

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**CAROLINE OLIVEIRA DOS REIS**

**APLICAÇÃO DE QUITOSANA E SEUS DERIVADOS EM HÍBRIDO DE MILHO SOB  
DÉFICIT HÍDRICO**

**ALFENAS/MG**

**2018**

**CAROLINE OLIVEIRA DOS REIS**

**APLICAÇÃO DE QUITOSANA E SEUS DERIVADOS EM HÍBRIDO DE MILHO  
SOB DÉFICIT HÍDRICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alfenas como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, para a obtenção do título de "Mestre".

Área de concentração: Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Corrêa de Souza

Coorientador: Dr. Paulo César Magalhães

**ALFENAS/MG**

**2018**

**Dedico a minha família e amigos.**

## AGRADECIMENTOS

A minha família. Ao meu pai Salvador, minha mãe Solange e ao meu irmão Carlos Miguel, agradeço pelo apoio incondicional e todo suporte, sem os quais não seria possível dar asas a esse sonho.

Aos velhos amigos de sempre que mesmo distantes fisicamente, se fazem sentir e estarão sempre em meu coração, obrigada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Thiago Corrêa de Souza, agradeço pela paciência em mostrar o caminho e muitas vezes pegar nas mãos e ensinar a caminhar.

Ao meu coorientador Dr. Paulo Magalhães, sou grata pela disposição e boa vontade de abrir as portas da Embrapa Milho e Sorgo para o desenvolvimento do projeto, e por ser sempre fonte de conhecimento e inspiração para seus orientados.

Ao Prof. Dr. Diogo Teixeira Carvalho, e a Daniela Ferreira Cabral, agradeço por serem responsáveis por sintetizar as biomoléculas.

Aos grandes amigos que fiz durante essa etapa da vida agradeço, principalmente a Lorena Gabriela, Roniel, Éder, Daniele e Carlos. Que foram indispensáveis nas atividades do experimento, porém mais indispensáveis ainda nos momentos vividos.

Ao Sr. Gilberto que foi meu braço direito meu muito obrigada por passar todo seu conhecimento prático, trabalhando sempre com muito amor e dedicação.

A todos os demais funcionários da Embrapa Milho e Sorgo que de alguma forma estiveram envolvidos e não hesitaram em ajudar, agradeço.

Agradeço a Embrapa Milho e Sorgo pela receptividade e amparo.

Ao laboratório Biogen e a todos os integrantes e parceiros do mesmo, obrigada.

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

Agradeço também a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado (C.O.Reis) e pelo financiamento do projeto (APQ-00651-14).

Obrigada!

*“Impressiona-me a urgência por fazer. Saber não é suficiente; deve-se praticar. Querer não é suficiente; deve-se agir.”*

**(Leonardo da Vinci)**

## RESUMO

O estresse pela baixa disponibilidade hídrica é um dos principais problemas enfrentados pela agricultura, e a habilidade das plantas para resistir a tal estresse é de suma importância para a segurança alimentar e o desenvolvimento do agronegócio, principalmente em grandes culturas como a do milho. O crescimento e o rendimento dessa cultura são altamente afetados em regiões com limitação hídrica, pois o milho possui uma alta sensibilidade a este estresse. Tendo em vista o exposto, é de suma importância a identificação e caracterização de tecnologias que busquem a tolerância à seca. A quitosana é um produto de baixo custo, renovável, biodegradável, biocompatível, não-tóxico, cujas propriedades vêm sendo exploradas em aplicações industriais e tecnológicas. A pesquisa por novas aplicações e o emprego da mesma têm aumentado exponencialmente em diversas áreas, como na agricultura, indústria de alimentos, de cosméticos e na indústria farmacêutica. Estudos recentes 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. O objetivo desse trabalho, portanto foi analisar o comportamento ecofisiológico de plantas de milho sob estresse hídrico após a pulverização com quitosana e seus derivados, *N*-succinóilico (SUC) e *N*, *O*-dicarboximetílico (MCA); estabelecendo uma relação entre a estrutura e a atividade antitranspirante dos compostos em estudo e entendendo seus mecanismos de ação, de forma a contribuir com estudos de tolerância a seca em milho. O experimento foi desenvolvido em casa de vegetação e para verificar os efeitos da quitosana e seus derivados foi utilizado o milho híbrido sensível a seca BRS1030. Quando as plantas atingiram o pré florescimento, as mesmas foram submetidas ao estresse hídrico e pulverizadas com as biomoléculas. O estresse foi mantido durante 15 dias e neste período foram feitas três avaliações, no início do estresse, no final e após a reidratação das plantas. Foram avaliados as trocas gasosas, a fluorescência da clorofila e o teor de pigmentos cloroplastídicos. Os resultados mostram que a utilização dos derivados de quitosana, SUC e MCA, afetou os mecanismos envolvidos na fotossíntese, como o movimento estomático, eficiência do uso da água e processos do fotossistema II. A fluorescência da clorofila *a* indicou que o complexo-antena foi danificado pela condição de déficit hídrico, havendo uma diminuição do fluxo de energia na cadeia transportadora de elétrons e na fase fotoquímica da fotossíntese, porém a pulverização de quitosana com a adição de grupos potencializou as atividades como indutoras de tolerância ao estresse hídrico da mesma, por estarem mais biodisponíveis as plantas. O estresse hídrico diminuiu o teor dos pigmentos, todavia tanto a aplicação de quitosana quanto dos derivados aumentaram estes teores. Conclui-se que os derivados de quitosana melhoraram os parâmetros relacionados as trocas gasosas e com as clorofilas em híbrido de milho sensível a seca induzindo a tolerância a este estresse.

Palavras-chave: Déficit hídrico, *Zea mays* L., fotossíntese.

## ABSTRACT

Water deficit is a major problem faced by agriculture, and the ability of plants to withstand such stress is of paramount importance for food security and the development of agribusiness, especially of important crops such as maize. The growth and yield of this crop are highly affected in regions with limited water content in soils, because maize has a high sensitivity to this stress. In view of the above, it is extremely important to identify and characterize technologies that seek drought tolerance. Chitosan is a low-cost, renewable, biodegradable, biocompatible and non-toxic product, which properties have been exploited for industrial and technological applications. Research into new applications and employment has increased exponentially in a number of areas, including agriculture, food industry, cosmetics and pharmaceutical industry. Recent studies have indicated that the biopolymer has the potential to be developed as an antiperspirant in agricultural under stressful situations, inducing drought tolerance through increased water use efficiency. The objective of this work was to analyze the ecophysiology of maize plants under water deficit after spraying with chitosan and its derivatives, N-succinoyl (SUC) and N, O-dicarboxymethyl (MCA). We sought to establish the relationship between the structure of the compounds and its antiperspirant activity, and understand the mechanisms of action of the compounds, in order to contribute to studies of drought tolerance in maize. The experiment was carried out under greenhouse condition and to verify the effects of chitosan and its derivatives, BRS1030 hybrid maize was used. When the plants reached pre-flowering stage, they were submitted to water deficit and sprayed with the biomolecules simultaneously. The stress was maintained during 15 days and during this period three evaluations were made, at the beginning of the stress, at the end and after the rehydration of the plants. Gaseous exchanges, chlorophyll fluorescence and chloroplastidic pigment content were evaluated. The results show that the use of SUC and MCA affected the mechanisms involved in photosynthesis, such as stomatal movement, water use efficiency and photosystem II processes. Chlorophyll a fluorescence data indicated that the antenna complex was damaged by the water deficit condition, resulting in a decrease in the energy flux in the electron transport chain and in the photochemical phase of the photosynthesis. The chitosan spraying, however, boosted water deficit tolerance in maize plants. Water deficit decreased the pigment content, however, both the application of chitosan and the derivatives increased these levels. It is concluded that the chitosan derivatives improve the parameters related to the gas exchange and with chlorophylls in hybrids of maize susceptible to drought inducing the tolerance to this stress.

Key words: Water deficit, *Zea mays* L., photosynthesis





## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>12</b>
2.1 <i>Déficit hídrico e suas implicações na produção de milho.....</i>	<i>12</i>
2.2 <i>Bioestimulantes.....</i>	<i>13</i>
2.3 <i>Quitina, quitosana e seus derivados.....</i>	<i>14</i>
2.4 <i>Aplicação da quitosana na agricultura.....</i>	<i>17</i>
<b>3 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>19</b>
<b>4 OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>20</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>28</b>
<b>Artigo: Ação de N-succinoílico quitosana e N, O-carboximetílico quitosana na fotossíntese e fluorescência da clorofila em milho sensível à seca.....</b>	<b>28</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>28</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>29</b>
<b>Material e métodos .....</b>	<b>30</b>
<i>Síntese dos derivados N-succinoílico (SUC) e de quitosana e N, O-carboximetílico (MCA) de quitosana.....</i>	<i>30</i>
<i>Condições locais e material vegetal.....</i>	<i>31</i>
<i>Imposição do estresse e aplicação de quitosana e derivados.....</i>	<i>31</i>
<i>Medidas de trocas gasosas.....</i>	<i>32</i>
<i>Medidas de fluorescência da clorofila.....</i>	<i>32</i>
<i>Clorofila a, b e carotenoides.....</i>	<i>32</i>
<b>Análise dos dados.....</b>	<b>33</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>33</b>
<i>Análise de trocas gasosas.....</i>	<i>33</i>
<i>Florescência da Clorofila “a”.....</i>	<i>34</i>
<i>Análise dos teores de clorofila.....</i>	<i>34</i>
<b>Discussão .....</b>	<b>35</b>
<b>Conclusão .....</b>	<b>37</b>
<b>Author contributions.....</b>	<b>38</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>38</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas estão entre as principais preocupações para todas as comunidades em todo o mundo e vem à frente dos problemas científicos (GODFRAY et al., 2010; TAIZ, 2013). Os sistemas agrícolas e alimentares representam os setores mais vulneráveis à variabilidade climática. Sem dúvida, a produção agrícola está sendo afetada pelas mudanças climáticas e a segurança alimentar de uma nação depende de como o rendimento das culturas respondem à essas mudanças.

A baixa disponibilidade hídrica ou déficit hídrico é o principal estresse abiótico, responsável por reduzir a produtividade de plantas em todo o mundo (TURNER; RAO, 2013). Quando a perda de água por transpiração excede a taxa de absorção de água pela planta, tem-se caracterizado o déficit hídrico (KRAMER, 1996). Por mais variados que sejam, todos os mecanismos vitais tendem sempre a regular o seu ambiente interno de forma a manter uma condição estável mediante a múltiplos ajustes de equilíbrio dinâmico. A essa estabilidade dá-se o nome de homeostase. Qualquer desvio nas condições ótimas para a vida, provocando mudanças e repostas dos organismos e interferindo em sua homeostase, é uma situação de estresse. Esse estresse pode causar alterações morfofisiológicas no vegetal, reduzir a acumulação de carbono, a expansão de tecidos e o número de células, resultando em queda de produtividade das plantas, que muitas vezes podem ser irreversíveis dependendo da intensidade, da duração, do estágio fenológico e do material genético da cultura.

O milho está entre as gramíneas mais cultivadas no mundo todo, visto a sua importância na produção agrícola, tanto para consumo humano como animal (SANTOS, 2002). Sendo produzido nos mais diversos ambientes e climas do planeta (WERLE et al., 2011). Segundo Bergamashi (2004), por pertencer ao grupo de plantas com metabolismo fotossintético do tipo C4, o milho é caracterizado pelo elevado potencial produtivo. Sua maior produtividade se manifesta quando a máxima área foliar coincide com a maior disponibilidade de radiação solar, desde que não haja déficit hídrico. Essa condição permite a máxima fotossíntese possível, porém aumenta a necessidade hídrica da cultura, já que o elevado fluxo energético incidente também eleva a evapotranspiração.

Apesar de todos os avanços tecnológicos utilizados (sementes, fertilizantes, herbicidas, irrigação, inseticidas, etc.), a cultura do milho é frequentemente afetada por adversidades e destas a que causa maior impacto neste importante produto do agronegócio é a seca

(BERGONCI et al., 2010). O déficit de água é uma questão crítica que limita o crescimento do milho por ter impacto nos processos anatômicos, morfológicos, fisiológicos e bioquímicos.

A quitosana é um composto natural que tem sido usado como produtos químicos de sementes, folhas e frutas na produção de vegetais. Plantas tratadas com quitosana podem ser menos propensas ao estresse provocado por condições desfavoráveis, como a seca, a salinidade, a baixa ou alta temperatura (LIZARRAGA-PAULI et al., 2011; JABEEN; AHMAD, 2013; PONGPRAYOON et al., 2013). A quitosana estimula os processos vitais das plantas em todos os níveis de organização biológica.

Esse polímero vem sendo relatado como indutor e regulador de crescimento, desenvolvimento e produção de diversas plantas cultivadas (CABRERA et al., 2013). Os oligossacarídeos de quitosana podem ativar a imunidade inata da planta frente a diversos estresses. É relatado que essas moléculas estimulam a produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) como molécula sinalizadora em plantas de arroz (LIN et al., 2005; LI et al., 2009), induzem respostas de defesa por NO em tabaco (ZHAO et al., 2007; ZHANG et al., 2011), promovem o desenvolvimento e a resistência à seca em café (NGUYEN et al., 2011), impactam a sinalização do ácido jasmônico-etileno em oleaginosas (YIN et al., 2013), desencadeiam a expressão de genes relacionados à defesa (CHEN et al., 2009), causam mudanças na fosforilação de proteínas (FENG et al., 2006), ativam proteínas quinases (YIN et al., 2010a), e possuem atividade antimicrobiana contra bactérias e fungos (RAAFAT et al., 2008). Além dos efeitos benéficos em plantas, a quitosana conta ainda com várias vantagens entre os biopolímeros, devido as excelentes propriedades físicas como alta solubilidade em água acidificada, não toxicidade e biocompatibilidade.

Ainda existem poucas pesquisas sobre o uso desse biopolímero no estímulo de respostas fisiológicas para tolerância ao déficit hídrico. Resultados das últimas décadas têm indicado que a quitosana possui potencial para ser desenvolvida como um antitranspirante em situações agrícolas de estresse, induzindo a tolerância a falta de água via aumento da eficiência do uso da água (menor perda de água por carbono fixado) e/ou maior defesa contra as espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo) (ZENG; LUO, 2012; PONGPRAYOON et al., 2013; SHARP, 2013).

Frente ao exposto, o objetivo desse trabalho foi verificar o efeito da quitosana e seus derivados na indução de tolerância ao déficit hídrico em milho, e a caracterização ecofisiológica e prospecção desses biopolímeros.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Déficit hídrico e suas implicações na produção de milho

Em resultado das mudanças climáticas, as secas tornam-se mais severas, prolongadas e frequentes (WOSSEN et al., 2017). Os custos econômicos podem ser enormes, pois a falta de água tem o potencial de causar uma grave crise alimentar, fome e desnutrição, bem como a longo prazo, intensificar a pobreza devido à limitada capacidade de adaptação dos pequenos proprietários (COLLIER et al., 2008; BRYAN et al., 2013).

As plantas experimentam a desidratação em condições ambientais adversas, porém o maior responsável por desencadear mudanças nos fenômenos moleculares, bioquímicos e fisiológicos, afetando assim o seu crescimento e desenvolvimento é a seca (FAROOQ et al., 2010). O déficit hídrico causa uma supressão acentuada na eficiência fotossintética, principalmente devido ao fechamento dos estômatos, o que limita a difusão de CO<sub>2</sub> na folha, ou devido à inibição da Rubisco, um fator não estomático (LAWLOR; CORNIC, 2002; DEMIREVSKA et al., 2010; RAPACZ et al., 2010). Provoca também distúrbios nas funções da água na planta que regulam diferentes sistemas metabólicos e de defesa para sua sobrevivência (DEMIREVSKA et al., 2010).

O funcionamento completo de uma planta pode ser dividido em três amplos processos fisiológicos: (1) acesso ao CO<sub>2</sub> (condutância estomática e mesofílica), (2) maquinaria da fotossíntese, por exemplo, o fotossistema e o ciclo de Calvin, e (3) fornecimento de água (função dos xilemas) (GLEASON et al., 2017).

O déficit hídrico promove inicialmente o fechamento estomático por períodos prolongados. Com o fechamento dos estômatos, ocorre a diminuição da concentração interna de CO<sub>2</sub>, comprometendo a atividade da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), refletindo em menor fotossíntese. Com o passar do tempo e aumento da intensidade do estresse, há a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) em função da diminuição do potencial redox do aparato fotoquímico. As EROs agem no fotossistema II (PSII), oxidando proteínas e impossibilitando a oxidação da molécula de água, comprometendo o fluxo de elétrons na cadeia transportadora, a síntese de ATP e a regeneração da Rubisco, levando a uma limitação bioquímica da fotossíntese (SOUZA et al, 2013).

Praticamente, toda matéria orgânica acumulada numa planta durante seu crescimento tem origem no processo fotossintético de fixação de carbono atmosférico, o que representa ao redor de 95% de toda sua fitomassa seca. Assim, qualquer fator ambiental que afetar a fotossíntese afetará o crescimento e o acúmulo de fitomassa (SYVERTSEN; LLOYD, 1994).

O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura extremamente importante, cultivada no mundo todo. Sua produção global aumentou enormemente ao longo das últimas décadas, e agora é a cultura de cereais mais amplamente produzida, com uma produção mundial de aproximadamente 1006,18 milhões de toneladas (FAO-AMIS, 2016).

O déficit hídrico compromete a produção da cultura do milho em diferentes proporções, dependendo principalmente da intensidade e do estágio de desenvolvimento em que se encontram as plantas. A restrição hídrica na germinação reduz a produção pela diminuição do número de plantas por área. Durante os estádios v4 e v5 (diferenciação floral), a redução se dá principalmente em vista da diminuição da área foliar fotossinteticamente ativa das plantas, podendo ocorrer perdas na ordem de 20 a 30% (MAGALHÃES; DURÃES, 2008). No entanto, o período de maior exigência de água pelo milho consiste no período de duas semanas antes e duas semanas depois do florescimento, momento este em que o número de grãos das espigas é fixado. Além disso, neste período a ocorrência de estresse hídrico pode reduzir a transferência de fotoassimilados para os órgãos reprodutivos das plantas, provocando uma desordem no tempo de emissão entre a parte masculina e feminina, resultando em grãos com menor massa e espigas vazias (EDMEADES et al., 2000).

A seca tem sido uma das principais restrições para a produção de milho. Em 2016, chuvas abaixo da normalidade provocaram perdas de lavouras e derrubaram o rendimento médio do milho 2ª safra (IBGE, 2017). O aumento da magnitude, duração e frequência das secas tem reduzido profundamente água disponível no solo para a absorção das plantas (RURINDA et al., 2015). A produção de milho está ameaçada por esse fenômeno (ŽALUD et al., 2017). Portanto, neste cenário, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas para melhorar o desempenho do milho em condições de seca (CAMPOS et al., 2004), objetivando manter rendimentos elevados utilizando menos água na irrigação.

## **2.2 Bioestimulantes**

As pesquisas em matéria de sistemas agrícolas têm sido orientadas há anos para aumentar o rendimento, não levando em consideração a qualidade do produto e o uso racional de recursos. Em contrapartida, a atenção agora está voltada principalmente na qualidade do produto e na sustentabilidade dos sistemas de cultivo. Os fertilizantes podem ter impactos negativos sobre o meio ambiente, como o nitrato por exemplo, que pode contaminar a água, aumentar as emissões de gases de efeito estufa e acumular nas plantas, causando impactos na saúde humana

(MATTNER et al., 2013; CAVAIUOLO; FERRANTE, 2014). Portanto, métodos alternativos para estimular o crescimento inicial de vegetais são muito interessantes.

Especialistas em horticultura cunharam a palavra biostimulante com o objetivo de descrever substâncias que promovem o crescimento das plantas sem serem nutrientes, condicionantes de solo ou pesticidas (JARDIN, 2015). Segundo Zhang e Schmidt (1997), o diferencial entre bioestimulantes e nutrientes, é a quantidade utilizada. Bioestimulantes são materiais que em pequenas quantidades promovem o crescimento das plantas, já os nutrientes também promovem o crescimento das plantas, todavia são aplicadas em quantidades maiores.

Apesar do reconhecimento das vantagens e pesquisas acerca dos bioestimulantes, não existe uma definição legal ou regulamentar em nenhuma parte do mundo. No entanto, algumas grandes categorias de bioestimulantes são amplamente reconhecidas por cientistas e partes interessadas (CALVO et al., 2014; DU JARDIN, 2012; HALPERN et al., 2015), abrangendo substâncias e microorganismos. As principais classes desses compostos são: ácidos húmicos e fúlvicos, hidrolisados de proteínas e outros compostos contendo N, extratos de algas marinhas e botânicos, quitosana e outros biopolímeros, compostos inorgânicos e fungos e bactérias benéficas.

Os bioestimulantes vem ganhando o interesse na agricultura sustentável porque sua aplicação ativa vários processos fisiológicos que aumentam a eficiência do uso de nutrientes, estimulando o desenvolvimento da planta e permitindo a redução do consumo de fertilizantes (KUNICKI et al., 2010). Muitos bioestimulantes também são capazes de amenizar estresses bióticos e abióticos, melhorando a qualidade e o rendimento das culturas (ZIOSI et al., 2013).

### **2.3 Quitina, quitosana e seus derivados**

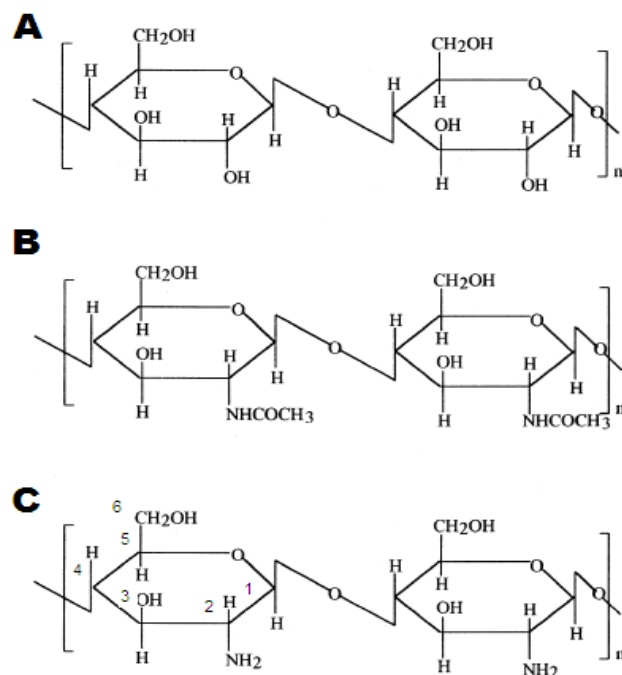
A quitina compartilha várias semelhanças bioquímicas com a celulose encontrada nas paredes celulares da planta. Em comum com a celulose, é um polissacárido linear, de cadeia longa, carregado de forma neutra. Além disso, como a celulose, a quitina é usada para construir barreiras mecânicas e físicas que proporcionam estabilidade estrutural. No entanto, ao contrário da celulose, a quitina possui uma rigidez inata.

A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, atrás apenas da celulose. A quitina e a celulose possuem semelhança funcional, apresentando baixa solubilidade e baixa reatividade química, e semelhança estrutural, porém a quitina apresenta no carbono de posição dois uma substituição da hidroxila por uma acetoamino (Fig. 1A e B). A quitina é um polissacarídeo formado por unidades N-acetil-2-deoxi-D-glicopirranose que são interligadas por

ligações glicosídicas  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4) que arranjam-se em alfa hélice estabilizadas por pontes de hidrogênio intramoleculares (SINGLA, 2001).

A quitina é um pó amarelado de estrutura cristalina ou amorfa, altamente hidrofóbica, insolúvel em água, em alguns ácidos e bases diluídas e em vários solventes orgânicos. Ela é solúvel em hexafluorisopropanol, hexafluoracetona, cloroálcoois adicionados a soluções aquosas de ácidos minerais e dimetilacetamida contendo 5% de cloridrato de lítio (KURITA, 1998). A estrutura da quitina pode ser modificada removendo-se os grupos acetil, por uma reação química em solução alcalina concentrada e elevada temperatura. Quando a desacetilação da quitina é superior a 60-65%, o co-polímero resultante é a quitosana (AZEVEDO et al., 2007; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006; SHI et al., 2006). Dessa forma a quitosana é um heteropolissacarídeo derivado do processo de desacetilação química da quitina (AZEVEDO et al., 2007; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

A quitosana é produzida a partir de quitina, principalmente de conchas de caranguejo, cascas de camarão e, em alguns casos, de fungos filamentosos, através de um processo heterogêneo de desacetilação (KUMARESAPILLAI et al., 2011; NWE et al., 2011; MUNOZ et al., 2015), onde a quitina sólida é embebida em 40-50% (p/v) NaOH. Enquanto a quitina é insolúvel na maioria dos solventes, a quitosana pode ser prontamente solubilizada em ácidos orgânicos fracos, tais como ácido acético ou ácido láctico (PICHYANGKURA; CHADCHAWAN, 2015).



**Figura 1.** Semelhanças entre as estruturas de celulose (A), quitina (B) e quitosana (C).

A natureza heterogênea do processo de produção torna a quitosana também heterogênea. As quitosanas derivadas de materiais ou preparações similares, podem ser bastante diferentes em termos de massa molecular, dispersividade de massa molecular e desacetilação. As diferenças nesses parâmetros podem afetar muito as propriedades físicas e as funções biológicas da quitosana, como a solubilidade e a capacidade de estimular plantas. Portanto, esses parâmetros devem ser bem caracterizados antes da sua aplicação. As diferenças no material de partida podem ser reduzidas ou eliminadas pelo pré-tratamento de NaOH para modular a desacetilação, e hidrólise química ou enzimática para modular o tamanho e a polidispersidade. Métodos de modificação para esses parâmetros foram bem documentados em outro lugar (JUNG; PARQUE, 2014; KUBOTA et al., 2000; THADATHIL; VELAPPAN, 2014).

A quitosana é um polímero mais versátil em comparação a quitina, apresentando três grupos reativos (susceptíveis a substituições), a hidroxila primária no carbono 6, a hidroxila secundária no carbono 3 e o grupo amino no carbono 2 (Figura 1C). Cada um desses grupos químicos pode ser objeto de modificações químicas (semisínteses) que podem alterar as propriedades físicas, mecânicas e biológicas. Vale ressaltar, que o grupo amino é geralmente mais escolhido por ser mais reativo que as hidroxilas. (JAYAKUMAR et al., 2008; BADAWY; RABEA, 2011).

De acordo com Gerasimenko et al. (2004), a atividade biológica da quitosana depende do seu peso molecular, grau de desacetilação, modificação química, grau de substituição, pH, comprimento e posição de substituição nas unidades de glucosamina, e é claro, o organismo alvo. As principais reações observadas em trabalhos de modificação química com quitosana são fosforilação, alquilação, acetilação, sulfatação, carboxilação, glicosilação, dentre outras (MOURYA; NAZMA; INAMDAR, 2008; JAYAKUMAR et al., 2008). A maioria dos trabalhos envolvendo derivatização da quitosana são voltados para a atividade biológica com aplicação médica e com aplicação na agricultura para combate de pragas e doenças (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009; RAMÍREZ et al., 2010).

A presença dos grupos aminos nas posições C-2 da quitosana, (DUTTA; DUTTA; TRIPATHI, 2004) (Figura 1C), permite que o polímero tenha propriedades químicas como poliamina catiônica linear, alta carga de densidade  $\text{pH} < 6.0$ , formação de géis com poliânions, viscosidade característica, grupos amino reativos, grupos hidroxilo reativos disponíveis e propriedade quelante. Algumas das propriedades biológicas da quitosana são: a biocompatibilidade, biodegradabilidade e não toxicidade. Dentre as propriedades físicas, a quitosana apresenta permeabilidade, razão de intumescimento em membranas, propriedades



térmicas, estabilidade a solventes, propriedades mecânicas e porosidade. (SENCADAS et al., 2012; DASH et al., 2011).

A síntese dos derivados de quitosana por meio da inserção de grupos funcionais à cadeia polimérica confere a este polímero diferentes propriedades permitindo sua utilização em áreas médicas, biotecnológicas e agrícolas (XU et al. 2010; SAHARAN, 2016). Contudo na agricultura são poucos os trabalhos baseados em derivados de quitosana. Estes derivados são moléculas que podem potencializar a atividade já que a própria quitosana possui funções importantes na tolerância ao estresse (MARTINS et al. 2010).

Com relação à agricultura, a aplicação de quitosana foi estudada em muitas espécies de plantas, incluindo cereais, ornamentais, frutíferas e plantas medicinais. Essa biomolécula promove várias respostas nas plantas dependendo da sua estrutura e concentração (KANANONT et al., 2010; LIMPANAVECH et al., 2008), espécies de plantas (OHTA et al., 2004) e seu estágio de desenvolvimento (PORNPIENPAKDEE et al., 2010).

#### **2.4 Aplicação da quitosana na agricultura**

As aplicações da quitosana na agricultura, foram desenvolvidas ao longo dos anos, com foco na proteção das plantas contra patógenos fúngicos, porém, com pesquisas recentes enfatizando suas propriedades na tolerância aos estresses abióticos (seca, salinidade, estresse a frio) e características de qualidade relacionadas aos metabolismos primários e secundários, seu uso vem expandindo. Hoje os benefícios da quitosana na agricultura podem ser amplamente divididos em quatro áreas principais: 1. “Anticorpos” diretos contra pragas e patógenos das culturas; 2. Condicionamento de microrganismos benéficos, tanto na defesa quanto no crescimento das plantas; 3. Estimulação das respostas de defesa das plantas contra o estresse biótico; 4. Regulação do crescimento da planta, desenvolvimento, nutrição e tolerância ao estresse abiótico (RUSSELL, 2013).

Como um dos biopolímeros naturais mais abundantes na natureza, e devido à sua natureza policíclica única, a quitosana tem uma ampla gama de campos de aplicação, tais como no controle de microorganismos na agricultura (COTA-ARRIOLA et al., 2012), na purificação de águas residuais, na formação de coacervação para aprisionamento celular, no revestimento de sementes para melhorar seu rendimento e como bioestimulante de plantas (PICHYANGKURA; CHADCHAWAN, 2015). De acordo com Katiyar et al. (2014), a quitosana e seus oligossacarídeos são moléculas que podem ser aplicadas em culturas com o objetivo de reduzir ou substituir bactericidas químicos caros e prejudiciais para o meio ambiente. Quando ocorre o

reconhecimento do patógeno pela planta, aumenta a produção de EROs na célula vegetal como o íon superóxido ( $O_2^-$ ) e  $H_2O_2$  (SHARMA et al., 2012). Esta indução na formação das EROs também ocorre quando as plantas reconhecem os compostos e eliciadores como a quitosana (LEI et al., 2011).

Entre as várias bioatividades da quitosana, o alívio do estresse contra diversos estresses bióticos como o ataque de pragas, fungos e bactérias, e abióticos como a contaminação por metais pesados e a seca, tem recebido atenção considerável nos últimos anos por causa dos bons resultados da sua aplicação e sua biodegradabilidade. Em estudos sobre os efeitos da aplicação de quitosana em plantas de jaborandi (*Piper mollicomum*) atacadas por patógenos, Dousseau et al. (2016), obtiveram maior resposta na produção de enzimas antioxidantes dessas plantas, sob o efeito da aplicação de quitosana, compondo assim, um eliciador que estimula os mecanismos de defesa dessas plantas.

De acordo com Iriti et al. (2009) a aplicação de quitosana nas folhas de feijão diminui a transpiração foliar em vinte e quatro horas pelo fechamento dos estômatos devido ao aumento de ácido abscísico (ABA) e além disso uma fina camada do biopolímero é formada nas folhas favorecendo a diminuição da perda de água. Como consequência do fechamento estomático estimulado pelo ABA em resposta a quitosana, ocorre também uma diminuição da fotossíntese pela restrição da entrada e difusão de gás carbônico na folha (POSPISILOVA, 2003). Contudo, em outros estudos concentrações de quitosana acima de 50 ppm levaram a um aumento no teor de clorofila e da fotossíntese em folhas em feijão Mungo (MONDAL et al., 2013).

A quitosana foi útil para melhorar a germinação das sementes, o crescimento das mudas e a resistência ao estresse a seca de mudas de trigo (ZENG; LUO, 2012). Os efeitos fisiológicos da quitosana e seus oligômeros em plantas são resultados da capacidade deste composto para se ligar a uma ampla gama de componentes celulares, incluindo DNA, membrana plasmática e componentes da parede celular, mas também para se ligar em receptores específicos envolvidos na ativação de genes de defesa, de maneira semelhante aos próprios ativadores da defesa da planta (EL HADRAMI et al., 2010; HADWIGER, 2013; KATIYAR et al., 2015; YIN et al., 2010).

Pesquisas recentes buscam explicar a atuação da quitosana a nível celular, especialmente relacionada a transdução de sinal. A quitosana demonstrou afetar a permeabilidade das membranas celulares de soja (*Glycine max*) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) em suspensão (YOUNG et al., 1982). Em estudo onde foram incubadas folhas de videira pulverizadas com quitosana, observou-se a indução da atividade da lipoxigenase (TROTEL-AZIZ et al., 2006),

levando, por sua vez, à peroxidação lipídica, que pode desempenhar papel na via de defesa octadecanóide, que conduz ao sistema de resistência (HU et al., 2015).

### 3 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos o mundo vem passando por diversas mudanças ambientais tais como altas temperaturas e secas prolongadas. Essas mudanças afetam significativamente a agricultura pela sua dependência das condições ambientais, especialmente as climáticas. A baixa disponibilidade de água as plantas é o fator que mais influencia na produção e rendimento de grãos de diversas culturas, por ocasionar perturbações fisiológicas e morfológicas que prejudicam o desenvolvimento das plantas, reduzindo o acúmulo de biomassa e a velocidade de crescimento (LI et al. 2014; MUSCOLO et al. 2015).

O milho, uma das gramíneas de maior importância econômica na agricultura em função do seu potencial produtivo e valor nutricional, é cultivado em países de clima tropical, subtropical e de clima temperado. O estresse hídrico é a maior fonte de instabilidade do rendimento de grãos de milho. No Brasil, as estimativas de perdas na produção, causadas pelo déficit hídrico, estão entre 14% e 28% do total produzido (COELHO, 2013).

O melhoramento genético é a forma comumente empregada na superação das limitações climáticas. Porém, existe o desafio de fazer com que as tecnologias genéticas sejam manejadas corretamente, para que elas alcancem o resultado desejado e se mantenham pelo maior período possível. 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.

Sendo a utilização da quitosana, comprovadamente benéfica na superação do déficit hídrico, bem como a otimização das suas propriedades por modificação química, obtendo-se derivados prontamente biodisponíveis, justifica-se a aplicação das mesmas e a avaliação de seus efeitos sobre a cultura do milho.

### 4 OBJETIVOS

Analisar o comportamento ecofisiológico de plantas de milho sob déficit hídrico após a pulverização com Quitosana e seus derivados (*N*-succinoílico e *N, O*-dicarboximetílico); estabelecendo uma relação entre a estrutura e a atividade antitranspirante dos compostos em

estudo e entendendo seus mecanismos de ação, de forma a contribuir com estudos de tolerância a seca em milho.

## REFERÊNCIAS

- ARANAZ, I.; MENGIBAR, M.; HARRIS, R.; PANOS, I.; MIRALLES, B.; ACOSTA, N.; GALED, G.; HERAS, A. Functional characterization of chitin and chitosan. **Current Chemical Biology**, v. 3, p. 203–230, 2009.
- AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n. 3, p. 27-34, 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**, v. 2011, p. 1-29, 2011.
- BERGAMASCHI, H.; DALMAGO, G.A.; BERGONCI, J.I.; BIANCHI, C.A.M.; MÜLLER, A.G.; COMIRAN, F.; HECKLER, B.M.M. Distribuição hídrica no período crítico do milho e produção de grãos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 9, p. 831-839, set. 2004.
- BERGONCI, J.; BERGAMASCHI, H.; BERLATO, M. A.; SANTOS, A. O. Potencial da água na folha como um indicador de déficit hídrico em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.8, p.1531-1540, 2000.
- CABRERA, J. C.; WEGRIA, G.; ONDERWATER, R. C. A.; GONZALEZ, G.; NAPOLES, M. C.; FALCON- RODRIGUEZ, A. B.; COSTALES, D.; ROGERS, H. J.; DIOSDADO, E.; GONZALEZ, S.; CABRERA, G.; GONZALEZ, L.; WATTIEZ, R. 2013. Practical use of oligosaccharins in agriculture. In: SILVA, S. S.; BROWN, P.; PONCHET, M. (Eds.), I World Congress on the Use of Biostimulants in Agriculture. **International Society for Horticultural Science**, Leuven, p. 195-212, 2013.
- CALVO, P.; NELSON, L.; KLOEPPER, J. W. Agricultural uses of plant biostimulants. **Plant and Soil**, v. 383, p. 3-41, 2014.
- CAMPOS, H.; COOPER, M.; HABBEN, J. E.; EDMEADES, G. O.; SCHUSSLER, J. R. Improving Drought Tolerance in Maize: A View from Industry. **Field Crops Research**, v. 90, n. 1, p. 19-34, 2004.
- CAVAIUOLO M.; FERRANTE A. Nitrates and glucosinolates as strong determinants of the nutritional quality in rocket leafy salads. **Nutrients**, v. 6, p. 519-1538, 2014.
- CHEN, W.G.; LIU, X.; CHEN, H.X. Preparation of modified chitosan with quaternary ammonium salt. **Textile Bioengineering and Informatics Symposium Proceedings**, v. 1, p. 226-230, 2009.

COELHO, H. E. **Diferentes condições de estresse hídrico no desenvolvimento de milhos transgênico e convencional.** 2016, 93 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Faculdade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu, 2013.

COTA-ARRIOLA, O.; CORTEZ-ROCHA, M. O.; BURGOS-HERNANDEZ, A.; EZQUERRA-BRAUER, J. M.; PLASCENCIA-JATOMEA, M. Controlled release matrices and micro/nanoparticles of chitosan with antimicrobial potential: development of new strategies for microbial control in agriculture. **Journal of The Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 1525-1536, 2013.

DEMIREVSKA, K.; SIMOVA-STOILOVA, L.; VASSILEVA, V.; FELLER, U. Rubisco and some chaperone protein responses to water stress and rewatering at early seedling growth of drought sensitive and tolerant wheat varieties. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 56, n. 2, p. 97-106, 2008.

DOUSSEAU, S.; RODRIGUES, A. C.; LIRA, J. M. S.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; PACHECO, F. V.; ALVARENGA, A. A.; RESENDE, M. L. V.; CLEMENTE FILHA, A. C.; DE PAULA, F. Exogenous chitosan application on antioxidant systems of jaborandi. **Ciência Rural**, v. 46, n. 1, p.191-197, 2016.

DU JARDIN, P. (2012). The Science of Plant Biostimulants - A Bibliographic Analysis, Ad hoc Study Report. Brussels: European Commission. In: <<http://hdl.handle.net/2268/169257>> Acesso em: 16 de fevereiro de 2018.

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

EDMEADES, G. O. et al. The role and regulation of the anthesis-silking interval in maize. In: WESTGATE, M. E.; BOOTE, K. J. (Ed) Physiology and modeling kernel set in maize. Madison: CSAA, p. 43-73, 2000.

EL HADRAMI, A.; ADAM, L. R.; EL HADRAMI, I.; DAAYF, F. Chitosan em proteção de plantas. **Marine Drugs**, v. 8, p. 968-987, 2010.

FAO (2016) <<http://www.fao.org/nr/nr-home/en>> Acesso em: 10 de fevereiro de 2018.

FAROOQ, M.; BASRA, S. M.; WAHID, A.; AHMAD, N. Changes in nutrient-homeostasis and reserves metabolism during rice seed priming: consequences for seedling emergence and growth. **Agricultural Sciences in China**, v. 9, p. 191-198, 2010.

- FENG, B.; CHEN, Y.; ZHAO, C.; ZHAO, X.; BAI, X.; DU, Y. Isolation of a novel Ser/Threosine kinase gene from oligochitosan-induced tobacco and its role in resistance against tobacco mosaic virus. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 596-603, 2006.
- GERASIMENKO, D. V.; AVDIENKO, I. D.; BANNIKOVA, G. E.; ZUEVA, O. Y.; VARLAMOV, V. P. Antibacterial effects of water-soluble low molecular-weight chitosans on different microorganisms. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 40, p. 253-257, 2004.
- GLEASON, S. M.; WIGGANS, D. R.; BLISS, C. A.; COMAS, L. H.; COOPER, M.; DE JONGE, K. C.; YOUNG, J. S.; ZHANG, H. Coordinated decline in photosynthesis and hydraulic conductance during drought stress in *Zea mays*. **Flora**, v. 227, p. 1-9, 2017.
- GODFRAY, H. C.; BEDDINGTON, J. R.; CRUTE, I. R.; HADDAD, G.; LAWRENCE, D.; MUIR, J. F.; ROBINSON, S.; THOMAS, S. M.; TOULMIN, C. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. **Science**, n. 327, p. 812-8, 2010.
- HALPERN, M.; BAR-TAL, A.; OFEK, M.; MINZ, D.; MULLER, T.; YERMIYAHU, U. The use of biostimulants for enhancing nutrient uptake. In: Sparks, D.L. (Ed.), **Advances in Agronomy**, v. 129, p. 141-174, 2015.
- L.A. HADWIGER. Multiple effects of chitosan on plant systems: Solid science or hype. **Plant Science**, v. 208, p. 42-49, 2013.
- HIRANO, S.; KITaura, S.; SASAKI, N.; SAKAGUCHI, H.; SUGIYAMA, M.; HASHIMOTO, K.; TANATANI, A. Chitin biodegradation and wound healing in tree bark tissues. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 4, p. 261-265, 1996.
- HU, T.; LIU, S. Q.; AMOMBO, E.; FU, J. M. Stress memory induced rearrangements of HSP transcription, photosystem II photochemistry and metabolism of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) in response to high-temperature stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 403-425, 2015.
- IRITI, M.; PICCHIB, V.; ROSSONIA, M.; GOMARASCA, S.; LUDWIGD, N.; GARGANOD, M.; FAORO, F. Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. **Environmental and Experimental Botany**, v. 66, p. 493-500, 2009.
- JABEEN, N.; AHMAD, R. The activity of antioxidant enzymes in response to salt stress in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings raised from seed treated with chitosan. **Journal of The Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 1699-1705, 2013.
- JAYAKUMAR, R.; SELVAMURUGAN, N.; NAIR, S. V.; TOKURA, S.; TAMURA, H. Preparative methods of phosphorylated chitin and chitosan—An overview. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p. 221-225, 2008.

- JUNG, W. J.; PARK, R. D. Bioproduction of chitoooligosaccharides: present and perspectives. **Marine Drugs**, v. 12, p. 5328-5356, 2014.
- KANANONT, N.; PICHYANGKURA, R.; CHANPRAME, S.; CHADCHAWAN, S.; LIMPANAVECH, P. Chitosan specificity for the in vitro seed germination of two Dendrobium orchids (*Asparagales: Orchidaceae*). **Scientia Horticulturae**, v. 124, p. 239-247, 2010.
- KANNAN, M.; NESAKUMARI, M.; RAJARATHINAM, K.; RANJIT SINGH, A. J. A. Production and characterization of mushroom chitosan under solid state fermentation. **Advance Biology Research**, v. 4, p. 10-13, 2010.
- KATIYAR, D.; HEMANTARANJAN, A.; BHARTI SINGH, B.; NISHANT BHANU, A. A Future Perspective in Crop Protection: Chitosan and its Oligosaccharides. **Advances in Plants e Agriculture Research**, v. 1, n. 1, p. 6, 2014.
- KUBOTA, N.; TATSUMOTO, N.; SANO, T.; TOYA, K. A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. **Carbohydrate Research**, v. 324, p. 268-274, 2000.
- KUNICKI, E.; GRABOWSKA, A.; SEKARA, A.; WOJCIECHOWSKA, R. The effect of cultivar type, time of cultivation, and biostimulant treatment on the yield of spinach (*Spinacia oleracea* L.). **Folia Horticulturae**, v. 22, p. 9-13, 2010.
- KURITA, K. Chemistry and application of chitin and chitosan. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, n. 1-3, p. 117-120, 1998.
- LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, p. 672-678, 2009.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000. 531p.
- LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 275-294, 2002.
- LEI, C.; MAA, D.; PUA, G.; QIU, X.; DUA, Z.; HONG, H.; LI, G.; YEA, H.; LIU, B. Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 1, p. 176-182, 2011.
- LI, Y.; YIN, H.; WANG, Q.; ZHAO, X. M., DU, Y.G., LI, F.L. Oligochitosan induced *Brassica napus* L. production of NO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and their physiological function. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 612-617, 2009.
- LI, X.; CAI, J.; LIU, F.; DAI, T.; CAO, W.; JIANG, D. Cold priming drives the sub-cellular antioxidant systems to protect photosynthetic electron transport against subsequent low temperature stress in winter wheat. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 82, p. 34-43, 2014.

LIMPANAVECH, P.; CHAIYASUTA, S.; VONGPROMEK, R.; PICHYANGKURA, R.; KHUNWASI, C.; CHADCHAWAN, S.; BANGYEEKHUN, T. Chitosan effects on floral production, gene expression, and anatomical changes in the *Dendrobium* orchid. **Scientia Horticulturae**, v.116, p. 65-72, 2008.

LIZARRAGA-PAULI E.G., TORRES-PACHECO I., MORENO- MARTINEZ E., MIRANDA-CASTRO S.P. Chitosan application in maize (*Zea mays*) to counteract the effects of abiotic stress at seedling level. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 34, p. 6439-6446, 2011.

LOBELL, D. B.; SCHLENKER, W.; COSTA-ROBERTS, J. Climate trends and global crop production since 1980. **Science**, v. 333, n. 6042, p. 616-20, 2011.

MARTINS, J. D.; CARLESSO, R.; KNIES, A. E.; OLIVEIRA, Z. B.; BROETTO, T.; RODRIGUES, G. J. Potencial hídrico foliar em milho submetido ao déficit hídrico. **Irriga**, v. 15, n. 3, p. 324-334, 2010.

MAGALHÃES. P. C.; DURÃES, F. O. M. Fisiologia da produção. In: CRUZ, J. C. et al (Ed.) A cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, p 63-87, 2008.

MATTNER, S. W.; WITE, D.; RICHES, D. A.; PORTER, I. J.; ARIOLI, T. The effect of kelp extract on seedling establishment of broccoli on contrasting soil types in southern Victoria, Australia. **Biological Agriculture and Horticulture**, v. 29, p. 258-270, 2013.

MONDAL, M. M. A.; PUTEH, A. B.; DAFADER, N. C.; RAFII, M. Y.; MALEK, M. A. Foliar application of chitosan improves growth and yield in maize. **Journal of Food, Agriculture e Environment**, v.11, p. 520-523. 2013.

MOURYA, V. K.; INAMDAR, N. N. Chitosan-modifications and applications: opportunities galore, **Reactive and Functional Polymers**, v. 68, p. 1013-1051, 2008.

MUSCOLO, A.; JUNKER, A.; KLUKAS, C.; WEIGELT-FISCHER, K.; RIEWE, D.; ALTMANN, T. Phenotypic and metabolic responses to drought and salinity of four contrasting lentil accessions. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, p. 5467-80, 2015.

MUNOZ, G.; VALENCIA, C.; VALDERRUTEN, N.; RUIZ-DURÁNTEZ, E.; ZULUAGA, F. Extraction of chitosan from *Aspergillus niger* mycelium and synthesis of hydrogels for controlled release of betahistine. **Reactive and Functional Polymers**, v. 91, p. 1-10, 2015.

NGUYEN, A. D.; VO, T. P. K.; TRAN, T. D. Research on impact of chitosan oligomers on biophysical characteristics, growth, development and drought resistance of coffee. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 751-755, 2011.

NWE, N.; FURUIKE, T.; TAMURA, H. Production: properties and applications of fungal cell wall polysaccharides: chitosan and glucan. **Advances in Polymer Science**, v. 244, p. 187-208, 2011.



OHTA, K.; MORISHITA, S.; SUDA, K.; KOBAYASHI, N.; HOSOKI, T. Effects of chitosan soil mixture treatment in the seedling stage on the growth and flowering of several ornamental plants. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v. 73, p. 66-68, 2004.

PICHYANGKURA, R.; CHADCHAWAN, S. Biostimulant activity of chitosan in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 49-65, 2015.

PONGPRAYOON, W.; ROYTRAKUL, S.; PICHAYANGKURA, R.; CHADCHAWAN, S. The role of hydrogen peroxide in chitosan-induced resistance to osmotic stress in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 70, p. 159-173, 2013.

PORNIENPAKDEE, P.; SINGHASURASAK, R.; CHAIYASAP, P.; PICHYANGKURA, R.; BUNJONGRAT, R.; CHADCHAWAN, S.; LIMPANAVECH, P. Improving the micropropagation efficiency of hybrid Dendrobium orchids with chitosan. **Scientia Horticulturae**, v. 124, p. 490-499, 2010.

POSPISILOVA, J. Participation of phytohormones in the stomatal regulation of gas exchange during water stress. **Biologia Plantarum**, v. 46, p. 491-506, 2003.

RAAFAT, D.; VON BARGEN, K.; HAAS, A., SAHL, H.G. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 7455-7455, 2008.

RAMÍREZ, M. A.; A RODRÍGUEZ, A. T.; ALFONSO, L.; PENICHE, C. CHITIN AND ITS derivatives as biopolymers with potential agricultural applications. **Biotecnología Aplicada**, v.7, p. 270-276, 2010.

ROBERTS, G. A. F. Chitin Chemistry, Macmillan, Indianapolis, USA, p. 274-301, 1992.

SANTOS, A.O.; PRADO, H., Análise de interações solo-planta-clima em zonas diferenciadas de área de cultivo de milho, **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 6, n. 1, p. 101–106, 2002.

SENCADAS, V.; CORREIA, D. M.; RIBEIRO, C.; MOREIRA, S.; BOTELHO, G.; GÓMEZ RIBELLES, J. L.; LANCEROS-MENDEZ, S. Physical-chemical properties of cross-linked chitosan electrospun fiber mats. **Polymer Testing**, v. 31, p. 1062-1069, 2012.

SHARMA, S. H. S.; LYONS, G.; MCROBERTS, C. Biostimulant activity of brown seaweed species from Strangford Lough: compositional analyses of polysaccharides and bioassay of extracts using mung bean (*Vigna mungo* L.) and pak choi (*Brassica rapa chinensis* L.). **Journal of Applied Phycology**, v, 24, p. 1081-1091, 2012.

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**, v. 3, p.757-793, 2013.

SINGLA, A. K.; CHAWLA, M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects – an update. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p. 1047-1067, 2001.

- SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.
- SOUZA, T. C. de; CASTRO, E. M. de; MAGALHÃES, P. C.; LINO, L. de O.; ALVES, E. T.; ALBUQUERQUE, P. E. P. de. Morphophysiology, morphoanatomy, and grain yield under field conditions for two maize hybrids with contrasting response to drought stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 3201-3211, 2013.
- SYVERTSEN, J. P.; LLOYD, J. J. Citrus. In: SCHAEFFER, B.; ANDERSEN, P. C. (eds), Handbook of Environmental Physiology of Fruits Crops: Sub-tropical and Tropical Crops, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1994.
- TAIZ, L. Agriculture, plant physiology, and human population growth: past, present, and future. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 25, n. 3, p.167-181, 2013.
- LIN, W. L.; HU, X. Y.; ZHANG, W. Q.; ROGERS, W. J. CAI, W.M. Hydrogen peroxidemediates defence responses induced by chitosans of different molecular weights in rice. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 937-944, 2005.
- THADATHIL, N.; VELAPPAN, S. P.; Recent developments in chitosanase researchand its biotechnological applications: a review. **Food Chemistry**, v. 150, p. 392-399, 2014.
- TROTEL-AZIZ, P.; COUDERCHET, M.; VERNET, G.; AZIZ, A. Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*, **European Journal of Plant Pathology**, v. 114, n. 4, p. 405-413, 2006.
- WERLE, A.J.K.; NICOLAY, R.J.; SANTOS, R.F.; BORSOI, A.; SECCO, D. Avaliação de híbridos de milho convencional e transgênico (Bt), com diferentes aplicações de inseticida em cultivo safrinha. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, v. 4, n. 1, p. 150-159, 2011.
- XU, Z.; ZHOU, G.; SHIMIZU, H. Plant responses to drought and rewatering. **Plant Signaling. Behavior**, v. 5, p. 649-654, 2010.
- YIN, Y. G.; KOBAYASHI, Y.; SANUKI, A.; KONDO, S.; FUKUDA, N.; EZURA, H. Salinity induces carbohydrate accumulation and sugar-regulated starch biosynthetic genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. "Micro-Tom") fruits in an ABA- and osmotic stress-independent manner. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, p. 563-574, 2010.
- YIN, H.; LI, Y.; ZHANG, H. Y.; WANG, W. X.; LU, H.; GREVSEN, K.; ZHAO, X. M., DU, Y. G. Chitosan oligosaccharides-triggered innate immunity contributes to oil seed rape resistance against *Sclerotinia sclerotiorum*. **International Journal of Plant Sciences**, v. 174, p. 722-732, 2013.
- YOUNG, D. H.; KOHLE, H.; KAUSS, H. **Plant Physiology**, v. 70, p. 1499-1454, 1982.

ZHANG, H. Y.; ZHAO, X. M.; YANG, J. L.; YIN, H.; WANG, W. X.; LU, H.; DU, Y. G. Nitricoxide production and its functional link with OIPK in tobacco defense response elicited by chitooligosaccharide. **Plant Cell Reports**, v. 30, p. 1153-1162, 2011.

ZHANG, X.; SCHMIDT, R. E. Biostimulating turfgrasses. **Ground Maint**, v. 34, p. 14-32, 1999.

ZHAO, X. M.; SHE, X. P.; DU, Y. G.; LIANG, X. M. Induction of antiviral resistance and stimulatory effect by oligochitosan in tobacco. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 87, p. 78-84, 2007.

ZENG, S.; LUO, R. Application of bioactive coating based on chitosan for soybean seed protection. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, p. 1-5, 2012.

ZIOSI, V.; ZANDOLI, R.; DI NARDO A. Biological activity of different botanical extracts as evaluated by means of an array of in vitro and in vivo bioassays. **Acta Horticulturae**, v. 1009, p. 61-66, 2013.

## ANEXO A

### **Artigo: Ação dos derivados N-succinílico e N, O-dicarboximetílico de quitosana na fotossíntese e fluorescência da clorofila em milho sensível à seca**

Caroline Oliveira dos Reis<sup>1</sup>, Paulo César Magalhães<sup>2</sup>, Roniel Geraldo Avila<sup>3</sup>, Lorena Gabriela Almeida<sup>3</sup>, Valquíria Mikaela Rabelo<sup>1</sup>, Diogo Teixeira Carvalho<sup>4</sup>, Daniela Ferreira Cabral<sup>5</sup>, Décio Karam<sup>2</sup>, Thiago Correa de Souza<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ciências da Natureza, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Brasil

<sup>2</sup> Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo (Embrapa), Sete Lagoas, Brasil

<sup>3</sup> Setor de Fisiologia vegetal, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil

<sup>4</sup> Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Brasil

<sup>5</sup> Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Brasil

**Corresponding author:** Thiago Corrêa de Souza, Professor pesquisador da Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Brasil

**Tel.:** 55 (35) 370 , **E-mail:** thiago.souza@unifal-mg.edu.br

#### **Resumo**

A quitosana induz a tolerância de plantas a vários estresses abióticos, incluindo à seca. No entanto, seu uso pode ser limitado devido a sua constituição e sua baixa solubilidade em água. Assim modificações químicas foram propostas neste trabalho com o objetivo de aumentar a hidrossolubilidade da quitosana e potencializar os seus efeitos biológicos em plantas de milho. Os derivados (*N*-succinílico e *N,O*-dicarboximetílico) e a quitosana foram aplicados via foliar em híbrido de milho sensível a seca sob déficit hídrico no pré-florescimento. O estresse hídrico foi mantido por 15 dias e as análises realizadas no início e final do estresse e também na reidratação. Foram avaliados o potencial hídrico, as trocas gasosas, a fluorescência da clorofila e o teor de pigmentos cloroplastídicos. Segundo os resultados, a utilização dos derivados modulou os parâmetros da fotossíntese, afetando os mecanismos envolvidos na mesma, como a atividade estomática, eficiência do uso da água e atividades do fotossistema II. A fluorescência da clorofila *a* indicou que o complexo-antena foi danificado pela condição de déficit hídrico, havendo uma diminuição do fluxo de energia na cadeia transportadora de elétrons e na fase fotoquímica da fotossíntese. Entretanto, a pulverização de derivados de quitosana, potencializou as atividades como indutoras de tolerância ao estresse hídrico da mesma, por estarem mais biodisponíveis as plantas. O estresse hídrico diminui o teor dos pigmentos, porém tanto a aplicação de quitosana quanto dos derivados aumentaram estes teores. Concluiu-se que os derivados de quitosana melhoraram os parâmetros fotossintéticos no milho sensível a seca induzindo a tolerância a este estresse e isso pode estar relacionado à maior hidrossolubilidade dos mesmos o que afeta diretamente a sua biodisponibilidade na planta.

**Palavras-chave:** déficit hídrico, *Zea mays* L., trocas gasosas, teor de clorofila, quenching.

## Introdução

Um dos maiores desafios enfrentados hoje no mundo em relação à segurança alimentar refere-se a pressão sobre os recursos naturais, principalmente a disponibilidade de água. A água desempenha várias funções dentro das plantas, incluindo atuar como transportadora de solutos e nutrientes, como suporte estrutural por meio da pressão de turgor e como reagente na fotossíntese. Sua ausência tem um impacto direto na produção da planta, principalmente pelos desarranjos provocados na maior parte dos componentes fotossintéticos, incluindo o transporte de elétrons nos tilacoides e a fixação do CO<sub>2</sub> pela diminuição da abertura estomática e/ou pela inibição das enzimas do ciclo de Calvin (Anjum et al. 2011, Souza et al. 2013). Portanto, a habilidade das plantas para resistir a tal estresse é de suma importância para o desenvolvimento do agronegócio de qualquer país, principalmente em grandes culturas como o milho.

A agricultura irrigada tem uma contribuição importante para produção agrícola, produzindo cerca de 40% dos alimentos e commodities agrícolas em 17% das terras cultivadas. A irrigação usa mais de 70% da água retirada dos rios. Um aumento no uso de irrigação para satisfazer as necessidades alimentares nos próximos anos será, no entanto, inviável em razão da diminuição dos recursos hídricos e crescente competição por água limpa. A dependência sobre a água torna-se uma restrição crítica sobre os progressos e ameaça diminuir o desenvolvimento, colocando em risco o abastecimento de alimentos e agravando a pobreza rural (FAO 2002). Estratégias de mitigação dos prejuízos advindos da falta de água vêm sendo adotadas, visando o estudo e desenvolvimento de genótipos tolerantes (melhoramento genético) e de produtos conhecidos como bioestimulantes que aplicados nas plantas induzem a tolerância ao déficit hídrico (Souza et al. 2013, Calvo et al., 2014, Patrick 2015, Martins et al. 2018).

Neste contexto, a quitosana que é formada por unidades de N-acetilglicosamina e glicosamina, vem trazendo vários benefícios para a agricultura devido as suas propriedades biológicas, alta biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixa toxicidade, fonte renovável e elevada abundância. (Badawy e Rabea 2011). A quitosana é o principal derivado da quitina e é obtida por desacetilação parcial (acima de 50%) ou total da mesma. A quitosana possui três grupos reativos (susceptíveis a substituições), que são a hidroxila primária no carbono 6, a hidroxila secundária no carbono 3 e o grupo amino no carbono 2. Cada um desses grupos químicos pode ser objeto de modificações químicas (semisínteses) que podem alterar as propriedades físicas, mecânicas e biológicas. Vale ressaltar, que o grupo amino é geralmente mais escolhido por ser mais reativo que as hidroxilas e por estar em grande quantidade na quitosana que contém alto grau de desacetilação (menor quantidade de grupo acetila ligado ao grupo amina) (Jayakumar et al. 2008, Badawy e Rabea, 2011).

A quitosana pode aumentar o crescimento e desenvolvimento das plantas sob condições normais e sob estresse hídrico alterando positivamente várias características. A aplicação do biopolímero levou um aumento na altura de plantas, número de ramificações da parte aérea, número de folhas, área foliar, atributos de biomassa e rendimento de grãos em diversas espécies de plantas como milho (Guan et al. 2009, Lizárraga-Paulín et al. 2011, Mondal et al. 2013, Martins et al. 2018), feijão (Ibrahim e Ramadan 2015), soja (Lee et al. 2005), trigo (Wang et al. 2015), arroz (*Oryza sativa* L.) (Boonlertnirun et al. 2006, Pongprayoon et al. 2013, Chamnanmanoontham et

al. 2015), milho (Sharathchandra et al. 2004), café (Dzung et al. 2011) dentre outras. Ainda existem poucas pesquisas sobre o uso desses biopolímeros no estímulo de respostas fisiológicas para tolerância ao estresse hídrico. Resultados das últimas décadas têm indicado que a quitosana possui potencial para ser desenvolvida como um antitranspirante em situações agrícolas de estresse, induzindo à tolerância ao déficit hídrico 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 (Iriti et al. 2009, Zeng e Luo 2012, Pongprayoon et al. 2013, Sharp 2013).

A maioria dos trabalhos envolvendo derivatização da quitosana são voltados para a atividade biológica com aplicação médica e com aplicação na agricultura para combate de pragas e doenças (Laranjeira e Fávère 2009, Ramírez et al. 2010) sendo pouco explorado a capacidade de induzir tolerância ao déficit hídrico. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi sintetizar dois derivados de quitosana e caracterizar seus efeitos na fotossíntese e fluorescência da clorofila em híbrido de milho sensível à seca. A racionalidade envolvida na proposta dos derivados é que a adição dos grupos *N*-succinílico (SUC) e *N,O*-dicarboximetílico (MCA) à estrutura da quitosana poderiam aumentar sua solubilidade em água e então, em função de maior biodisponibilidade na planta, aumentar suas atividades como indutoras de tolerância ao déficit hídrico.

## Material e métodos

### *Síntese dos derivados SUC e MCA*

A quitosana utilizada para obtenção dos derivados possui uma porcentagem de desacetilação (DDA%) de 63,5% (Martins et al., 2018). A estrutura dos derivados e da quitosana podem ser evidenciados na Figura 1. Ambos os derivados sintetizados possuem cadeias com grupos ácido carboxílico, as quais foram inseridas na quitosana de partida via seus grupos amina (SUC) ou amina+hidroxila (MCA).

Para a semissíntese do SUC (Fang Li e Ding 2013), a quitosana (Galena Química e Farmacêutica Ltda) (1 g) foi dissolvida, sob agitação magnética e temperatura ambiente, em 100 mL de solução aquosa de ácido acético glacial a 1% (v/v). Na sequência, foi adicionada, gota a gota e ainda sob agitação, uma solução de anidrido succínico (1,8 g) em acetona (20 mL). A mistura formada foi submetida a irradiação ultrassônica de 40-50 Hz em banho a 50°C por 60 min. Então, a solução resultante foi resfriada até a temperatura ambiente, foi adicionado álcool etílico hidratado (100 mL) e a mistura transferida para freezer onde permaneceu por 24 h. Após este período, adicionou-se solução aquosa de hidróxido de sódio a 1 mol L<sup>-1</sup> até que o pH = 10. Em seguida, adicionou-se acetona até que ocorresse a precipitação do produto como uma massa caseosa e esbranquiçada. A mistura foi novamente acondicionada em freezer pelo prazo de 48 horas. Após este tempo, o produto foi separado por filtração a pressão reduzida, utilizando-se álcool etílico (cerca de 1000 mL) para lavagem do sólido retido, que foi revolvido com bastão de vidro durante todo este processo de limpeza. O produto final foi obtido na forma de um sólido amorfo, grosseiro e branco-amarelado após secagem em dessecador sob vácuo e protegido da luz. Utilizando-se o mesmo procedimento, quantidades adicionais do produto foram obtidas.

Para a semissíntese do MCA (Liu et al. 2001) a quitosana (5 g) foi adicionada a álcool isopropílico (60 mL) sob agitação magnética a temperatura ambiente. Adicionou-se então solução aquosa (12 mL) de hidróxido de sódio a 10 mol.L<sup>-1</sup>, dividida em cinco porções, durante um período de 25 min. Agitou-se a mistura magneticamente por 30 min a temperatura ambiente. Na sequência, adicionou-se ácido monocloroacético (30 g) dividido em cinco porções ao longo de cinco minutos. Aqueceu-se a mistura formada a 70°C com agitação magnética por 3 h. Então,

resfriou-se a mistura reagente e o produto sólido obtido foi separado por filtração a vácuo e lavado com metanol absoluto (100 mL). Secou-se o produto em estufa rapidamente a uma temperatura de 60°C o que resultou em um sólido amarelo. Quantidades adicionais do produto foram obtidas utilizando-se o mesmo procedimento.

#### *Condições locais e material vegetal*

O experimento foi conduzido em casa de vegetação localizada na Embrapa Milho e Sorgo, na cidade de Sete Lagoas - MG (latitude 19°28'S, longitude 44°15'08''W e 732 m de altitude). As médias de temperaturas registradas durante o período de avaliação foram máxima de 36,3°C e mínima de 17,6°C. A umidade relativa do ar oscilou entre 72% a 30%. Utilizaram-se duas plantas por vaso de 20 litros, preenchidos previamente com solo do tipo Latossolo Vermelho Distrófico Típico. A adubação foi feita de acordo com a recomendação da análise química do solo, aplicando-se no momento do plantio 10 g de 08-28-16 a cada 20 kg de solo. A cobertura foi realizada aplicando-se 6 g de sulfato de amônio por vaso aos 30 e 60 dias após o plantio. As plantas foram irrigadas regularmente mantendo uma ótima umidade do solo até a imposição do estresse. Todos os tratamentos fitossanitários necessários a cultura foram realizados. O material vegetal utilizado foi o híbrido BRS 1030 oriundo do Programa de Melhoramento da Embrapa e caracterizado como sensível a seca (Souza et al., 2013a; Souza et al., 2014). Foram plantadas três sementes por vaso, e após a germinação, foi realizado o desbaste, deixando assim duas plantas por vaso.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), compreendendo 5 condições (Controle Irrigado, Controle Estressado, Estressado com Quitosana, Estressado com SUC e Estressado com MCA) e 6 repetições, totalizando 30 vasos.

#### *Imposição do estresse e aplicação de quitosana e derivados*

O potencial hídrico do solo foi monitorado diariamente nos períodos da manhã e da tarde (9:00 e 15:00), com o auxílio de tensiômetro (Watermark modelo 200SS, Irrrometer, Califórnia, EUA), instalado no centro dos vasos de cada repetição, na profundidade de 20 cm. Estes sensores detectam a tensão de água no solo com base na resistência elétrica e foram acoplados a medidores digitais (Watermark meter) da mesma empresa. Os valores variam de 0 MPa (totalmente úmido) a -2,00 MPa (totalmente seco). A reposição hídrica foi realizada com base nas leituras obtidas com o sensor e a água foi repostada até a capacidade de campo (CC) durante o período que antecedeu a imposição dos tratamentos. Esses cálculos foram realizados com o auxílio de uma planilha eletrônica, feita em função da curva de retenção de água do solo.

Quando as plantas atingiram o estágio de pré-florescimento, os tratamentos foram impostos. O tratamento irrigado consistiu na irrigação diária até o solo alcançar umidade próxima a capacidade de campo (tensão da água no solo de aproximadamente -0,18 MPa), enquanto que para os tratamentos não irrigados, a irrigação foi realizada aplicando-se 50 % da água total disponível, ou seja, até a tensão da água no solo atingir -1,38 MPa, cujo valor corresponde ao solo especificado.

Quando as plantas atingiram o estresse hídrico planejado (tensão da água no solo -1,38 MPa), foram realizadas pulverizações com quitosana e com os derivados SUC e MCA na concentração de 0,5 mg planta<sup>-1</sup>, através de um pulverizador costal pressurizado a CO<sub>2</sub> (2,15 kg f cm<sup>2</sup>) equipado com bico tipo XR – Teejet 110.02 VS, aplicando o equivalente a 120 L ha<sup>-1</sup> de calda. O déficit hídrico foi mantido por 15 dias. As análises foram

realizadas 24 h após a pulverização (1DAA), no final do período de estresse hídrico (15 dias de estresse, 15DAA), e 24 h após o reestabelecimento hídrico (reidratação), no qual o solo voltou a receber irrigação até atingir valores de potencial próximos aos da capacidade de campo. Durante esse período foram analisadas as seguintes variáveis: trocas gasosas foliares, fluorescência da clorofila e teor de clorofila a, b e carotenoides.

#### *Medidas de trocas gasosas*

As medidas de trocas gasosas foram feitas através de um sistema portátil de fotossíntese (IRGA, Model LI-6400 XT, Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA). Todas as medidas foram realizadas no período da manhã entre 8:00 e 12:00 em uma folha totalmente expandida (folha da espiga). As variáveis avaliadas foram taxa fotossintética ( $P_n$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), transpiração (E), concentração intercelular de  $CO_2$  ( $C_i$ ), eficiência do uso da água (WUE), relação carbono interno/carbono externo ( $C_i/C_a$ ) e eficiência da carboxilação (CE). As medidas foram feitas em uma área foliar de  $6\text{ cm}^2$ , com fluxo de  $CO_2$  controlado na concentração de  $380\text{ }\mu\text{mol CO}_2\text{ mol}^{-1}\text{ ar}$ . A densidade de fluxo de fótons (PPFD) foi de  $1500\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  com fonte de luz LED azul-vermelho (6400-02B LED) e temperatura foliar controlada ( $30^\circ\text{C}$ ).

#### *Medidas de fluorescência da clorofila*

Na medição dos parâmetros da fluorescência da clorofila a, foi utilizado um fluorômetro modulado Mini-PAM (Heinz Walz, Effeltrich, Germany). Após uma adaptação de 30 min no escuro, foi medida a fluorescência mínima ( $F_o$ ) com uma luz suficientemente baixa evitando reações fotoquímicas e a fluorescência máxima ( $F_m$ ), aplicando-se por 0,8 segundos um pulso de luz saturante de  $7000\text{ }\mu\text{m de fótons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ . Nas amostras adaptadas no escuro, a máxima eficiência do fotossistema (PS II) foi estimada pela razão  $F_v/F_m$ . Em seguida as folhas foram iluminadas com luz actínica com intensidade de  $1500\text{ }\mu\text{mol de fótons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ . Então a fluorescência constante ( $F_s$ ) foi obtida e em seguida outro pulso de luz saturante foi aplicado por 1 s para obtenção da fluorescência máxima emitida pelas folhas ( $F_m'$ ). A luz actínica foi removida e as folhas foram irradiadas com luz vermelho-distante, para obtenção de  $F_o$  adaptado a luz ( $F_o'$ ). O *quenching* fotoquímico foi calculado como  $qP = (F_m' - F_s)/(F_m' - F_o')$ , e o *quenching* não fotoquímico foi calculado como  $NPQ = (F_m - F_m')/F_m'$ . Outros parâmetros também foram avaliados como: taxa de transporte de elétrons (ETR) =  $[(F_m' - F_s)/F_m'] \times \text{PPFD} \times 0,5 \times 0,84$ ; produção quântica fotoquímica efetiva adaptada à luz (YII) =  $F_m' - F_s/F_m' = \Delta F/F_m'$ , rendimento quântico de dissipação regulada de energia não fotoquímica do FSII,  $YNPQ = F_s/F_m' - F_s/F_m$ , rendimento quântico de dissipação não-regulada de energia não fotoquímica do FSII,  $YNO = F_s/F_m$  (van Kooten e Snel 1990; Genty et al., 1996).

#### *Clorofila a, b e carotenoides*

A extração das clorofilas e carotenoides foi realizada a partir de 100 mg de tecido foliar macerado em gral e pistilo na presença 3,0 mL de acetona 80 % (Arnon 1949) durante 5 min seguido de filtração, procedimento este repetido três vezes com o resíduo que permaneceu no papel de filtro. O filtrado foi misturado e centrifugado a 3500 rpm por 20 min. O volume final ajustado em 10 mL com água destilada. Durante o procedimento os tubos foram protegidos da luz com papel alumínio. As leituras, realizadas em 470 (A470), 647 (A647) e 663 nm (A663), e as concentrações de clorofila a, b e carotenóides totais calculados pelas seguintes equações:



Clorofila a (ug/mL): 12,25 A663 - 2,79 A647

Clorofila b (ug/mL): 21,50 A647 - 5,10 A663

Carotenóides (ug/mL):  $(1000 A470 - 1,82 [Cl a] - 85,02 [Cl b])/198$ .

### **Análise dos dados**

Foram calculadas as médias e o  $\pm$  erro padrão (SE) para cada parâmetro. Para análise estatística dos resultados foi realizada uma comparação entre os tratamentos em cada dia após a aplicação (1DAA = um dia após a aplicação, 15 DAA – 15 dias após a aplicação e rehydration) e foi utilizada a análise de variância (ANAVA) e o teste de comparação de médias Scott Knott, a 0,05 % de significância ( $P \leq 0.05$ ), no programa Sisvar versão 4.3 (Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil).

### **Resultados**

#### *Análise do potencial hídrico e trocas gasosas*

A análise de variância para o potencial hídrico ( $\Psi$  MPa) e para as trocas gasosas: taxa fotossintética ( $P_n$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), concentração intercelular de  $CO_2$  ( $C_i$ ), eficiência do uso da água (WUE), eficiência da carboxilação (CE), foi significativa ( $P \leq 0.05$ ). Diferente dos demais parâmetros, a primeira análise do potencial hídrico foi realizada somente no sétimo dia após a aplicação (7DAA). Com sete e quinze dias de déficit hídrico, em geral, as plantas que foram submetidas a esse estresse, assim como esperado, apresentaram menores potenciais hídricos em relação as que foram irrigadas normalmente durante todo o período de avaliação. No entanto, quando reidratadas, plantas sob déficit hídrico e tratadas com SUC (SC+SUC) e MCA (SC+MCA), demonstraram uma melhor capacidade de recuperação, apresentando maiores valores de potencial hídrico, sendo até maiores que os obtidos pelo controle irrigado (IC).

Para a taxa fotossintética ( $P_n$ ), no primeiro dia de estresse (1DAA) observou-se que os tratamentos que receberam a quitosana e os derivados apresentaram um decréscimo da mesma (Fig. 2A). Contudo aos 15 dias de estresse (15DAA) a aplicação de MCA levou a uma maior taxa fotossintética em relação ao tratamento que não recebeu as moléculas (SC) e que recebeu a quitosana (SC+CH) (Fig. 2A) e o derivado SUC (SC+SUC). Na reidratação a taxa fotossintética dos tratamentos com quitosana e derivados retomaram a valores semelhantes ao controle (Controle irrigado - IC), exceto no tratamento controle estressado (SC).

No primeiro dia de estresse (1DAA), os tratamentos com aplicação da quitosana e MCA promoveram uma diminuição na condutância estomática ( $g_s$ ) em relação ao tratamento controle estressado (SC). Os derivados SUC e MCA se destacaram no final do período de estresse (15DAA), obtendo maiores médias de  $g_s$ . Na reidratação, esses tratamentos apresentaram menor condutância em relação aos controles (IC e SC) (Fig. 2B).

As plantas de milho tratadas com quitosana, SUC obtiveram maior  $C_i$ , no primeiro dia de estresse (1DAA) e no décimo quinto (15DAA). Já o derivado MCA apresentou  $C_i$  semelhantes aos controles ao final do período de estresse (15DAA). Na fase de reidratação das plantas, todos os tratamentos com adição das moléculas, foram estatisticamente iguais e inferiores aos controles, irrigado e não irrigado (Fig. 2D).

Com relação a eficiência do uso da água (WUE), no primeiro dia de estresse (1DAA), o tratamento com a molécula MCA apresentou maiores médias quando comparado aos demais tratamentos. Este mesmo resultado foi observado na reidratação das plantas (Fig. 2E).

No primeiro dia após a aplicação (1DAA), as plantas que receberam o tratamento com quitosana e seus derivados, tiveram menor eficiência da carboxilação (Pn/Ci), em relação aos controles (IC e SC). Ao final do período de estresse hídrico, o híbrido BRS 1030 apresentou maior Pn/Ci em plantas pulverizadas com quitosana e SC+MCA e após o reestabelecimento hídrico, plantas tratadas com quitosana, SUC e MCA, foram estatisticamente superiores aos demais tratamentos para a variável em estudo (Fig. 2F).

#### *Florescência da Clorofila "a"*

Durante o primeiro dia de avaliação (1DAA), plantas tratadas com MCA, foram superiores que os demais tratamentos para a variável produção quântica fotoquímica efetiva adaptada à luz (YII) ( $P \leq 0.05$ ) (Fig. 3A). Aos 15 dias de estresse hídrico (15DAA) foi observado a mesma resposta com maior YII para as moléculas SUC e MCA. Os resultados da taxa de transporte de elétrons (ETR) seguiram as mesmas tendências encontradas para o rendimento quântico efetivo do FSII (YII) sendo que os tratamentos SC+SUC e SC+MCA apresentaram maior ETR e semelhante ao controle irrigado (IC) durante todo período de estresse e reidratação (Fig. 3B).

No primeiro dia após a aplicação (1DAA), os tratamentos controle irrigado (IC) e o derivado SUC apresentaram maior quenching fotoquímico (qP). Aos 15 dias de estresse hídrico (15DAA) e na reidratação não houve diferença entre os tratamentos. (Fig. 3C).

Com relação ao quenching não fotoquímico (NPQ) foi possível observar que no primeiro dia após a aplicação de quitosana e seus derivados (1DAA), não houve diferença estatística entre os tratamentos (Fig. 3D). Já ao final do período de estresse (15DAA) apenas a aplicação de MCA induziu uma diminuição do NPQ, porém na reidratação este derivado apresentou maior quenching não fotoquímico. (Fig. 3D).

Houve apenas uma redução no rendimento quântico de dissipação regulada de energia não fotoquímica do FSII (YNPQ) com o tratamento estresse hídrico (SC) no 1DAA, mas as aplicações não modificaram este parâmetro aos 15DAA e na reidratação (Fig. 4A). Entretanto a aplicação de SUC e MCA diminuíram o rendimento quântico de dissipação não-regulada de energia não fotoquímica do FSII (YNO) no início do estresse (1DAA) (Fig. 4B). No processo de reidratação o derivado MCA ainda diminuiu o YNO.

A utilização de SUC e MCA foi responsável por menor fluorescência inicial ( $F_0$ ) em 15DAA e na reidratação (Fig. 4C),

No primeiro dia de estresse e aos 15 dias (1DAA e 15DAA) não houve diferenças entre os tratamentos para a máxima eficiência do fotossistema (PSII) ( $F_v/F_m$ ) (Fig. 4D).

#### *Análise dos teores de clorofila*

Nas análises de teores de clorofilas notou-se que em todos os pigmentos (exceto clorofila B) a aplicação de quitosana seguida dos derivados apresentaram maiores médias quando comparadas ao controle não irrigado (SC) (Tab. 1).

## Discussão

Segundo Boyer (1970), a fotossíntese máxima ocorre com potenciais hídricos foliares entre -0,6 a -0,8 MPa. Os derivados de quitosana proporcionaram uma boa capacidade de recuperação do potencial hídrico das plantas quando essas voltaram a receber a irrigação normalmente, assim como o ilustrado na Fig. 1A e B. É possível observar que os potenciais estão dentro da faixa supracitada pelo autor (Boyer 1970), e os dados da fotossíntese também acompanharam o observado pelo mesmo, sendo maiores durante a reidratação.

Uma das primeiras respostas que ocorrem sob exposição à seca é o fechamento estomático seguido da diminuição da taxa fotossintética ( $P_n$ ) (Souza et al. 2013). Assim sendo, plantas de milho submetidas a déficit hídrico, e que foram tratadas com os derivados de quitosana, passaram por fechamento estomático no início do estresse, o que acarretou em diminuição da condutância estomática (gs) e por consequência na taxa fotossintética ( $P_n$ ). As pesquisas apontam a quitosana como antitranspirante nas primeiras horas do estresse atuando no fechamento estomático (Pospisilova 2003, Iriti et al. 2009). E os tratamentos em que aplicou-se os derivados e a quitosana aumentaram essa resposta no início do estresse hídrico. Esse aumento pode ser importante para a adaptação das plantas de milho no início do estresse já que constitui um mecanismo de tolerância à seca (Yao et al. 2013). Essa diminuição da condutância e transpiração pela quitosana é induzida por mensageiros químicos de  $H_2O_2$  e pelo ABA, que limitam as trocas gasosas (Lee et al. 1999, Iriti et al. 2009, Khokon et al. 2010, Pongprayoon et al. 2013). Assim o derivado MCA parece estar induzindo mais que a própria quitosana, a produção de ABA e de outros mensageiros nas primeiras 24 h. Mais interessante ainda é a atuação dos dois derivados (principalmente o MCA) após os 15 dias de estresse (15DAA) que aumentaram significativamente as trocas gasosas ( $P_n$ , gs, E) quando comparado com a quitosana e o controle estressado (SC). Um aumento da fotossíntese e da condutância estomática também foi verificado na aplicação de quitosana em soja e milho por Khan, Prithiviraj e Smith (2002). Variabilidade genética para a tolerância à seca foi encontrada em cultivares de milho que apresentaram maior fotossíntese ( $P_n$ ) e condutância estomática (gs) frente ao estresse hídrico prolongado (Carvalho et al. 2011, Souza et al. 2013).

Essa indução da tolerância no milho pelo aumento significativo da fotossíntese (trocas gasosas e reações fotoquímicas) pelos derivados de quitosana podem ter acontecido devido à atuação dessas moléculas em processos a nível fisiológico e molecular das folhas como aumento dos mecanismos de defesa contra as espécies reativas de oxigênio (EROS) (Sharp 2013, Katiyar et al. 2015) ou pela atuação em genes do núcleo e cloroplasto envolvendo o processo fotossintético (Chamnanmanoontham et al. 2015). Vários trabalhos evidenciam que doses de quitosana pulverizadas nas folhas resultem em menor peroxidação lipídica (estabilidade nas membranas) e uma maior atividade enzimática antioxidante, maior teor de compostos não enzimáticos antioxidantes (ácido ascórbico, compostos fenólicos e outros) sob condição de seca (Choudhary et al. 2017, Pirbalouti et al. 2017, Povero et al. 2011, Mondal et al. 2012, Karimi et al. 2012, Yang et al. 2009). Em *Dendrobium* sp a quitosana teve sua maior ação nos cloroplastos (Limpanavech et al. 2008) e a quitosana aplicada em arroz aumentou positivamente a expressão de proteínas localizadas em sua maioria no cloroplasto indicando que o alvo principal de ação da quitosana é esta organela (Chamnanmanoontham et al. 2015).

Neste trabalho os derivados e também a quitosana elevaram a concentração intercelular de  $CO_2$  ( $C_i$ ) no início do estresse. Esses resultados também foram encontrados por Iriti e colaboradores (2009) trabalhando com aplicação de quitosana em feijão no início do estresse. Estes dados corroboram com menor eficiência de

carboxilação (Pn/Ci) também encontrado em nosso trabalho no início do estresse. Isso indica que pode estar ocorrendo alguma limitação não estomática envolvendo as enzimas carboxilativas da fotossíntese do milho (Perdomo et al. 2017). Souza e colaboradores (2013) trabalhando com o mesmo híbrido de milho (BRS1030) também observaram uma limitação não estomática nessas plantas sob seca, contudo essa limitação não estomática foi diminuída com o tratamento MCA ao longo do estresse em nosso trabalho. Aos 15 DAA, porém, a quitosana e o MCA preveniram a redução na eficiência carboxilativa, apresentando mesmo Pn/Ci que o tratamento controle irrigado.

Fato interessante de destacar é que o derivado MCA, em geral, potencializou significativamente a eficiência do uso da água (WUE) ao longo do estresse mostrando que este derivado induz uma maior economia de água por carbono fixado. Este parâmetro é um grande indicador de tolerância ao estresse hídrico em plantas do tipo C4 como o milho (Araus et al. 2010; Lopes et al. 2011; Souza et al. 2013b; Hasan et al. 2017). Em plantas de feijão a quitosana com 85% de desacetilação não aumentou EUA (Iriti et al. 2009). O derivado MCA pulverizado neste trabalho ainda resultou em maior EUA na reidratação fato ainda não evidenciado em trabalhos com aplicação foliar de quitosana.

Esta característica do híbrido de milho BRS1030 de ser sensível a seca pode ser observada neste trabalho também pelos valores encontrados nos parâmetros de fluorescência da clorofila. O híbrido sob seca apresentou menores valores para YII, qP, ETR no tratamento estressado (SC) corroborando com outros trabalhos com genótipos sensíveis (Souza et al. 2013; Saglam et al. 2014). Ahmad et al. (2017), Zou et al. (2015) e Zhang et al. (2016) sugeriram em seus trabalhos com *Mentha piperita* L. e trigo que oligômeros de quitosana podem ter um papel como elicitores na eficiência do uso da luz devido as modificações positivas dessas moléculas na fluorescência da clorofila.

Em milho, genótipos tolerantes tendem a ter maior produção quântica fotoquímica efetiva adaptada à luz (YII) (Ding et al. 2005; O'Neill et al. 2006; Souza et al. 2013) e os derivados de quitosana proporcionaram maiores valores para esse parâmetro induzindo certa tolerância ao híbrido de milho BRS1030. A falta de água nas plantas de milho (tratamento controle estressado) induzem em uma diminuição na “abertura” dos centros de reação do fotossistema II medido pelo quenching fotoquímico (qP). Genótipos sensíveis a seca tendem a ter uma menor manutenção do status hídrico (Efeoglu et al. 2009; Carvalho et al. 2011; Souza et al. 2013b) ocasionando em menores valores de qP, mas o uso de quitosana e seus derivados reverteu esses valores.

Nos tratamentos SUC e MCA, o aumento da fotossíntese (Pn) corroborou com o aumento de YII e ETR confirmando o alvo de ação dessas moléculas na capacidade fotossintética pelo aumento do rendimento do transporte de elétrons no PSII.

O NPQ está envolvido na dissipação do excesso de energia e na regulação do centro de reação do fotossistema II (PSII) e em milho este pode ser um importante parâmetro para indicar mecanismos fotoprotetores (Yan et al. 2017). Os dados de NPQ neste trabalho não mostraram diferenças corroborando com o resultado encontrado por Iriti et al. (2009), contudo a divisão dos quenchings não fotoquímicos (YNPQ e YNO) deixam mais claro o papel dos derivados de quitosana no processo de partição da energia luminosa absorvida pelo aparato fotossintético. Os derivados SUC e MCA levam, no início do estresse, a diminuição de YNO, manutenção de YNPQ e aumento YII indicando que o excesso de energia de excitação é dissipado com segurança ao nível da antena e que os fluxos de energia fotossintética estão bem regulados nesses tratamentos e sem resultar em um fotodano devido, por exemplo, as EROs.

Quando não há estresse, sob condições fotossintéticas normais, a luz absorvida é usada primeiramente para a fotossíntese, enquanto que apenas uma pequena porção é transformada em aquecimento ou fluorescência da clorofila (Rinderle e Linchenthaler, 1988). Incrementos no nível mínimo de fluorescência ( $F_0$ ) estariam relacionados a efeitos negativos na fotossíntese, pois levam a redução da transferência de energia de excitação, do complexo antena do FSII para os centros de reação. A aplicação de MCA principalmente não levou a este incremento. Peltier e Cournac (2002) relacionaram a  $F_0$  com o estado redox da quinona (QA), primeiro acceptor do FSII.

Os valores de Máxima eficiência quântica do PSII ( $F_v/F_m$ ), indicam que não houve danos no aparato fotossintético das plantas, uma vez que segundo Kalaji e colaboradores (2008), para ser considerado danos ao maquinário fotossintético, os valores de  $F_v/F_m$ , devem ser inferiores que 0,70.

O decréscimo do teor de clorofila em milho sob seca é bem evidenciado. Saglam et al. (2014) e Ghahfarokhi et al. (2015) observaram em experimento de estresse hídrico um decréscimo dos pigmentos cloroplastídeos em cultivar de milho sensível e um aumento em genótipos tolerantes. Em estudos com a aplicação de quitosana e oligômero de quitosana nas folhas de plantas café, Dzung et al. (2011), concluíram que a aplicação desses polímeros aumentou o teor de clorofila a, b e carotenoide nas folhas. Em nosso trabalho a aplicação de quitosana (principalmente) e dos derivados aumentaram o teor de todos os pigmentos. De acordo com Farouk e Amany (2012) quitosana deve aumentar os níveis endógenos de citocininas que estimulam a síntese de clorofila.

O derivado MCA, mas também o SUC, em menor intensidade, melhoraram as características fisiológicas e aliviaram os efeitos do estresse hídrico nas plantas de milho, quando comparados com a quitosana pura. Quando a quitosana é aplicada nas folhas e chega à parede celular, enzimas como quitinases são produzidas e este biopolímero é reduzido a oligossacarídeos (Quitooligossacarídeos) que são importantes sinalizadores para as células vegetais (Hadwiger 2015; Malerba e Cerana, 2016). Estes oligossacarídeos chegam no núcleo e no cloroplastídeo e atuam em reações em cascata induzindo burst oxidativo, mudança de influxos de  $Ca^{+2}$ , produção de hormônios e fitoalexinas e modificando a cromatina e expressão de proteínas (Zeng et al. 2010; Zhang et al. 2011; Hadwiger 2013; Pichyangkura e Chadchawan 2015; Chamnanmanoontham et al. 2015; Hadwiger 2015). Um possível motivo dessa resposta dos derivados é que os oligossacarídeos oriundos da clivagem por quitinases no derivado MCA e SUC contendo grupos *N*-succinófilico e *N,O*-dicarboximetílico respectivamente parecem ser mais ativos em potencializar respostas fotossintéticas no milho sensível do que os oligossacarídeos originados apenas da quitosana, por serem mais solúveis no meio fisiológico. Isso melhora sua biodisponibilidade, levando às alterações celulares citadas anteriormente. A quitosana, por conter mais de 50% de seus grupos  $NH_2$  (do carbono 2) desacetilados, apresenta alta solubilidade quando em solução aquosa ácida, mas não em água pura. Tanto o derivado SUC quanto o MCA são muito mais hidrossolúveis que a quitosana, pois contêm grupos ácidos carboxílicos que facilitam o processo de solvatação em água. Ainda, é importante citar que quando no meio fisiológico, estes grupos podem colaborar ainda mais no processo de solubilização do composto pois poderão estar ionizados na formas de carboxilato, o que intensifica a solubilização em meios aquosos (Campana Filho 2000).

## Conclusão

Os resultados desse trabalho mostraram que a utilização dos derivados de quitosana é positiva para parâmetros da fotossíntese e fluorescência, afetando os mecanismos envolvidos nas mesmas, como a atividade estomática, eficiência do uso da água e atividade do fotossistema II (PSII). A pulverização de quitosana com a

adição de grupos N-succinoílico (derivado SUC) e N, O-dicarboximetílico (derivado MCA), potencializou as atividades como indutoras de tolerância ao estresse hídrico da mesma.

#### Author contributions

Paulo César Magalhães: deu suporte durante a montagem e condução do experimento, ajudou na análise dos dados e na escrita do texto.

Roniel Geraldo Avila, Lorena Gabriela Almeida, Valquíria Mikaela Rabelo: ajudaram na implantação do experimento e na coleta dos dados.

Diogo Teixeira Carvalho, Daniela Ferreira Cabral: responsáveis por sintetizar as biomoléculas.

Décio Karam: responsável pela pulverização das biomoléculas.

Thiago Correa de Souza: orientou a pesquisa e ajudou na escrita do artigo.

#### Acknowledgements

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado (C.O.Reis) e pelo financiamento do projeto (APQ-00651-14).

#### Referencias

Ahmad B, Masroor M, Khan A, Jaleel H, Sadiq Y, Shabbir A, Uddin M (2017) Exogenously sourced  $\gamma$ -irradiated chitosan-mediated regulation of growth, physiology, quality attributes, and yield in *Mentha piperita* L. Turk J Biol 41: 388-401. <https://doi.org/10.3906/biy-1608-64>

Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol 24(1): 1-15, 1949. <https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1>

Badawy MEI, Rabea EI (2011) A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. International Journal of Carbohydrate Chemistry 2011: 1-29. <https://dx.doi.org/10.1155/2011/460381>

Bittelli M, Flury M, Campbell GS, Nichols EJ (2001) Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. Agri Forest Meteorol 107(3): 167-175. [https://doi.org/10.1016/S0168-1923\(00\)00242-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1923(00)00242-2)

Boonlertnirun S, Sarobol ED, Meechoui S, Sooksathan I (2007) Drought recovery and grain yield potential of rice after chitosan application. Kasetsart J. Nat. Sci 41: 1-6.

Borchard G, Junginger HE (2001) Modern drug delivery applications of chitosan. Adv Drug Del Rev 52(2): 103

Brine CJ, Sandford PA, Zikakis JP (1992) Advances in chitin and chitosan. Elsevier Science Publishers 685: 2. <https://doi.org/10.1002/pi.4990310419>

Calvo P, Nelson L, Kloepper JW (2014) Agricultural uses of plant biostimulants. Plant Soil 383: 3-41. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2131-8>

Carmo SLM, Santos JB, Hagiwara WE, Ferreira JL (2007) Avaliação do “stay green” em famílias segregantes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). Cienc e Agrotec 31: 953- 957. <https://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542007000400002>

Chae SY, Jang MK, Nah JW (2005) Influence of molecular weight on oral absorption of water soluble chitosans. J Control Release 102(2): 383-394. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.10.012>

- Chen WG, Liu X, Chen HX (2009) Preparation of modified chitosan with quaternary ammonium salt. *Textile Bioengineering and Informatics Symposium Proceedings 1*: 226–230
- Chibu H, Shibayama H (2001). Effects of chitosan applications on the growth of several crops. *Chitin and Chitosan in Life Science* 235-239. [https://doi:10.5958 / 2348-7542.2016.00060.7](https://doi.org/10.5958/2348-7542.2016.00060.7)
- Choudhary RC, Kumaraswamy RV, Kumari S, Sharma SS, Pal A, Raliya R, Biswas P, Saharan V (2017) Cu-chitosan nanoparticle boost defense responses and plant growth in maize (*Zea mays* L.). *Sci Rep* 7: 9754. [https://doi:10.1038/s41598-017-08571-0](https://doi.org/10.1038/s41598-017-08571-0)
- De Souza TC, Castro EM, Magalhaes PC, Lino LO, Alves ET, Albuquerque PEP (2013) Morphophysiology, morphoanatomy, and grain yield under field conditions for two maize hybrids with contrasting response to drought stress. *Acta Physiol Plant* 35: 3201-321. [https://doi:10.1007/s11738-013-1355-1](https://doi.org/10.1007/s11738-013-1355-1)
- De Souza TC, Castro EM, Magalhães PC, Castro EM, Albuquerque PEP, Marabesi MA (2013) 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: 515-527. [https://doi:10.1007/s11738-012-1093-9](https://doi.org/10.1007/s11738-012-1093-9)
- Du Jardin P (2015) Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Sci Hortic-Amsterdam* 196: 3-14. <https://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Fang L, Chunmei D (2014) Optimization of ultrasonic synthesis of N-succinyl-chitosan and adsorption of Zn<sup>2+</sup> from aqueous solutions. *Desalination and Water Treatment* 52: 40-42, 7856-7865 [https://doi:10.1080/19443994.2013.833867](https://doi.org/10.1080/19443994.2013.833867)
- Farouk S, Ramadan AA (2012) Improving growth and yield of cowpea by foliar application of chitosan under water stress. *Egyptian Journal of Biology* 14: 14-26. [http://doi:10.4314/ejb.v14i1.2](http://doi.org/10.4314/ejb.v14i1.2)
- Felt O, Buri P, Gurny R (1998) Chitosan: a unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Dev Ind Pharm* 24(11): 979-993. [http://doi:10.3109 / 03639049809089942](http://doi.org/10.3109/03639049809089942)
- Ghahfarokhi MG, Mansurifar S, Taghizadeh-Mehrjardi R, Saeidi M, Jamshidi AM, Ghasemi E (2015) Effects of drought stress and rewatering on antioxidant systems and relative water content in different growth stages of maize (*Zea mays* L.) hybrids. *Arch Agron Soil Sci* 61(4): 493-506. <http://doi.org/10.1080/03650340.2014.943198>
- Genty B, Harbinson J, Cailly AL, Rizza F (1996) Fate of excitation at PS II in leaves: the non- photochemical side. Presented at: The Third BBSRC Robert Hill Symposium on Photosynthesis, March 31 to April 3, University of Sheffield, Department of Molecular Biology and Biotechnology, Western Bank, Sheffield, UK, pp 28
- Gornik K, Grzesik M, Duda BR (2008) The effect of chitosan on rooting of grapevine cuttings and on subsequent plant growth under drought and temperature stress. *J Fruit Ornamental Plant Res* 16: 333-343
- Guan YJ, Hu J, Wang XJ, Shao CX (2009) Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. *J Zhejiang Univ-Sc* 10: 427-433. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0820373>
- Hadwiger LA (2013) Multiple effects of chitosan on plant systems: Solid science or hype. *Plant Sci* 208: 42-49. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.03.007>
- Hadwiger LA (2015) Anatomy of a nonhost disease resistance response of pea to *Fusarium solani*: PR gene elicitation via DNase, chitosan and chromatin alterations. *Front Plant Sci* 6: 373. [http://doi:10.3389/fpls.2015.00373](http://doi.org/10.3389/fpls.2015.00373)

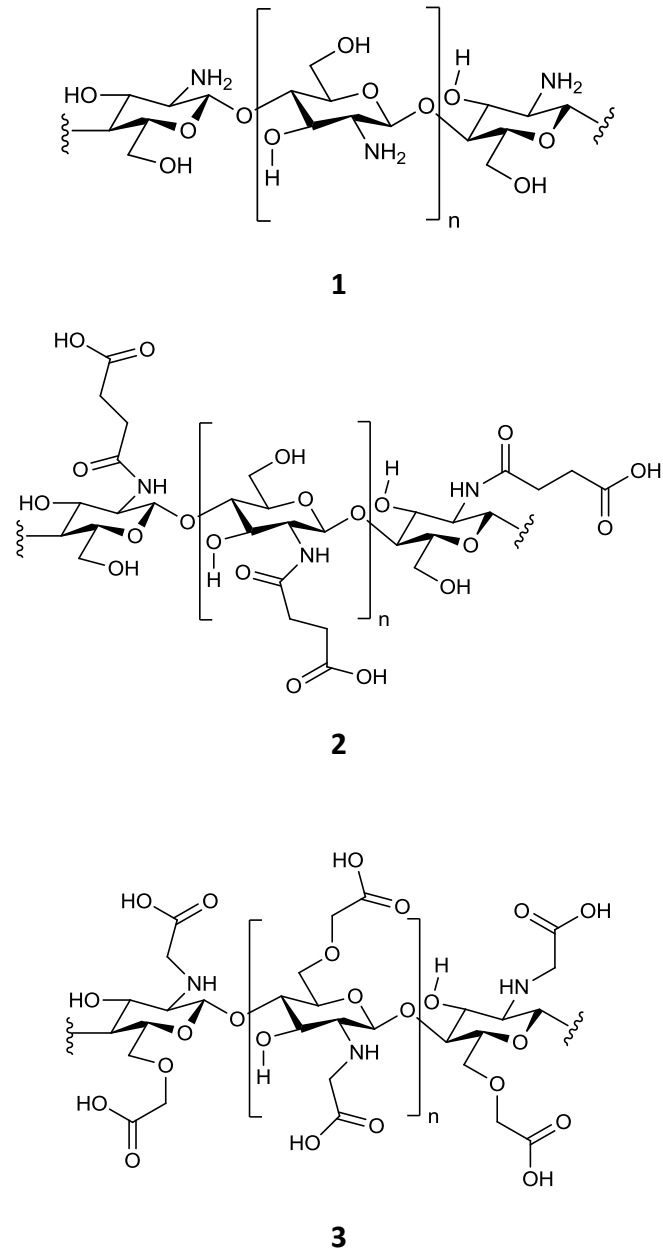
- Hasan SA, Rabei SH, Nada RM, Abogadallah GM (2017) Water use efficiency in the drought-stressed sorghum and maize in relation to expression of aquaporin genes. *Biol Plantarum* 61(1): 127-137. <https://doi.org/10.1007/s10535-016-0656-9>
- Iriti M, Picchi V, Rossonia M, Gomarasca S, Ludwig N, Gargano M, Faoro F. Chitosan antitranspirant activity is due to abscisic acid-dependent stomatal closure. *Environ Exp Bot* 66 (2009) 493-500. <http://doi:10.1016/j.envexpbot.2009.01.004>
- Jeuniaux C, Almas KA, Baradarajan A, Blair H, Decock P, et al. (1986) Chitosan as a tool for the purification of waters. *Chitin in nature and technology* 551-570. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2167-5\\_66](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-2167-5_66)
- Karlsen J, Skaugrud O (1991) Excipient properties of chitosan. *Manuf Chem* 62: 18-19
- Kalaji MH, Guo P (2008) Chlorophyll fluorescence: a useful tool in barley plant breeding programs. In: Sanchez A, Gutierrez SJ (eds) *Photochemistry research progress*. Nova Publishers, pp 439–463
- Katiyar D, Hemantaranjan A, Singh B (2015) Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. *Indian J Plant Physiol* 20(1):1-9. <http://doi:10.1007/s40502-015-0139-6>
- Khan WM, Prithviraj B, Smiyh DL (2002) Effect of foliar application of chitin oligosaccharides on photosynthesis of maize and soybean. *Photosynthetica* 40(4): 621-624. <https://doi.org/10.1023/A:1024320606812>
- Khokon AR, Uraji M, Munemasa S, Okuma E, Nakamura Y, Mori IC, Murata Y (2010) Chitosan Induced Stomatal Closure Accompanied by Peroxidase-Mediated Reactive Oxygen Species Production in Arabidopsis. *Biosci Biotech Bioch* 74 (11): 2313-2315. <http://doi:10.1271/bbb.100340>
- Lee SH, Choi S, Suh JS, Doo IS, Oh KY (1999) Oligogalacturonic acid and chitosan reduced stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cell of tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiol* 121(1): 147-152
- Liu XF, Guan YL, Yang DZ, Li Z, Yao KD (2001) Antibacterial Action of Chitosan and Carboxymethylated Chitosan Research Institute of Polymeric Materials. *J Appl Polym Sci* 79: 1324–1335 [https://doi:10.1002/1097-4628\(20010214\)79:7<1324::AID-APP210>3.0.CO;2-L](https://doi:10.1002/1097-4628(20010214)79:7<1324::AID-APP210>3.0.CO;2-L)
- Malerba M, Cerana R (2016) Chitosan Effects on Plant Systems. *Int J of Mol Sci* 17(7): 996. <https://doi:10.3390/ijms17070996>
- Peniche-covas C, Alvarez LW, Arguelles-Monal W (1992) The adsorption of mercuric ions by chitosan. *J Appl Polym Sci* 46(7): 1147-1150. <https://doi.org/10.1002/app.1992.070460703>
- Perdomo JA, Capó-Bauçà S, Carmo-Silva E, Galmés J (2017) Rubisco and Rubisco Activase Play an Important Role in the Biochemical Limitations of Photosynthesis in Rice, Wheat, and Maize under High Temperature and Water Deficit. *Frontiers in Plant Science* 8: 490. <https://doi:10.3389/fpls.2017.00490>
- Pichyangkura R, Chadchawan S (2015) Biostimulant activity of chitosan in horticulture. *Sci Hortic-Amsterdam* 196: 49-65. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.031>
- Pirbalouti AG, Malekpoor F, Salimi A, Golparvar A (2017) Exogenous application of chitosan on biochemical and physiological characteristics, phenolic content and antioxidant activity of two species of basil (*Ocimum ciliatum* and *Ocimum basilicum*) under reduced irrigation. *Sci Hortic-Amsterdam*, 217: 114-122. <https://doi:10.1016/j.scienta.2017.01.031>
- Pospisilova J (2003) Participation of phytohormones in the stomatal regulation of gas exchange during water stress. *Biol Plantarum* 46: 491-506. <https://doi:10.1023/a:1024894923865>



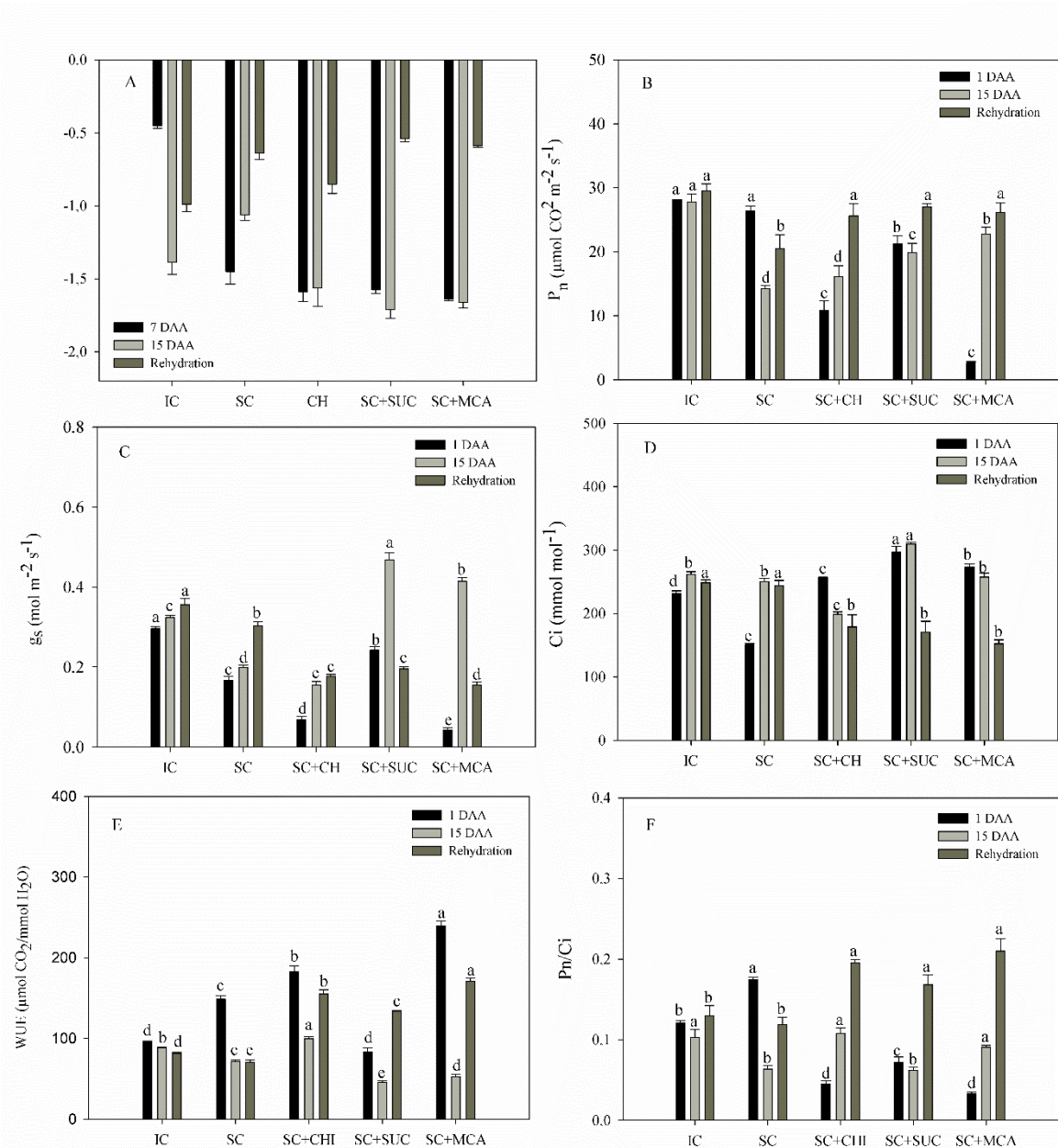
- Rivas R, Falcão HM, Ribeiro RV, Machado EC, Pimentel C, Santos MG (2016) Drought tolerance in cowpea species is driven by less sensitivity of leaf gas exchange to water deficit and rapid recovery of photosynthesis after rehydration. *S Afr J Bot* 103: 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.08.008>
- Saglam A, Kadioglu A, Demiralay M, Terzi R (2014) Leaf rolling reduces photosynthetic loss in maize under severe drought. *Acta Bot Croat* 73(2): 315-332. <https://doi.org/10.2478/botcro-2014-0012>
- Shahidi F, Synowiecki J (1991) Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chionoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. *J Agric Food Chem* 39(8): 1527-1532. <https://doi.org/10.1021/jf00008a032>
- Sharp RG (2013) A Review of the Applications of Chitin and Its Derivatives in Agriculture to Modify Plant-Microbial Interactions and Improve Crop Yields. *Agronomy* 3: 757-793. <https://doi.org/10.3390/agronomy3040757>
- Serei A, Neven A, Abd-El-Aal S, Sahab AF (2007) The mutagenic activity and its effect on the growth of *Trichoderma harzianum* and *Fuzarium oxysporum*. *J Appl Sci Res* 3: 350-455
- Suchada B, Ed S, Sawit M, Isara S (2007) Drought Recovery and Grain Yield Potential of Rice after Chitosan Application. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 41: 1-6
- Sun T, Zhou D, Xie J, Mao F (2006) Preparation of chitosan oligomers and their antioxidant activity. *Eur. Food Res. Technol* 225: 451-456. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0439-1>
- Sun T, Yao Q, Zhou D, Mao F (2008) Antioxidant activity of N-carboxymethyl chitosan oligosaccharides. *Bioorg. Med Chem Lett* 18: 5774-5776. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.09.072>
- Tanaka Y, Tanioka S, Tanaka M, Tanigawa T, Kitamura Y (1997) Effect of chitin and chitosan particles on BALB/c mice by oral and parenteral administration. *Biomaterials* 18(8): 591-595. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(96\)00182-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(96)00182-2)
- Xie W, Xu P, Liu Q (2001) Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 11: 1699-1701. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)00285-2](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)00285-2)
- Yamada T, Shibuya N, Kodama O, Akatsuka T (1993) Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by N-acetyl-chitooligosaccharides. *Biosci Biotech Biochem* 57: 405-409. <https://doi.org/10.1271/bbb.57.405>
- Yan H, Wu L, Filardo F, Yang X, Zhao X (2017) Chemical and hydraulic signals regulate stomatal behavior and photosynthetic activity in maize during progressive drought. *Acta Physiol Plant* 39:125. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2418-5>
- Yao Y, Liu X, Li Z, Ma X, Rennenberg H, Wang X, Li H (2013) Drought-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in subsidiary cells is involved in regulatory signaling of stomatal closure in maize leaves. *Planta* 238: 217-227. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1886-0>
- Zhang X, Li K, Liu S, Xing R, Yu H, Chen X, Li P (2016) Size effects of chitooligomers on the growth and photosynthetic characteristics of wheat seedlings. *Carbohydr Polym* 138: 27-33. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.11.050>
- Zhang H, Zhao X, Yang J, Yin H, Wang W, Lu H, Du Y (2011) Nitric oxide production and its functional link with OIPK in tobacco defense response elicited by chitooligosaccharide. *Plant Cell Rep* 30(6): 1153-1162. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1024-z>
- Zeng K, Deng Y, Ming J, Deng L (2010) Induction of disease resistance and ROS metabolism in navel oranges by chitosan. *Sci Hortic-Amsterdam* 126: 223-228. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.07.017>

Zeng LT, Qin CQ, Wang W, Chi WL, Li W (2008) Absorption and distribution of chitosan in mice after oral administration. *Carbohydr Polym* 71(3): 435-440. [https://doi: 10.1016 / j.carbpol.2007.06.016](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.06.016)

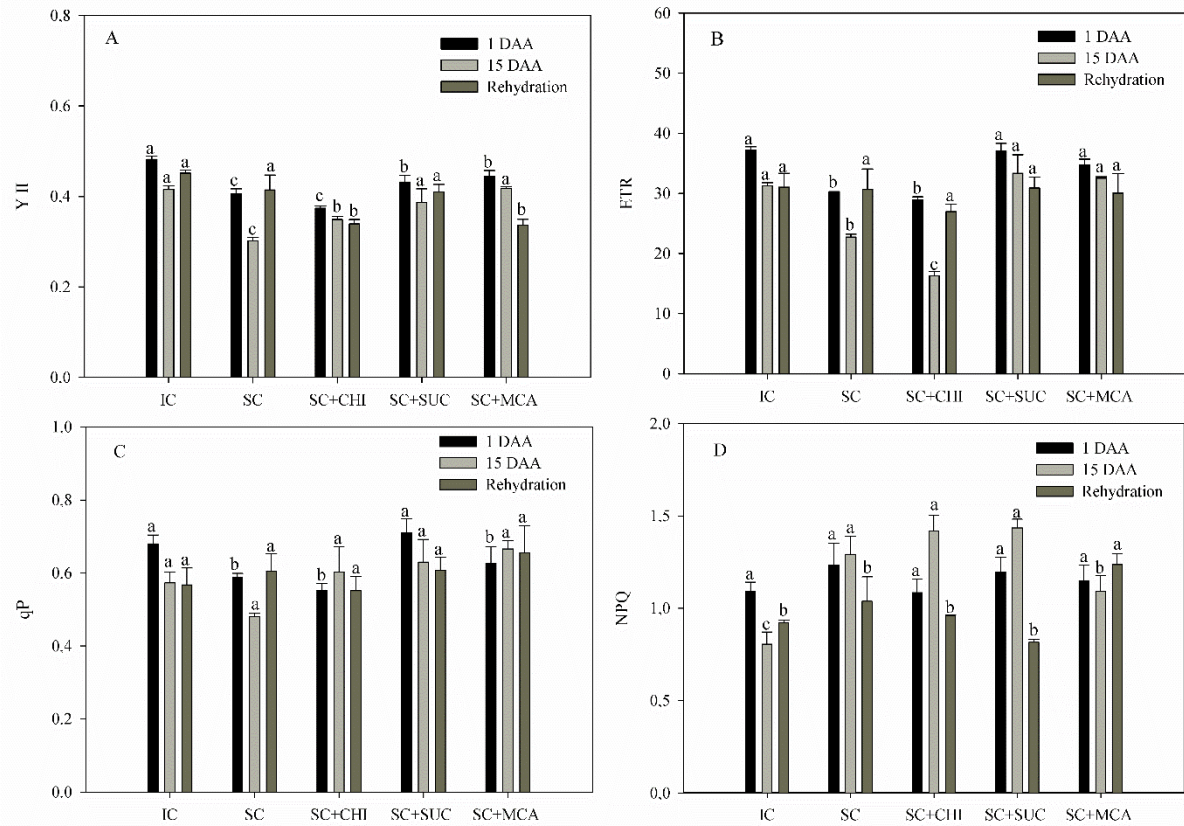
Zou P, Li K, Liu S, Xing R, Qin Y, Yua H, Zhou M, Li P (2015) Effect of chitooligosaccharides with different degrees of acetylationon wheat seedlings under salt stressing. *Carbohydr Polym* 126: 62-69. [https://doi:10.3390/molecules22111903](https://doi.org/10.3390/molecules22111903)



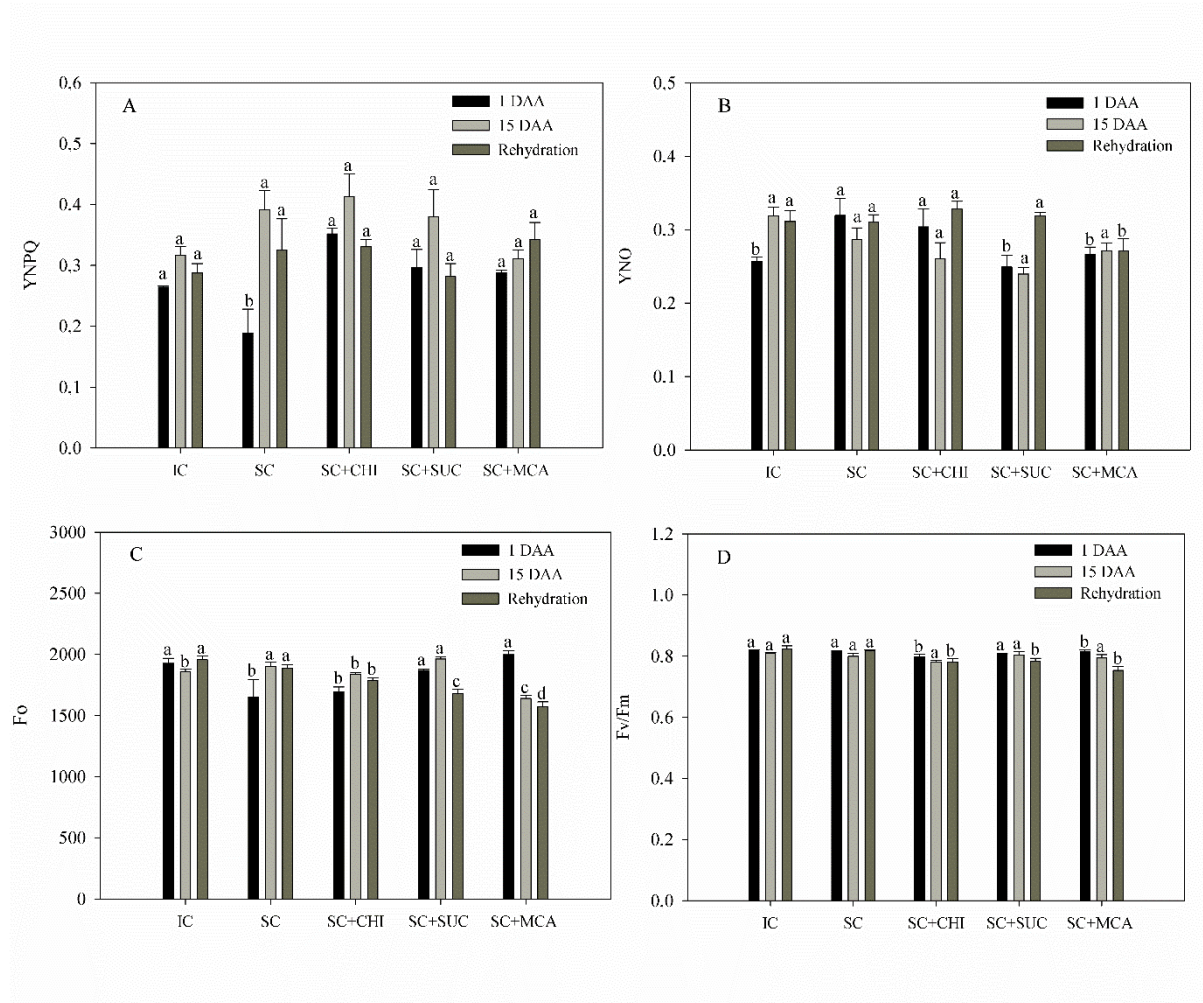
**Fig 1.** Estrutura química da quitosana (1), do derivado *N*-succinílico (2) e do derivado *N*, *O*-dicarboximetílico (3).



**Fig 2.** (A) Potencial hídrico médio foliar ( $\Psi$  (MPa)) e parâmetros de trocas gasosas durante a imposição do estresse e recuperação hídrica no híbrido de milho BRS 1030 com a aplicação de quitosana e seus derivados. (B) Taxa fotossintética ( $P_n$ ), (C) Condutância estomática ( $g_s$ ), (D) Concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ), (E) Eficiência do uso da água (WUE), (F) Eficiência da carboxilação (CE). Médias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos em cada dia após a aplicação (1DAA; 7DAA; 15DAA; Rehydration) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ( $P \leq 0.05$ ). Controle irrigado (Irrigated control - IC), Controle estressado (Stressed Control - SC), Quitosana (Stressed Control + Chitosan - SC+CH), N-succinóilico (Stressed Control + SUC - SC+SUC), N-dicarboximetílico (Stressed Control + MCA - SC+MCA). Barras correspondem ao  $\pm$  erro padrão (SE) ( $n = 6$ ).



**Fig 3.** Parâmetros de fluorescência da clorofila durante a imposição do estresse e recuperação hídrica em híbrido de milho sensível a seca BRS 1030, com a aplicação de quitosana e seus derivados. **(A)** Rendimento quântico fotoquímico do PSII (YII), **(B)** Taxa de transporte de elétrons (ETR), **(C)** Quenching fotoquímico (qP), **(D)** Quenching não fotoquímico (NPQ). Médias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos em cada dia após a aplicação (1DAA; 15DAA; Rehydration) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ( $P \leq 0.05$ ). Controle irrigado (Irrigated control - IC), Controle estressado (Stressed Control - SC), Quitosana (Stressed Control + Chitosan - SC+CHI), (Stressed Control + SUC - SC+SUC), *N*-dicarboximetílico (Stressed Control + MCA - SC+MCA). Barras correspondem ao  $\pm$  erro padrão (SE) ( $n = 6$ ).



**Fig 4.** Parâmetros de fluorescência da clorofila durante a imposição do estresse e recuperação hídrica em híbrido de milho sensível a seca BRS 1030, com a aplicação de quitosana e seus derivados. **(A)** Rendimento quântico de dissipação de fluorescência não fotoquímica induzida pela luz – YNPQ, **(B)** Rendimento quântico de dissipação de calor não regulada e emissão de fluorescência - YNO, **(C)** Fluorescência inicial - Fo, **(D)** Máxima eficiência quântica do PSII – Fv/Fm. Médias seguidas pela mesma letra entre os tratamentos em cada dia após a aplicação (1DAA; 15DAA; Rehydration) não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade ( $P \leq 0.05$ ). Controle irrigado (Irrigated control - IC), Controle estressado (Stressed Control - SC), Quitosana (Stressed Control + Chitosan – SC+CH), N-succinofílico (Stressed Control + SUC – SC+SUC), N-dicarboximetílico (Stressed Control + MCA – SC+MCA). Barras correspondem ao  $\pm$  erro padrão (SE) ( $n = 6$ ).

**Tabela 1.** Teores de clorofila a (CHL A) e b (CHL B); clorofila a+b (CHL A+CHL B) e xantofilas + carotenoides (XANT + CARO), após 15 dias de estresse hídrico em híbrido de milho BRS1030, pulverizados ou não com quitosana (CH) e seus derivados (SUC e MCA).

TREATMENT	CHL A	CHL B	CHL A + CHL B	XANT + CARO
IC	0.5066B	0.1100D	0.6533B	10.2266C
SC	0.2500D	0.2300A	0.4400D	7.4566D
SC+CH	0.6066A	0.2000B	0.8233A	19.6566A
SC+SUC	0.4133C	0.1466C	0.5500C	12.3800B
SC+MCA	0.3900C	0.1733C	0.5800C	11.3666C

\* Médias seguidas por mesma letra na vertical, não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade ( $P \leq 0.05$ ). Controle irrigado (Irrigated control - IC), Controle estressado (Stressed Control - SC), Quitosana (Chitosan - CH), Controle estressado + N-succinoílico (SC+SUC), Controle estressado + N-dicarboximetílico (SC+MCA).