

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

MAYRON MARTINS

**APLICAÇÃO DA QUITOSANA EM MILHO TRANSGÊNICO E NÃO
TRANSGÊNICO**

**Alfenas/MG
2016**

MAYRON MARTINS

**APLICAÇÃO DA QUITOSANA EM MILHO TRANSGÊNICO E NÃO
TRANSGÊNICO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em Ciências Ambientais
pela Universidade Federal de Alfenas/UNIFAL-MG.

Orientador: Dr. Thiago Corrêa de Souza

Colaboradora: Dra. Marília Carvalho

**Alfenas/MG
2016**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Martins, Mayron.

Aplicação da quitosana em milho transgênico e não transgênico /
Mayron Martins. – Alfenas - MG, 2016.
66 f.

Orientador: Thiago Corrêa de Souza.
Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade
Federal de Alfenas, 2016.
Bibliografia.

1. Biopolímero. 2. Germinação. 3. Zea mays L. I. Souza, Thiago
Corrêa de. II. Título.

CDD-581



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG
Programa de Pós-graduação – Ciências Ambientais
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714. Alfenas - MG CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1449 (Coordenação) / (35) 3299-1392 (Secretaria)
<http://www.unifal-mg.edu.br/ppgca/>



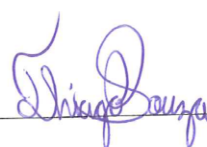
MAYRON MARTINS

“APLICAÇÃO DA QUITOSANA EM MILHO TRANSGÊNICO E NÃO TRANSGÊNICO”

A Banca julgadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Ciências Ambientais.

Aprovado em: 28 de julho de 2016.

Prof. Dr. Thiago Corrêa de Souza
Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura: 

Dr. Paulo César Magalhães
Instituição: EMPRABA MILHO E SORGO

Assinatura: 

Prof. Dr. Marcelo Polo
Instituição: (UNIFAL-MG)

Assinatura: 

À minha mãe Joana, fonte de humildade,
resiliência, perseverança e todo amor que carrego
comigo.

À minha irmã Milaine, companheira incansável.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Joana e à minha irmã Milaine, pelo amor, carinho, apoio, compreensão e companheirismo de uma vida toda, sem os quais não seria possível estar aqui e alcançar este objetivo. Família, esta conquista é nossa!

Ao orientador Thiago Corrêa de Souza, pela paciência, atenção e todos ensinamentos transmitidos neste período.

Aos amigos Valdir Veroneze Júnior e Marília Carvalho, pela compreensão, empatia, prestatividade, colaboração e parceria na execução do trabalho.

Aos amigos “extra projeto”, presentes e ausentes, pelo incentivo e boas energias emanadas.

Aos professores Maria Vanda Marinho e Sandro Barbosa e ao Químico MSc Gustavo Silveira pelas colaborações.

À bióloga Ursuléia Oliveira pela colaboração e disponibilidade.

Ao Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Genotoxicidade (BIOGEN) e ao Laboratório de Botânica e Herbário da Universidade Federal de Alfenas, pela receptividade e amparo.

À Universidade Federal de Alfenas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais pela oportunidade.

À Embrapa Milho e Sorgo pelo apoio.

A todos que, independente da maneira, colaboraram para que fosse possível encerrar este importante ciclo em minha vida.

Serei eternamente grato a todos vocês!

RESUMO

Este trabalho objetivou colaborar com estudos entorno do cultivo de milho através da caracterização físico-química da quitosana e da avaliação de seus efeitos na germinação e crescimento inicial, no ciclo celular e na anatomia radicular em dois híbridos de milho. A caracterização foi realizada por métodos como espectroscopia de absorção na região do infravermelho, porcentagem de desacetilação, determinação de cinzas totais, difração de raios-x, microscopia eletrônica de varredura e análise de viscosidade. Para avaliação de seus efeitos, foram utilizados híbridos de milho transgênico e não transgênico, expostos a 7 tratamentos de quitosana dissolvida em ácido acético 0,1%. Placas de Petri forradas com 2 folhas de papel filtro e umedecidas com 3,6 mL dos respectivos tratamentos, foram mantidas em câmara de germinação tipo B.O.D., com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas. O delineamento experimental foi composto de 7 tratamentos (controle, 50, 150, 300, 600, 1200 e 2400 ppm), com 4 repetições, contendo 15 sementes por placa. Seus efeitos na germinação foram avaliados através do percentual de germinação (G%) com 48 horas de exposição aos tratamentos e do índice de velocidade de germinação durante 7 dias, de 12 em 12 horas. Para avaliar seus efeitos no crescimento inicial, foram mensurados comprimento radicular e o teor relativo de água. Para mensurar seus efeitos no ciclo celular, avaliou-se o índice mitótico e a presença de anormalidades cromossômicas com pontas de raízes coletadas após 96 horas de exposição aos respectivos tratamentos. Os efeitos da quitosana na anatomia radicular foram avaliados após 7 dias de tratamento, através coleta de ápices radiculares, confecção de lâminas microscópicas e de medições de estruturas radiculares primárias. A análise estatística dos resultados foi realizada através da análise de variância (ANAVA) e do teste de comparação de médias Skott-Knott, a 0,05% de significância ($P \leq 0.05$), no programa Sisvar versão 4.3. A estrutura da quitosana utilizada neste estudo confere com as demais já caracterizadas na literatura e o biopolímero possui viscosidade aumentada de acordo com o aumento da concentração. A porcentagem de desacetilação encontrada foi de grau médio/baixo, justificando o teor de cinzas constatado como superior ao encontrado na literatura, mas dentro dos padrões comerciais. Em ambos híbridos pode-se observar aumento na G% quando em contato com altas concentrações do biopolímero, ao contrário do apresentado no crescimento inicial, onde houve diminuição dos parâmetros avaliados, exceto do comprimento radicular do DKB 390 Pró, que não sofreu alterações. O índice mitótico do DKB 390 diminuiu quando exposto às concentrações de quitosana, ao contrário do transgênico, que não sofreu alterações exposto a baixas

concentrações. A baixa frequência de anormalidades cromossômicas evidencia que o biopolímero não é genotóxico nas concentrações estudadas. Os efeitos sobre a anatomia radicular dos híbridos foram diferentes, com melhores resultados para o DKB 390 Pro, como a melhor condutividade hidráulica e maior proteção contra substâncias indesejadas. Conclui-se que a quitosana, em concentrações adequadas pode proporcionar o bom desenvolvimento de milho (principalmente no transgênico), tanto na germinação quanto em alterações na anatomia radicular, permitindo maior resistência e adaptação das plântulas à condições adversas.

Palavras-chave: Biopolímero. Germinação. Anatomia radicular. *Zea mays* L.

ABSTRACT

This study aimed to collaborate with surrounding studies of maize crop by physicochemical characterization of chitosan and evaluation of its effects on the germination and early growth, cell cycle and root anatomy in two corn hybrids. The characterization was carried out by methods such as absorption spectroscopy in the infrared region, percentage of deacetylation, determination of total ash, diffraction of x-ray, scanning electron microscopy and viscosity analysis. To evaluate its effects, transgenic corn hybrids were used and not transgenic, exposed to 7 chitosan treatments dissolved in acetic acid 0.1%. Petri dishes lined with two sheets of filter paper and moistened with 3.6 ml of the respective treatments were maintained in germination chamber type B.O.D., with temperature of 25 ° C and photoperiod of 12 hours. The experiment consisted of seven treatments (control, 50, 150, 300, 600, 1200 and 2400 ppm), with 4 replications of 15 seeds per plate. Its effects on germination were evaluated by the germination percentage (G%) with 48 hours of exposure to treatment and germination speed index for 7 days 12 to 12 hours. To evaluate the effects on early growth were measured root length and relative water content. To measure their effects on the cell cycle, we evaluated the mitotic index and the presence of chromosomal abnormalities with root tips collected after 96 hours of exposure to the respective treatments. The effects of chitosan in the root anatomy were evaluated 7 days after treatment by collecting root tips, preparation of microscope slides and root structures of primary measurements. The statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) and mean comparison test Skott-Knott, 0.05% significance ($p \leq 0.05$) in Sisvar version 4.3 program. The structure of chitosan used in this study have been characterized with others in the literature and the biopolymer has increased viscosity according to the concentration. The percentage of deacetylation was found in medium / low grade, justifying the ash content found as superior to that found in the literature, but within the commercial standards. In both hybrids can be observed an increase in G% when in contact with high concentrations of biopolymer, unlike shown in the initial growth, where there was a decrease of the evaluated parameters, except the root length of DKB 390 Pro, which has not changed. The mitotic index DKB 390 when exposed to decreased concentrations of chitosan, unlike the GE, which remains unchanged exposed to low concentrations. The low frequency of chromosomal abnormalities indicates that the biopolymer is not genotoxic in the studied concentrations. The effects on root anatomy of hybrids were different, with better results for the DKB 390 Pro as the best hydraulic conductivity and greater protection against unwanted

substances. It is concluded that chitosan in suitable concentrations can provide good developing maize (especially in transgenic) during germination as for changes in root anatomy, allowing for greater resistance and adaptation to the adverse conditions of the seedlings.

Keywords: Biopolymer. Germination. Root anatomy. *Zea mays* L.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1	A CULTURA DE MILHO (<i>Zea mays</i> L.).....	11
2.1.1	Transgenia em milho.....	11
2.2	QUITINA, QUITOSANA E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	12
2.3	ATIVIDADE BIOLÓGICA DA QUITOSANA E APLICAÇÕES....	16
2.4	APLICAÇÃO DA QUITOSANA NA AGRICULTURA.....	17
2.5	EFEITO DA QUITOSANA NO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS.....	17
2.6	PRÉ-CONDICIONAMENTO GERMINATIVO (PRIMING).....	19
2.7	TESTES DE FITOTOXICIDADE.....	20
2.8	MORFOANATOMIA RADICULAR E SUAS MODIFICAÇÕES...	21
3	JUSTIFICATIVA.....	23
4	OBJETIVOS.....	24
4.1	OBJETIVOS GERAIS.....	24
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
	REFERÊNCIAS.....	25
	ANEXO A: CARACTERIZAÇÃO FÍSICOQUÍMICA E AÇÃO DA QUITOSANA NO CRESCIMENTO INICIAL, CICLO CELULAR E ANATOMIA RADICULAR DE HÍBRIDOS TRANSGÊNICO E NÃO TRANSGÊNICO DE MILHO.....	34

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma espécie que pertence à família Gramineae/Poaceae, com origem no Teosinto, cultivada em muitas partes do mundo, como Estados Unidos da América, República Popular da China, Índia, França, Indonésia, África do Sul e Brasil. Sua grande adaptabilidade, representada por variados genótipos, permite seu cultivo desde a Linha do Equador até o limite das terras temperadas e, desde o nível do mar até altitudes superiores a 3600 metros, sendo assim, encontrado em climas tropicais, subtropicais e temperados. (BARROS; CALADO, 2014).

No Brasil, a maior parte da produção encontra-se nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do país, tendo grande importância socioeconômica devido à utilização deste cereal como alimento animal e humano, bem como fonte de matéria prima na confecção de produtos industrializados, evidenciando sua importância na obtenção de bioenergia (CARVALHO et al., 2015).

Dentre os fatores que mais tem contribuído para o incremento da produção de grãos brasileira nos últimos anos destacam-se a adoção de inovações tecnológicas e práticas adequadas por parte dos produtores rurais, como por exemplo, o incremento do uso de fertilizantes no processo de produção, uso eficiente de agroquímicos, sementes com melhoramento genético adequado a diferentes zoneamentos climáticos, manejo adequado do solo, entre outros (MACHADO et al., 2013).

A aplicação de produtos no milho em busca de maior tolerância à seca, por exemplo, vem aumentando nos últimos tempos, podendo-se citar aplicação de várias moléculas como ácido ascórbico (DOLATABADIAN; MODARRES-SNAVY; SHARIFI, 2009), ácido fúlvico (ANJUM et al., 2011), ácido abscísico (SOUZA et al., 2013), entre outras, ocasionando o aumento do crescimento e desenvolvimento, do status hídrico foliar (teor relativo de água e potencial hídrico), da atividade enzimática antioxidante e das trocas gasosas.

Algumas tecnologias são atualmente empregadas para potencializar o desenvolvimento inicial das plantas e, dentre elas, os bioestimulantes vegetais evidenciam considerável importância (JARDIN, 2015).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta seção, será apresentada a revisão de literatura que embasou a realização deste estudo, com o intuito de informar sobre a cultura do milho e a inserção do melhoramento genético na cultura deste cereal; sobre o polissacarídeo natural quitina, seu derivado desacetilado quitosana e a caracterização físico-química dos mesmos; sobre a atividade biológica da quitosana e suas aplicações na agricultura, bem como seus efeitos no crescimento e desenvolvimento de plantas. Serão ainda apresentadas informações sobre o pré-condicionamento germinativo de sementes (priming), sobre testes de fitotoxicidade e sobre a morfoanatomia radicular do milho e suas modificações.

2.1 A CULTURA DE MILHO (*Zea mays L.*)

A cadeia produtiva do milho é uma das mais importantes do agronegócio brasileiro, considerando que apenas a produção primária, responde por aproximadamente 37% da produção nacional de grãos. A demanda crescente interna e externa é justificada pelo fato do milho, juntamente à soja, ser insumo básico para avicultura e suinocultura, sendo o principal macro-ingrediente para a produção de rações (CALDARELLI; BACCHI, 2012).

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2016), a estimativa de produção brasileira de milho alcançará 69,1 milhões de toneladas na safra 2015/2016. Nos últimos anos, a cultura do milho no Brasil vem passando por importantes mudanças no manejo e nos tratamentos culturais, o que tem resultado em aumentos significativos na produtividade de grãos. Entre essas mudanças, destacam-se a adoção de sementes de cultivares com maior potencial de produção, adequada nutrição mineral, alterações no espaçamento e na densidade de semeadura de acordo com as características das cultivares e, principalmente, a adoção da biotecnologia. O uso da biotecnologia no milho já é uma realidade e o uso de cultivares transgênicas tem sido de extrema importância para o acréscimo de produtividade da cultura (FARINELLI; JÚNIOR, 2014).

2.1.1 Transgenia em milho

Atualmente, informações sobre a organização e regulação do genoma do milho estão sendo disponibilizadas frequentemente e existe um grande potencial de utilização deste conhecimento para o melhoramento desta cultura através da transformação genética. Esta cultura destaca-se entre as lavouras biotecnológicas cultivadas, por ser uma das commodities mais comercializadas mundialmente, movimentando um mercado bilionário entre indústrias de produção de alimentos para consumo humano, rações e centenas de produtos industrializados. Nos programas de melhoramento genético de milho, é importante visar o aumento da produtividade de grãos sem comprometer a qualidade nutricional e a constituição do grão, tanto em cultivares transgênicas como em convencionais. Além disso, a composição proteica e aminoacídica dos grãos têm influência do genótipo, do ambiente e da interação entre esses fatores. Com isso, não é possível afirmar que cultivares transgênicas apresentam melhor qualidade nutricional quando comparadas às cultivares convencionais (ALVES et al., 2015).

O aumento da produtividade em áreas tradicionalmente produtoras tem sido fruto de investimento em tecnologia aliado ao uso de cultivares com grande potencial e estabilidade produtiva. Mas, o aumento da área plantada nos últimos anos em diferentes regiões com diferentes condições ambientais é um grande desafio para as instituições de pesquisa, principalmente, no que diz respeito à geração ou identificação de cultivares com potencial produtivo que garanta a sustentabilidade no meio rural (CRUZ, 2013).

Trabalhos em pesquisas e desenvolvimento genético têm evoluído rapidamente em todo mundo, desenvolvendo linhagens com maior produtividade, resistência a pragas e insetos, tolerância à seca e com melhorias das características nutricionais. Estas são características que estão sendo adicionadas às sementes que prometem aumentar a produtividade, reduzir o seu custo de produção e ainda, com potencial para reduzir a taxa de desnutrição em países subdesenvolvidos, onde a fome ainda é um dos maiores problemas sociais (JORGE, 2011).

2.2 QUITINA, QUITOSANA E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

Atualmente os polissacarídeos naturais, incluindo a quitina, vêm ganhando destaque na pesquisa e na indústria devido às suas propriedades biológicas, fonte renovável, elevada

abundância e fácil obtenção, alta biodegradabilidade e biocompatibilidade e baixa toxicidade (BADAWY; RABEA, 2011), entre outros.

A quitina é um polissacarídeo de ocorrência natural no exoesqueleto de crustáceos, insetos, moluscos e na parede celular de fungos. Após a celulose, o polissacarídeo de maior abundância é a quitina. Sua estrutura química é similar à celulose (polímero de glicose), diferindo-se pela presença de um grupo nitrogenado acetamida (-NHCOCH₃) na posição C2. Por isso a quitina pode ser descrita como um polissacarídeo constituído de unidades monoméricas de β -1,4-N-acetilglucosamina (DUTTA et al., 2004) (Figura 1A, B).

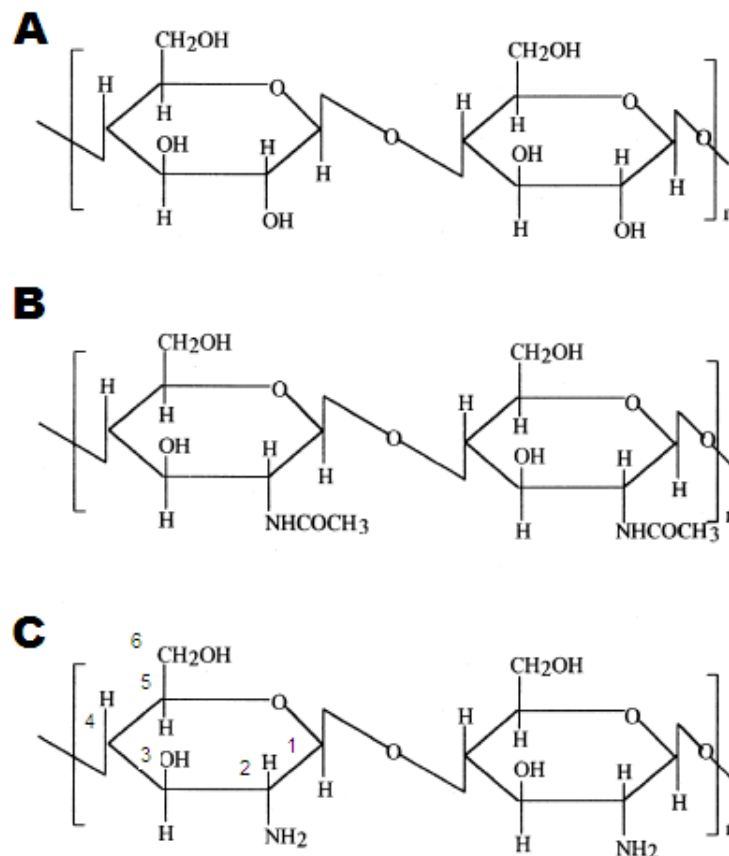


Figura 1- Estrutura química das unidades de celulose (A), quitina (B) e quitosana (C).

Fonte: do autor.

As fontes comerciais de obtenção de quitina (e também de quitosana) têm sido a carapaça de caranguejos e cascas de camarão, oriundas de resíduos da indústria pesqueira que

processa alguns crustáceos (FAI et al., 2008). O biopolímero de quitosana pode também ocorrer naturalmente em fungos principalmente na classe *Zygomycetes* (BERGER; STAMFORD; STAMFORD, 2011).

Devido à grande quantidade de proteínas e minerais (carbonato de cálcio), o isolamento da quitina nestes organismos envolve etapas de desproteinização, desmineralização e descoloração (BADAWY; RABEA, 2011).

A quitosana é um derivado desacetilado da quitina sendo estruturalmente similar (BADAWY; RABEA, 2011). Assim ela é constituída de unidades de N-acetilglicosamina e glicosamina (Figura 1C). Para ser considerado quitosana, o biopolímero desacetilado deve conter uma porcentagem de desacetilação (DDA) entre 40 a 98% (IRITI; FAORO, 2009).

A obtenção da quitosana (desacetilação) pode ser por métodos químicos com soluções de hidróxido de sódio ou potássio e aquecimento ou através de métodos bioquímicos fermentativos (KUMAR, 2000; BOONLERTNIRUN, 2006; KANNAN et al., 2010).

Com relação a solubilidade, a quitina é insolúvel em meio aquoso e já a quitosana, por conter mais de 50% do grupo NH_2 (do carbono 2) desacetilado, apresenta alta solubilidade em solução aquosa ácida ($\text{pH} < 6$). Ácidos orgânicos como acético, fórmico e láctico são utilizados para dissolver quitosana. Quanto maior a desacetilação deste biopolímero, maior é a solubilidade em solução aquosa ácida, contudo o peso molecular e a distribuição das unidades de glicosamina e N-acetil-glicosamina também interferem (SIGNINI; DESBRIERES; CAMPANA FILHO, 2000).

As técnicas mais convenientes para a caracterização físicoquímica da quitosana são espectroscopia na região do Infravermelho, espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), espectroscopia de massas, espectroscopia na região Ultravioleta-Visível (UV-Vis), métodos titulométricos e viscosimétricos, análise elementar, microscopia eletrônica de varredura (MEV), teor de cinzas totais, termogravimetria, difração de Raio-X, entre outros (PAULINO; SIMIONAT, 2006; RINAUDO, 2006; ABDOU et al., 2008; SAGHEER et al., 2009; KUMARI, et al., 2015; KUMIRSKA et al., 2010; ABDEL-RAHMAN et al., 2015).

A espectroscopia de infravermelho é um tipo de espectroscopia de absorção que usa a região do infravermelho do espectro eletromagnético e, como as demais técnicas espectroscópicas, pode ser usada para identificar um composto ou investigar a composição de uma amostra, baseando-se nas frequências de vibrações específicas das ligações químicas, correspondentes a níveis de energia das moléculas. A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, é uma técnica para colher o espectro infravermelho mais rapidamente. Em vez de coletar os dados variando-se a frequência da luz infravermelha macromática, a luz

IV é guiada através de um interferômetro. Depois de passar pela amostra o sinal é o interferograma. Realizando-se uma transformada de Fourier no sinal resulta-se em um espectro idêntico ao da espectroscopia IV convencional (BASTOS, 2012).

O grau de desacetilação refere-se ao conteúdo de grupamentos amina livres e afeta a solubilidade, hidrofiliabilidade e as características de atração eletrostática com poliânions (HEJAZI; AMIJI, 2003). Polímeros com baixo grau de desacetilação estão relacionados à maior toxicidade, enquanto que altos valores de desacetilação (em torno de 85%) conferem menor toxicidade. Em ambas situações a quitosana atua como um promotor de permeação (HAAS, 2012).

A análise elementar é uma técnica utilizada para avaliação da eficiência do processo de desacetilação da quitina e espera-se que, quanto mais eficiente a desacetilação da quitina, maior será o percentual de nitrogênio encontrado na quitosana e, conseqüentemente maior o grau de desacetilação. Métodos como a difração por raio X são eficientes para alcançar a clara distinção da quitina de seus derivados desacetilados, como por exemplo a quitosana, bem como a utilização da termogravimetria, que é o resultado de uma transformação física (sublimação, evaporação, condensação) ou química (degradação, decomposição, oxidação) em função do tempo ou da temperatura. Os métodos termogravimétricos mais utilizados são o dinâmico, o isotérmico e o quase-isotérmico (ANTONINO, 2007).

Para analisar as amostras de quitosanas a técnica de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio tem mostrado boa reprodutibilidade, rapidez nas análises e exige pouca quantidade de amostra. A obtenção de um espectro de ^1H -RMN quantitativo depende de parâmetros como tempo de irradiação da amostra, tempo de varredura, tempo de espera antes do pulso seguinte, número de varredura, entre outros (ANTONINO, 2007). A espectroscopia de ^1H -RMN é útil nas análises das amostras de quitosana em ampla faixa de valores de desacetilação e é independente da viscosidade da amostra, pois a análise é realizada a 70°C. No entanto, é necessário que a varredura do espectro e a aquisição dos dados sejam realizadas rapidamente ao se efetuar a análise a 70°C, de modo a minimizar problemas tais como a reação de hidrólise ácida que leva à desacetilação e/ou à degradação da amostra (SANTOS et al., 2003).

O Método de Determinação de Cinzas Totais consiste na carbonização do material até cinzas, sendo o peso além do limite estabelecido um indicativo da presença de material inorgânico adulterante (BRANDÃO; FREIRE; SOARES, 1998). A determinação do teor de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido são importantes parâmetros de qualidade por indicar adulterações, pois avalia a presença de resíduos inorgânicos não voláteis (SONAGLIO et al., 2003).

A viscosimetria, embora seja um método não absoluto, é um dos processos mais utilizados para a determinação da massa molar de polímeros. As medidas são feitas com base no tempo de escoamento do solvente e das soluções diluídas do polímero, utilizando-se um viscosímetro (SANTOS et al., 2003).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia de uma amostra sólida, sendo um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos, com a importante característica de aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo (PEREIRA; SILVA; COSTA, 2013). Antonino (2007) considerou a análise de Microscopia Eletrônica de Varredura essencial para observação do tamanho e formato das partículas de quitina e quitosana, destacando suas características de matérias quanto ao aspecto físico.

Bonomo (2014) considera a análise do crescimento de espécies vegetais, juntamente às análises químicas, facilitadores na compreensão de eventos ou substâncias contaminantes em amostras ambientais.

2.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DA QUITOSANA E APLICAÇÕES

Apesar de a quitina também conter propriedades biológicas, devido a sua baixa solubilidade em água e a facilidade de se obter os seus derivados, tem-se encontrado maiores estudos e aplicações para a quitosana (RAMÍREZ et al., 2010).

Devido sua ampla atividade biológica, a quitosana vem sendo aplicada em várias áreas do conhecimento como Biotecnologia, Ciências Ambientais, Alimentos, Biomedicina, Farmacêutica, Cosmética e Agricultura (KAUR; DHILLON, 2014). Por ter grande habilidade de formar biofilmes e géis, estabilidade mecânica e biocompatibilidade, a quitosana vem sendo utilizada como imobilizadora de biomoléculas (enzimas); protetora de frutas (uma fina camada de quitosana permite uma proteção contra entrada de microrganismos e permite uma modificação da atmosfera do entorno); emulsificante e suplemento dietético (QIN et al., 2006; RIBEIRO et al., 2007; LIU; ZHANG; XIA, 2008; WU et al., 2010).

Estudos na área de saúde tem apontado para a descoberta de quitosana com atividade antitumoral, anticoagulante, anti-inflamatória, antimicrobiana, anti-hipertensiva, antioxidante e antidiabética, entre outras (DUTTA et al., 2004; PARK; KIM, 2010; BANSAL et al., 2011).

Kabbashi et al. (2009) mostraram em seus trabalhos que a quitosana pode ser utilizada no tratamento de efluentes industriais devido a capacidade adsorver metais pesados como o Crômio.

2.4 APLICAÇÃO DA QUITOSANA NA AGRICULTURA

A aplicação da quitosana vem trazendo bons resultados na agricultura para: proteção de plantas, antes e após a colheita, contra pragas e doenças (estimula o sistema de defesa) (EL HADRAMI et al., 2010); aumento da ação antagonista de microrganismos no controle biológico (BERGER; STAMFORD; STAMFORD, 2011); aumento da interação entre plantas e microrganismos (simbiose) (KAUR; DHILLON, 2014); aumento da fertilidade do solo e nutrição de plantas devido seu alto teor de nitrogênio (GHORMADE; DESHPANDE; PAKNIKAR, 2011) e regulação no crescimento e desenvolvimento de plantas (RAMÍREZ et al., 2010).

A disponibilidade de quitosana para as plantas tem sido realizada de várias formas como via absorção radicular através da adição direta ao solo (BOONLERTNIRUN; BOONRAU; SUVANASARA, 2008) ou dissolvidas em solução nutritiva (DZUNG; KHANH; DZUNG, 2011) e via absorção foliar através de aplicação nas folhas (MONDAL et al., 2012). Vários autores também utilizaram a quitosana em condicionamento pré-germinativo de sementes (priming) (GUAN et al., 2009; LIZÁRRAGA-PAULÍN et al., 2011; ZENG; LUO, 2012).

2.5 EFEITO DA QUITOSANA NA REGULAÇÃO DO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS

Bioestimulante pode ser qualquer substância, que não seja considerada como nutriente pesticida ou corretivo de solos e que proporcione benefícios às plantas. A característica policatiônica de oligômeros de quitosana permite que estes sejam capazes de realizar ligações com uma variedade de componentes celulares (como constituintes da membrana plasmática e parede celular), bem como ligações específicas a receptores influentes nos genes de sistema de

defesa da planta (JARDIN, 2015). Alguns autores consideram a quitosana como um elicitor devido às suas propriedades estimulantes de aumento da produção de metabólitos secundários, como o terpenóide Artemisinina em *Artemisia annua* L (LEI et al., 2011) e também como estimulantes de defesas contra microrganismos (induzem a ativação de reações em cascatas no metabolismo) (SHARP, 2013; MEJÍA-TENIENTE et al., 2013).

A quitosana pode levar ao aumento do crescimento e desenvolvimento em plantas alterando positivamente várias características. A aplicação do biopolímero levou ao aumento na altura de plantas, no número de ramificações da parte aérea, no número de folhas, da área foliar e de atributos de biomassa em diversas espécies de plantas como milho (*Zea mays* L.) (LIZÁRRAGA-PAULÍN et al., 2011; MONDAL et al., 2013), soja (*Glycine max*) (LEE et al., 2005), arroz (*Oryza sativa* L.) (BOONLERTNIRUN et al. 2006), milheto (*Pennisetum glaucum*) (SHARATHCHANDRA et al. 2004), abóbora (*Cucumis sativus* L.) (SHEHATA et al., 2012) e orquídeas (PORNPIENPAKDE et al. 2010; SOPALUN et al. 2010), entre outras.

Alterações no florescimento, rendimento de grãos e na qualidade de frutos também foram encontradas. Plantas de Lisianto (*Eustoma grandiflorum*) tratadas com quitosana apresentaram maior número de flores (OHTA et al., 1999) e ainda flores de girassóis tratadas com o mesmo biopolímero possuem maior qualidade devido ao aumento do estímulo da capacidade de sequestrar radicais livres (CHO; NO; PRINYAWIWATKUL, 2008). Quando aplicada nas folhas de morango, a quitosana favoreceu o aumento do número de frutos por planta e o nível de acidez e carboidratos totais presentes nestes frutos (ABDEL-MAWGOUD et al., 2010). Quitosana diminui o abortamento de frutos em café (DZUNG, KHANH, DZUNG, 2011).

Mondal et al., (2013a) recomenda uma aplicação de 100 ppm de quitosana em plantas de milho no estágio vegetativo para se obter um maior rendimento de grãos. O efeito da quitosana na produção de milho também foi observado por Guan e colaboradores (2009). Arroz, feijão mungo, trigo, café e quiabo (BOONLERTNIRUN; BOONRAU; SUVANASARA, 2008; DZUNG; KHANH; DZUNG, 2011; MONDAL et al., 2012; MONDAL et al., 2013b; TOURIAN et al., 2013) também possuem aumento da produção quando tratados com quitosana.

A quitosana pode estimular respostas fisiológicas para tolerância ao estresse de seca. Plantas, incluindo o milho, após a aplicação de quitosana, vêm possuindo mecanismos de defesa contra a este estresse e vem aumentando a produção (GUAN et al., 2009; DZUNG; KHANH; DZUNG, 2011; LIZÁRRAGA-PAULÍN, et al., 2011). Os recentes resultados das últimas décadas têm indicado que o biopolímero tem potencial para ser desenvolvido como um antitranspirante em situações agrícolas de estresse, induzindo a tolerância a seca via aumento

da eficiência do uso da água (EUA, menor perda de água por carbono fixado) e/ou maior defesa contra as espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo). O fechamento estomático induzido por quitosana através de um mecanismo dependente de ácido abscísico (ABA) confere a participação deste bioestimulante à proteção da planta perante o estresse ambiental. (BITTELLI et al., 2001; IRITI et al., 2009; LUDWI et al., 2010; ZENG; LUO, 2012; PONGPRAYOON et al., 2013; SHARP, 2013).

A quitosana regula o sistema de defesa de plantas de arroz, além de melhorar o índice de germinação, aumentar o peso seco da raiz, devido à grande quantidade de moléculas de nitrogênio, promovendo o crescimento de plântulas e antecipando a ocorrência da floração (BOONLERTNIRUN et al., 2008).

2.6 PRÉ-CONDICIONAMENTO GERMINATIVO DE SEMENTES (PRIMING)

Jisha, Vijayakumari e Puthur (2013) definem o condicionamento fisiológico ou pré-condicionamento (priming) germinativo como a indução de um estado fisiológico específico em plantas através de compostos naturais e sintéticos para as sementes antes da germinação e, segundo Van et al., (2006), tal técnica vem emergindo nos últimos anos como uma estratégia moderna promissora no combate ao estresse tanto biótico quanto abiótico sem afetar a aptidão das mesmas.

As sementes condicionadas geralmente apresentam uma maior taxa e maior uniformidade de germinação (BASRA et al., 2005). Durante o condicionamento fisiológico as sementes são parcialmente hidratadas até que o processo de germinação comece, mas surgimento radicular não ocorra (BRADFORD, 1986).

Em muitas culturas, a germinação de sementes e o crescimento inicial de mudas são as fases mais sensíveis ao déficit de água, que pode reduzir a taxa e uniformidade de germinação, o que leva ao mau desempenho da cultura e rendimento (DEMIR et al., 2004). O pré-condicionamento germinativo utilizando a quitosana induz resistência a certas doenças, aumenta a energia e porcentagem de germinação, a atividade da lipase, os níveis de GA3 e AIA e também melhora a qualidade das sementes das culturas (REDDY et al., 1999; SHAO et al., 2008). O tratamento de sementes de trigo com quitosana induziu resistência a certas doenças e melhoria da qualidade de sementes (REDDY et al., 1999). Em sementes revestidas com

quitosana houve aceleração da germinação e melhorias na tolerância às condições de estresse em mudas de arroz híbrido (RUAN; XUE, 2002).

O priming com quitosana aumenta a tolerância ao frio em milho, reforçando o índice de germinação e diminuindo o tempo de germinação a baixas temperaturas e produzindo um maior crescimento de plântulas em sementes tratadas em comparação com sementes não tratadas (GUAN et al., 2009).

2.7 TESTES DE FITOTOXICIDADE

Os bioensaios expõem organismos vivos a várias diluições de uma amostra ou a diferentes concentrações de um produto químico sob condições experimentais bem definidas. Os sistemas vivos, sejam eles organismos inteiros ou parte deles, respondem de forma integral, com reações específicas, a todas as perturbações diretas ou indiretas causadas por substâncias nocivas. Geralmente os bioensaios são realizados em condições controladas, sendo a germinação de sementes o teste mais aplicado (RICE, 1984), devido sua simplicidade (germina ou não germina) (FERREIRA; ÁQUILA, 2000).

Testes de fitotoxicidade permitem determinar o potencial tóxico de um agente químico ou de uma mistura complexa (SILVA, 2005). Tais testes são vantajosos por apresentarem uma gama de parâmetros que permitem avaliar a toxicidade de determinada substância, como acréscimo de biomassa, taxa de germinação, alongamento de raiz e aspectos bioquímicos. Apresentam ainda baixo custo e simplicidade, permitindo serem realizados com frequência (ŽALTAUSKAITĖ; ČYPAITĖ, 2008). Na literatura ainda não há relatos sobre a fitotoxicidade da quitosana e o que parece ser tóxico são os solventes utilizados para dissolvê-la (ROMANAZZI et. al., 2009).

Ao sintetizar nanopartículas de quitosana através da polimerização por ácido metacrílico e aplicá-las em *Allium cepa*, Lima et al. (2013) concluíram que as partículas somente eram tóxicas quando utilizadas como partículas grandes e em concentrações elevadas e que partículas pequenas, podem ser utilizadas em concentrações elevadas.

O índice mitótico, é um parâmetro que, quando observado, permite analisar a citotoxicidade de determinada substância (BONOMO, 2014), sendo determinado pelo aumento ou decréscimo nos valores da divisão celular em função da mesma. A genotoxicidade de uma

substância é entendida como a sua capacidade de induzir anormalidades cromossômicas (MARTINS et al., 2016).

Ahmadi (2015) conclui em seus estudos com *Vicia faba* (feijão-fava) que, em baixas concentrações a quitosana beneficia a divisão celular, aumentando-a com efeito análogo ao do fitormônio giberelina, estimulando o crescimento de plantas. O autor afirma ainda que a utilização do biopolímero provoca anormalidades cromossômicas equiparadas às provocadas em plantas que não receberam sua aplicação, o que indica que a quitosana pode ser utilizada para fins agrícolas causando menos danos às plantas, surgindo como uma alternativa de adubação química.

Limpanavech et al. (2008) afirmam que a quitosana aumenta a capacidade floral em orquídea, atuando principalmente nos genes dos cloroplastos, bem como promove alterações na anatomia foliar, aumentando corpos de sílica e atuando benéficamente na tolerância ao estresse.

2.8 MORFOANATOMIA RADICULAR E SUAS MODIFICAÇÕES

O sistema radicular do milho tem uma parte seminal de raízes adventícias que constitui cerca de 52% da planta e promove a fixação primária e absorção de nutrientes pelas plantas, uma vez que o sistema nodal é 48% da massa total de as raízes das plantas. Além disso, o sistema radicular possui a função de manter a posição vertical da planta, evitando sua queda (ORTEGA, 2014). A parte do embrião que corresponde à radícula originará a raiz primária que se aprofunda no solo em sentido vertical. A seguir surgem as raízes secundárias, as quais apresentam uma grande capacidade de ramificação e a raiz primária desintegra-se. Posteriormente, surgem as raízes adventícias, que partem dos primeiros nós do colmo e quando atingem o solo ramificam-se intensamente, sendo muito importante na sustentação física da planta (BARROS; CALADO, 2014).

O crescimento e o desenvolvimento das raízes dependem das condições físicas e químicas do solo. Entre as modificações morfológicas nas raízes provocadas pela restrição ao crescimento estão o aumento do diâmetro e a diminuição do comprimento, tornando-as tortuosas (FREDDI; CENTURION; ALMEIDA, 2009).

Estudos anatômicos de plantas auxiliam no entendimento de mecanismos de fitotoxicidade. Alterações morfofisiológicas em todo corpo da planta podem estar relacionadas

diretamente a modificações na estrutura radicular, uma vez que as raízes constituem a via primária de absorção de água e nutrientes no vegetal. Sendo assim, tais modificações são importantes para avaliar a adaptação das plantas a condições de estresse ambiental (TEIXEIRA, 2014).

3 JUSTIFICATIVA

Recentemente vem sendo relatado que a perda expressiva na produção de milho no Brasil ocorre principalmente devido à seca. No sul de Minas Gerais, há notícias de que as margens de perda da produção da safra de milho, devido a uma estiagem prolongada nos meses de janeiro e fevereiro de 2014 chegam a 30% (VALVERDE, 2014). E o último levantamento realizado pela CONAB (2016) confirmou a queda de produtividade de milho na safra 2015/2016 devido ao estresse hídrico.

Ainda há entraves na produção e na disponibilidade de genótipos de milho, devido, sobretudo, às incertezas climáticas da época de plantio, as quais constituem um dos problemas a serem superados.

Se considerarmos que o Brasil é um dos grandes produtores de milho, é justificável a identificação e caracterização de tecnologias que busquem maior eficácia nos processos de produção.

Sendo a utilização da quitosana, comprovadamente benéfica ao crescimento e desenvolvimento de plantas, bem como de não comprovada fitotoxicidade, justifica-se a avaliação de seus efeitos sobre a cultura deste cereal.

4 OBJETIVOS

Nesta seção, serão apresentados os objetivos gerais e específicos do presente trabalho.

4.1 OBJETIVO GERAL

Os objetivos gerais deste trabalho são: contribuir com estudos para a cultura de milho transgênico e não transgênico; realizar a caracterização físicoquímica da quitosana e investigar os efeitos da quitosana no milho transgênico e não transgênico.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho são: caracterizar a quitosana através de espectroscopia de absorção na região do infravermelho análise elementar, porcentagem de desacetilação (DDA%), método de cinzas totais, ressonância magnética nuclear (RMN), análises termogravimétricas, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e viscosidade dinâmica; investigar o efeito da quitosana no processo germinativo e crescimento inicial de milho transgênico e não transgênico através de Teste de Fitotoxicidade; avaliar os efeitos da quitosana no ciclo celular de milho transgênico e não transgênico através do Teste de Citogenotoxicidade; avaliar os efeitos da quitosana na anatomia radicular de milho transgênico e não transgênico.

REFERÊNCIAS

ABDEL-MAWGOUD, A.M.R. et al. Growth and yield responses of strawberry plants to chitosan application. **European Journal of Scientific Research**, United Kingdom, v. 39, p. 170-177, 2010.

ABDEL-RAHMAN, R. M. et al. Chitin and chitosan from Brazilian Atlantic Coast: Isolation, characterization and antibacterial activity, **International Journal of Biological Macromolecules**, Netherlands, v. 80, p. 107–120, 2015.

ABDOU, E.S. et al. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. **Bioresource Technology**, United Kingdom, v. 99, p. 1359-1367, 2008.

ALVES, M. C. et al. **Fatores que influenciam a transformação genética de milho (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium tumefaciens***. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2015. 40 p.

AL-AHAMADI, M. S. Cytogenetic effect of chitosan on mitotic chromosomes of root tip cells of *Vicia faba*, **Life Science Journal**, [S. l.], v. 12, p. 158-162, 2015.

ANJUM, S. A. et al. Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange **Journal Agronomy and Crop Science**, Netherlands, v. 197, n. 3, p. 177-185, 2011.

ANTONINO, N. A. **Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundo da indústria pesqueira paraibana**. 2007. 88p. Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCEN, João Pessoa, 2007.

BADAWY, M.E.I; RABEA, E.I. A biopolymer chitosan and Its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, [S. l.], v. 2011, p. 1-29, 2011.

BANSAL, V. et al. Applications of chitosan and chitosan derivatives in drug delivery. **Advances in Biological Research**, [S. l.], v. 5, p. 28-37, 2011.

BARROS, J. F. C.; CALADO, J. G. **A Cultura do Milho**, Universidade de Évora, Escola de Ciências e Tecnologia, Departamento de Fitotecnia, Évora, 2014.

BASRA S. M. A., FAROOQ, M., TABASSUM, R. Physiological and biochemical aspects of seed vigour enhancement treatments in fine rice (*Oryza sativa L.*). **Seed Science Technology**. [S. l.], v. 33, p. 623–628, 2005.

BASTOS, C. A. **Obtenção de nanocompósitos à base de bentonita, amido e quitosana**. 2012. 73p. Dissertação de Mestrado em Engenharia – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012..

BERGER, L.R.R.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, N.P. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, [S. l.], v.12, p. 195-215, 2011.

BITTELLI, M. et al. Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. **Agricultural and Forest Meteorology**, [S. l.], v. 107, p. 167-175, 2001.

BOONLERTNIRUN, S. **Effects of chitosan on agronomic characters and some physiological responses of rice (*oryza sativa l.*) cultivar suphanburil under drought condition**. 89p. 2006. A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy (Tropical Agriculture) Graduate School, Kasetsart University. 2006.

BOONLERTNIRUN, S.; BOONRAUNG, C.; SUVANASARA, R. Application of chitosan in rice production. **Journal of Metals, Materials and Minerals**, [S. l.], v.18, p. 47-52, 2008.

BONOMO, M. M. **Efeitos citogenéticos, bioquímicos, morfológicos e anatômicos da aplicação de lodo de esgoto higienizado em Caricapapaya**. 86p. 2014. Dissertação – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória/ES, 2014.

BRADFORD, M. Rapid and quantitative method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annual Biochemistry**, [S. l.], v. 72, p. 284-252, 1986.

BRANDÃO, M. G. L., FREIRE, N., SOARES, C. D. V. Surveillance of phytotherapeutic drugs in the State of Minas Gerais. Quality assessment of commercial samples of chamomile. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 14(3):613-616, jul-set, 1998.

CALDARELLI, C. E.; BACCHI, M. R. P. Fatores de influência no preço do milho no Brasil. **Nova Economia**, Belo Horizonte, 22 (1), p. 141 – 164, abril de 2012.

CARVALHO, I.R. et al. Efeitos fisiológicos atribuídos ao teste de frio e adição de reguladores vegetais em híbridos de milho. **Scientia Plena**, [S. l.], v. 11, p. 030201, 2015.

CHO, M.H.; NO, H.K.; PRINYAWIWATKUL, W. Chitosan treatments affect growth and selected quality of sunflower sprouts. **Journal of Food Science**, United Kingdom, v.73, p.71-77, 2008.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: décimo levantamento, Julho/2016**. Brasil. Disponível em: <www.conab.gov.br> Acesso em: 20 jul. 2014.

CRUZ, S. J. S. **Características morfofisiológicas de plantas e produtividade do milho** / Sihélio Júlio Silva Cruz – Botucatu, 2013, 60 f. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2013.

DEMIR, I. MAVI, K. The effect of priming on seedling emergence of differentially matured water melon (*Citrullus lanatus* (Thunb.)Matsum and Nakai) seeds. **Science Horticulturae**, Belgium, v. 102, p. 467–473, 2004.

DOLATABADIAN, A.; MODARRES-SANAVY, S. A. M.; SHARIFI, M. Alleviation of water deficit stress effects by foliar application of ascorbic acid on *Zea mays* L. **Journal Agronomy and Crop Scienc**, United Kingdom, v. 195, n. 5, p. 347-355, 2009.

DUTTA et al. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. **Journal of Scientific & Industrial Researchs**, [S. l.], v. 63, p. 20-31, 2004.

DZUNG, N.A.; KHANH, V.T.P.; DZUNG, T.T. Research on impact of chitosan oligomers on biophysical characteristics, growth, development and drought resistance of coffee. **Carbohydrate Polymers**, United Kingdom, v. 84, p. 751-755, 2011.

EL HADRAMI, A. et al. Chitosan in Plant Protection. **Marine Drugs**, Suíça, v. 8, p. 968-987, 2010.

FARINELLI, R.; JUNIOR, W. R. C. Resposta de cultivares de milho transgênico e convencional a densidades populacionais. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.13, n.3, p. 336-346, 2014.

FERREIRA, A. G.; ÁQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasil, v. 12, p. 175-204, 2000. Edição Especial.

FREDDI, O. S., CENTURION, J. F., ALMEIDA, C. X. Compactação de um Latossolo Vermelho de textura argilosa afetando o sistema radicular e a produtividade do milho. **Revista Ceres**, [S. l.], v. 56, n. 5, p. 654-665, 2009.

GHORMADE, V.; DESHPANDE, M.V.; PAKNIKAR, K.M. Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 29, p. 792-803, 2011.

GUAN, Y.J. et al. Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. **Journal of Zhejiang University Science B**, [S. l.], v. 10, p. 427-433, 2009.

HAAS, S. E. **Desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação farmacocinética de nanopartículas auto-organizadas de quitosana**. 2012. 170 f. Tese (doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

IRITI, M.; FAORO, F. Chitosan as a MAMP searching for a PRR. **Plant Signaling Behavior**, [S. l.], v. 4, p. 1–3, 2009.

IRITI, M. et al., Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure, **Environ. Exp. Bot.** [S. l.], v. 66 (2009), p. 493–500.

JARDIN, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation, **Scientia Horticulturae**, [S. l.], v. 196, p. 3-14, 2015

JISHA, K.; VIJAYAKUMARI, K.; PUTHUR, J. T. Seed priming for abiotic stress tolerance: na overview. **Acta Physiologiae Plantarum**, [S. l.], v. 35, p. 1381 – 1396, 2003.

JORGE, A. **O caso do milho geneticamente modificado: questões de produção, segurança e métodos de detecção**. 2011. 51 f. Monografia (Especialização em Gestão Industrial: Conhecimento e Inovação) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2011.

KABBASHI, N.A. et al. Development of a wastewater treatment system for chromium removal using chitosan. **International Journal of Chemical Technology**, [S. l.], v.1, p. 44-51, 2009.

KANNAN, M. et al. Production and characterization of mushroom chitosan under solidstate fermentation. **Advance Biology Research**, [S. l.], v. 4, p. 10–13, 2010.

KAUR, S., DHILLON, G.S. The versatile biopolymer chitosan: potential sources, evaluation of extraction methods and applications. **Critical Reviews Microbiology**, United Kingdom, v. 40, p. 155-175, 2014.

KUMAR, M.N.V.R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, Netherlands, v. 46, p. 1-27, 2000.

KUMARI, S; P. RATH, P; S.H.A. KUMAR, S. H. A. TIWARI, T. N. Extraction and characterization of chitin and chitosan from fishery waste by chemical method. **Environ. Technol. Innov.** Netherlands, v. 3 (2015). p. 77–85.

KUMIRSKA, J. et al. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. **Marine Drugs**, Swidzerland, v. 8. p. 1567-1636, 2010.

LEI, C. et al. Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. **Industrial Crops and Products**, Netherlands, v. 33, p. 176-182, 2011.

LIMA, R.; FEITOSA, L.; PEREIRA, A. E. S.; MOURA, M. R.; AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H. C.; FRACETO, L. F.; Evaluation of the genotoxicity of chitosan nanoparticles for use in food packaging films, **J. Food Sci.** United States, v. 75 (2013). p. 89-96.

LIMPANAVECH, P., CHAIYASUTA, S., VONGPROMEK, R., PICHYANGKURA, R., KHUNWASI, C., CHADCHAWAN, S., LOTRAKUL, P., BUNJONGRAT, R., CHAIDEE, A., BANGYEEKHUN, T. Chitosan effects on floral production, gene expression, and anatomical changes in the Dendrobium orchid, **Scientia Horticulturae**, [S. l.], v. 116 (2008) p. 65–72.

LIU, J.; ZHANG, J.; XIA, W. Hypocholesterolaemic effects of different chitosan samples in vitro and in vivo. **Food Chemistry**, United Kingdom, v. 107, p. 419-425, 2008.

LIZÁRRAGA-PAULIN, E.G. et al. Chitosan application in maize (*Zea mays*) to counteract the effects of abiotic stress at seedling level. **African Journal of Biotechnology**, Nigéria, v. 10, p. 6439-6446, 2011.

LUDWI, N. et al. Reduction of evaporative flux in bean leaves due to chitosan treatment assessed by infrared thermography. **Infrared Physics & Technology**, Netherlands, v. 53, p. 65-70, 2010.

MACHADO, J. V.; SOUZA, C. H. E.; LANA, R. M. Q.; SILVA, A. A.; RIBEIRO, V. J. Productivity maize yield as a function of nitrogen side dressing fertilization. **Revista Verde**, Mossoró – RN, Brasil, v. 8, n. 5, p. 93 - 104, dezembro, 2013.

MEJÍA-TENIENTE, L. et al. Oxidative and molecular responses in *Capsicum annuum* L. after hydrogen peroxide, salicylic acid and chitosan foliar applications. **International Journal of Molecular Sciences**, Switzerland, v. 14, p. 10178-10196, 2013.

MONDAL, M.M.A et al. Effect of foliar application of chitosan on growth and yield in okra. **Australian Journal of Crop Science**, Australia, v. 6, p. 918-921, 2012.

MONDAL, M.M.A. et al. Foliar application of chitosan improves growth and yield in maize. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, Finlândia, v. 11, p. 520-523. 2013a.

MONDAL M.M.A. et al. Foliar application of chitosan on growth and yield attributes of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). **Bangladesh Journal of Botany**, Bangladesh, v. 42, p. 179-183, 2013b.

OHTA, K. et al. Chitosan treatment affects plant growth and flower quality in *Eustoma grandiflorum*. **HortScience**, United States, v. 34, p. 233-234, 1999.

ORTEGA, I. S. Maíz I (*Zea mays*). **Reduca (Biología)**. Brasil, ISSN: 1989-3620, Série Botânica, v. 7 (2), p. 151-171, 2014.

PARK, B.K.; KIM, M-M. Applications of Chitin and its Derivatives in biological medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, Switzerland, v. 11, p. 5152-5164, 2010.

PAULINO, A.T.; SIMIONAT, J.I. Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm chrysalides. **Carbohydrate Polymers**, United Kingdom, v. 64, p. 98-103, 2006.

PEREIRA, E.; SILVA, I. J.; COSTA, M. R. M. M. Preparação de amostras para análise em microscopia eletrônica de varredura em interfaces de revestimentos cerâmicos, **Revista de Engenharia e Tecnologia**, Paraíba, Brasil, v. 5, p. 44-52, 2013.

PORNPIENPAKDE, P. et al. Improving the micropropagation efficiency of hybrid *Dendrobium* orchids with chitosan. **Scientia Horticulturae**, Netherlands, v. 124, p. 490-499, 2010.

QIN, C. et al. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. **Carbohydrates Polymers**, United Kingdom, v. 63, p. 367-374, 2006.

RAMÍREZ, M.A. et al. Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications. **Biotecnologia Aplicada**, Cuba, v. 7, p. 270-276, 2010.

REDDY, M. V. B. et al. Chitosan treatment of wheat seeds induces resistance to *Fusarium graminearum* and improves seeds quality. **Journal Agriculture Food Chemistry**, [S. l.], v. 47, p. 67-72, 1999.

RIBEIRO, C. et al. Optimization of edible coating composition to retard strawberry fruit senescence. **Postharvest Biology and Technology**, Netherlands, v. 44, p. 63-70, 2007.

RICE, E.L. **Allelopathy**. 2. ed. New York: Academic Press, 1984.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, United Kingdom, v. 31, p. 603-632, 2006.

ROMANAZZI, G. Effect of chitosan dissolved in diferente acids on its abity to control postarvest gray moldo of table grape. **Phytophatology**, [S. l.], v. 99, p. 1028 – 1036, 2009.

RUAN, S. L., XUE, Q. Z. Effects of chitosan coating on seed germination and salt-tolerance of seedlings in hybrid rice (*Oryza sativa L.*). **Acta Agron Sin**, Netherlands, v. 28, p. 803-808, 2002.

SAGHEER, F. A. et al. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. **Carbohydrate Polymers**, United Kingdom, v. 77, p. 410-419, 2009.

SANTOS, J. E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, E. R.; FILHO, C. S. P.; CAVALHEIRO, É. T. G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens, **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, Brasil, v. 13, n° 4, p. 242-249, 2003.

SHAO, H. et al. Water-deficit stress induced anatomical changes in higher plants. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 331, n. 3, p. 215-225, Mar. 2008.

SHARATHCHANDRA, R.G. et al. A chitosan formulation elaxat induces downy mildew disease resistance and growth promotion in pearl millet. **Crop Protect**, United Kingdom, v. 23, p. 881-888, 2004.

SHARP, R.G. A Review of the Applications of Chitin and Its Derivatives in Agriculture to Modify Plant-Microbial Interactions and Improve Crop Yields. **Agronomy**, [S. l.], v. 3, p. 757-793, 2013.

SHEHATA, S.A. et al. Response of Cucumber plants to foliar application of chitosan and yeast under greenhouse conditions. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, Pakistan, v. 6, p. 63-71, 2012.

SIGNINI, R.; DESBRIERES, J. CAMPANA FILHO, S.P. On the stiffness of chitosan hydrochloride in acid-free aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, United Kingdom, v. 43, p. 351-357, 2000.

SILVA, G. L. **Redução de corante em efluente de processo de tingimento de lavanderias industriais por adsorção em argila**. 120p. 2005. Tese de Doutorado em Engenharia Química - Faculdade de Engenharia Química, Unicamp, Campinas, 2005.

SONAGLIO, D. et al. 2003. **Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos**. In: SIMÕES, C.M.O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Ed. 5, Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 289-326, 2003.

SOPALUN, K.; THAMMASIRI, K.; ISHIKAWA, K. Micropropagation of the Thai orchid *Grammatophyllum speciosum Blume*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, Netherlands, v. 101, p. 143-150, 2010.

SOUZA, T. C. et al. Morphophysiology, morphoanatomy, and grain yield under field conditions for two maize hybrids with contrasting response to drought stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, Poland, v. 35, p. 3201-3211, 2013.

TEIXEIRA, M. B. **Genotoxicidade e modificações anatômicas radiculares em *Allium cepa* L. (*Amaryllidaceae*) provocadas pelo efluente do beneficiamento de rochas ornamentais**. 84p. 2014. Dissertação (Mestrado em Botânica Aplicada) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

TOURIAN, N. et al. Change in photosynthetic pigment concentration of wheat grass (*Agropyron repens*) cultivars response to drought stress and foliar application with chitosan. **International Journal of Agronomy and Plant Production**, [S. l.], v. 4, p. 1084-1091, 2013.

VAN, H. M. et al. Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. **Proc Natl Acad Science USA**, United States, v. 103: 5602–5607, 2006.

VALVERDE, M. Seca pode comprometer plantio de milho. **Diário do comércio**, Brasil, Sessão agronegócio. In: <www.diariodocomercio.com.br/noticia.php?id=130163> Acesso em: 13 fev. 2016.

WU, Y. et al. Effect of solvents and precipitant on the properties of chitosan nanoparticles in water-in-oil microemulsion and its lipase immobilization performance. **Bioresource Technology**, United Kingdom, v. 101, p. 841-844, 2010.

ŽALTAUSKAITĖ, J.; ČYPAITĖ, A. Assessment of landfill leachate toxicity using higher plants Assessment of landfill leachate toxicity using higher plants. **Environmental Research - Engineering and Management**, [S. l.], v. 46, p. 42-47, 2008.

ZENG, D.; LUO, X. Physiological effects of chitosan coating on wheat growth and activities of protective enzyme with drought tolerance. **Open Journal of Soil Science**, [S. l.], v. 2, p. 282-288, 2012.

ANEXO A**CARACTERIZAÇÃO FÍSICOQUÍMICA E AÇÃO DA QUITOSANA NO
CRESCIMENTO INICIAL, CICLO CELULAR E ANATOMIA RADICULAR DE
HÍBRIDOS TRANSGÊNICO E NÃO TRANSGÊNICO DE MILHO**

AUTORES: Mayron Martins, Valdir Veroneze Júnior, Marília Carvalho, Sandro Barbosa, Diogo Teixeira Carvalho, Antônio Carlos Doriguetto, Paulo César Magalhães, Cleberson Ribeiro, Thiago Corrêa de Souza

Artigo redigido conforme as normas da Revista International Journal of Biological Macromolecules.

Caracterização físico-química e ação da quitosana no crescimento inicial, ciclo celular e anatomia radicular de híbridos transgênico e não transgênico de milho

Mayron Martins⁽¹⁾, Valdir Veroneze Júnior⁽¹⁾, Marília Carvalho⁽¹⁾, Sandro Barbosa, Diogo Teixeira Carvalho, Antônio Carlos Doriguetto, Paulo César Magalhães ⁽²⁾, Cleberson Ribeiro⁽³⁾
Thiago Corrêa de Souza^{(1)*}

⁽¹⁾Universidade Federal de Alfenas, Instituto de Ciências da Natureza, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, prédio V, CEP 37130-000, Alfenas-MG, Brasil. ⁽²⁾Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35701-970, Sete Lagoas-MG, Brasil. ⁽³⁾ Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, CEP 36570-000, Viçosa,-MG, Brasil. * Autor para correspondência - email: thiago.souza@unifal-mg.edu.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização físico-química da quitosana, avaliar seus efeitos na germinação, crescimento inicial e na anatomia radicular, bem como seus efeitos a nível de ciclo celular em dois híbridos de milho. A caracterização foi realizada por análise elementar, cinzas totais, espectroscopia de absorção na região do infravermelho, RMN, DRXP, TG, MEV e viscosidade. Foram utilizados os híbridos DKB 390 e DKB 390 Pró, sendo o último, transgênico. Com a caracterização físico-química a estrutura da quitosana foi confirmada e esta apresenta baixo grau de desacetilação. Em ambos híbridos de milho pode-se observar aumento na germinação quando em contato com a quitosana, e no crescimento inicial não houve alterações. As análises a níveis celulares mostraram, que a quitosana não foi tóxica mesmo em concentrações altas, pois não ocorreu diferenças no índice mitótico e não foram detectadas anormalidades cromossômicas. Os efeitos da quitosana na anatomia radicular foram avaliados através da coleta de ápices radiculares, confecção de lâminas e de medições nas raízes e os melhores resultados foram para o transgênico. Conclui-se que a quitosana, em concentrações adequadas pode favorecer o desenvolvimento de milho (principalmente no transgênico), tanto na germinação quanto em alterações na anatomia radicular, permitindo maior resistência e adaptação das plântulas à condições adversas.

Palavras-chave: Bioestimulante, Germinação, Índice mitótico, Xilema, *Zea mays* L.

1 INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva do milho é uma das mais importantes do agronegócio brasileiro, justificando-se a crescente demanda interna e externa pelo fato do mesmo, juntamente à soja, ser insumo básico para avicultura e suinocultura, sendo o principal macro-ingrediente para a produção de rações [1]. O milho é uma das commodities mais importantes do mundo e os maiores produtores são Estados Unidos, China e Brasil [2]. A décima estimativa de produção total de milho no Brasil para a safra 2015/16 é de aproximadamente 69,1 milhões de toneladas [3].

Tem-se buscado tecnologias para obtenção de plantas mais vigorosas, mais tolerantes a estresses para assim elevar a produção. Uma das tecnologias é baseada na utilização de Bioestimulantes, ou seja, aplicação de moléculas que estimulam o crescimento de plantas, tolerância a estresses abióticos e bióticos entre outros [4].

Os polissacarídeos naturais, incluindo a quitosana, vêm ganhando destaque na pesquisa e na indústria de Bioestimulantes devido às suas propriedades biológicas, fonte renovável, elevada abundância e fácil obtenção, alta biodegradabilidade e biocompatibilidade [4,5,6]. A aplicação da quitosana na agricultura vem trazendo bons resultados para proteção de plantas, antes e após a colheita, apresentando-se como indutor do sistema de defesa das plantas (pragas e doenças) [7,8] e da ação antagonista de microrganismos no controle biológico [9]; aumenta a interação entre plantas e microrganismos (simbiose) [10]; induz o aumento da fertilidade do solo e favorece nutrição de plantas devido ao seu alto teor de nitrogênio [11] e regula o crescimento e desenvolvimento de plantas [12,13]. Vale ressaltar ainda que a quitosana pode até modificar a anatomia [14] e a bioquímica das plantas [15].

Atualmente pesquisadores de plantas tem aplicado substâncias químicas em genótipos diferentes de milho e alguns destes tem mostrado serem mais responsivos do que outros [16,17]. Apesar de pesquisas com genótipos diferentes e mesmo sabendo que a transgenia vem contribuindo com a agricultura no mundo todo, principalmente no cultivo de cereais [18], ainda pouco se tem comparado o efeito da aplicação de substâncias em genótipos transgênicos e não transgênicos.

A quitosana vem sendo utilizada em variadas concentrações e muito é discutido se esta molécula não é tóxica. Apesar disso, alguns trabalhos vêm relatando a sua citotoxicidade na área da saúde em células animais [19], contudo nenhum trabalho foi encontrado sobre a toxicidade da quitosana em plantas. Sabe-se que os solventes utilizados para dissolvê-la é que podem levar à toxicidade [20], mas se altas concentrações levam a efeitos negativos no ciclo celular de plantas de milho como a produção de anormalidades cromossômica, ainda não foi testado.

Devido à importância da cultura do milho e aos bons resultados oriundos da aplicação de quitosana no desenvolvimento de plantas, o presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização físico-química deste biopolímero, avaliar seus efeitos

na germinação, no crescimento inicial, no ciclo celular e na anatomia radicular de dois híbridos de *Zea mays* L. (transgênico e não transgênico).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização físicoquímica da quitosana

2.1.1 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho [Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)]

A caracterização espectroscópica na região do Infravermelho foi realizada com um espectrofotômetro de Infravermelho com transformador de Fourier (Thermo Scientific Nicolet, Model iS50) pela técnica de reflectância total atenuada (ATR, attenuated total refraction), na resolução de 4 cm^{-1} , e região espectral de 4000 a 400 cm^{-1} .

2.1.2 Análise Elementar e Porcentagem de desacetilação (DDA%)

A análise elementar foi realizada através do equipamento Analisador Elementar (Leco Instruments LTDA, modelo TruSpec CHNS-O) de acordo com os procedimentos indicados pelo fabricante.

A porcentagem de desacetilação da quitosana (DDA%) foi calculada como descrito por Sagheer et al. [21] através da seguinte fórmula: $(6,857 - C/N) / 1,7143$, onde C/N é a relação de porcentagem de carbono pelo nitrogênio medido pela Análise Elementar.

2.1.4 Método de Cinzas Totais

O grau de pureza da quitosana (Galena Química e Farmacêutica Ltda.) foi avaliado através do Método de Cinzas Totais de acordo com Abdel-Rahman et al. [22] com modificações. Para tanto, depositou-se 1g de quitosana em cada um dos três cadinhos de porcelana, dispondo-os posteriormente em forno (marca Magnus, modelo 200F DM), onde as amostras foram incineradas, aumentando-se gradativamente a temperatura. O gradiente de temperatura utilizado foi de 30 minutos a 200°C , 60 minutos a 400°C e 90 minutos a 600°C . O material incinerado foi então resfriado em dessecador e pesado, calculando em seguida, a porcentagem de cinzas em relação ao biopolímero seco ao ar.

2.1.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para aquisição do espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (^1H -RMN), e subespectro DEPT-135 cerca de 10 mg da amostra foram solubilizadas em 1 mL de solução de HCL/D₂O 2% (v/v), à temperatura ambiente. A solução foi transferida para um tubo de quartzo de RMN ($\Phi = 5\text{mm}$) e o espectro foi obtido em um espectrômetro (Bruker, AC-300) com operação de 300 MHz.

2.1.6 Difração de Raio X por pó (DRXP)

Os experimentos de DRXP foram realizados em difratômetro de raios X por pó (Rigaku, Tokyo, Japan), modelo Ultima IV, de geometria θ - 2θ , com detector de cintilação, e radiação monocromatizada por grafite proveniente de um tubo selado de Cu ($\text{CuK}\alpha$, $\lambda = 1,54187 \text{ \AA}$). As varreduras foram realizadas entre intervalos de 3 até $35^\circ 2\theta$, à temperatura ambiente, com passo de 2θ de $0,01^\circ$, corrente de 30 mA, tensão de 40 kV, velocidade de varredura de $1^\circ 2\theta \text{ min}^{-1}$.

2.1.7 Análises termogravimétricas

A análise termogravimétrica (TGA) e a análise térmica diferencial (DTA) foram realizadas simultaneamente utilizando equipamento Netzsch (modelo 209) na faixa de temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$) até 700°C . Aproximadamente 10,8 mg da amostra foi inserida no cadinho (Al_2O_3) em atmosfera inerte de nitrogênio com fluxo de 100 mL/min. A razão de aquecimento foi de $10^\circ\text{C}/\text{min}$.

2.1.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Viscosidade Dinâmica

A morfologia superficial da quitosana foi analisada em microscópio eletrônico de varredura digital – marca ZEISS LEO – modelo 1430 VP. As amostras foram moídas, armazenadas em dessecador com sílica gel e foram colocadas em fitas adesivas de carbono no porta-amostra de alumínio. A corrente do feixe utilizado foi de 500 pA e a potência do feixe de 20 KV.

A determinação da viscosidade dinâmica foi realizada por um viscosímetro rotacional (Quimis, Modelo Q-860-A24) utilizando um spindle 1 e velocidade 60 rpm a 25°C . A amostra foi dissolvida em água acidificada (0,1%) e o volume final foi de 20 mL. A viscosidade da quitosana foi expressa em função da concentração.

2.2 Material vegetal e procedimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Ambiental & Genotoxicidade (BIOGEN) da Universidade Federal de Alfenas e foram utilizadas sementes de 2 híbridos, DKB 390 e DKB 390 PRÓ, sendo o último transgênico, cedidas pela Embrapa Milho e Sorgo. As soluções foram preparadas dissolvendo-se a quitosana em água acidificada (ácido acético) a 0,1%. As concentrações das soluções utilizadas foram determinadas em pré-testes de acordo com a quantidade de ácido acético necessária para sua dissolução, sendo: controle (solução acidificada 0,1%) e 50, 150, 300, 600, 1200 e 2400 ppm de quitosana, umedecendo-se duas folhas de papel filtro com 3,6 mL das respectivas soluções, dispostas em placas de Petri de 12 cm. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto de 7 tratamentos (controle, 50, 150, 300, 600, 1200 e 2400 ppm), com 4 repetições, contendo 15 sementes por placa. As placas foram mantidas em câmara de germinação tipo B.O.D. (SOLAB SL-225), com temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12 horas.

2.2.1 Efeito da quitosana no processo germinativo e crescimento inicial

Para avaliar o efeito da quitosana no processo germinativo de milho foram utilizados 15 sementes na placa e temperatura de 25°C. O tempo de germinação foi de 7 dias, bem como o tempo esperado para realizar as coletas e o volume de soluções em cada placa foi de 3,6 mL [23]. Os parâmetros de germinação avaliados foram: Porcentagem de Germinação (G%), avaliada com 48 horas de exposição aos tratamentos e o Índice de Velocidade de Germinação (GRI), avaliado de 12 em 12 horas durante 7 dias.

Para avaliar o efeito da quitosana durante o crescimento inicial de *Zea mays* L., foi seguida a mesma metodologia supracitada, avaliando-se os seguintes parâmetros: Comprimento Radicular (RL), utilizando-se paquímetro digital e o Teor Relativo de Água (RWC), calculado pela fórmula $PF - PS / PT - PS \times 100$, onde PF = Peso Fresco, PS = Peso Seco e PT = Peso Túrgido [16].

2.2.2 Efeitos da quitosana no ciclo celular

Para avaliar os efeitos citogenotóxicos da quitosana em milho, utilizou-se a metodologia de esmagamento sugerida por Pereira et al. [24] com modificações. Pontas de raízes foram coletadas com 96 horas, após a exposição a cada concentração de

quitosana, seguida de fixação em Carnoy (3:1) por 24 horas, hidrólise a quente do material em $1 \text{ molL}^{-1} \text{ HCl}$ a 60° por 8 - 10 minutos, pré coloração com Reativo de Shiff e confecção de lâminas. Foram avaliados em microscópio óptico (NIKON ECLIPSE E200) 5 campos com 100 células, totalizando 2000 células por tratamento. Para o estudo do comportamento do complemento cromossômico foram quantificadas as etapas do ciclo celular.

O índice mitótico (IM) foi determinado utilizando-se a equação: $\text{IM} = \text{NCM} \times 100 / \text{NTC}$, em que NCM é o número de células em mitose e NTC o número total de células observadas. Além do índice mitótico as anormalidades cromossômicas (AC) das células foram analisadas de acordo com os critérios a seguir: C-metáfases (CM), pontes cromossômicas em anáfase (PA) e em telófase (PT), cromossomos perdidos (CP), stickiness (ST) e presença de micronúcleo.

2.2.3 Efeitos da quitosana na anatomia radicular

Para avaliar os efeitos da quitosana na anatomia radicular foram coletadas, após 7 dias de exposição aos tratamentos, 2 raízes de cada repetição e realizadas secções transversais de acordo com Souza et al. [25] em uma região de 2 cm a partir do ápice da raiz. Posteriormente, as lâminas microscópicas foram confeccionadas, coradas com safrablou e fotografadas em microscópio óptico de luz AXIO ZEISS SCOPE A1 com câmera digital acoplada. Os parâmetros avaliados foram espessura da epiderme (ET), espessura do córtex (CT), espessura da endoderme (EnT), número de xilemas (NX), espessura de xilemas (XT) e espessura de floema (FT).

Todas estas medições foram feitas pelo programa de análise de imagens AxionVisionSE64 Rel 4.8, utilizando-se calibrações feitas com régua microscópica fotografada nos mesmos aumentos das fotomicrografias.

2.3 Análise dos dados dos testes biológicos

Para todos os parâmetros analisados foram calculadas as médias e o \pm erro padrão (SE). Para análise estatística dos resultados, utilizou-se a análise de variância (ANAVA) e o teste de comparação de médias Skott-Knott, a 0,05% de significância ($P \leq 0.05$), no programa Sisvar versão 4.3 (Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização físico-química da quitosana

3.1.1 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho [Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)]

O espectro na região do infravermelho da quitosana pode ser observado na Fig. 1. Todas as bandas características encontradas na quitosana deste estudo são muito semelhantes a outras encontradas na literatura [21,22,26]. A banda intensa em 3353 cm^{-1} corresponde ao estiramento axial de OH e ao estiramento de grupos N-H. O banda a 1586 cm^{-1} corresponde a deformação angular de N-H e a 1651 cm^{-1} corresponde a deformação axial de C=O. Quando quitinas são desacetiladas formando quitosanas ocorre um aumento da intensidade da banda próxima de 1590 cm^{-1} e diminuição da banda próxima de 1655 cm^{-1} devido ao aumento do número de grupos NH_2 . Na quitosana deste trabalho estas duas bandas apresentaram intensidades semelhantes mostrando uma desacetilação média a baixa e corroborando os resultados encontrados na porcentagem de desacetilação da quitosana (DDA%). Também pode-se destacar a banda em 1417 cm^{-1} correspondente a deformação axial C-N de grupos amida e a banda 1374 cm^{-1} da deformação axial C-N de grupos amino. As bandas entre 894 a 1149 cm^{-1} são característicos da natureza polissacarídica da quitosana.

3.1.2 Análise Elementar e porcentagem de desacetilação (DDA%)

Pela análise elemental foi observado que a porcentagem de N, C e H da quitosana foram 7,254; 41,850 e 5,880% respectivamente (Tabela 1). A relação da porcentagem do carbono e nitrogênio (C/N) foi de 5,769. Com a análise elemental pode-se observar o grau de desacetilação das quitosanas, pois as mais desacetiladas possuem maior porcentual de nitrogênio. Já a porcentagem de carbono diminui devido a saída do grupo acetamida no processo de desacetilação. A porcentagem de nitrogênio e carbono encontrada em quitina de origem crustácea por Liu et al. [27] foi de 6,24 e 43,75 respectivamente. Assim os resultados apresentados neste trabalho estão com valores acima dos encontrados usualmente em quitina e corroboram com valores encontrados em quitosanas comerciais [28] e não comerciais [21,22, 29]).

A porcentagem de desacetilação da quitosana (DDA%) foi de 63,5% (Tabela 1). O parâmetro mais importante na determinação química da quitosana é o grau de desacetilação (DDA) [30], pois ele influencia as propriedades físicas, químicas e biológicas da quitosana, como comportamento ácido-base, biodegradabilidade e propriedades de auto agregação, sorção e quelação. Os valores médios de DDA em quitosana variam de 40 a 95% [31] e estes são variáveis porque dependem do processo de obtenção, como temperatura, tamanho da partícula da matéria bruta, solventes utilizados e tempo de contato [22]. Assim a quitosana deste estudo possui baixa porcentagem de desacetilação. Vale ressaltar que os processos que levam ao alto nível de desacetilação são morosos e de alto custo.

3.1.4 Cinzas totais

Após incineração da quitosana, a porcentagem média de cinzas encontrada foi de 1,32 % em relação à quitosana seca ao ar (Tabela 1). Este valor diferencia-se do encontrado por Kumari et al. [32], que obteve quitosana através de resíduos de pesca (camarão e outros) com percentual de cinzas menor (1,0%) do que encontrado neste trabalho, considerando-a dentro dos padrões de quitosana comercial. Os resultados encontrados neste estudo para cinzas totais pode ser justificado pela metodologia de desacetilação da quitina (a concentração de ácido clorídrico por exemplo) influenciar na pureza da quitosana e quanto maior DDA% menor é o percentual de cinzas [33].

3.1.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os resultados das análises por RMN de ^1H e subspectro DEPT-135 da quitosana mostraram dados que foram coincidentes com aqueles descritos na literatura [21,22,34,35]. No espectro de RMN de ^1H (Fig. 2), os sinais referentes aos hidrogênios H3-H6 da subunidade glicosamínica e H2-H6 da porção N-acetilglicosamínica puderam ser notados como multipeto no intervalo de 3,94-3,78 ppm, enquanto o H2 da subunidade N-acetilglicosamínica gerou um sinal em cerca de 3,22 ppm, devido à influência do grupo NH vizinho. A existência de um sinal em cerca de 2,1 ppm, relativo à metila do grupo acetamida, comprova a presença de subunidades acetiladas. Os dados obtidos da análise do subspectro DEPT-135 (Fig.3) corroboram esses achados. É possível perceber a existência do carbono anomérico (C1) em 97,6 ppm, seguido dos sinais relativos a C4,

C3, C5, C6 e C2 a 76,1; 74,6; 69,8; 60,01 e 55,6 ppm, respectivamente. O sinal relativo à metila do grupo acetamida pode ser visualizado em 22 ppm. É interessante notar que o sinal relativo a C2 está duplicado, o que comprova a existência, na mesma molécula, de átomos de C2 de naturezas distintas, em função da desacetilação parcial existente na mesma.

3.1.6 Difração de Raio X por pó (DRXP)

O padrão de PXRD da quitosana comercial utilizado neste trabalho é mostrado na Fig.4 que exibe dois intensos picos característicos em $2\theta \sim 10,0^\circ$ (8,85 Å) e $\sim 19,8^\circ$ (4,50 Å), que correspondem aos índices de Miller (020) e (110) da estrutura da quitosana [36]. Ressalta-se que todo o padrão de PXRD é semelhante a outros reportados recentemente para quitosana [21,37,38].

3.1.7 Análise termogravimétrica

Analisando a curva da análise termogravimétrica (TGA) na Fig.5, observa-se dois eventos térmicos típicos do composto: o primeiro com um pico em 70-95 °C com perda de massa de 9% correspondente a evaporação de água que estavam nos grupos hidrofílicos das cadeias poliméricas [22,26]. E o segundo evento com pico em 300-380 °C com perda de massa de 65 %, referente a decomposição da glicosamina e dos resíduos de N-acetil glicosamina das cadeias de quitosana [22,26,39]. Pela análise térmica diferencial (DTA) observa-se um amplo pico endotérmico na faixa 55-95°C corroborando com o primeiro evento da TGA. Com intuito de observar as características químicas reais da quitosana, não foi feita nenhuma pré-secagem da amostra. Assim observa-se que a quitosana comercial chega ao mercado com uma certa hidratação isso porque polissacarídeos possuem uma boa afinidade por água [21;40]. Acima de 200 ° C observa-se na DTA dois picos fortemente exotérmicos típicos da decomposição da quitosana [40,41].

3.1.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Viscosidade

Observa-se na fotomicrografia de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da quitosana partículas irregulares com vários tamanhos e com superfícies lisas, fibrosas e com orifícios (porosas) (Fig.6). A morfologia de superfície da quitosana varia de acordo

com os organismos e podem ser de 3 tipos: com poros e estrutura fibrosas; sem poros ou estrutura fibrosa e apenas estrutura fibrosa [42]. Quitosanas oriundas de carangueijo e camarão tendem a ser classificadas como porosas e estrutura fibrosa como corroborando com as imagens avaliadas neste trabalho e de outros estudos [21,37,43].

Com relação a viscosidade observou-se um aumento crescente a medida que se aumentou as concentrações de quitosana o que era de se esperar (Fig.7). A viscosidade da quitosana foi avaliada entre as concentrações de 0.5-2.5 w/v% e foram encontrados valores de viscosidade de 18.5-392 mPa.s. Ramos et al. [44] avaliando a viscosidade da quitosana de duas espécies de camarão nas mesmas concentrações deste trabalho observaram valores de viscosidade bem menores.

3.2 Efeitos da quitosana no processo germinativo e crescimento inicial

Comparando-se o percentual de germinação, entre os híbridos, com 48 horas (G%) de exposição às concentrações de quitosana, não foram observadas diferenças significativas. Ambos híbridos apresentaram valores de germinação significativamente maiores quando expostos às altas concentrações de quitosana (600, 1200 e 2400 ppm) diferenciando-se estatisticamente do controle e demais tratamentos (Fig. 8A). Isso indica que a quitosana promoveu o aumento do percentual germinativo das sementes de milho. Quanto ao índice de velocidade de germinação (GRI), o DKB 390 apresentou valor maior quando exposto à concentração de 1200 ppm, diferenciando-se do transgênico. Não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações em ambos híbridos (Fig. 8B).

Segundo Ferreira e Borghetti [45], alguns compostos químicos inibem a síntese de giberelinas (GAs) em sementes e, conseqüentemente, inibem a germinação. Sugere-se portanto, no presente estudo que a quitosana não pertence a este grupo de compostos inibidores, uma vez que, utilizada em concentrações acima de 600 ppm no período de 48 horas de exposição, promoveu benefícios ao processo germinativo de milho e em concentrações abaixo desta, não alteraram tal processo. Os autores ainda afirmam que tanto a velocidade de germinação quanto a germinabilidade, dependem das condições de incubação das sementes. Sendo assim, tais condições (aplicação da quitosana) parecem ter sido favoráveis no presente estudo, uma vez que não foram apresentadas influências negativas. Em vários trabalhos a quitosana estimulou a germinação de sementes tanto em milho [46,47,48] quanto em outras plantas [49,50].

Comparando os híbridos observa-se que o DKB 390 apresentou maior comprimento radicular (RL) quando exposto aos tratamentos 50, 1200 e 2400 ppm e no controle (Fig. 8C). Para este mesmo genótipo observou-se que, para todas as concentrações, o RL diminuiu com a aplicação da quitosana. Já para o transgênico DKB 390 Pró, não houve alterações significativas entre os tratamentos, indicando que a quitosana não afetou o comprimento radicular (RL), independentemente de sua concentração (Fig. 8C).

Tanto a germinação quanto o comprimento radicular são parâmetros utilizados em bioensaios vegetais para verificar a fitotoxicidade. Percebe-se com os resultados desses parâmetros nesse trabalho que a quitosana não é tóxica para o milho (principalmente o DKB 390 Pró) e que ainda pode favorecer positivamente funcionando como um estimulador biológico. Novos conceitos vem sendo construídos e na revisão de Jardim [4] foi relatado a quitosana como bioestimulante, ou seja, substâncias que quando aplicada nas plantas aumentam a eficiência nutricional, as características de qualidade da cultura, a tolerância a estresse abiótico entre outras. Ainda sobre a não toxicidade da quitosana deste estudo, vale ressaltar que em células animais a toxicidade de quitosanas de baixo percentual de desacetilação (como encontrada neste trabalho) é baixa em comparação as de alta porcentagem de desacetilação e peso molecular [19].

Quanto ao teor relativo de água (RWC), comparando-se os híbridos, o DKB 390 Pró apresentou maior RWC que o DKB 390 quando exposto ao tratamento 50 ppm. O RWC do DKB 390 apresentou diminuição significativa quando exposto às concentrações de 50 e 150 ppm, quando comparados aos demais tratamentos. Tal comportamento sugere que baixas concentrações de quitosana reduz o teor de água dos tecidos. Já no DKB 390 Pró, uma diminuição do RWC foi observada nos tratamentos 150, 600, 1200 e 2400 ppm, diferindo estatisticamente do controle e demais tratamentos (Fig. 8D). Apesar da quitosana em altas concentrações no híbrido DKB 390 Pró ter influenciado negativamente o RWC das plântulas este nível hídrico menor em relação ao controle não parece ser prejudicial para elas já que essas não tiveram inibição do crescimento radicular (RL). Em plantas adultas e cultivadas no solo a quitosana tem levado ao fechamento estomático e a economia de água (estabilização do status hídrico) [31].

3.3 Efeitos da quitosana no ciclo celular

Na fig. 9A observa-se que o índice mitótico (IM) no DKB 390 diminuiu com a aplicação da quitosana. Por outro lado, para o híbrido transgênico DKB 390 Pró, o IM das células expostas até a concentração 300 ppm de quitosana foi equiparado ao controle, ou seja, não há redução do IM em concentrações inferiores a 300 ppm. Estes resultados corroboram os encontrados para o comprimento radicular (RL) dos dois híbridos (Fig.8C). O IM pode ser utilizado como parâmetro de citotoxicidade e a redução deste índice, principalmente no DKB 390, indica que a quitosana interferiu no desenvolvimento normal da mitose, causando bloqueio do ciclo celular e/ou impedindo a progressão das células que entraram em divisão [51,52]. Assim a quitosana foi mais citotóxica para o híbrido DKB 390 quando comparado ao transgênico DKB 390 Pro.

A intérfase foi a fase do ciclo celular mais frequente em células meristemáticas radiculares dos dois híbridos de milho (Fig.9B e Fig. 9C). Esta maior frequência de células interfásicas é esperada, pelo fato desta ser a fase mais longa do ciclo celular na maioria de organismos eucariotos. O ciclo celular das células somáticas está dividido em duas fases: a intérfase e a divisão celular ou mitose. Estas fases têm durações diversas de acordo com a célula e/ou organismo estudado [53]. Quanto às anormalidades cromossômicas (AC) avaliadas foi observada uma baixa frequência para os dois híbridos (dados não mostrados) evidenciado que a quitosana deste estudo não é genotóxica. Alguns estudos citogenéticos que avaliaram o efeito da aplicação da quitosana ou nanopartículas de quitosana em *Vicia faba* e *Allium cepa* também não encontraram mudanças significativas no índice mitótico e na frequência de anormalidades cromossômicas [54,55].

3.4 Efeitos da quitosana na anatomia radicular

Comparando-se os híbridos de milho, o DKB 390 Pró, quando exposto a 300 ppm de solução de quitosana, resultou em uma espessura de epiderme radicular (ET) significativamente maior se comparado ao DKB 390 (Fig. 10A). Observando a ET do híbrido DKB 390, entre as concentrações, percebe-se que as concentrações de 50 e 600 ppm induziram a um aumento das médias porém equipararam-se ao tratamento controle. Já as concentrações de 150 e 300 ppm no híbrido DKB 390 Pró proporcionaram aumento da ET se comparados aos demais tratamentos (Fig. 10A). Souza et al. [25] trabalhando com uma variedade de milho tolerante e não tolerante ao estresse hídrico por alagamento

observaram que uma das adaptações anatômicas de sobrevivência do milho tolerante é um aumento da espessura da epiderme da raiz, entendendo tal fato como uma maneira de dificultar a entrada de patógenos e substâncias tóxicas através da raiz. Neste âmbito, a quitosana, quando aplicada no substrato, também pode favorecer a sobrevivência das plantas de milho a estresse abiótico e biótico pelo espessamento da epiderme radicular.

Comparando-se os dois híbridos, não foram observadas diferenças significativas no que diz respeito à espessura do córtex (CT). Percebe-se para o DKB 390 também não ocorreram alterações significativas da CT com a exposição às diversas concentrações. A quitosana levou a uma redução de CT no DKB 390 Pró quando exposto à concentração de 50 ppm e a partir da concentração de 300 ppm (Fig. 10B e Fig. S1). Estudos com milho [56,57] afirmam que a espessura menor do córtex é importante para uma maior flexibilidade da raiz, o que facilita seu desdobramento e penetração em solos compactados/duros. O benefício da quitosana na diminuição da espessura do córtex então estaria ligado a melhor penetração em solos compactados, reduzindo assim, o custo metabólico para a exploração do solo e favorecendo o melhor desenvolvimento da planta sob algum tipo de estresse abiótico. A redução da EC pela quitosana também pode contribuir com a melhor condutividade hidráulica da raiz devido à diminuição da distância necessária para a água chegar ao cilindro vascular (xilema) [58].

Não houve diferenças significativas no âmbito de espessura da endoderme (EnT) entre os híbridos. Em altas concentrações de quitosana (1200 ppm) a EnT diminuiu tanto no DKB 390 quanto no DKB 390 Pró. No entanto é interessante notar que o híbrido transgênico DKB 390 Pró apresentou aumento significativo de EnT no tratamento de 150 ppm de quitosana em relação aos demais tratamentos (Fig. 10C). A endoderme é uma estrutura radicular considerada como uma barreira apoplástica. Em milho é constituída de um espessamento de lignina (e outras substâncias) em forma de “U” [59]. A quitosana aplicada em plantas pode aumentar a síntese de lignina como mecanismo de defesa contra pragas/disease [60]. Sugere-se que no híbrido transgênico a quitosana esteja estimulando o espessamento dessa endoderme. Isso seria interessante no cultivo do milho, pois assim como a epiderme radicular e a endoderme podem servir como uma barreira física contra microrganismos patógenos [25] resultando em plantas mais saudáveis. Em altas concentrações (1200 ppm) este espessamento parece ser inibido talvez pela inativação do metabolismo da lignina devido ao excesso dessa substância.

Em comparação entre os híbridos no controle, percebe-se que o DKB 390 Pro apresenta maior número de xilemas (NX) que o DKB 390, mas não houve alterações no NX em ambos híbridos comparando-se as concentrações (exceto em 50 ppm) (Fig. 11A). Na concentração 300 ppm, a espessura de xilema (TX) foi significativamente maior no DKB 390 quando comparado ao DKB 390 Pro. O DKB 390 Pro, apresentou uma diminuição da TX nos tratamentos 300, 600, 1200 ppm (Fig. 11B, e Fig. S2). Mais uma vez a quitosana vem influenciar as relações hídricas dos genótipos, principalmente no transgênico (DKB 390 Pró). Um menor diâmetro dos vasos está relacionado com a diminuição do risco do embolismo e aumento da resistência do fluxo de água. Essas características do DKB 390 Pró podem indicar uma maior condutividade hidráulica aumentando a capacidade de transporte de água [61]. Apesar de não ter ocorrido influência da quitosana no número de xilemas, esta característica anatômica também pode influenciar a condutividade hidráulica das raízes. Farouk e Mohsen [62] verificaram em feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) que a aplicação de quitosana aumentou a área e número de xilema nas folhas.

Não foi observada diferença significativa na espessura do floema (TP) entre os híbridos. A TP do híbrido DKB 390 não foi influenciada pelas diferentes concentrações de quitosana testadas. Já o DKB 390 Pro, teve a TP aumentada nas concentrações de 150 e 300 ppm de solução de quitosana em comparação aos demais tratamentos. (Fig. 11C). Souza et al. [25] afirmaram que aumento na espessura do floema induz possivelmente, a um maior fluxo de carboidratos no mesmo, fornecendo mais substrato respiratório para plantas, permitindo maior tolerância a estresse hídrico. De acordo com os resultados obtidos, sugere-se que a quitosana tenha beneficiado as plântulas do híbrido DKB 390 Pro, um vez que a TP foi aumentada. Farouk e Mohsen [62] também verificaram em feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) o aumento do tecido floemático devido à aplicação de quitosana.

4 CONCLUSÃO

A quitosana deste estudo possui baixa porcentagem de desacetilação e não possui efeitos citogenotóxicos.

As plântulas de milho transgênicas (DKB 390 Pró) foram mais responsivas com a aplicação da quitosana do que as plântulas não transgênicas (DKB 390).

Foi observado, principalmente no material transgênico, que a quitosana não influenciou o comprimento radicular, mas aumentou a porcentagem de germinação e resultou em uma modificação das características anatômicas ligadas à proteção e sobrevivência a estresses abióticos e bióticos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Professora Dra Maria Vanda Marinho pelas análises termogravimétricas; ao Químico MSc Gustavo Silveira pelas análises viscosimétricas; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo auxílio financeiro (APQ-00651-14) concedido a esta pesquisa e pela concessão de bolsa de Iniciação Científica via cotas institucionais.

5 REFERÊNCIAS

- [1] C.E. Caldarelli, M.R.P. Bacchi, Factors influencing the price of corn in Brazil, *New Econ.* 22 (2012) 141 – 164.
- [2] United States Department of Agriculture - USDA. Second estimate of commodity 2016/2017. <http://www.usda.gov>, 2016 (accessed 12.07.2016).
- [3] National Supply Company: Monitoring of the Brazilian grain harvest : tenth Survey, July / 2016. <http://www.conab.gov.br>, 2016. (accessed 12.07. 2016).
- [4] P. Du Jardin, Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and Regulation, *Sci. Hortic.* 196 (2015) 3–14.
- [5] R. Pichyangkura, S. Chadchawan, Biostimulant activity of chitosan in horticulture, *Sci. Hortic.* 196 (2015) 49–65.
- [6] M.E.I. Badawy, E.I. Rabea, A biopolymer chitosan and Its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. *Int. J. Carbohydr. Chem.* 2011 (2011) 1-29.
- [7] M. Iriti, E.M. Varoni, Chitosan-induced antiviral activity and innate immunity in plants, *Environ Sci Pollut Res* 22 (2015) 2935–2944.
- [8] H. Li, Y. Wang, F. Liu, Y. Yang, Z. Wu, H. Cai, Q. Zhang, Y. Wang, P. Li, Effects of chitosan on control of postharvest blue mold decay of applefruit and the possible mechanisms involved, *Sci. Hortic.* 186 (2015) 77–83.

- [9] L.R.R. Berger, T.C.M. Stamford, N.P. Stamford, Prospects for the use of chitosan in agriculture, *Rev. Iberoam. Polímeros*, 12 (2011) 195–215.
- [10] S. Kaur, G.S. Dhillon, The versatile biopolymer chitosan: potential sources, evaluation of extraction methods and applications. *Crit. Rev. Microbiol.* 40 (2014) 155–175.
- [11] V. Ghormade, M.V. Deshpande, K.M. Paknikar, Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants, *Biotechnol. Adv.* 29 (2011) 792–803.
- [12] M.Á. Ramírez, A.T Rodríguez, L. Alfonso, C. Peniche, Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications. *Biotecnología Aplicada* 7 (2010) 270–276.
- [13] D. Katiyar, A. Hemantaranjan, B. Singh, Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review, *Ind. J. Plant Physiol.* 20 (2015) 1–9.
- [14] P. Limpanavech, S. Chaiyasuta, R. Vongpromek, R. Pichyangkura, C. Khunwasi, S. Chadchawan, P. Lotrakul, R. Bunjongrat, A. Chaidee, T. Bangyeekhun, Chitosan effects on floral production, gene expression, and anatomical changes in the *Dendrobium* orchid, *Sci. Hortic.* 116 (2008) 65–72.
- [15] S. Dousseau, A.C. Rodrigues, J.M.S. Lira, P.M. Ribeiro Júnior, F.V. Pacheco, A.A. Alvarenga, M.L.V. Resende, A.C.C.F.F. De Paula, Exogenous chitosan application on antioxidant systems of Jaborandi, *Ciênc. Rural* 46 (2016) 191–197.
- [16] T.C. Souza, P.C. Magalhães, E.M. Castro, P.E.P. Albuquerque, M.A. Marabesi, The influence of ABA on water relation, photosynthesis parameters, and chlorophyll fluorescence under drought conditions in two maize hybrids with contrasting drought resistance. *Acta Physiol. Plant.* 35 (2013) 515–527.
- [17] Q. Ali, M. Ashraf, Induction of drought tolerance in maize (*Zea mays* L.) due to exogenous application of trehalose: growth, photosynthesis, water relations and oxidative defense mechanism. *J. Agron. Crop Sci.* 197 (2011) 258–271.
- [18] J. Rani, R. Usha, Transgenic plants: types, benefits, public concerns and future, *J. Pharm. Res.* 6 (2013) 879–883.
- [19] M. Dash, F. Chiellini, R.M. Ottenbrite, E. Chiellini, Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications, *Prog. Polym. Sci.* 36 (2011) 981–1014.
- [20] G. Romanazzi, G. Effect of chitosan dissolved in diferente acids on its abity to control postarvest gray moldo of table grape, *Phytophatology* 99 (2009) 1028 – 1036.

- [21] F.A. Sagheer, M.A. Al-Sughayer, S. Muslim, M.Z. Elsabee, Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf, *Carbohydr. Polym.* 77 (2009) 410–419.
- [22] R.M. Abdel-Rahman, R. Hrdina, A.M. Abdel-Mohsen, A.M. Moustafa, M.G. Fouada, A. Y. Soliman, F.K. Mohamed, K. Mohsin, T.D. Pinto. Chitin and chitosan from Brazilian Atlantic Coast: isolation, characterization and antibacterial activity, *Int. J. Biol. Macromol.* 80 (2015) 107–120.
- [23] Brasil. Ministry of Agriculture , Livestock and Food Supply. Rules for seed testing /Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Agricultural Defense Secretariat, Brazil, Brasília: Mapa/ACS, 2009.
- [24] M.P. Pereira, F.J. Pereira, L.C.A. Rodrigues, S. Barbosa, E.M. Castro, Lead phytotoxicity on germination and early growth of lettuce as a function of root anatomy and cell cycle. *Rev. Agroambiente On-line* 7 (2013) 36–43.
- [25] T.C. Souza, E.M. Castro, F.J. Pereira, S.N. Parentoni, P.C. Magalhães, Morpho-anatomical characterization of root in recurrent selection cycles for flood tolerance of maize (*Zea mays* L.), *Plant Soil Environ.* 55 (2009) 504–510.
- [26] A.T. Paulino, J.I. Simionato, J.C. Garcia, J. Nozaki, Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides, *Carbohydr. Polym.* 64 (2006) 98–103.
- [27] S. Liu, J. Sun, L. Yu, C. Zhang, J. Bi, F. Zhu, M. Qu, C. Jiang, Q. Yang, Extraction and characterization of chitin from the beetle *Holotrichia parallela* Motschulsky, *Molecules* 17 (2012) 4604–4611.
- [28] J.E. SANTOS, J.P. SOARES, E.R. DOCKAL Characterization of comercial chitosan from different suppliers, *Polímeros* 13 (2003) 242–249.
- [29] E.S. Abdou, S.A. Khaled, N.M. Elsabee, Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources, *Bioresource Technol.* 99 (2008) 1359–1367.
- [30] Jana, S., Saha, A., Nayak, A. K., Sen, K. K., Basu, S. K. Aceclofenac-loaded chitosan-tamarind seed polysaccharide interpenetrating polymeric network microparticles, *Colloid. Surface. B.* 105 (2013) 303–309.
- [31] M. Iriti, V. Picchi, M. Rossoni, S. Gomasasca, N. Ludwig, M. Gargano, F. Faoro, Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure, *Environ. Exp. Bot.* 66 (2009) 493–500.
- [32] S. Kumari, P. Rath, S.H.A. Kumar, T.N. Tiwari, Extraction and characterization of chitin and chitosan from fishery waste by chemical method, *Environ. Technol. Innov.* 3 (2015) 77–85.

- [33] Y. Yuan, B.M. Chesnutt, W.O. Haggard, J.D. Bumgardne, Deacetylation of chitosan: material characterization and in vitro evaluation via albumin adsorption and pre-osteoblastic cell cultures, *Materials* 4 (2011) 1399–1416.
- [34] J. Kumirska, M. Czerwicka, Z. Kaczyński, A. Bychowska, K. Brzozowski, J. Thöming, P. Stepnowski, Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan, *Mar. Drugs* 8 (2010) 1567–1636.
- [35] N. Sayari, A. Sila, B.E. Abdelmalek, R.B. Abdallah, S. Ellouz-Chaabouni, A. Bougateg, R. Balti. Chitin and chitosan from the Norway lobster by-products: Antimicrobial and anti-proliferative activities. *Int. J. Biol. Macromol.* 87 (2016) 163–171.
- [36] T. Yui, K. Imada, K. Okuyama, Y. Obata, K. Suzuki, K. Ogawa, Molecular and crystal structure of the anhydrous form of chitosan, *Macromolecules* 27 (1994) 7601–7605.
- [37] A. Shavandi, A.A. Bekhit, A.E. Bekhit, Z. Sun, M.A. Ali, Preparation and characterisation of irradiated crab chitosan and New Zealand Arrow squid pen chitosan, *Mater Chem Phys* 167 (2015) 295–302.
- [38] M-T. Yen, J-H Yang, J-L Mau, Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. *Carbohydr. Polym.* 75 (2009) 15–21.
- [39] L. Ma, C. Xin, C. Tan, Preparation, physicochemical and pharmaceutical characterization of chitosan from *Catharsius molossus* residue, *Int. J. Biol. Macromol.* 80 (2015) 547–556.
- [40] E.A. El-Hefian, E.S. Elgannoudi, A. Mainal, A.H. Yahaya. Characterization of chitosan in acetic acid: rheological and thermal studies, *Turk. J. Chem.* 34 (2010) 47–56.
- [41] V. Georgieva, D. Zvezdova, L. Vlaev, Non-isothermal kinetics of thermal degradation of chitosan, *Chem. Cent. J.* 6 (2012) 1–10.
- [42] M. Kaya, T. Baran, A. Mentés, M. Asaroglu, G. Sezen, K.O. Tozak, Extraction and characterization of α -chitin and chitosan from six different aquatic invertebrates, *Food Biophys.* 9 (2014) 145–157.
- [43] R. Jayakumar, H. Nagahama, T. Furuike, H. Tamura, Synthesis of phosphorylated chitosan by novel method and its characterization, *Int. J. Biol. Macromol.* 42 (2008) 335–339.
- [44] V.M. Ramos, N.M. Rodríguez, M.F. Díaz, M.S. Rodríguez, A. Heras, E. Agulló. N-methylene phosphonic chitosan. Effect of preparation methods on its properties, *Carbohydr. Polym.* 52 (2003) 39–46.

- [45] A.G. Ferreira, F. Borghetti. Germination: From basic to applied, first eed., Artmed, Brazil, 2004.
- [46] Y. Guan, J. Hu, X. Wang, C. Shao, Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress, *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 10 (2009) 427–433.
- [47] E. G. Lizárraga-Paulín, I. Torres-Pacheco, E. Moreno-Martínez, S.P. Miranda-Castro, Chitosan application in maize (*Zea mays*) to counteract the effects of abiotic stress at seedling level, *Afr. J. Biotechnol.* 10 (2011) 6439–6446.
- [48] N.A. Agbodjato, P.A. Noumavo, A. Adjanohoun, L. Agbessi, L. Baba-Moussa, Synergistic effects of plant growth promoting rhizobacteria and chitosan on in vitro seeds germination, greenhouse growth, and nutrient uptake of maize (*Zea mays* L.), *Biotechnol. Res. Int.* 2016 (2016) 1–11.
- [49] D. Zeng, X. Luo, Physiological effects of chitosan coating on wheat growth and activities of protective enzyme with drought tolerance, *Open J. Soil Sci.* 2 (2012) 282–288.
- [50] B. Mahdavi, A. Rahimi, Seed priming with chitosan improves the germination and growth performance of ajowan (*Carum copticum*) under salt stress, *Eurasian J. Biosci.* 7 (2013) 69–76.
- [51] L.W. Rijstenbil, T.C.W. Poortvliet, Copper and zinc in estuarine water: chemical speciation in relation to bioavailability to the marine planktonic diatom *Ditylum brightwellii*, *Environ. Toxicol.Chem.* 11 (1992) 1615–1625.
- [52] R. Fernandes, W. Luz, M. Fontes, L. Fontes, Evaluation of heavy metal concentrations in vegetable crop cultivation areas in Minas Gerais, Brazil, *Rev. Bras. Eng. Agr.Amb.* 11(2007) 81-93.
- [53] T.F. Molina, M. Â.A. Tillmann, L.B. Dode, L. Viégas, Cryoconservation in onion seeds, *Rev. Bras. Sementes* 28 (2006) 72-81.
- [54] M.S. Al-Ahamadi, Cytogenetic effect of chitosan on mitotic chromosomes of root tip cells of *Vicia faba*, *Life Sci. J.* 12 (2015) 158-162.
- [55] R. Lima, L. Feitosa, A.E.S. Pereira, M. R. Moura, F. A. Aouada, L.H.C. Mattoso, L.F. Fraceto, Evaluation of the genotoxicity of chitosan nanoparticles for use in food packaging films, *J. Food Sci.* 75 (2010) 89-96.
- [56] J. G. Chimungu, K.M. Brow, J. P.Lynch, Reduced root cortical cell file number improves drought tolerance in maize, *Plant Physiol.* 166 (2014) 1943–1955.
- [57] J.G. Chimungu, K.W. Loades, J.P. Lynch, Root anatomical phenes predict root penetration ability and biomechanical properties in maize (*Zea mays*), *J. Exp. Bot.* 66 (2015) 3151–3162.

- [58] F.J. Pereira, E.M. Castro, T.C. Souza, P.C. Magalhães, Evolution of the root anatomy of 'Saracura' maize in successive selection cycles, *Pesq. Agropec. Bras.* 43 (2008) 1649–1656.
- [59] D. E. Enstone, A. Peterson, F. Ma, Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment, *J. Plant Growth Regul.* 21 (2003) 335–351.
- [60] A. El Hadrami, L.R. Adam, I. El Hadrami, F. Daayf, Chitosan in plant protection. *Mar. Drugs* 8 (2010) 968–987.
- [61] Y. Li, J.S. Sperry, M. Shao, Hydraulic conductance and vulnerability to cavitation in corn (*Zea mays* L.) hybrids of differing drought resistance. *Environ. Exp. Bot.* 66 (2009) 341–346.
- [62] S. Farouk, A.R. El Mohsen, Improving growth and yield of cowpea plant by foliar application of chitosan under water stress, *J. Plant Prod.* 2 (2011) 1341–1358.

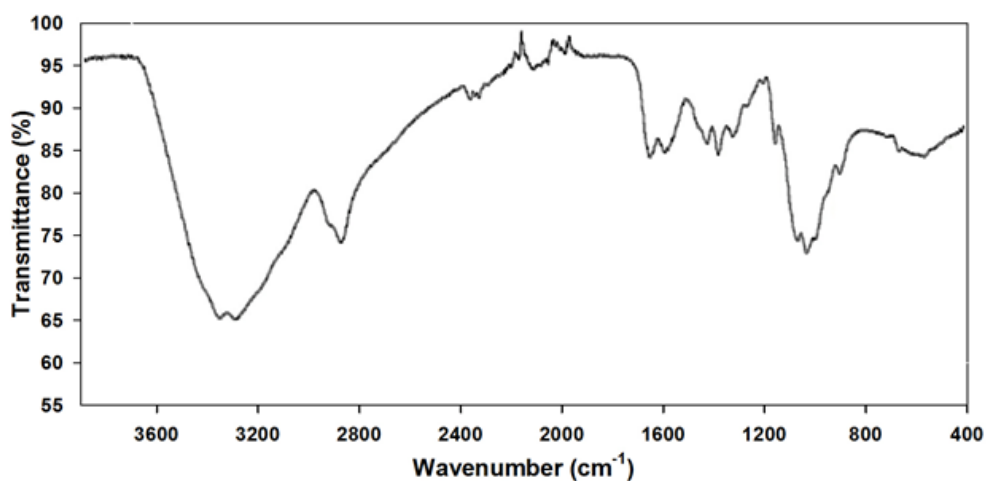


Fig.1. Espectros da absorção na região do infravermelho da quitosana.

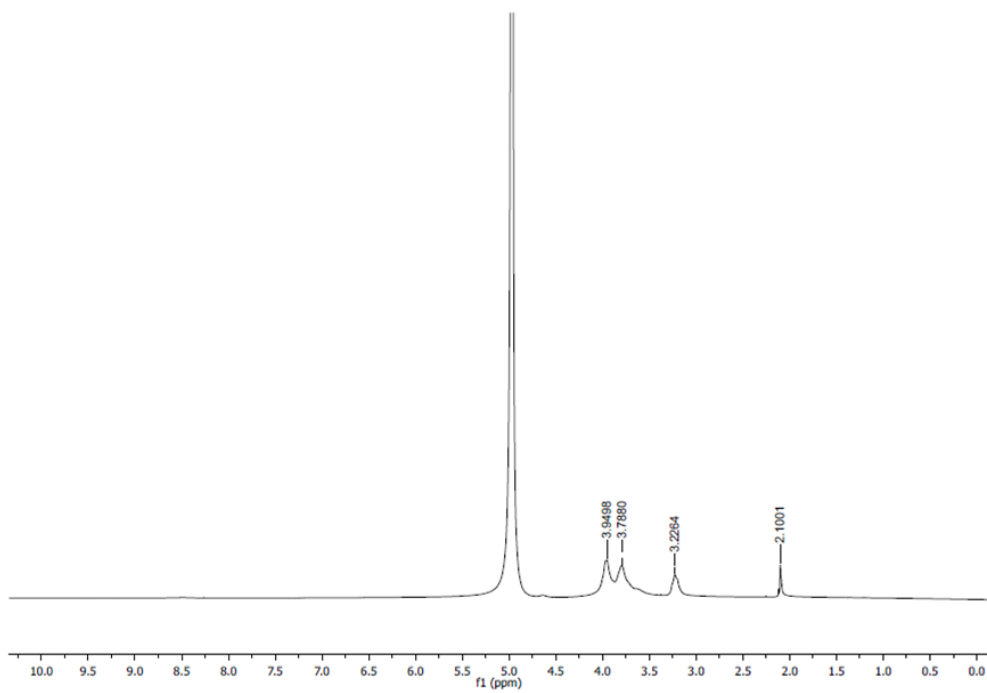


Fig.2. Espectro de ^1H -RMN da quitosana A.

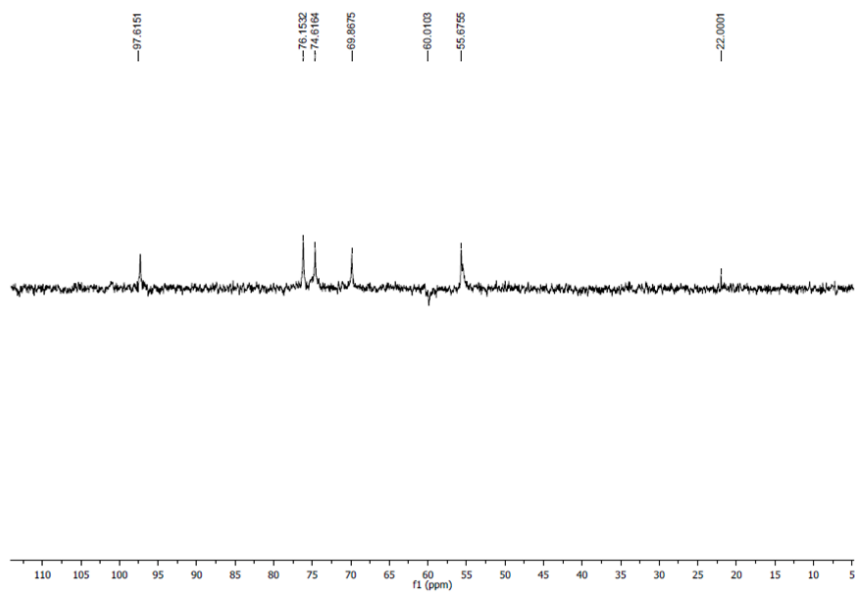


Fig. 3. Subspectro de ^{13}C -RMN da quitosana.

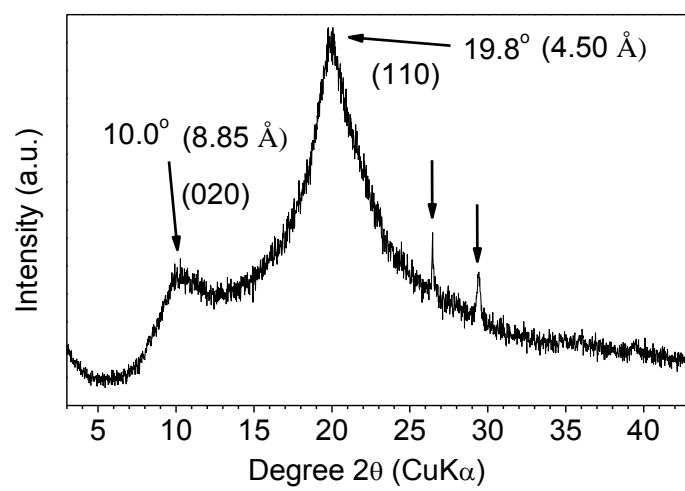


Fig. 4. Difratomogramas de Raio-x por pó da quitosana.

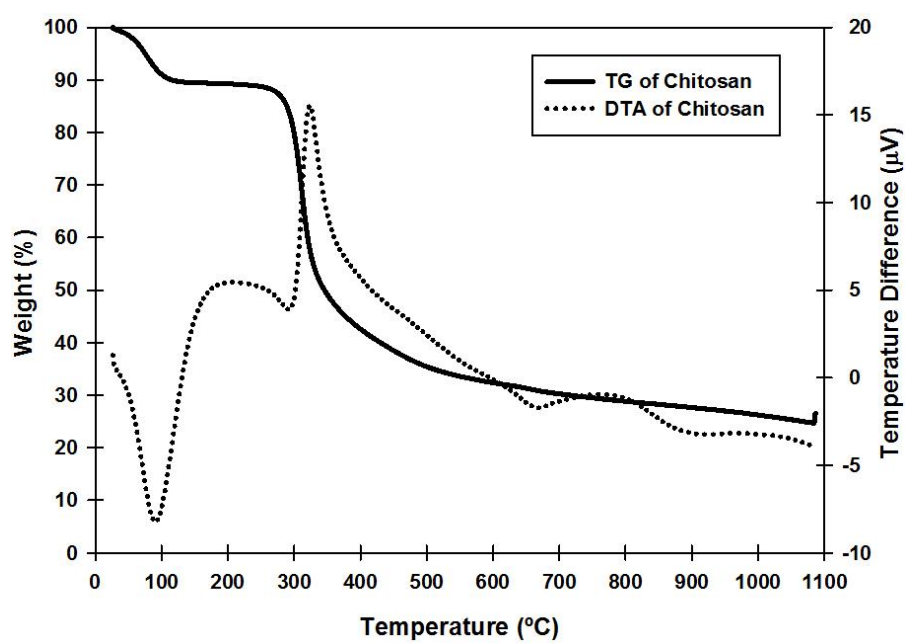


Fig. 5. Curvas de TGA e DTA da quitosana.

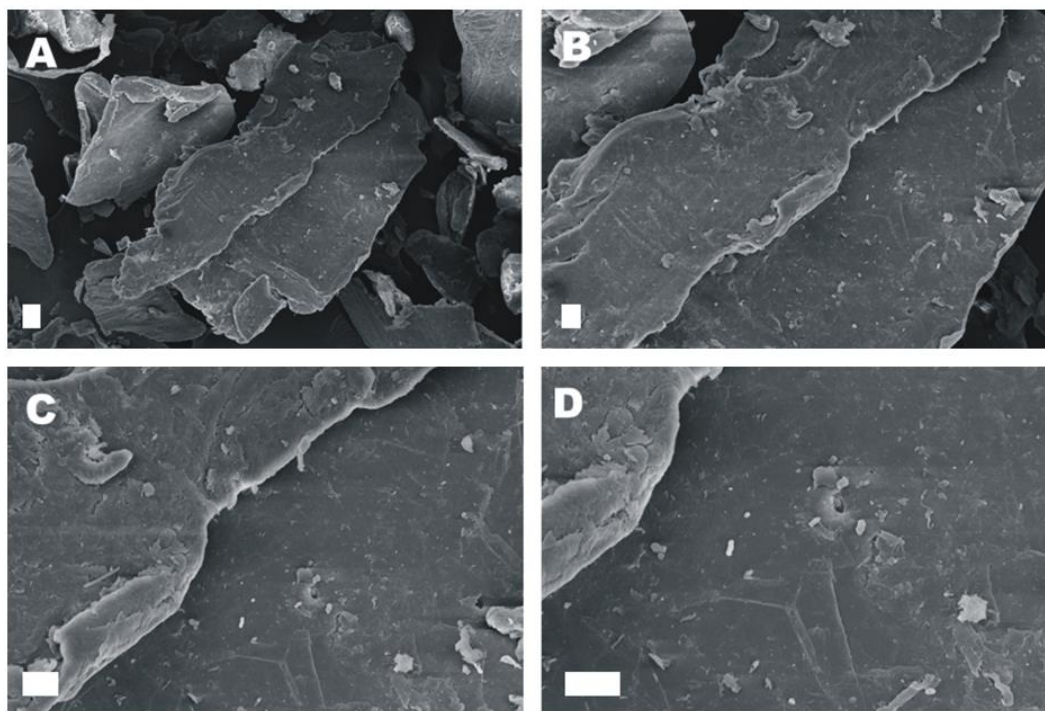


Fig. 6. Eletromicrografias de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) da quitosana. (A) – Magnificação de 500 vezes e barra = 20 μm ; (B) - Magnificação de 1000 vezes e barra = 10 μm ; (C) - Magnificação de 2000 vezes e barra = 10 μm ; (D) - Magnificação de 3000 vezes e barra = 10 μm .

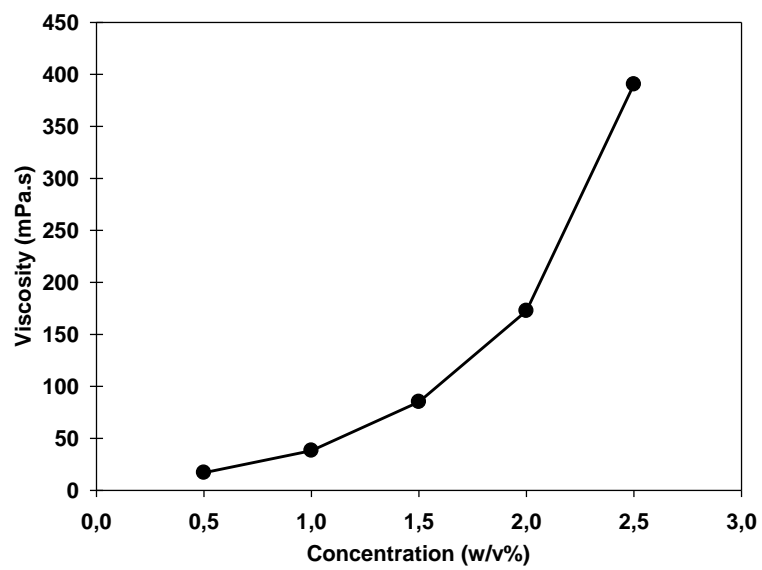


Fig. 7. Viscosidade da quitosana em função da concentração.

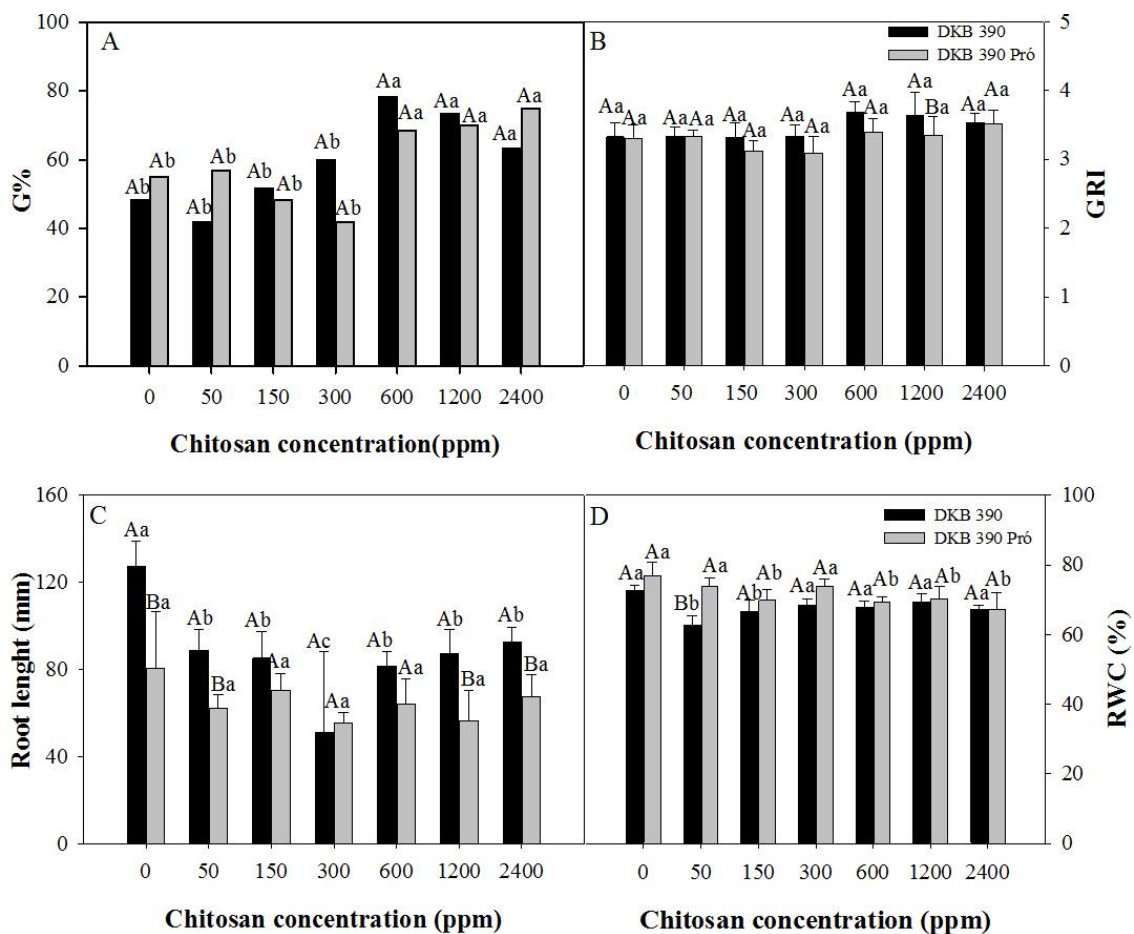


Fig. 8. Efeito da quitosana na germinação e crescimento inicial de milho. (A) – Porcentagem de germinação (G%); (B) – Índice de velocidade de germinação; (C) – Comprimento da raiz; (D) – teor relativo de água das plântulas (RWC%). Cada barra indica a média do tratamento \pm S.E. Médias seguidas por mesma letra (letra maiúscula comparando-se os híbridos e minúscula comparando as concentrações) em cada barra não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5% de probabilidade ($P \leq 0.05$).

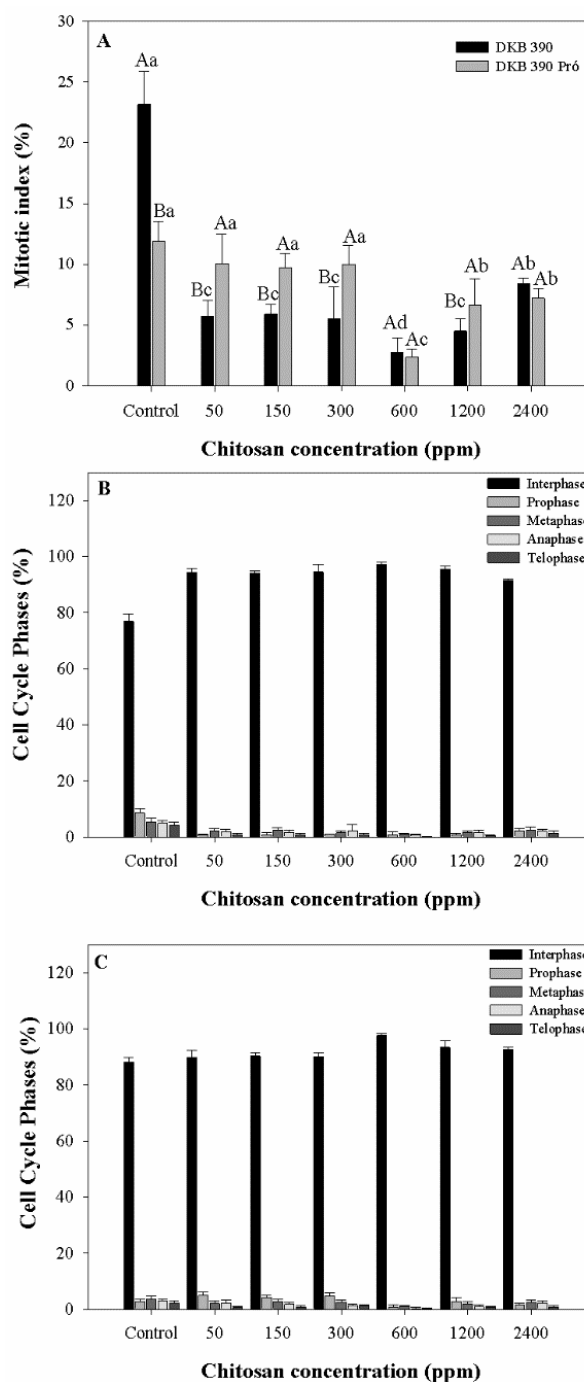


Fig. 9. Efeito da quitosana no ciclo celular: (A) – índice mitótico (%); (B) – Frequência das fases do ciclo celular no DKB 390; (C) – Frequência das fases do ciclo celular no DKB 390 Pró. Cada barra indica a média do tratamento \pm S.E. Médias seguidas por mesma letra minúscula entre as concentrações em cada barra não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5% de probabilidade ($P \leq 0.05$). Médias seguidas por mesma letra (letra maiúscula comparando-se os híbridos e minúscula comparando as concentrações) em cada barra não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5% de probabilidade ($P \leq 0.05$).

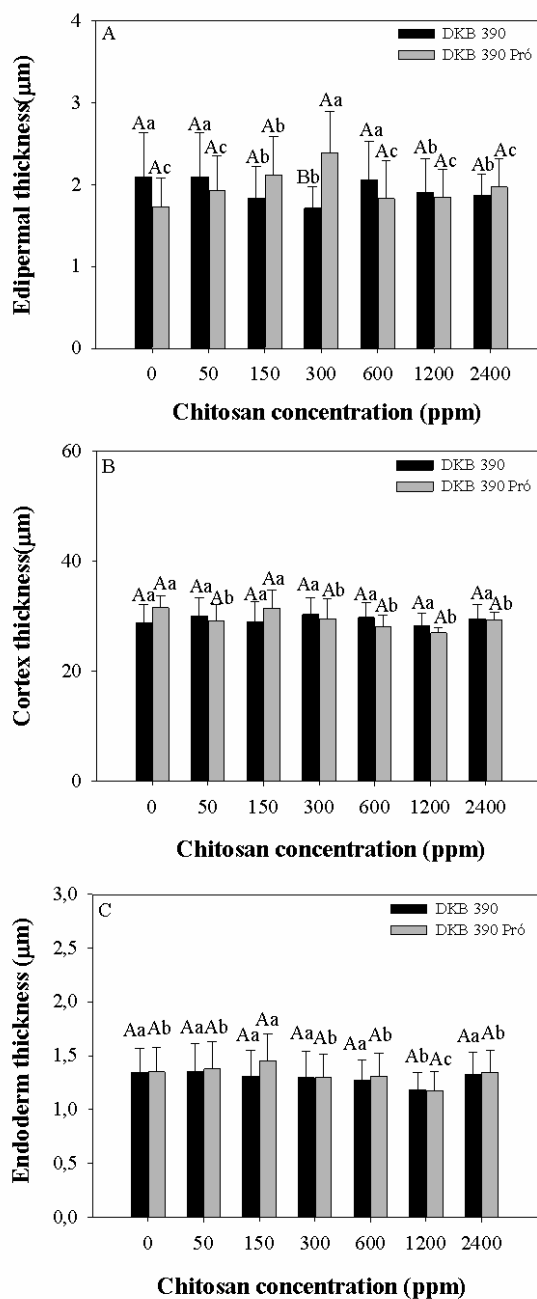


Fig. 10. Efeito da quitosana na anatomia radicular de milho. (A) Espessura da epiderme, (B) Espessura do córtex, (C) Espessura da endoderme. Cada barra indica a média do tratamento \pm S.E. Médias seguidas por mesma letra (letra maiúscula comparando-se os híbridos e minúscula comparando as concentrações) em cada barra não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5% de probabilidade ($P \leq 0.05$).

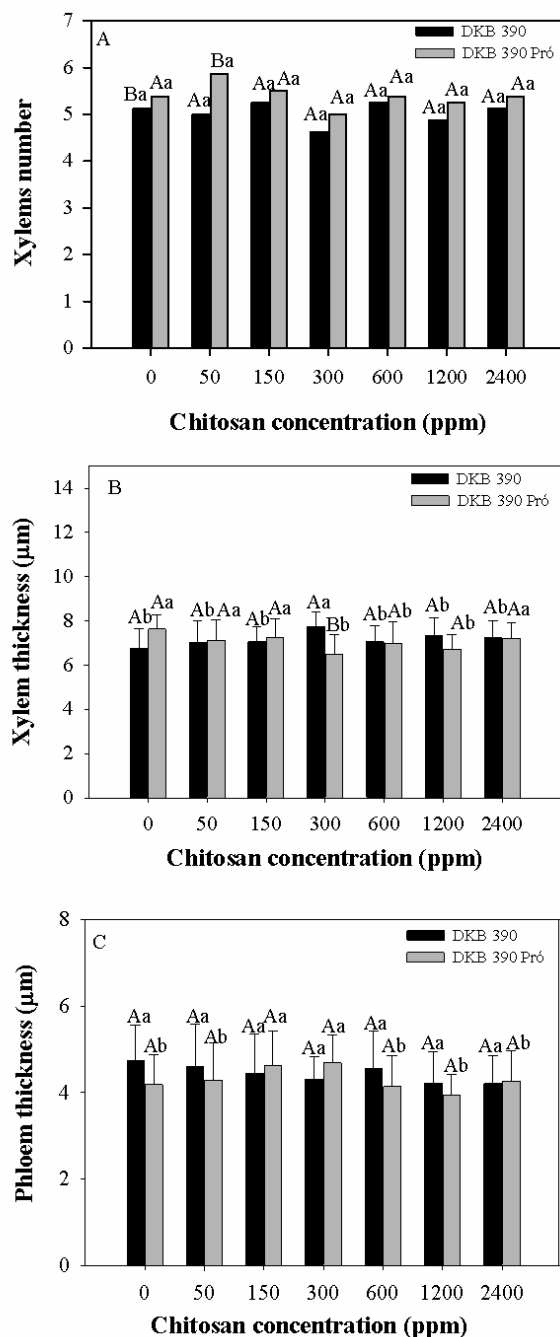


Fig. 11. Efeito da quitosana no sistema vascular das raízes de milho. (A) – Número de metaxilemas; (B) – diâmetro do metaxilema; (C) – Espessura do floema. Cada barra indica a média do tratamento \pm S.E. Médias seguidas por mesma letra (letra maiúscula comparando-se os híbridos e minúscula comparando as concentrações) em cada barra não diferem entre si pelo teste Skott-Knott a 5% de probabilidade ($P \leq 0.05$).

Table 1: Análise Elementar (porcentagem de N, C e H), teor de cinzas, e porcentagem de desacetilação (DDA%) da quitosana.

Amostra	Conteúdo %			C/N	Cinzas	DDA%
	N	C	H			
Quitosana	7,254	41,850	5,880	5,769	1,32	63,5

Material Suplementar

Dados suplementares associados a este artigo podem ser encontrados, na versão on-line, no endereço [http :www.xxxxxxxxxxxx](http://www.xxxxxxxxxxxx)

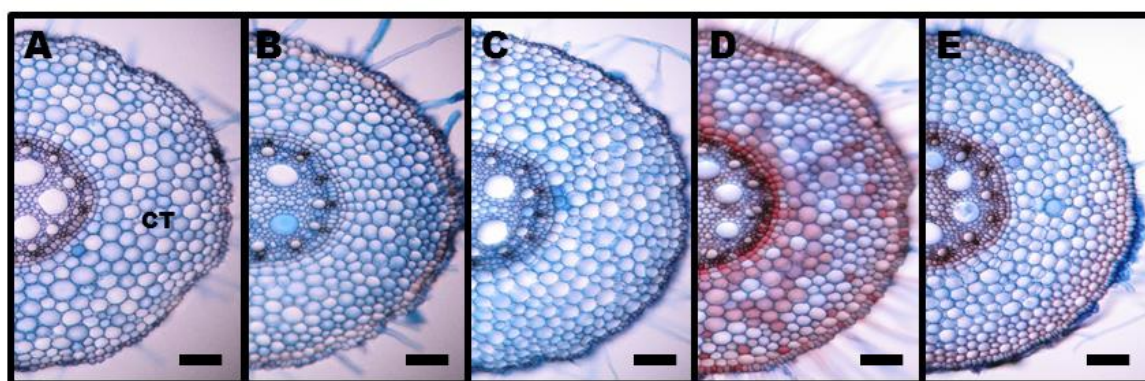


Fig. S1. Fotomicrografias de secções transversais de raízes de milho (DKB 390 Pró) demonstrando o decréscimo da espessura do córtex com aplicação de quitosana comparando com o controle. A - controle, B - 300 ppm, C - 600 ppm, D - 1200 ppm, E - 2400 ppm. CT = córtex; Barra = 100 μ m

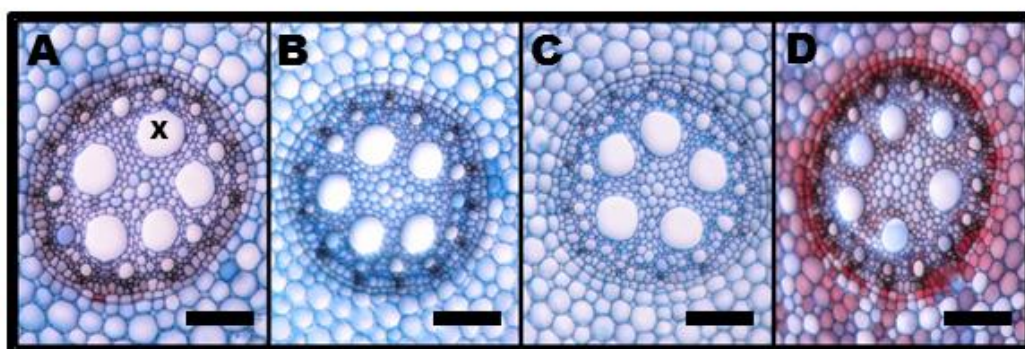


Fig. S2. Fotomicrografias de secções transversais de raízes de milho (DKB 390 Pró) demonstrando o decréscimo da espessura do xilema com aplicação de quitosana comparando com o controle. A - controle, B - 300 ppm, C - 600 ppm, D - 1200 ppm. X = xilema; Barra = 100 μ m.

Graphical Abstract

