015.

KONRAD, M. L. F.; da SILVA, J. A. B.; FURLANI, P. R.; MACHADO, E. C. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. **Bragantia: boletim tecnico do Instituto Agronomico do Estado de Sao Paulo**, Campinas, v. 64, n. 3, p. 339–347, jun. 2005.

KUMARASWAMY, R. V.; KUMARI, S.; CHOUDHARY, R. C.; PAL, A.; RALIYA, R.; BISWAS, P.; SAHARAN, V. Engineered chitosan-based nanomaterials: Bioactivities, mechanisms and perspectives in plant protection and growth. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amesterdã, v. 113, p. 494-506, jul. 2018.

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

LOPES-OLIVEIRA, P. J.; GOMES, D. G.; PELEGRINO, M. T.; BIANCHINI, E.; PIMENTA, J. A.; STOLF-MOREIRA, R.; SEABRA, A. B.; OLIVEIRA, H. C. Effects of nitric oxide-releasing nanoparticles on neotropical tree seedlings submitted to acclimation under full sun in the nursery. **Scientific Reports**, Londres, v. 9, n. 17371, nov. 2019

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in plant science**, Oxford, v. 7, n. 9, p. 405 – 410, set. 2002.

MONTEIRO, A.C.A.; RESENDE, M.L.V.; VALENTE, T.C.T.; JUNIOR, P.M.R.; PEREIRA, V.P.; COSTA, J.R.; SILVA, J.A.G. manganese phosphite in coffee defence against *Hemileia vastatrix*, the coffee rust fungus: Biochemical and molecular analyses. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 164, p. 1043-1053, set. 2016.

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

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

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

PEREIRA, A.D.E.S.; OLIVEIRA, H.C.; FRACETO, L.F. Polymeric nanoparticles as an alternative for application of gibberellic acid in sustainable agriculture: a field study. **Scientific Reports**, Londres, v. 9, n. 7135, mai. 2019.

POSSA, K.F.; SILVA, J.A.G.; RESENDE, M.L.V.; TENENTE, R.; PINHEIRO, C.; CHAVES, I.; PLANCHON, S.; MONTEIRO, A.C.A.; RENAUT, J.; CARVALHO, M.A.F.; RICARDO, C.P.R.; GUERRA-GUIMARÃES, L. Primary metabolism is distinctly modulated by plant resistance inducers in *coffea arabica* leaves infected by *Hemileia vastatrix*. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 11, n. 309, mar. 2020.

QUITERIO-GUTIÉRREZ, T.; ORTEGA-ORTIZ, H.; CADENAS-PLIEGO, G.; HERNÁNDEZ-FUENTES, A. D.; SANDOVAL-RANGEL, A.; BENAVIDES-MENDOZA, A.; de LA FUENTE, M. C.; JUÁREZ-MALDONADO. The application of selenium and copper nanoparticles modifies the biochemical responses of tomato plants under stress by *Alternaria solani*. **International journal of molecular sciences**, Basel, v. 20, n. 8, p. 1950, abr. 2019.

R, development core team, 2020. **R: A language and environment for statistical computing**. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. Acessado em 06 abr. 2022.

RUBERTI, I., SESSA, G.; CIOLFI, A.; POSSENTI, M.; CARABELLI, M.; MORELLI, G. Plant adaptation to dynamically changing environment: the shade avoidance response. **Biotechnology advances**, Amesterdã, v. 30, n. 5, p. 1047–1058, out. 2012.

SAHARAN, V.; MEHROTRA, A.; KHATIK, R.; RAWAL, P.; SHARMA, S. S.; PAL, A. Synthesis of chitosan based nanoparticles and their *in vitro* evaluation against phytopathogenic fungi. **International journal of biological macromolecules**, Amesterdã, v. 62, p. 677–683, nov. 2013.

SAHARAN, V.; KUMARASWAMY, R.V.; CHOUDHARY, R.C.; KUMARI, S.; PAL, A.; RALIYA, R.; BISWAS, P. Cu-Chitosan nanoparticle mediated sustainable approach to enhance seedling growth in maize by mobilizing reserved food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 64, n. 31, p. 6148–6155, ago. 2016.

SAHARAN, V.; SHARMA, G.; YADAV, M.; CHOUDHARY, M.K.; SHARMA, S.S.; PAL, A.; RALIYA, R.; BISWAS, P. Synthesis and *in vitro* antifungal efficacy of Cu–chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato. **International Journal of Biological Macromolecules**, Amesterdã, v. 75, p. 346-353, abr. 2015.

SATHIYABAMA, M.; MANIKANDAN, A. Application of copper-chitosan nanoparticles stimulate growth and induce resistance in finger millet (*Eleusine coracana* gaertn.) plants against blast disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Oxfordshire, v. 66, n. 8, p. 1784-1790, fev. 2018.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature methods**, Nova York, v. 9, n. 7, p. 671–675, jun. 2012.

SEABRA, A. B.; SILVEIRA, N. M.; RIBEIRO, R. V.; PIERETTI, J. C.; BARROSO, J. B.; CORPAS, F. J.; PALMA, J. M.; HANCOCK, J. T.; PETRIVALSKY, M.; GUPTA, K. J.; WENDEHENNE, D.; LOAKE, G. J.; DURNER, J.; LINDERMAYR, C.; MOLNAR, A.; KOLBERT, Z.; OLIVEIRA, H. C. Nitric oxide-releasing nanomaterials: from basic research to potential biotechnological applications in agriculture. **The new phytologist**, Lancaster, v. 234, n. 4, p. 1119–1125, mar. 2022.

SERA, G. H.; CARVALHO, C. H. S.; ABRAHÃO, J. C. R.; POZZA, E. A.; MATIELLO, J. B.; ALMEIDA, S. R.; BARTELEGA, L.; BOTELHO, D. M. S. Coffee leaf rust in Brazil: Historical events, current situation, and control measures. **Agronomy**, Basel, v. 12, n. 2, p. 496, fev. 2022.

SERA, T.; SERA, G. H.; FAZUOLI, L. C.; MACHADO, A. C. Z.; ITO, D. S.; SHIGUEOKA, L. H.; DA SILVA, S. A. IPR 100 - Rustic dwarf Arabica coffee cultivar with resistance to nematodes *Meloidogyne paranaensis* and *M. incognita*. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v. 17, n. 2, p. 175–179, jun. 2017.

SILVA, H. S. A.; TERRASAN, C. R. F.; TOZZI, J. P. L.; MELO, I. S. BETTIOL, W. Bactérias endófitas do cafeeiro e a indução de enzimas relacionadas com o controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix*). **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 1, p. 049 – 054, fev. 2008.

SILVA, L.F.; ZAMBOLIM, L.; VIDIGAL, A.E.C.; RUBINGER, M.M.M. Potencial dos fungicidas do grupo dos ditiocarbimatos no controle da ferrugem do cafeeiro. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, n. X, 2019, Vitória, ES. **Anais...Vitória: Consórcio Pesquisa Café**, 2019, p. 1-6.

SILVA, M. C.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; DINIZ, I.; LOUREIRO, A.; AZINHEIRA, H.; PEREIRA, A. P.; TAVARES, S.; BATISTA, D.; VÁRZEA, V. An overview of the mechanisms involved in coffee-*Hemileia vastatrix* interactions: Plant and pathogen perspectives. **Agronomy**, Basel, v. 12, n. 2, p. 326, jan. 2022.

SILVA, M. C.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; LOUREIRO, A.; NICOLE, M. R. Involvement of peroxidases in the coffee resistance to orange rust (*Hemileia vastatrix*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, Amesterdã, v. 72, n. 1-3, p. 29-38, mar. 2008.

SOARES, A. S.; VIEIRA, B. S.; BEZERRA, T. A.; MARTINS, G. D.; SIQUIEROLI, A. C. S. Early detection of coffee leaf rust caused by *Hemileia vastatrix* using multispectral images. **Agronomy**, Basel, v. 12, n. 12, p. 2911, nov. 2022.

USMAN, M.; FAROOQ, M.; WAKEEL, A.; NAWAZ, A.; CHEEMA, S. A.; REHMAN, H. U.; ASHRAF, I.; SANAUULLAH, M. Nanotechnology in agriculture: Current status, challenges and future opportunities. **Science of the Total Environment**, Amesterdã, v. 721, n. 137778, jun. 2020

ZAMBOLIM, L. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. **Tropical plant pathology**, Berlim, v. 41, n. 1, p. 1–8, jan. 2016.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

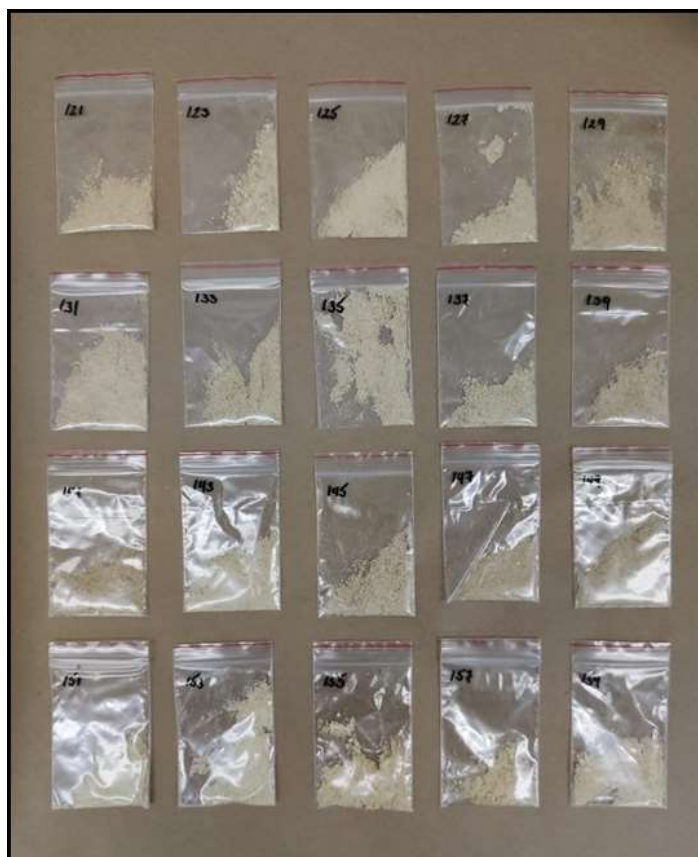
No presente estudo, foi possível verificar respostas distintas entre os tratamentos com nanopartículas à base de cobre e o cobre convencional, sendo avaliados em diferentes situações. Entretanto, sem a incidência de estresse, os efeitos promovidos são semelhantes, com o convencional promovendo resultados similares. Por outro lado, sob condição de cultivo desfavorável e, conseqüentemente, avaliando as respostas induzidas para mitigar a situação, a associação do cobre com nanopartículas de quitosana e/ou nanopartículas metálicas de cobre são mais eficientes, evidenciando diferenças consideráveis entre o convencional e a forma nano. A associação de nanopartículas de quitosana com cobre, reuniu as propriedades da quitosana com a essencialidade do cobre, promovendo um melhor aproveitamento do elemento e, sob condições adversas, uma maior proteção ao estresse, ativando diferentes mecanismos de defesa, além de manter ou melhorar o crescimento das plantas.

Outra possibilidade observada, foi o uso de nanopartículas metálicas de óxido de cobre obtidas via síntese verde. Enquanto a síntese clássica envolve métodos que utilizam componentes tóxicos, gerando resíduos nocivos para a saúde e o meio ambiente, a síntese verde de nanomateriais baseia-se em rotas ecologicamente mais corretas, abrindo mão dos agentes nocivos. O produto final é uma nanopartícula metálica que possui uma maior biocompatibilidade, bioatividade no metabolismo vegetal, não apresentando ou reduzindo a fitotoxicidade. Estas características podem mitigar os impactos ambientais causados pelo uso de nanopartículas de síntese convencional, reduzindo a quantidade de nanomaterial lançado no ambiente. Diante das perspectivas para a agricultura, de lidar com situações adversas cada vez mais frequentes e, mesmo assim, ter a necessidade de atender a demanda por alimentos de uma população em constante crescimento, a nanotecnologia vem se consolidando como uma aliada para criação de uma agricultura mais eficiente, permitindo conciliar produtividade com práticas agrícolas mais sustentáveis, adequando-se às necessidades futuras.

APÊNDICES

APÊNDICE A – MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO II

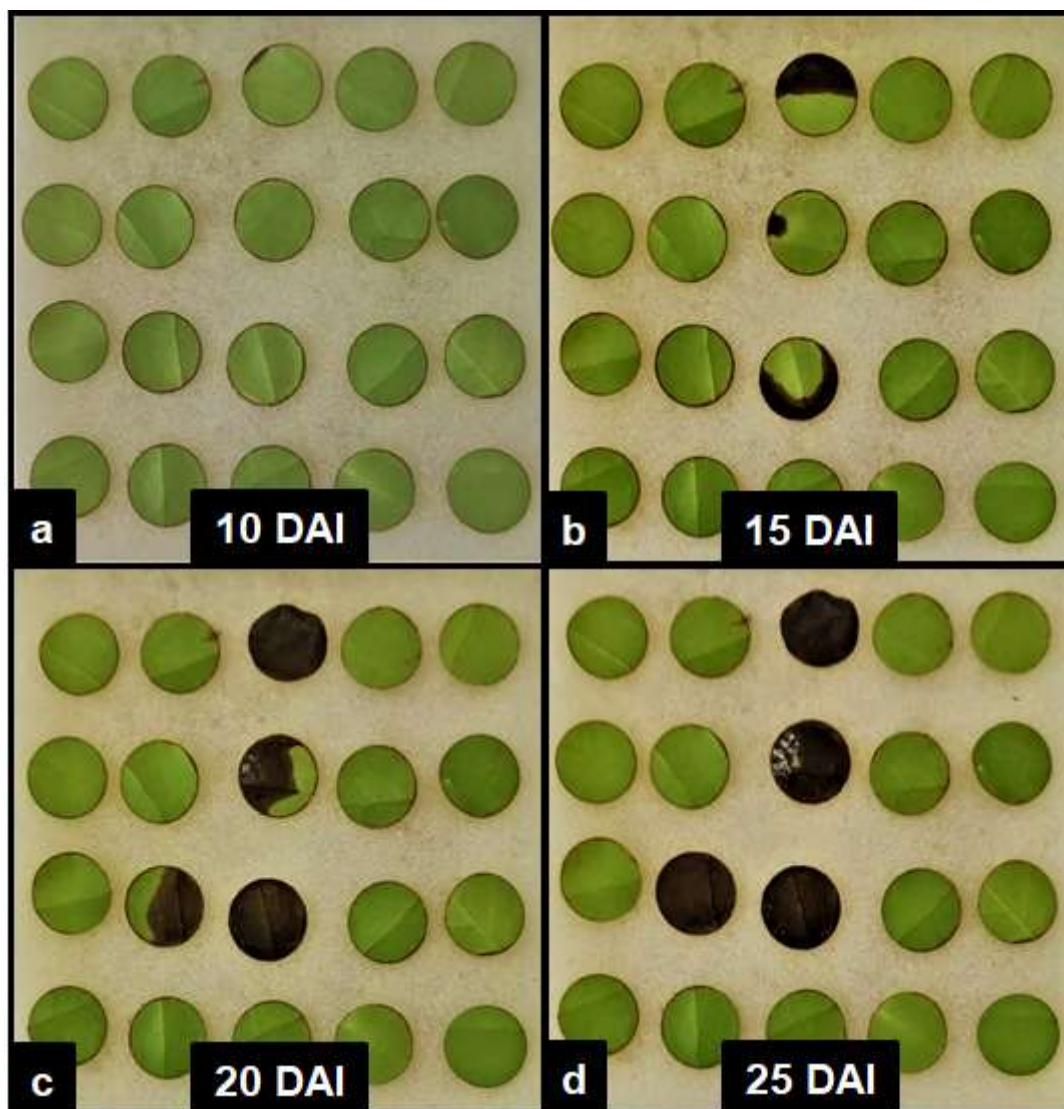
Foto 1 Exemplo das amostras acondicionadas em sacos plásticos de polietileno transparente para análises de EDXRF.



Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE B – MATERIAL SUPLEMENTAR DO CAPÍTULO III

Foto 2 Discos de folhas de cafeeiro do tratamento controle (CONT) não aptos e descartados das análises, devido à incidência de patógeno oportunista.



Fonte: Próprio autor.

Foto 3 Coleta de esporos de *H. vastatrix* no campo do Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná – IAPAR-EMATER (IDR-Paraná, Londrina, Paraná, BR).



Fonte: Luciana Harumi Shigueoka.

Foto 6 Inoculação dos discos foliares de *Coffea arabica* cv. IPR 100 com a suspensão de esporos de *H. vastatrix*.



Fonte: Próprio autor.

Advances in nano-based delivery systems of micronutrients for a greener agriculture²

Diego Genuário Gomes, Joana Claudio Pieretti, Wallace Rosado Rolim, Amedea Barozzi Seabra, Halley Caixeta Oliveira

Abstract

The fertilization with micronutrients is an important practice for increasing crop production, as they have roles in plant growth, development and stress response. However, the inadequate use of chemical fertilizers has been associated with environmental contamination and harms to non-target organisms. Therefore, the combination of intensive cultivation and reduced consumption of fertilizers is a challenge for current agriculture. In this scenario, nanotechnology has emerged as a promising strategy to improve the efficiency of the delivery of micronutrients to plants, thereby reducing environmental harms. Here, we review the major challenges in micronutrient fertilization practices and discuss how nanotechnology can contribute to increasing the efficient use of micronutrients. We provide several examples of applications of nano-based delivery systems of micronutrients for plant nutrition, including metal nanoparticles and metal-containing polymeric nanomaterials. We also discuss the major challenges regarding the synthesis, applications and toxicity evaluation of micronutrient-containing nanofertilizers.

Keywords: chitosan; metallic nanoparticles; nanofertilizer; nanotechnology; plant nutrition

² *Capítulo de livro publicado. Advances in Nano-Fertilizers and Nano-Pesticides in Agriculture.*
<https://doi.org/10.1016/C2019-0-01205-8>

Copper-based nanoparticles for pesticide effects³

Diego Genuário Gomes, Joana Claudio Pieretti, Isabella Martins Lourenço, Halley Caixeta de Oliveira, Amedea Barozzi Seabra

Abstract

In recent years, engineered nanoparticles have been the focus of intensive scientific and technological development in different applications, including agriculture and food production/security. Copper-based nanoparticles have interesting features, such as low production cost and potent antimicrobial actions at concentrations considered safe to humans and to the environment, making them good candidates for agricultural applications. Moreover, copper-based nanomaterials can be prepared not only by traditional chemical and physical methods, but also by green routes involving biogenic methods, in a sustainable manner. Copper is involved in plant growth, metabolism and defense, and it has been used in agriculture as a key player in fungicides in the combat of plant diseases. Recently, the design of nano-based copper particles has opened new avenues to protect and defend crops, with superior results and lower toxic effects, compared with bulk copper (massive copper). In this scenario, this chapter presents and discusses the recent progress in the design and applications of copper-based nanoparticles with potent antimicrobial applications for agriculture in pest management. Green routes to synthesize the nanoparticles, the recent progress in the applications of copper-based nanoparticles as pesticides, and their phytotoxic are highlighted and discussed. We hope that this chapter opens new avenues in this important topic involving nanotechnology and agriculture.

Keywords: Copper-based nanoparticles, copper oxide nanoparticles, metallic nanoparticles, pesticides, pest control, agriculture.

³ *Capítulo de livro publicado.* Inorganic Nanopesticides and Nanofertilizers.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-94155-0_6