

**Respostas estruturais e fisiológicas de espécies de Solanaceae com
folhas glabras e pilosas à aplicação de imidacloprido**

JUAN DE NICOLAI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós-
graduação em Biologia Vegetal Interunidades
Botucatu/Rio Claro. AC: Morfologia e
Diversidade Vegetal.

BOTUCATU - SP

2023

**Respostas estruturais e fisiológicas de espécies de Solanaceae com
folhas glabras e pilosas à aplicação de imidacloprido**

JUAN DE NICOLAI

PROF^a DR^a TATIANE MARIA RODRIGUES
ORIENTADORA

PROF^a DR^a ELIZABETH ORIKA ONO
COORIENTADORA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós-
graduação em Biologia Vegetal
Interunidades Botucatu/Rio Claro. AC:
Morfologia e Diversidade Vegetal.

BOTUCATU – SP

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Nicolai, Juan de.

Respostas estruturais e fisiológicas de espécies de Solanaceae com folhas glabras e pilosas à aplicação de imidacloprido / Juan de Nicolai. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Tatiane Maria Rodrigues

Coorientador: Elizabeth Orika Ono

Capes: 20302037

1. Solanaceae. 2. Plantas - Efeito dos inseticidas. 3. Inseticidas. 4. Molhabilidade. 5. Fisiologia vegetal. 6. Anatomia vegetal.

Palavras-chave: Absorção foliar; Anatomia; Fisiologia; Inseticida; Molhabilidade.

Dedicatória

Àqueles que estão sempre comigo, me apoiando e inspirando:

Minha mãe, Fernanda;
Meus avós, Isilda e Hildo;
Meus tios, Rodrigo e Hildo.
Meu primo, Bernardo.
Meu companheiro, Lucas.

Amo vocês!

Agradecimentos

Ao **Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq)** pela bolsa de doutorado concedida.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001**, pelo apoio financeiro.

À **Profa. Dra. Tatiane Maria Rodrigues**, pelos 10 anos de orientação, por toda confiança depositada em mim, por me auxiliar em minha carreira científica e sempre estar disposta a me ajudar e me manter no foco.

Aos amigos e amigas **Francielle Mosele, Jéssica Silvino, Larissa Vasque, Mayra Vasque, João Vasque, Gustavo Rodrigues, Gabriela Pimentel, Leide Melo, Yasmin Fagali, William Xavier** por compartilhar diversos momentos, risadas e a vida.

Aos **Técnicos e Colaboradores do Departamento de Botânica**, pelo convívio e por sempre estarem dispostos a auxiliar.

Aos meus colegas de laboratório, **Aline Rodrigues, Ana Paula Tachevski, Diana Pacheco Seixas, Fernanda Helena Palermo, Karise Mamede Macedo, Karla Bianca de Deus Bento, Paloma Victor, Paulo Antônio Gonçalves de Jesus, Shelly Favorito, Stefany Cristina de Melo Silva, Zoraide Valério**, agradeço pelo convívio, compartilhamento diário, ensinamentos, por me auxiliarem quando precisei e por me encorajarem.

Aos colegas do **Departamento de Botânica** pelas risadas, experiências.

À **Profa. Dra. Regiane Cristina de Oliveira** pelas dicas para instalação do experimento e por fornecer o inseticida utilizado no projeto.

À **Profa. Dra. Elizabeth Orika Ono** e os alunos do Laboratório de Fisiologia Vegetal, **Francisco Gilvan Borges Junior, Eduardo Aires, Isabelly Marques** por disponibilizar o laboratório e auxiliar com as análises bioquímicas e fisiológicas.

Ao **Prof. Dr. Marcelo de Almeida Silva** e sua orientada **Hariane Luis Santos**, do Laboratório de Ecofisiologia Aplicada à Agricultura (LECA), por emprestar o equipamento IRGA e auxílio nas análises fisiológicas.

Ao **Prof. Dr. Fernando Putti** pelo auxílio com as análises e interpretações estatísticas.

À equipe do **Centro de Microscopia Eletrônica, IBB, UNESP** pela assistência e processamento do material.

À todas as pessoas que de alguma forma estiveram presentes na minha vida ao longo desses 10 anos que saí de casa para realizar meus sonhos.

E a todos que de alguma forma colaboraram com a realização deste trabalho,

Meu mais sincero obrigado!

Sumário

Introdução Geral	8
Objetivo geral	12
Referências Bibliográficas.....	12
Investigação das respostas estruturais e funcionais em espécies de Solanaceae com folhas glabras e pilosas submetidas à aplicação de imidacloprido.....	20
Introdução	20
Material e Métodos	21
Resultados	27
Discussão	33
Referências Bibliográficas	38
Figuras e Gráficos	46
Considerações Gerais	56

NICOLAI, J. **Respostas estruturais e fisiológicas de espécies de Solanaceae com folhas glabras e pilosas à aplicação de imidacloprido**. 2023. 56pp. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Resumo – O imidacloprido (IMI) é o inseticida neonicotinoide mais utilizado nas lavouras para o controle de pragas no Brasil. Estudos têm demonstrado que a aplicação de inseticidas pode levar a alterações em aspectos estruturais e funcionais em diferentes espécies vegetais e que a taxa de absorção foliar dessas substâncias está relacionada a características micromorfológicas da superfície das folhas. Este trabalho teve como objetivo investigar as respostas anatômicas, fisiológicas e bioquímicas à aplicação de IMI em *Capsicum annuum* que apresenta folhas glabras e *Solanum aethiopicum* que apresenta folhas pilosas, ambas pertencentes à Solanaceae. IMI foi aplicado por meio de pulverização foliar. Testes de absorção foliar e de molhabilidade foram aplicados. Foram realizadas análises de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, atividade das enzimas peroxidase e superóxido dismutase e de peroxidação lipídica. Análises morfométricas do limbo foliar foram realizadas ao microscópio de luz. 3,3-diaminobenzidina (DAB) foi utilizado para marcação *in situ* de espécies reativas de oxigênio (ERO). Ambas as espécies apresentaram folhas anfiestomáticas revestidas por epiderme unisseriada com células cobertas por cutícula lisa e delgada. Em *C. annuum* as folhas apresentaram relevo irregular formando áreas de depressão na superfície do limbo. As folhas de *S. aethiopicum* se mostraram não-molháveis enquanto as folhas de *C. annuum* foram classificadas como molháveis. Em ambas as espécies, folhas de plantas tratadas com IMI apresentaram maior espessura do mesofilo e marcação mais intensa de ERO. Indivíduos de *C. annuum* submetidos à aplicação de IMI apresentaram alterações mais severas em aspectos fisiológicos e bioquímicos em comparação com indivíduos de *S. aethiopicum*, especialmente quanto a taxa de assimilação de CO₂, condutância estomática, taxa de transpiração e eficiência instantânea de carboxilação, além de terem apresentado alterações estruturais bastante evidentes como a maior sinuosidade no contorno das células do parênquima paliádico e aumento da área ocupada por espaços intercelulares no parênquima esponjoso. As alterações mais pronunciadas nos aspectos funcionais e estruturais de *C. annuum* em resposta à aplicação de IMI podem estar associadas à sua maior molhabilidade e provável maior absorção de IMI.

Palavras-chave: absorção foliar, anatomia, fisiologia, inseticida, molhabilidade, superfície foliar, tricomas.

NICOLAI, J. **Structural and physiological responses of Solanaceae species with glabrous and hairy leaves to imidacloprid application.** 2023. 56pp. PhD Thesis – Biosciences Institute, UNESP – São Paulo State University, Botucatu.

Abstract - Imidacloprid (IMI) is the most used neonicotinoid insecticide for controlling crop pests in Brazil. Studies have shown that insecticide application could change structural and functional aspects in different plant species, and the foliar absorption rates of substances are related to micromorphological traits of the leaf surface. This study aimed to investigate the anatomical, physiological and biochemical responses to IMI application in *Capsicum annuum* with glabrous leaves, and *Solanum aethiopicum* with hairy leaves, both belonging to Solanaceae. IMI was applied by leaf pulverization. Leaf absorption and wettability tests were performed. Analyses of gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence, activity of peroxidase and superoxide dismutase enzymes, lipid peroxidation were performed. Morphometric analyses of leaf blades were performed under light microscopy. 3,3-diaminobenzidina (DAB) was used *for in situ* detection of reactive oxygen species (ROS). Both species showed amphistomatic leaves covered by a uniseriate epidermis with cells covered by thin and smooth cuticle. In *C. annuum* the leaves showed irregular surface forming depression areas. *S. aethiopicum* leaves were non-wettable while *C. annuum* leaves was classified as wettable. In both species, leaves of plants treated with IMI showed higher mesophyll thickness and more intense marking of ROS. *C. annuum* plants submitted to IMI application showed more severe alterations in physiological and biochemical aspects in comparison with *S. aethiopicum*, specially in terms of CO₂ assimilation rate, stomatal conductance, transpiration rate, and instant carboxylation efficiency, in addition to presented evident structural alterations as greater sinuosity on palisade parenchyma cell shape and increased are occupied by intercellular spaces in the spongy parenchyma. The most pronounced alterations in functional and structural aspects of *C. annuum* in response to IMI application could be associated to the highest wettability of their leaves and possible higher IMI absorption.

Key words: anatomy, foliar absorption, insecticide, leaf surface, physiology, trichomes, wettability.

Introdução geral

A agricultura é um dos setores econômicos mais importantes para a sociedade, pois produz alimentos e matéria-prima para diversos ramos da indústria (Mehrara and Baghbanpour 2016). Para atender ao crescimento da demanda global de alimentos necessita-se do aumento de sua produtividade por meio de mecanização, irrigação, emprego de mão de obra qualificada, melhoramento genético das plantas e do combate às pragas com uso de defensivos agrícolas (James 2010). O Brasil apresenta clima e solo favoráveis para a produção agrícola, que juntamente com uma série de incentivos comerciais, investimentos em pesquisa e desenvolvimento, transformam o país em um dos maiores produtores de alimentos, fibras e biocombustíveis do mundo (Chaddad and Jank 2006; Barros 2008). Entretanto, o setor agrícola é responsável pela liberação de poluentes que promovem contaminação do ambiente por conta da toxicidade dos produtos empregados no campo (Gilmore 2001; Hoai et al. 2011).

Dentre os defensivos agrícolas mais utilizados encontram-se acaricidas, bactericidas, cupinicidas, fungicidas, herbicidas, inseticidas, moluscicidas e nematocidas (Nayak and Solanki 2021) que atuam direta ou indiretamente nas formas de vida que são consideradas prejudiciais à agricultura (Baptista 1999). No Brasil, os defensivos agrícolas são utilizados em grande escala nas lavouras, sendo que desde 2008, o país é considerado o maior usuário destes produtos (Graff 2013) devido ao fato do país possuir grande área cultivada. Esses defensivos são pulverizados diretamente nas plantas e sua eficácia é determinada pela interação planta-pesticida, sendo que algumas características do produto e da planta podem influenciar nessa interação (Antonious and Snyder 1993).

O uso de defensivos químicos na agricultura pode influenciar significativamente a fotossíntese (Petit et al. 2012), a eficiência do uso da água, teor de proteínas e a produtividade das plantas (Diaz-Espejo et al. 2012), além de alterar aspectos estruturais das plantas (Tuffi Santos et al. 2009). Folhas tratadas com herbicidas podem apresentar-se mais espessas, com formação de tecido parenquimático fortemente vacuolado e feixes vasculares reduzidos. Plantas de *Ricinus communis* L. tratadas com inseticidas apresentaram aumento na atividade do câmbio interfascicular no caule, menor diferenciação do floema e ruptura dos tecidos em geral, sendo notado mesofilo foliar compactado e maior número de cloroplastos (Dickinson 2000). Plântulas de erva-doce (*Foeniculum vulgari* Mill.) tratadas com inseticidas apresentaram aumento na espessura das células epidérmicas e da cutícula e no número de estômatos nas folhas (Azevedo et al. 2014). Diferentes concentrações de inseticidas como piriproxifeno podem acarretar

alterações radiculares e inibir a germinação em sementes de milho (Coskun et al. 2015). Ainda, no que se refere aos aspectos bioquímicos, sabe-se que as substâncias tóxicas podem desencadear o aumento da atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD) e catalase (CAT) como forma de tolerar o estresse oxidativo e prevenir danos às plantas (Mishra et al. 2009).

Os organofosforados, piretroides e os neonicotinoides são três grandes classes de inseticidas utilizados no campo, sendo os neonicotinoides a classe mais nova de inseticidas (Ford et al. 2010). Os neonicotinoides surgiram em 1970, criados pela *Shell Development Company* para combater moscas domésticas (Soloway et al. 1978; Kollmeyer et al. 1999). Uma alteração de sua estrutura química foi realizada pela *Nihon Tokushu Noyaku Convulo* no Japão (atualmente *Bayer Crop Science* Japão) através da introdução de um grupo de cloropiridinilmetil, levando a um protótipo de nitrometileno de excelente potência no controle de insetos sugadores do arroz (Tomizawa and Casida 2005). Os neonicotinoides são a classe de inseticida mais vendida no mundo (Castellanos et al. 2021). Essa substância age no sistema nervoso de insetos sugadores, atuando, principalmente, no bloqueio de processos fisiológicos e/ou bioquímicos (Gallo et al. 2002) por conta de sua ação neurotóxica nos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) (Cimino et al. 2017). Entretanto, os neonicotinoides são considerados tóxicos para muitos insetos benéficos às culturas, principalmente às abelhas (Araújo 2015), podendo causar redução no crescimento da colônia e da produtividade da rainha (Whitehorn et al. 2012). Exposições a essas substâncias podem prejudicar o desenvolvimento do sistema nervoso de mamíferos, assim como ocorre com a nicotina (Kimura-Kuroda et al. 2012). Ainda não se sabe ao certo o que os neonicotinoides podem causar em seres humanos, entretanto, acredita-se que podem causar distúrbios neurológicos (Cimino et al. 2017).

Os neonicotinoides são metabolizados pelas plantas através da oxidação, redução, clivagem e conjugação de produtos (Sur and Stork 2003; Casida 2011). Em plantas jovens de cana-de-açúcar, os neonicotinoides podem beneficiar seu desenvolvimento inicial, resultando em aumento da massa da planta e promovendo o desenvolvimento da raiz (Endres et al. 2016); entretanto, outros estudos demonstram danos na estrutura radicular de plantas sob diferentes concentrações dessa classe de inseticidas (Çavuşoğlu et al. 2012; Shahid et al. 2021). Plantas de *Brassica juncea* (L.) Czern. que crescem sob ação de neonicotinoides aumentam seus níveis de enzimas

antioxidantes (Sharma et al. 2017), por outro lado, estudos com plantas tratadas com neonicotinoides não expressam danos no aparato fotossintético (Cone et al. 2022).

O imidacloprido (IMI) é o neonicotinoide mais importante no controle de pragas (Shepker et al. 2020), principalmente insetos sugadores, como trips e afídios (Yan et al. 2019), atuando como um composto sistêmico que pode ser absorvido e translocado pelas plantas (Kagabu 2003) podendo ser encontrado inclusive no pólen e em sementes (Nauen et al. 2001; Schmuck et al. 2001). Estudos demonstram que o IMI, um composto de características hidrofílicas, pode alterar o desenvolvimento das plantas, causando alterações radiculares (Zhang et al. 2020; Shahid et al. 2021), desarranjo celular no mesofilo foliar (Zhang et al. 2020) e aumento da peroxidação lipídica (Zhang et al. 2020). No Brasil, é muito utilizado nas culturas de algodão, batata, feijão, jiló, melão, milho, palma forrageira, pimentão, soja, trigo, entre outras (Agrofit– MAPA 2022) e aplicado via pulverização foliar (Kagabu 2003).

A penetração das substâncias pulverizadas na superfície foliar está associada às características do produto utilizado e da própria estrutura foliar, tendo forte relação com a taxa de molhabilidade das folhas. Molhabilidade é a maneira pela qual um líquido se espalha ao ser depositado sobre uma superfície sólida (Oliveira 2010), sendo resultante da interação entre a tensão superficial do líquido e as propriedades físico-químicas da superfície (Koch et al. 2008; He et al. 2019). Alguns fatores podem influenciar a molhabilidade foliar, especialmente aspectos relacionados à micromorfologia da superfície da folha (Goldsmith et al. 2017). As gotas formadas durante o processo de pulverização de uma determinada substância sobre as plantas formam um ângulo de contato com a superfície foliar, o que determina sua molhabilidade. Dessa forma, se o ângulo de contato entre gota e a superfície for menor que 90°, caracteriza-se uma superfície molhável, enquanto se o ângulo de contato for maior que 90° caracteriza-se uma superfície não-molhável (Moita Neto 2006). Nesse sentido, estudos têm demonstrado a existência de correlação positiva entre o ângulo de contato da gota molhante com a densidade e tamanho dos tricomas e ceras epicuticulares (Pandey and Nagar 2002; Holder 2007, Matos and Rosado 2016, Goldsmith et al. 2017; Papierowska et al. 2018). A aplicação de defensivos químicos nas lavouras apresentam o emprego de adjuvantes. Os adjuvantes são substâncias que servem para melhorar a atuação das substâncias pulverizadas por desempenhar específicas funções, incluindo tamponantes, dispersantes, emulsificantes, molhantes, adesivos e espalhantes (Oliveira, 2011).

A consequência do grau de molhabilidade foliar é um assunto controverso. Sabe-se que inibição das trocas gasosas (Smith and McClean 1989; Ishibashi and Terashima 1995; Hanba et al. 2004), promoção do crescimento de patógenos (Huber and Gillespie 1992; Bradley et al. 2003), lixiviação de nutrientes (Sase et al. 2008), aumento do

estresse biomecânico (Holbrook and Putz 1989), favorecimento da deposição de poluentes (Neinhuis and Barthlott 1997; Klemm et al. 2002), assim como a formação de gelo (Aryal and Neuner 2010), além de lesão a tecidos pela focalização da luz solar (Brewer et al. 1991) podem ser consequências adversas da molhabilidade foliar. Por outro lado, estudos sugerem que o umedecimento das folhas pode ser benéfico às plantas, sendo associado ao fornecimento adicional da água através da captação direta pela superfície foliar (Eller et al. 2013; Goldsmith 2013; Gotsch et al. 2014). Ainda, pode levar a inibição ou redução da transpiração (Katata et al. 2010; Eller et al. 2013; Goldsmith 2013; Gotsch et al. 2014). Podendo ainda promover alívio térmico (Katata et al. 2010). E ainda, melhorar a capacidade das plantas em absorver CO₂ e manter o balanço de carbono positivo, mesmo sob déficits de água no solo (Simonin et al. 2009; Ben-Asher et al. 2010).

Produtos químicos gasosos e/ou líquidos, incluindo inseticidas, podem penetrar na superfície das plantas pela cutícula e/ou pelos estômatos, levando a modificações fisiológicas e estruturais, mesmo que seus efeitos não sejam evidenciados na morfologia externa desses vegetais (Dickinson 2000). Nesse contexto, sabe-se que as características morfológicas das plantas, em especial aspectos estruturais das folhas, podem influenciar na absorção dessas substâncias e no efeito dos pesticidas (Fernández et al. 2021). Folhas que apresentam superfícies rugosas, por exemplo, apresentam maior retenção de inseticidas que plantas com a superfície foliar lisa (Furmidge 1962). A densidade de tricomas no limbo foliar também pode influenciar na absorção dos pesticidas pelas folhas, atuando na retenção desses produtos na superfície foliar (Edwards 1975). Estudos mostram que a maior densidade de tricomas nas folhas proporciona maiores oportunidades de absorção, adesão e/ou coesão da solução inseticida em *Lycopersicon hirsutum* Dunal (Antonious and Snyder 1993). Além disso, tricomas podem apresentar alta atividade higroscópica por possuírem paredes celulares ricas em pectina, podendo atuar na absorção e distribuição de diferentes substâncias pelo limbo foliar (Schreel et al. 2020). Por outro lado, existem estudos demonstrando que a abundância de tricomas pode dificultar a absorção de substâncias pela superfície foliar (Xie et al. 2020). Os tricomas podem aumentar a hidrofobicidade das folhas (Brewer et al. 1991) podendo reduzir a absorção hídrica (Berry et al. 2019), assim como de outras substâncias hidrossolúveis que podem ser aplicadas e/ou que atinjam a superfície foliar. Em folhas glabras, por sua vez, a cutícula representa a primeira barreira contra entrada de patógenos e substâncias pela superfície foliar (Riederer and Muller 2006); entretanto, as

características físico-químicas da cutícula podem ou não favorecer a aderência das gotas de diferentes substâncias na superfície foliar (Fernández et al. 2017); ainda, o pH da substância aplicada pode influenciar no transporte de água e solutos através da parede celular ou da cutícula (Aponte and Baur 2018).

Solanaceae é uma das famílias de angiospermas de maior importância econômica do mundo, principalmente devido à produção de alimentos, apresentando espécies como tomate, batata, pimentão, berinjela, jiló, dentre outras; além disso, muitas espécies da família, como por exemplo o tabaco, são utilizadas na produção de fármacos e drogas, sendo grandes produtoras de alcalóides (Chowánski et al. 2016). Inclui cerca de 100 gêneros e mais de 2500 espécies de diferentes hábitos (Motti 2021), sendo que a maioria delas apresenta flores vistosas e hermafroditas e frutos do tipo baga ou cápsula. Na maioria de seus representantes, as folhas são simples, alternas, lobadas ou partidas, sésseis ou pecioladas, desprovidas de estípulas, podendo ser glabras ou pilosas (Parrini et al. 2017). A aplicação de imidacloprido em culturas de diferentes espécies de Solanaceae tem sido uma prática comum no Brasil (MAPA - 2023).

Assim, este trabalho teve como objetivo investigar as respostas anatômicas, fisiológicas e bioquímicas à aplicação foliar do imidacloprido em espécies de Solanaceae com folhas glabras e pilosas. Nossa hipótese foi que espécies com folhas glabras apresentariam-se molháveis e consequentemente apresentariam alterações estruturais e funcionais à aplicação do IMI.

Referências Bibliográficas

- AGROFIT: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. MAPA/Brasil/Brasília/DF <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/pages/AGROFIT.html> Acesso em: 08.11.2022.
- Antonious, G.F., Snyder, J.C. 1993. Trichome density and pesticide retention and half-life. **Journal of Environmental Science and Health**, **28**: 205-219.
- Aponte, J., Baur, P. 2018. The role of pH for ionic solute uptake by the non-aerial hypocotyl of mung bean plants. **Journal of Plant Diseases and Protection**, **125**: 433–442.
- Araujo, W.L. 2015. **Toxicidade de neonicotinoides sobre abelhas (*Apis melífera*)**. Dissertação de Mestrado – UFCG/PB. 49pp.
- Aryal, B., Neuner, G. 2010. Leaf wettability decreases along an extreme altitudinal gradient. **Oecologia**, **162**: 1.

Azevedo, C.F., Bruno, R.D.L.A., Quirino, Z.G.M. 2014. Anatomia de plântulas de erva doce (*Foeniculum vulgare* Mill.) sob efeito de inseticida. **Revista Biociências**, **20**: 63-71.

Baptista, G.C. 1999. **Curso de proteção de plantas: toxicologia, meio ambiente e legislação**. Brasília/DF – ABEAS. 33pp.

Barros, G. 2008. Brazil: the challenges in becoming an agricultural superpower. In *Brazil as an Economic Superpower? Understanding Brazil's Changing Role in the Global Economy*. Edited by Lael Brainard L, Martinez-Diaz L. Washington, D.C.:Brookings Institution Press; 2-35.

Ben-Asher, J., Alpert, P., Ben-Zvi, A. 2010. Dew is a major factor affecting vegetation water use efficiency rather than a source of water in the eastern Mediterranean area. **Water Resources Research**, **46**.

Berry, Z.C., Emery, N.C., Gotsch, S.G., Goldsmith, G.R. 2019. Foliar wateruptake: processes, pathways, and integration into plant water budgets. **Plant, Cell and Environment**, **42**:410-423.

Bradley, D.J., Gilbert, G.S., Parker, I.M. 2003. Susceptibility of clover species to fungal infection: the interaction of leaf surface traits and environment. **American Journal of Botany**, **90**: 857-864.

Brewer, C.A., Smith, W.K.,Vogelmann, T.C. 1991. Functional interaction between leaf trichomes, leaf wettability and the optical properties of water droplets. **Plant, Cell and Environment**, **14**: 955-962.

Casida, J.E. 2011. Neonicotinoid Metabolism: Compounds, Substituents, Pathways, Enzymes, Organisms, and Relevance. **Journal of Acrigultural and Food Chemistry**, **59**: 2923-2931.

Castellanos, N.L., Ferreira-Filho, N.A., Rodrigues, H.S., Martínez, L.C., Serrão, J.E., Oliveira, E.E. 2021. Imidacloprid-mediated alterations on the salivary glands of the Neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*. **Ecotoxicology**, **30**: 678-688.

Chaddad, F.R, Jank, M.S. 2006. The evolution of agricultural policies and agribusiness development in Brazil. **Choices**, **21**:85-90.

Chowański, S., Adamski, Z., Marciniak, P., Rosiński, G., Büyükgüzel, E., Büyükgüzel, K., Bufo, S. 2016. A Review of Bioinsecticidal Activity of Solanaceae Alkaloids. **Toxins**, **8**: 60.

Cimino, A.M.; Boyles, A.L.; Thayer, K.A.; Perry, M.J. 2017. Effects of Neonicotinoid Pesticide Exposure on Human Health: A Systematic Review. **Environment Health Perspectives**, **125**:155–162.

Cone, I.V., Blazier, M.A., Adams, J.P., Sayer, M.A.S., Tyree, M.C. 2022. Effect of the Systemic Neonicotinoid Insecticide Dinotefuran on Leaf-level Photosynthesis in Loblolly Pine (*Pinus taeda*). **Communications in Soil Science and Plant Analysis**: 1-6.

Coskun, Y., Kilic, S., Duran, R.E. 2015. The effects of the insecticide pyriproxyfen on germination, development, and growth responses of maize seedlings. **Fresenius Environment Bulletin**, **24**: 278-284.

Çavuşoğlu, K., Yalçın, E., Türkmen, Z., Yapar, K., Sağır, S. 2012. Physiological, anatomical, biochemical, and cytogenetic effects of thiamethoxam treatment on *Allium cepa* (amaryllidaceae) L. **Environmental Toxicology**, **27**: 635-643.

Diaz-Espejo, A., Cuevas, M.V., Ribas-Carbo, M., Flexas, J., Martorell, S., Fernández, J.E. 2012. The effect of strobilurins on leaf gas exchange, water use efficiency and ABA content in grapevine under field conditions. **Journal of Plant Physiology**, **169**: 379-386.

Dickinson, W.C. 2000. **Integrative plant anatomy**. Academic Press.

Edwards, C.A. 1975. **Factors that affect the persistence of pesticides in plants and soils**. Environmental pollution by pesticides. Plenum Press – London and New York. 541pp.

Eller, C.B., Lima, A.L., Oliveira, R.S. 2013. Foliar uptake of fog water and transport belowground alleviates drought effects in the cloud forest tree species, *Drimys brasiliensis* (Winteraceae). **New Phytologist**, **199**:151-162.

Endres, L., Oliveira, N.G., Ferreira, V.M., Silva, J.V., Barbosa, G.V.S., Maia Junior, S.O. 2016. Morphological and physiological response of sugarcane under abiotic stress to neonicotinoid insecticides. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, **28**:347-355.

Fernández, V., Bahamonde, H.A., Peguero-Pina, J.J., Gil-Pelegrin, E., Sancho-Knapik, D., Gil, L., Goldbach, H.E. Eichert, T. 2017. Physicochemical properties of plant cuticles and their functional and ecological significance. **Journal of Experimental Botany**, **68**: 5293–5306.

Fernández, V., Gil-Pelegrín, E., Eichert, T. 2021. Foliar water and solute absorption: an update. **The Plant Journal**, **105**: 870-883.

Ford, K.A., Casida, J.E., Chandran, D., Gulevich, A.G., Okrent, R.A., Durkin, K.A., Wildermuth, M.C. 2010. Neonicotinoid insecticides induce salicylate-associated plant defense responses. **PNAS**, **107**: 17527–17532.

Furmidge, C.G.L. 1962. The Retention of Spray Liquids on Leaf Surfaces. Physico-chemical studies on agricultural sprays. **Journal of Science of Food and Agriculture**, **13**.

Gallo, D.O., Nakano, O., Silvera Neto, S., Carvalho, R.P.L., Baptista, G.C., Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S., Omoto, C. 2002. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba, FEALQ. 920p.

Gilmore, E.A. 2001. Critique of soil contamination and remediation: the dimensions of the problem and the implications for sustainable development. **Bulletin of Science and Technology Society**, **21**: 394-400.

Goldsmith, G.R., Matzke, N.J., Dawson, T.E. 2013. The incidence and implications of clouds for cloud forest plant water relations. **Ecology Letters**, **16**: 307-314.

Goldsmith, G.R., Bentley, L.P., Shenkin, A., Salinas, N., Blonder, B., Martin, R.E., Castro-Crossco, R., Chambi-Porroa, P., Diaz, S., Enquist, B.J., Asner, G.P., Malhi, Y. 2017. Variation in leaf wettability traits along a tropical montane elevation gradient. **New Phytologist**, **214**: 989-1001.

Gotsch, S.G., Asbjornsen, H., Holwerda, F., Goldsmith, G.R., Weintraub, A.E., Dawson, T.E. 2014. Foggy days and dry nights determine crown-level water balance in a seasonal tropical montane cloud forest. **Plant, Cell and Environment**, **37**: 261-272.

Graff, L. 2013. **Os agrotóxicos e o meio ambiente: uma abordagem a partir do direito humano à alimentação adequada**. Dissertação de Mestrado em Direito Ambiental – Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul. 122 p.

Hanba, Y.T., Moriya, A., Kimura, K. 2004. Effect of leaf surface wetness and wettability on photosynthesis in bean and pea. **Plant, Cell and Environment**, **27**: 413-421.

He, Y., Xiao, S., Wu, J., Fang, H. 2019. Influence of Multiple Factors on the Wettability and Surface Free Energy of Leaf Surface. **Applied Sciences**, **9**: 593.

Hoai, P.M., Sebesvari, Z., Minh, T.B., Viet, P.H., Renaud, F.G. 2011. Pesticide pollution in agricultural areas of Northern Vietnam: Case study in Hoang Liet and Minh Dai communes. **Environmental Pollution**, **159**: 3344-3350.

Holbrook, N.M., Putz, F.E. 1989. Influence of neighbors on tree form: effects of lateral shade and prevention of sway on the allometry of *Liquidambar styraciflua* (sweet gum). **American Journal of Botany**, **76**: 1740-1749.

Holder, C.D. 2007. Leaf water repellency as an adaptation to tropical montane cloud forest environments. **Biotropica**, **39**: 767-770.

Huber, L., Gillespie, T.J. 1992. Modeling leaf wetness in relation to plant disease epidemiology. **Annual Review of Phytopathology**, **30**: 553-577.

Ishibashi, M., Terashima, I. 1995. Effects of continuous leaf wetness on photosynthesis: adverse aspects of rainfall. **Plant, Cell and Environment**, **18**: 431-438.

James, C. 2010. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010**. ISAAA Brief, n. 42. ISAAA: Ithaca, NY.

Kagabu, S. 2003. Molecular design of neonicotinoids: Past present and future. **Chemistry of Crop Protection**, eds Voss A, Ramos G (Wiley-VCH, Weinheim, Germany), pp 193–212.

Katata, G., Nagai, H., Kajino, M., Ueda, H., Hozumi, Y. 2010. Numerical study of fog deposition on vegetation for atmosphere–land interactions in semi-arid and arid regions. **Agricultural and Forest Meteorology**, **150**: 340-353.

Kimura-Kuroda, J., Komuta, Y., Kuroda, Y., Hayashi, M., Kawano, H. 2012. Nicotine-Like Effects of the Neonicotinoid Insecticides Acetamiprid and Imidacloprid on Cerebellar Neurons from Neonatal Rats. **PLoS ONE**, **7**: e32432

Klemm, O., Milford, C., Sutton, M.A., Spindler, G., Van Putten, E. 2002. A climatology of leaf surface wetness. **Theoretical and Applied Climatology**, **71**: 107-117.

Koch, K., Bhushan, B., Barthlott, W. 2008. Diversity of structure, morphology and wetting of plant surfaces. **Soft Matter**, **4**: 1943-1963.

Kollmeyer, W.D., Flattum, R.F., Foster, J.P., Powell, J.E., Schroeder, M.E., Soloway, S.B. 1999. **Discovery of the nitromethylene heterocycle insecticides**. In Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor, ed. I Yamamoto, JE Casida, pp. 71–89. Tokyo: SpringerVerlag.

Matos, I.S., Rosado, B.H.P. 2016. Retain or repell? Droplet volume does matter when measuring leaf wetness traits. **Annals of Botany**, **117**: 1045-1052.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/DAS. Disponível em: www.gov.br/agricultura/pt-br) Acesso em: 10.01.2023.

Mehrara, M., Baghbanpour, J. 2016. The contribution of industry and agriculture exports to economic growth: the case of developing countries. **World Scientific News**, **46**: 100-111.

Mishra, V., Srivastava, G., Prasad, S.M. 2009. Antioxidant response of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) seedlings to interactive effect of dimethoate and UVB irradiation. **Scientia Horticulturae**, **120**:373–378.

Moita Neto, J.M. 2006. Molhamento e ângulo de contato. Teresina: FAPEPI, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí.

Motti, R. 2021. The Solanaceae Family: Botanical Features and Diversity. In **The wild solanums genomes** (pp. 1-9). Springer, Cham.

Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Schmuck, R. 2001. Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Pest Management Science**, **57**: 577-586.

Nayak, P., Solanki, H. 2021. Pesticides and Indian agriculture—a review. **International Journal of Research- Granthaalayah**, **9**: 250-63.

Neinhuis, C., Barthlott, W. 1997. Characterization and distribution of water-repellent, self-cleaning plant surfaces. **Annals of Botany**, **79**: 667-677.

Oliveira, L.R. 2010. Modelagem bidimensional de hidrofobicidade e superhidrofobicidade em superfícies de pilares. 86f. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

Oliveira, R.B.D. 2011. Caracterização funcional de adjuvantes em soluções aquosas. 12p. Tese (Doutorado em Energia na Agricultura). Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, São Paulo.

Pandey, S., Nagar, P.K. 2002. Leaf surface wetness and morphological characteristics of *Valeriana jatamansi* grown under open and shade habitats. **Biologia Plantarum**, **45**: 291-294.

Parrini, R., Pardo, C. S., Pacheco, J. F. 2017. Conhecendo as plantas cujos frutos e recursos florais são consumidos pelas aves na Mata Atlântica do Parque Nacional da Serra dos Órgãos. **Atualidades Ornitológicas**, **199**: 38-136.

Papierowska, E., Szporak-Wasilewska, S., Szewińska, J., Szatyłowicz, J., Debaene, G., Utratna, M. 2018. Contact angle measurements and water drop behavior

on leaf surface for several deciduous shrub and tree species from a temperate zone. **Trees**, **32**: 1253-1266.

Petit, A.N., Fontaine, F., Vatsa, P., Clément, C., Vaillant-Gaveau, N. 2012. Fungicide impacts on photosynthesis in crop plants. **Photosynthesis Research**, **111**: 315-326.

Riederer, M., Muller, C. 2006. **Biology of the Plant Cuticle**. Annual Plant Reviews, Vol. 23. Oxford: Blackwell.

Sase, H., Takahashi, A., Sato, M., Kobayashi, H., Nakata, M., Totsuka, T. 2008. Seasonal variation in the atmospheric deposition of inorganic constituents and canopy interactions in a Japanese cedar forest. **Environmental Pollution**, **152**: 1-10.

Schepker, T.J., Webb, E.B., Tillitt, D., La Grange, T. 2020. Neonicotinoid insecticide concentrations in agricultural wetlands and associations with aquatic invertebrate communities. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, **287**: 106678.

Schmuck, R., Schoning, R., Stork, A., Schramel, O. 2001. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L., Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. **Pest Management Science**, **57**: 225-238.

Schreel, J.D., Leroux, O., Goossens, W., Brodersen, C., Rubinstein, A., Steppe, K. 2020. Identifying the pathways for foliar water uptake in beech (*Fagus sylvatica* L.): a major role for trichomes. **Plant Journal**, **103**: 769–780.

Shahid, M., Khan, M.S., Ahmed, B., Syed, A., Bahkali, A.H. 2021. Physiological disruption, structural deformation and low grain yield induced by neonicotinoid insecticides in chickpea: A long term phytotoxicity investigation. **Chemosphere**, **262**: 128388.

Sharma, A.; Kumar, V.; Kanwar, M.K.; Thukral, A.K.; Bhardwaj, R. 2017. Ameliorating imidacloprid induced oxidative stress by 24-epibrassinolide in *Brassica juncea* L. **Russian Journal of Plant Physiology**, **64**: 509-517

Simonin, K.A., Santiago, L.S., Dawson, T.E. 2009. Fog interception by *Sequoia sempervirens* (D. Don) crowns decouples physiology from soil water deficit. **Plant, Cell and Environment**, **32**: 882-892.

Soloway, S.B., Henry, A.C., Kollmeyer, W.D., Padgett, W.M., Powell, J.E., Roman, S.A., Tieman, C.H., Corey, R.A., Horne, C.A. 1978. **Nitromethyleneheterocycles as insecticides**. In Pesticide and Venom Neurotoxicity, ed. DL Shankland, RM Hollingworth, T Smyth Jr, pp. 153–58. New York: Plenum

Smith, W.K., McClean, T.M. 1989. Adaptive relationship between leaf water repellency, stomatal distribution, and gas exchange. **American Journal of Botany**, **76**: 465-469.

Sur, R., Stock, A. 2003. Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants. **Bulletin of Insectology**, **56**: 35–40.

Tomizawa, M., Casida, J.E. 2005. Neonicotinoid Insecticide Toxicology: Mechanisms of Selective Action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, **45**: 247-268.

Tuffi Santos, L.D., Sant'Anna-Santos, B.F., Meira, R.M.S.A., Ferreira, F.A., Tiburcio, R.A.S., Machado, A.F.L. 2009. Leaf anatomy and morphometry in three eucalypt clones treated with glyphosate. **Brazilian Journal of Biology**, **69**: 129-136.

Whitehorn, P.R., O'connor, S., Wackers, F.L., Goulson, D. 2012. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. **Science**, **336**: 351-352.

Xie, R., Zhao, J., Lu, L., Brown, P., Guo, J., Tian, S. 2020. Penetration of foliar-applied Zn and its impact on apple plant nutrition status: in vivo evaluation by synchrotron-based X-ray fluorescence microscopy. **Horticulture research**, **7**.

Yan, Y., Sun, S., Zhao, N., Yang, W., Shi, Q., Gong, B. 2019. COMT1 overexpression resulting in increased melatonin biosynthesis contributes to the alleviation of carbendazim phytotoxicity and residues in tomato plants. **Environmental Pollution**, **252**: 51-61.

Zhang, X., Chen, L., Leng, R., Zhang, J., Zhou, Y., Zhang, Y., Yang, S., He, K., Huang, B. 2020. Mechanism study of the beneficial effect of sodium selenite on metabolic disorders in imidacloprid-treated garlic plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **200**: 110736.

Investigação das respostas estruturais e funcionais em espécies de Solanaceae com folhas glabras e pilosas submetidas à aplicação de imidacloprido

Introdução

A utilização excessiva de inseticidas para proteger as culturas agrícolas de pragas é uma questão que gera grande preocupação (Shahid et al. 2021). Inseticidas são utilizados para melhorar a produtividade vegetal prevenindo as perdas das culturas por ataques de pragas (Nwadinigwe 2010; Jayaraj et al. 2016). Contudo, podem causar grandes impactos no ambiente e nas plantas, interferindo na fertilidade dos solos (Mukherjee et al. 2016; Shahid et al. 2017), no crescimento vegetal (Tiyagi et al. 2004), e em aspectos fisiológicos (Wagner 1939; Diaz-Espejo et al. 2012; Petit et al. 2012; Zaller et al. 2016), e estruturais das plantas (Tuffi Santos et al. 2009).

A aplicação de inseticidas por meio de pulverização leva à entrada de substâncias pelas folhas, sendo que os aspectos estruturais da superfície foliar podem influenciar na absorção de substâncias (Fernández et al. 2021). A densidade de tricomas e suas características estruturais, as propriedades físico-químicas da cutícula e a presença/ausência de ceras epicuticulares podem influenciar a absorção, adesão e/ou coesão da solução inseticida na superfície das folhas (Antonious and Snyder 1993; Fernández et al. 2017). Nesse sentido, influenciado pelas características estruturais da folha, o ângulo de contato da gota de substância líquida com a superfície foliar pode determinar o grau de molhabilidade da folha (Barthlott et al. 2017; Fernández et al. 2021) e a consequente taxa de absorção das substâncias aplicadas.

Pertencente à classe dos neonicotinoides, o imidacloprido (IMI) é um dos inseticidas mais utilizados no controle de insetos mastigadores e/ou sugadores (Shobharani 2019). No Brasil é empregado em culturas como algodão, batata, feijão, jiló, melão, milho, palma forrageira, pimentão, soja, trigo, dentre outras (MAPA 2023). É aplicado por meio de pulverização foliar e apresenta ação sistêmica no corpo vegetal, sendo absorvido e translocado para os tecidos (Kagabu 2003). Em altas dosagens, neonicotinoides podem retardar atividades biológicas, fisiológicas e enzimáticas, além de causar autólise por estresse oxidativo nas plantas (Çavuşoğlu et al. 2012; Sharma et al. 2017; Shahid et al. 2021). Pesquisas têm mostrado que o uso de inseticidas neonicotinoides podem promover alterações na densidade e morfologia de estômatos (Coskun et al. 2015; Shahid et al. 2021), alterações morfológicas em raízes em desenvolvimento (Çavuşoğlu et al. 2012; Coskun et al. 2015; Zhang et al. 2020;

Shahidet al. 2021), desarranjo celular no mesofilo foliar (Zhang et al. 2020), fragmentação vacuolar em células radiculares (Zhang et al. 2022), além de afetar comunidades de insetos polinizadores (Nauen et al. 2001; Schmuck et al. 2001; Whitehorn et al. 2012; Araújo 2015). Alterações fisiológicas como aumento da peroxidação lipídica em folhas (Zhang et al. 2020) e aumento da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em sementes (Dar et al. 2015) foram relatadas em plantas tratadas com neonicotinóides.

Solanaceae é uma das famílias de angiospermas de maior importância econômica do mundo, principalmente devido à produção de alimentos, envolvendo espécies como tomate, batata, pimentão, berinjela, jiló, dentre outras; além disso, muitas espécies da família são utilizadas na produção de fármacos e drogas, sendo grandes produtoras de alcalóides (Chowánski et al. 2016) como por exemplo *Nicotiana tabacum* L. Na maioria de seus representantes, as folhas são simples, alternas, lobadas ou partidas, sésseis ou pecioladas, desprovidas de estípulas, podendo ser glabras ou pilosas (Parrini et al. 2017). Apesar da ampla utilização de inseticidas em culturas de membros da família, pouco se sabe sobre a influência de neonicotinóides em aspectos estruturais e funcionais de Solanaceae.

Nosso objetivo foi investigar as respostas anatômicas, fisiológicas e bioquímicas em duas espécies de Solanaceae com folhas glabras e pilosas à aplicação foliar de imidacloprido. Nós hipotetizamos que espécies com folhas glabras apresentariam diferentes taxas de molhabilidade e, portanto, diferentes respostas estruturais e funcionais à aplicação do inseticida em comparação com espécies com folhas pilosas.

Material e Métodos

Material vegetal

Foram selecionadas como modelo para esse estudo duas espécies da família Solanaceae, pertencentes à subfamília Solanoideae. *Capsicum annuum* L., popularmente conhecido como pimentão, é uma planta arbustiva, com folhas simples e glabras, utilizada, principalmente, na culinária e gastronomia (Aguilar-Rincón et al. 2010). *Solanum aethiopicum* L. var. Gilo, popularmente conhecido como jiló, é uma planta arbustiva, com folhas simples e pilosas, cultivada, principalmente, para consumo de seus frutos (Lester and Daunay 2003); suas folhas apresentam tricomas tectores e glandulares por toda a superfície do limbo (Bello et al. 2017; Watts and Kariyat 2021).

Experimento em casa de vegetação

Sementes, da TopSeed Garden®, de ambas as espécies, foram espalhadas em bandejas acrílicas contendo vermiculita. Trinta dias após a germinação, as plantas foram transplantadas para vasos de 800 mL preenchidos com substrato Carolina®, contendo turfa de *Sphagnum*, conhecida como turfa canadense e/ou europeia, perlita expandida, vermiculita expandida, e casca de arroz torrefada. Os vasos foram mantidos em estufa tipo Pad & Fan, fabricado pela Van der Hoeven Estufas Agrícolas Ltda., no Setor de Biologia Vegetal do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP e irrigados a cada dois dias, até ocorrer o percolamento da água. Após 15 dias de aclimação, quando o eixo aéreo das plantas apresentava cerca de 35,0 cm de altura, iniciou-se a aplicação do defensivo Evidence® 700WG da Bayer AG®, 1-(6-chloro-3pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine (Imidacloprido - IMI).

O experimento foi conduzido em blocos casualizados com dois tratamentos: a) pulverização foliar de água + adjuvante (controle); b) pulverização foliar do defensivo + adjuvante. Dez indivíduos de cada espécie (n =10) foram submetidos a cada tratamento. A área total de superfície dos vasos foi calculada para obtenção da relação em hectares (ha). A aplicação do defensivo foi realizada com o auxílio de pulverizador costal manual de pressão constante (CO₂), equipado com bico único, tipo cone cheio, modelo 101 SP 04, com as dosagens de produtos e volume de calda de 200 mL/ha, sendo adicionados os 0,05% de adjuvante não iônico Haiten®, fabricado pela Arysta Lifescience do Brasil Indústria Química e Agropecuária Ltda., com princípio ativo de polioxietileno, aquifenol e éter. Foram realizadas três aplicações ao longo de 21 dias, em intervalos de sete dias, seguindo recomendações da bula do produto para o controle de *Thrips palmi* Karny.

Coleta de dados fisiológicos

Foram realizadas medidas de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila *a* entre 8:00 e 11:00 horas da manhã (Ramos et al. 2015) em folhas completamente expandidas localizadas no terceiro nó caulinar, de 3 indivíduos, por espécie, por tratamento, no dia anterior à primeira aplicação e a cada dois dias após o tratamento (DAT), sendo performadas ao zero (0), aos três (3), dez (10) e 17 dias.

As medidas da clorofila *a* foram realizadas através de fluorômetro acoplado ao Analisador de Fotossíntese (IRGA), modelo LI-6400, da Li-Cor pelo método do pulso

saturado (Maxwell and Johnson 2000), utilizando a nomenclatura recomendada por Baker and Rosenqvist (2004). Na presença de luz artificial foram medidos o rendimento fotoquímico máximo do fotossistema II (PSII), fluorescência inicial (F_0), fluorescência máxima (F_m) e fluorescência variável (F_v). A fluorescência mínima (F_0) foi determinada sob irradiação suficientemente baixa ($<1 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). A fluorescência máxima (F_m) foi determinada após um pulso de saturação de 0,8 s a $4.200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ nas folhas adaptadas à escuridão (30 min). Nas folhas adaptadas à luz, a radiação dos pulsos de saturação para determinar a fluorescência máxima (F_m') foi de $6.000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para 0,8 s, enquanto a luz actínica foi de $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. As medições do rendimento quântico fotoquímico do PSII foram obtidas por aplicação de um pulso de luz de saturação ($6.000 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para 0,8 s) sob irradiação ambiente. Os parâmetros de fluorescência, como rendimento quântico máximo variável do PSII (F_v/F_m): representando o rendimento quântico da fase fotoquímica da fotossíntese; rendimento quântico efetivo do PSII (F_v'/F_m'): representando a eficiência da captura da excitação dos elétrons pelos centros de reação abertos do PSII; *quenching* fotoquímico (qP): refletindo o metabolismo fotossintético do carbono; *quenching* não-fotoquímico (qNP): representando todas as outras formas de dissipação de energia, principalmente calor e taxa relativa de transporte eletrônico (ETR), foram calculados de acordo com Schreiber (1986). Para o cálculo de ETR , a fração de excitação de energia distribuída para o PSII foi considerada 0,5 e a fração de densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) absorvida pela folha, 0,84 (Demig and Bjorkman 1987). Para essas análises, as folhas foram envolvidas com papel alumínio por 30 minutos, para que pudessem se adaptar ao escuro.

As medidas de trocas gasosas foram efetuadas utilizando o equipamento de sistema aberto de fotossíntese com analisador de CO_2 e vapor d'água por radiação infravermelho (*Infra Red Gas Analyser* – IRGA), fabricado pela Li-Cor (USA), modelo 6400. As taxas de assimilação de CO_2 (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$), taxa de transpiração (E , $\text{mmol vapor de água m}^{-2}\text{s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), e concentração interna de CO_2 (C_i , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}\text{ar}$) foram mensuradas em três plantas por tratamento, com as avaliações feitas pela manhã, entre as 8:00 e 11:00 horas, sendo utilizado o programa de análise de dados do equipamento medidos de fotossíntese (Von Caemmerer and Farquhar 1981). A concentração de CO_2 que entrou na câmara (LCF câmara; 2cm^2 , Li-cor) foi em média de $400 \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$, fornecido pelo misturador de CO_2 6400-01 (Li-cor). A Densidade de Fluxo de Fótons Fotossintéticos (PPFD) foi

fornecida por um diodo emissor de luz (LED) como fonte de luz (6400-40 LCF, Li-cor, com espectro de 90% vermelho e 10% azul), sendo definido para fornecer $1.000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ na c\u00e2mara, com base na curva de luz realizada anteriormente. O d\u00e9ficit de press\u00e3o de vapor (VPD) dentro da c\u00e2mara foi $2,08 \pm 0,18 \text{ kPa}$, o que significa que a umidade relativa na c\u00e2mara (amostra) foi $65.1 \pm 2.3\%$. Tamb\u00e9m foram calculadas a efici\u00eancia do uso da \u00e1gua (*EUA*, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} / \text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) pela rela\u00e7\u00e3o entre taxa de assimila\u00e7\u00e3o de CO_2 e transpira\u00e7\u00e3o. A efici\u00eancia instant\u00e2nea de carboxila\u00e7\u00e3o (*A/Ci*) foi determinada pela rela\u00e7\u00e3o entre taxa de assimila\u00e7\u00e3o de CO_2 e concentra\u00e7\u00e3o interna de CO_2 na folha.

An\u00e1lises de atividade enzim\u00e1tica

Para as an\u00e1lises bioqu\u00edmicas, foram coletadas folhas completamente expandidas e n\u00e3o-senescentes de quatro indiv\u00edduos de cada esp\u00e9cie por tratamento, no per\u00edodo da manh\u00e3, entre as 8:00 e as 11:00 horas. As amostras foram congeladas instantaneamente em nitrog\u00eanio l\u00edquido e mantidas a -80°C em ultrafreezer. No laborat\u00f3rio, as folhas foram maceradas com aux\u00edlio de nitrog\u00eanio l\u00edquido. Do material pulverizado foram pesadas 300mg para extra\u00e7\u00e3o enzim\u00e1tica e 200mg para an\u00e1lise de peroxida\u00e7\u00e3o lip\u00eddica. Todo o processo foi realizado com tubos e pin\u00e7as pr\u00e9-resfriados para evitar o descongelamento das amostras.

A extra\u00e7\u00e3o de enzimas foi realizada de acordo com metodologia proposta por Kar and Mishra (1976), adicionando 5,0 mL de solu\u00e7\u00e3o contendo 50,0 mM de tamp\u00e3o fosfato (pH 6,7), e 1% (m/v) polyvinylpyrrolidone. As amostras foram homogeneizadas com utiliza\u00e7\u00e3o de centr\u00edfuga a 10.000 rpm por 10min a 4°C e o sobrenadante foi coletado para a realiza\u00e7\u00e3o das an\u00e1lises. Para determinar a atividade espec\u00edfica das enzimas antioxidantes, a quantifica\u00e7\u00e3o das prote\u00ednas sol\u00faveis para cada extrato enzim\u00e1tico foi previamente realizada de acordo com Bradford (1976).

A atividade da enzima antioxidante super\u00f3xido dismutase (SOD) foi determinada atrav\u00e9s da habilidade da enzima em inibir a fotorredu\u00e7\u00e3o do *nitroblue tetrazolium* (NBT), de acordo com metodologia proposta por Giannopolitis and Ries (1977), com modifica\u00e7\u00f5es de Dousseau et al. (2016). As leituras de absorv\u00eancia foram realizadas a 560 nm em espectrofot\u00f4metro (BiotekEpochTM Microplate Elisa Spectrophotometer). Uma unidade de atividade da SOD foi definida como a quantidade necess\u00e1ria de enzima para inibir a fotorredu\u00e7\u00e3o do NBT em 50% sob condi\u00e7\u00f5es de ensaio, expressas por $\text{U mg prote\u00edna}^{-1}$.

A atividade da enzima peroxidase (POD) foi determinada de acordo com metodologia proposta por Teisseire and Guy (2000), com adaptações, e as leituras foram realizadas a 430 nm no espectofotômetro (BiotekEpoch™ Microplate Elisa Spectrophotometer). Para calcular a atividade da POD, foi utilizado o coeficiente de extinção molar ($2,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), sendo a atividade expressa em $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ mg} \cdot \text{proteína}^{-1}$.

Medição dos índices de peroxidação lipídica

A medição dos índices de peroxidação lipídica (MDA) foi realizada de acordo com a técnica proposta por Rama Devi and Prasad (1998). Amostras de folhas maceradas (200 mg) foram homogeneizadas em 5,0 mL de tampão de extração contendo 0,25% de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% de ácido tricloroacético (TCA) e, em seguida, fervidas a 95°C por 30min. A mistura de reação foi resfriada no gelo e depois centrifugada em 10.000 rpm por 5 min. A absorbância foi mensurada em 560 e 600 nm, e os resultados expressos em μmol de MDA por grama de massa fresca.

Microscopia de luz

Para estudos anatômicos, folhas completamente expandidas formadas após a aplicação dos tratamentos foram coletadas e fixadas em solução de formaldeído 37%, ácido acético glacial e álcool 50% (5:5:90) por 24 h (Johansen 1940). Amostras da região mediana do limbo foliar foram desidratadas em série etílica e embebidas em resina metacrilato Leica (Gerrits 1991). Secções transversais (5,0 μm) foram obtidas ao micrótomo rotativo semiautomático Leica RM2145 e coradas com Azul de Toluidina 0,05% pH 4,7 (O'Brien et al. 1964). Lâminas permanentes foram montadas utilizando resina sintética como meio de montagem. O laminário foi analisado ao fotomicroscópio Leica DMR e os resultados foram documentados com auxílio de câmera digital Leica DFC425 acoplada.

Foram realizadas análises morfométricas ao microscópio de luz com auxílio do software LAS VS 3.8. Foram mensuradas a espessura da epiderme nas faces adaxial e abaxial do limbo, espessura da parede periclinal externa das células epidérmicas na face adaxial do limbo, espessura do mesofilo, espessura do parênquima paliçádico e parênquima esponjoso, área ocupada por espaços intercelulares no parênquima esponjoso, distância entre feixes vasculares de terceira ordem, e densidade de idioblastos.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a análise da superfície do limbo foliar, amostras da região mediana do limbo de folhas totalmente expandidas formadas após a aplicação dos tratamentos foram fixadas em solução Karnovsky (paraformaldeído 4%, glutaraldeído 1% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2; tampão fosfato 0,2 M pH 7,2) por 24 horas (Karnovsky 1965). Posteriormente, foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3 por uma hora e desidratadas em série etílica. As amostras foram secas em ponto crítico (CPD) 020 (*Balzer Union*) utilizando CO₂ líquido, coladas em suportes de alumínio e metalizadas com ouro. As análises foram realizadas ao microscópio eletrônico de varredura FeiQuanta a 20 kV.

Testes histoquímicos

Para a determinação da natureza dos cristais presentes em idioblastos no mesofilo foliar, amostras de limbo foliar recém-coletadas foram seccionadas à mão com auxílio de lâminas de barbear e tratadas com ácido clorídrico a 10% (Jensen 1962).

Para histolocalização de espécies reativas de oxigênio (ERO) amostras de limbo foliar foram mantidas em solução de 0,5% de 3,3-diaminobenzidina - DAB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em tampão fosfato salino pH 7,4 por 60 minutos no escuro. Para o teste controle, amostras foram mantidas pelo mesmo período de tempo em solução de ácido ascórbico. A seguir, as amostras foram seccionadas à mão com auxílio de lâminas de barbear e analisadas e os resultados documentados utilizando fotomicroscópio Leica DMR acoplado à câmera digital Leica DFC425.

Absorção foliar

Na superfície adaxial do limbo de folhas completamente expandidas localizadas no terceiro nó caulinar abaixo do ápice foi depositada uma gota de 200 µL de Safranina aquosa a 1%; a solução permaneceu na superfície foliar até a completa secagem. A seguir, as folhas ainda ligadas à planta, foram lavadas com álcool 90% até a retirada total do corante da superfície do limbo e depois lavadas em água corrente. Após serem destacadas das plantas, secções transversais da região tratada foram realizadas com auxílio de lâminas de barbear (Milanez and Machado 2008 - adaptado). As secções foram montadas entre lâmina e lamínula utilizando água e analisadas ao microscópio confocal de varredura a laser TCS SP5 Leica, com excitação em 514nm e detecção entre 559 – 605 nm.

Análise de molhabilidade

Diferentes testes de molhabilidade foram realizados utilizando água deionizada, com pH 6,5 e temperatura de 18,9°C: a) água deionizada; b) água deionizada + adjuvante; c) água deionizada + IMI + adjuvante.

Foram utilizadas cinco folhas de cada espécie. Cada folha recém-coletada foi afixada em placa plana de isopor com auxílio de fita adesiva. Na face adaxial de cada folha foi depositada uma gota de 5,0 µL (Matos and Rosado 2016) de cada um dos tratamentos, com auxílio de uma micropipeta. Registros foram obtidos com auxílio de câmera fotográfica e o ângulo de contato entre a gota de água e a superfície foliar foi calculado com auxílio do software ImageJ, versão 1.53. Para classificação das folhas quanto à molhabilidade foi utilizado critério apresentado por Fernández et al. (2021): folhas molháveis apresentam ângulos de contato entre a gota e a superfície foliar menores que 90°; nas folhas não-molháveis o ângulo de contato entre a gota e a superfície foliar é maior ou igual a 90°; enquanto as folhas onde o ângulo de contato entre a gota e a superfície foliar é maior ou igual a 130° são consideradas altamente não-molháveis.

Análises estatísticas

Para cada tratamento, inicialmente foi checada a normalidade dos dados pelo teste Anderson-Darling com posterior verificação da homocedasticidade (homogeneidade das variâncias) por meio do teste Hartley. Os dados qualitativos de fluorescência da clorofila *a* e taxas fotossintéticas foram submetidos à análise de variância, com níveis de significância de 5% de probabilidade de erro. Quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro. Para as variáveis quantitativas aplicou-se a análise de regressão também adotando 5% de probabilidade de erro. Utilizou-se o programa estatístico R (versão 4.1.2) e o RStudio (versão 2021.09.2 Build 382) como ambiente gráfico. Os gráficos foram elaborados no programa SigmaPlot (versão 14.0).

Resultados

Fluorescência da clorofila *a* e análises fisiológicas

***Capsicum annuum* L.**

Para plantas de *C. annuum* do grupo controle (F=não significativo 'ns'), foi observado diminuição do *quenching* fotoquímico (qP) aos 3 dias após o tratamento (DAT), aumento aos 10 DAT e queda aos 17 DAT, enquanto plantas tratadas com imidacloprido (IMI) (F=11,8) foi observado aumento aos 3 e 10 (DAT) e queda aos 17 DAT (Fig. 1A). O *quenching* não-fotoquímico (qNP) apresentou queda aos 3 DAT e elevação aos 10 DAT, tanto em plantas do grupo controle (F=ns) quanto em plantas tratadas com IMI (F=ns), porém, aos 17 DAT, plantas do grupo controle apresentaram queda e plantas tratadas com IMI apresentaram ligeiro aumento (Fig. 1B). Para o rendimento quântico efetivo do PSII (Fv'/Fm') foi observado o aumento aos 3 DAT, e queda aos 10 DAT para ambos os tratamentos (F=ns), porém, plantas do grupo controle continuaram a mostrar queda aos 17 DAT enquanto plantas tratadas com IMI mostraram estabilização aos 17 DAT (Fig. 1C). O rendimento máximo variável do PSII (Fv/Fm) em ambos os tratamentos apresentou queda aos 3 e 10 DAT e aumento aos 17 DAT (F=8,23 controle; F=ns IMI) (Fig. 1D).

A assimilação de CO_2 (A) apresentou aumento aos 3 DAT e queda exponencial aos 10 e 17 DAT em plantas do grupo controle (F=18,2), enquanto as plantas tratadas com IMI (F=7,2) apresentaram queda linear ao longo de todo o tratamento (Fig. 2A). Já na condutância estomática (g_s), tanto plantas do grupo controle (F=62,3) quanto tratadas com IMI (F=ns) apresentaram elevação aos 3 DAT e queda aos 10 DAT, porém, plantas do grupo controle continuaram apresentando queda aos 17 DAT, enquanto plantas tratadas com IMI mostraram estabilização nos valores de g_s aos 17 DAT (Fig. 2B). A concentração interna de carbono (C_i) aumentou ao longo de todo o tratamento em plantas do grupo controle (F=5,98), enquanto plantas tratadas com IMI (F=ns) apresentaram aumento aos 3 DAT, queda aos 10 DAT e aumento aos 17 DAT (Fig. 2C). As taxas de transpiração (E) aumentaram em plantas do grupo controle (F=15,52) aos 3 DAT e apresentaram queda exponencial aos 10 e 17 DAT; plantas tratadas com IMI (F=17,2) apresentaram elevação aos 3 DAT, queda aos 10 DAT e ligeiro aumento aos 17 DAT (Fig. 2D).

A taxa relativa do transporte de elétrons (ETR) mostrou aumento aos 3 DAT e queda aos 10 DAT em ambos os tratamentos, porém continuou a cair em plantas do grupo controle (F=9,3) e se estabilizou em plantas tratadas com IMI (F=ns) aos 17 DAT (Fig. 3A). A eficiência instantânea de carboxilação (A/C_i) aumentou aos 3 DAT, e apresentou queda exponencial aos 10 e 17 DAT em plantas do grupo controle (F=40,1), enquanto plantas tratadas com IMI (F=24,0) diminuíram ao longo do tratamento (Fig.

3B). A eficiência do uso da água (*EUA*) apresentou queda linear em plantas do grupo controle ($F=16,97$) ao longo de todo o tratamento, enquanto plantas tratadas com IMI ($F=ns$) apresentaram aumento aos 3 DAT, queda aos 10 DAT e estabilização aos 17 DAT (Fig. 3C).

***Solanum aethiopicum* L.**

Para plantas de *S. aethiopicum* foi observado estabilização do *quenching* fotoquímico (*qP*) ao longo do tratamento para plantas do grupo controle ($F=ns$), enquanto plantas tratadas com IMI ($F=12,3$) apresentaram elevação aos 3 e 10 DAT e queda aos 17 DAT (Fig. 1A). O *quenching* não-fotoquímico (*qNP*) apresentou aumento ao longo do tratamento para ambos os tratamentos ($F=8,6$ controle; $F=9,5$ IMI) (Fig. 1B). O rendimento quântico efetivo do PSII (F_v'/F_m') apresentou aumento linear em plantas do grupo controle ($F=7,8$) ao longo do tratamento, enquanto plantas tratadas com IMI ($F=ns$) apresentaram estabilização aos 3 e 10 DAT e aumento aos 17 DAT (Fig. 1C). Já o rendimento quântico máximo variável do PSII (F_v/F_m) apresentou queda aos 3 e 10 DAT e aumento aos 17 DAT em ambos os tratamentos ($F=7,34$ controle; $F=ns$ IMI) (Fig. 1D).

Tanto a assimilação de CO_2 (*A*) ($F=11,3$ controle; $F=ns$) (Fig. 2A) quanto à condutância estomática (*g_s*) ($F=43,2$ controle; $F=ns$) (Fig. 2B) apresentaram aumento linear em plantas do grupo controle ao longo do tratamento, enquanto plantas tratadas com IMI apresentaram elevação aos 3 DAT, queda aos 10 DAT e elevação aos 17 DAT. A concentração interna de CO_2 (*C_i*) apresentou queda aos 3 DAT e aumento linear aos 10 e 17 DAT em plantas do grupo controle ($F=6,16$), enquanto plantas tratadas com IMI ($F=ns$) apresentaram elevação aos 3 DAT, queda aos 10 DAT, e aumento aos 17 DAT (Fig. 2C). A taxa de transpiração (*E*) apresentou aumento aos 3 e 10 DAT, e queda aos 17 DAT em plantas do grupo controle ($F=19,4$), enquanto plantas tratadas com IMI ($F=ns$) apresentaram aumento aos 3 DAT, queda aos 10 DAT, e estabilização aos 17 DAT (Fig. 2D).

A taxa relativa do transporte de elétrons (*ETR*) mostrou aumento linear ao longo do tratamento em plantas do grupo controle ($F=10,3$), enquanto plantas tratadas com IMI ($F=12,8$) apresentaram elevação aos 3 e 10 DAT e queda aos 17 DAT (Fig. 3A). A eficiência instantânea de carboxilação (*A/C_i*) apresentou aumento aos 3 e 10 DAT e queda aos 17 DAT plantas do grupo controle ($F=12,36$), enquanto plantas tratadas com IMI ($F=ns$) apresentaram elevação aos 3 DAT, queda aos 10 DAT e estabilização aos 17

DAT (Fig. 3B). A eficiência do uso da água (*EUA*) apresentou queda aos 3 DAT, estabilização aos 10 DAT e aumento aos 17 DAT em plantas do grupo controle ($F=6,32$), enquanto plantas tratadas com IMI ($F=ns$) apresentaram aumento aos 3 DAT, queda aos 10 DAT e aumento aos 17 DAT (Fig. 3C).

Análises bioquímicas

***Capsicum annuum* L.**

Com relação às análises bioquímicas ao longo do tratamento, notamos que a peroxidação lipídica aumentou em ambos os tratamentos ($F=48,2$ controle; $F=25,4$ IMI) ao longo do experimento (Fig. 4A). A atividade da enzima peroxidase (POD) apresentou pequena queda em plantas do grupo controle ($F=31,17$), enquanto plantas tratadas com IMI ($F=15,02$) apresentaram queda aos 3 DAT e ligeira queda aos 10 e 17 DAT (Fig. 4B). A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) apresentou aumento aos 3 e 10 DAT e queda aos 17 DAT em plantas do grupo controle ($F=ns$), enquanto plantas tratadas com IMI ($F=36,14$) apresentaram ligeira elevação ao longo de todo o tratamento (Fig. 4C).

***Solanum aethiopicum* L.**

A peroxidação lipídica (POD) diminuiu aos 3 DAT, aumentou aos 10 DAT, e caiu aos 17 DAT em plantas do grupo controle ($F=ns$), enquanto plantas tratadas com IMI ($F=7,64$) apresentaram queda aos 3 DAT, ligeira queda aos 10 DAT e ligeiro aumento aos 17 DAT (Fig. 4A). A atividade da enzima peroxidase (POD) apresentou queda exponencial em plantas do grupo controle ($F=33,9$); plantas tratadas com IMI ($F=62,6$) também apresentaram diminuição da atividade da POD ao longo do tratamento (Fig. 4B). A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) apresentou aumento linear ao longo do tratamento em plantas do grupo controle ($F=22,3$), enquanto plantas tratadas com IMI ($F=31,17$) apresentaram ligeiro aumento ao longo do tratamento (Fig. 4C).

Comparações entre plantas de *Capsicum annuum* e *Solanum aethiopicum* tratadas com IMI

Ao final do período experimental, plantas de *S. aethiopicum* tratadas com IMI apresentaram maior eficiência fotossintética (Fv'/Fm') quando comparada com plantas de *C. annuum* tratadas com IMI (Fig. 1C); entretanto, ambas as espécies tratadas com

IMI após sofrerem uma queda nos valores de rendimento quântico máximo variável do PSII (F_v/F_m) durante o tratamento, mostraram elevação dos valores ao final do experimento (Fig. 1D). As taxas de assimilação (A) e de condutância estomática (g_s) de plantas de *C. annuum* tratadas com IMI, ao final do período experimental, foram menores em comparação com *S. aethiopicum* (Fig. 2A, B). Plantas de *S. aethiopicum* tratadas com IMI mostraram maior concentração interna de CO_2 (C_i) (Fig. 2C) e maiores taxas de transpiração (E) (Fig. 2D) que *C. annuum*.

Morfologia foliar

a) Superfície foliar

Em vista frontal, as células epidérmicas comuns na face adaxial do limbo de *S. aethiopicum* apresentaram contorno levemente sinuoso e eram recobertas por cutícula lisa tanto em plantas do grupo controle (Fig. 5A) quanto em plantas tratadas com IMI (Fig. 5B). Estômatos, tricomas tectores e tricomas glandulares foram observados em ambas as faces do limbo em plantas do grupo controle (Fig. 5A) e em plantas tratadas com IMI (Fig. 5B). Em secção transversal, a epiderme se mostrou unisseriada, com células com formato variando de arredondado a ligeiramente alongado tangencialmente na face adaxial do limbo foliar; na face abaxial do limbo, as células epidérmicas comuns eram menos volumosas e apresentaram formato arredondado a retangular (Fig. 5C, D) em ambos os tratamentos.

A superfície adaxial do limbo foliar de *C. annuum*, em vista frontal, mostrou relevo irregular; grupos de células epidérmicas se dispunham em diferentes níveis, tanto nas plantas do grupo controle (Fig. 5E) quanto em plantas tratadas com IMI (Fig. 5F), formando porções levemente mais salientes e porções mais profundas na superfície foliar. A cutícula na face adaxial do limbo foliar apresentou-se delgada e lisa em plantas do grupo controle (Fig. 5E) e em plantas tratadas com IMI (Fig. 5F); leve estriação da cutícula foi observada nas células adjacentes aos estômatos (Fig. 5E, F). As folhas eram anfistomáticas e, em secção transversal, a epiderme se mostrou unisseriada (Fig. 5G, H). Na face adaxial do limbo, as células epidérmicas comuns eram volumosas com formato arredondado a ligeiramente alongado tangencialmente em plantas de ambos os tratamentos (Fig. 5G, H). Na face abaxial do limbo, as células epidérmicas comuns eram menos volumosas. Nas secções transversais, foi observada descontinuidade da epiderme em regiões do limbo, o que está associado ao relevo irregular da superfície

foliar; nas folhas de plantas tratadas com IMI essas regiões de descontinuidade da epiderme foram mais comumente observadas (Fig. 5H).

A espessura da parede periclinal externa na face adaxial do limbo (Fig. 6A) e a altura das células epidérmicas nas faces adaxial (Fig. 6B) e abaxial (Fig. 6C) do limbo não variou entre indivíduos do grupo controle e indivíduos tratados com IMI, em ambas as espécies.

b) Mesofilo

Ambas as espécies apresentaram mesofilo dorsiventral, tanto em plantas do grupo controle (Fig. 5C, G) quanto em plantas tratadas com IMI (Fig. 5D, H). Uma camada de parênquima paliçádico foi observada subjacente à epiderme na face adaxial do limbo em ambas as espécies (Fig. 5C, G). Entretanto, em indivíduos de *S. aethiopicum* que receberam aplicação de IMI algumas células do parênquima paliçádico apresentaram divisão periclinal, tornando o parênquima paliçádico localmente bisseriado (Fig. 5D). Nas plantas de *C. annuum* do grupo controle, as células do parênquima paliçádico apresentaram contorno levemente sinuoso (Fig. 5G); já nas plantas tratadas com IMI a sinuosidade das células do parênquima paliçádico foi bem mais evidente (Fig. 5H).

O parênquima esponjoso, em plantas do grupo controle e plantas tratadas com IMI, apresentou de 4 a 5 camadas de células em *S. aethiopicum* (Fig. 5C, D) e de 3 a 4 camadas de células em *C. annuum* (Fig. 5G, H). A área ocupada pelos espaços intercelulares no parênquima esponjoso foi menor em plantas de *S. aethiopicum* tratadas com IMI em comparação com plantas do grupo controle (Fig. 7A). Por outro lado, maior área ocupada pelos espaços intercelulares foi registrada em folhas de indivíduos de *C. annuum* tratados com IMI em comparação com folhas de indivíduos do tratamento controle (Fig. 7A).

Para ambas as espécies estudadas, a espessura do parênquima paliçádico e do parênquima esponjoso (Fig. 7B, C) e a espessura total do mesofilo (Fig. 7D) foi maior em plantas que receberam aplicação de IMI em comparação com plantas do grupo controle.

Indivíduos de ambas as espécies pertencentes ao grupo controle e tratados com IMI apresentaram idioblastos com cristais arenosos no parênquima esponjoso (Fig. 5C, D, G, H). O resultado do teste com solução de ácido clorídrico a 10% indicou que esses cristais eram constituídos por oxalato de cálcio (CaOx). Plantas de *S. aethiopicum* e *C.*

annuum tratadas com IMI apresentaram maior densidade de idioblastos de cristais em comparação com plantas do grupo controle (Fig. 7E).

c) Sistema vascular

Feixes vasculares colaterais ocorreram imersos no mesofilo foliar de ambas as espécies em ambos os tratamentos (Fig. 5C, D, G, H). Em ambas as espécies a distância entre os feixes vasculares de terceira ordem foi menor em folhas de indivíduos que receberam a aplicação de IMI em comparação com plantas do grupo controle (Fig. 7F).

Detecção histoquímica de ERO

Espécies reativas de oxigênio (ERO) foram histoquimicamente detectadas nas folhas das espécies estudadas em ambos os tratamentos (Fig. 8A-H). Marcação foi produzida em todos os tecidos do limbo foliar, tendo sido observada nas células epidérmicas comuns, parênquima paliádico, parênquima esponjoso, floema e xilema (Fig. 8A-H). Em *S. aethiopicum*, ERO também foram detectadas nos tricomas tectores (Fig. 8A-D) e tricomas glandulares (Fig. 8B, D). Em ambas as espécies, plantas tratadas com IMI (Fig. 8C, D, G, H) apresentam marcação mais intensa que plantas do tratamento controle (Fig. 8A, B, E, F).

Absorção foliar

O teste de absorção foliar mostrou impregnação por Safranina na epiderme, nas células parenquimáticas do mesofilo e nos tecidos vasculares de ambas as espécies (Fig. 9A, B). Em *S. aethiopicum* marcação também foi observada nos tricomas tectores (Fig. 9A).

Molhabilidade

Os testes de molhabilidade apresentaram resultados diferentes quanto ao ângulo médio de deposição da gota em relação à superfície foliar. O teste apenas com água deionizadas mostrou ângulos de 102° em *S. aethiopicum* e de 86° em *C. annuum*, sendo consideradas folhas não-molháveis e folhas molháveis, respectivamente. O teste de água deionizada + adjuvante mostrou ângulos de 34° em *S. aethiopicum* e de 40° em *C. annuum*, sendo ambas as folhas, nesse contexto, categorizadas como molháveis. Por fim, o teste de água deionizadas + IMI + adjuvante mostrou ângulos de 42° em *S.*

aethiopicum e de 48° em *C. annuum*, também conferindo a característica de molháveis às folhas de ambas as espécies.

Discussão

De modo geral, nossas análises fisiológicas mostraram redução dos índices de trocas gasosas em *C. annuum* ao longo de todo o tratamento, tanto em plantas do grupo quanto em plantas tratadas com IMI. Porém, os índices da concentração interna de carbono (C_i) aumentaram, mesmo as plantas apresentando baixa condutância estomática (g_s), podendo indicar que a função carboxilase da enzima ribulose 1,5-bifosfatocarboxilase/oxigenase (Rubisco) apresentaria variabilidade, o que acarretaria em acúmulo de CO_2 , sugerindo que a atividade carboxilase da enzima Rubisco estaria sendo alterada por algum motivo, provavelmente pela resistência da passagem do CO_2 para os sítios de ação dessa enzima (Busch 2020). Ainda, notamos que plantas de *C. annuum* e *S. aethiopicum* tratadas com IMI apresentaram redução do *quenching* fotoquímico (qP). Isto pode indicar risco de danos ao aparato fotossintético pela capacidade reduzida de proteção a este, uma vez que a energia captada não pode ser dissipada de maneira satisfatória (Silva et al. 2016). Tal situação poderia levar ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) causando estresse oxidativo nas plantas estudadas. Sabe-se que as plantas evoluíram com um sistema antioxidante complexo atuando para reparar os danos causados pelas ERO (Dar et al. 2015). Os testes histoquímicos com DAB para histolocalização de ERO produziram marcações mais intensas em plantas tratadas com IMI, em ambas as espécies estudadas. Altas concentrações de ERO podem causar danos moleculares em lípidios, proteínas e DNA (Juan et al. 2021). Esses danos podem alterar as propriedades das membranas, como a fluidez, transporte de íons, perda de atividades enzimáticas, inibição da síntese de proteínas, podendo ainda, levar à morte celular (Sharma et al. 2012).

A capacidade das plantas de amenizar o estresse oxidativo depende parcialmente da indução da atividade da SOD e, posteriormente, da regulação de outras enzimas antioxidantes derivadas (Alscher et al. 2002). A enzima SOD compreende a primeira linha de defesa das plantas contra as ERO (Liang et al. 2003). Plantas de *S. aethiopicum* e *C. annuum* tratadas com IMI apresentam menor atividade da enzima SOD em comparação com plantas do grupo controle, diferentemente do relatado para outras espécies vegetais (Dar et al. 2015; Homayoonzadeh et al. 2020), o que pode justificar o maior acúmulo de ERO detectado pelo teste com DAB. Entretanto, mesmo que se

mantendo inferior ao das plantas controle, os indivíduos de ambas as espécies tratados com IMI mostraram aumento na atividade da SOD ao longo do tratamento. Dessa forma, podemos ainda notar, que a atividade da SOD em plantas de *S. aethiopicum* mantém as taxas de peroxidação lipídica relativamente estáveis tendo o IMI papel elicitor, gerando respostas de defesa (Alscher et al. 2002).

A atividade da enzima POD diminuiu em ambas as espécies ao longo do tratamento, tanto em plantas do grupo controle quanto em plantas tratadas com IMI. Porém, desde o início do tratamento, plantas de *C. annuum* apresentaram menor atividade dessa enzima. Sabe-se que a menor atividade de enzimas antioxidantes pode levar ao aumento da peroxidação lipídica, gerando danos nas membranas celulares (Hernandez et al. 2000). Mesmo apresentando as maiores quedas da atividade da POD, plantas de *S. aethiopicum* não apresentaram maiores taxas de peroxidação lipídica. Por outro lado, plantas de *C. annuum* mostraram maiores taxas de peroxidação lipídica o que pode ter levado às alterações anatômicas mais pronunciadas aqui registradas.

Ao ser metabolizado pelas plantas, o IMI pode gerar dois metabólitos principais, o ácido 6-chloropyridinyl-3-carboxylic e o ácido 6-chloro-2-hydroxypyridinyl-3-carboxylic, sendo ambos os compostos análogos ao ácido salicílico (Ford et al. 2010), o que pode induzir à resistência sistêmica adquirida (Szczepaniec et al. 2013). A aplicação de ácido salicílico pode aumentar a atividade de enzimas antioxidantes como SOD e POD, reduzindo a peroxidação lipídica, protegendo o aparato fotossintético, melhorando g_s e aumentando A em plantas de tomate (Aires et al. 2022). Dessa forma, podemos notar que as plantas de *S. aethiopicum* sob efeito de IMI apresentam respostas semelhantes às aquelas tratadas com ácido salicílico, podendo indicar uma possível ação antioxidante deste inseticida nessa espécie. Porém, em plantas de *C. annuum* tratadas com IMI, apesar do aumento da concentração da enzima SOD, houve aumento dos índices de peroxidação, sugerindo que o aumento na concentração dessa enzima tenha sido insuficiente para deter os processos oxidativos.

As folhas de ambas as espécies aqui estudadas submetidas à aplicação de IMI apresentaram alterações anatômicas, fisiológicas e bioquímicas em comparação com plantas do grupo controle. Embora o IMI seja amplamente usado nas culturas vegetais, sabe-se que seus resíduos afetam o desenvolvimento normal das plantas (Zhang et al. 2020). Indivíduos de *C. annuum* submetidos à aplicação de IMI apresentaram alterações mais severas em aspectos fisiológicos e bioquímicos em comparação com indivíduos de *S. aethiopicum*, especialmente no que se refere aos valores de taxa de assimilação de

CO₂, condutância estomática, taxa de transpiração e eficiência instantânea de carboxilação, além de terem apresentado alterações estruturais bastante evidentes especialmente quanto à maior sinuosidade no contorno das células do parênquima paliçádico e aumento da área ocupada por espaços intercelulares no parênquima esponjoso. As alterações mais pronunciadas nos aspectos funcionais e estruturais de *C. annuum* em resposta à aplicação do IMI podem estar associadas à sua maior molhabilidade e provável maior absorção de IMI. Nossos resultados corroboram os de Weryszko-Chmielewska and Michalojc (2009) que mencionam que a parede periclinal externa e cutícula delgadas das células epidérmicas das folhas de *C. annuum* não parecem ser uma barreira para a penetração de substâncias aplicadas na superfície foliar.

Em folhas de indivíduos de *C. annuum* que receberam aplicação de IMI, as células do mesofilo adquiriram contorno bastante sinuoso, o que pode ter resultado na maior área de espaços intercelulares registrada no mesofilo dessas folhas. Assim como já verificado para outras espécies vegetais, plantas tratadas com IMI podem apresentar alterações na morfologia das células do mesofilo (Zhang et al. 2020). Considerando que o IMI pode alterar a formação de componentes estruturais em células animais (Gao et al. 2016), as alterações na conformação das células do parênquima clorofiliano de *C. annuum* podem estar relacionadas à problemas na configuração de elementos do citoesqueleto que são essenciais na formação e manutenção da estrutura da parede celular (Chebli et al. 2021). Entretanto, não encontramos estudos sobre o efeito do IMI no citoesqueleto de células vegetais.

Plantas de ambas as espécies tratadas com IMI apresentaram redução da distância entre feixes vasculares imersos no mesofilo foliar. Plantas sob efeito de substâncias tóxicas, como herbicidas, apresentam redução na distância entre feixes vasculares, o que pode estar associado com a maior translocação dessas substâncias dentro do corpo vegetal (Marques et al. 2012). Isso pode ser uma tentativa de eliminação desse composto por promover maior distribuição para sítios de degradação da substância (Rocha 2001).

Em ambas as espécies tratadas com IMI, registramos aumento na espessura do mesofilo em comparação com plantas do grupo controle, sendo que em *S. aethiopicum* o parênquima paliçádico se tornou localmente bisseriado. O aumento da espessura dos parênquimas paliçádico e esponjoso em plantas sob condições de estresse pode favorecer a manutenção das taxas fotossintéticas por aumentar os locais de assimilação e melhorar a difusão do CO₂ nas folhas (Ennajeh et al. 2010). Mudanças na espessura do

mesofilo tem um impacto significativo na melhora da captura de CO₂ e difusão em situações de condutância estomática (g_s) reduzida (Violet-Chabrand et al. 2017; Toscano et al. 2018).

Plantas tratadas com IMI podem apresentar elevação na concentração de cálcio e zinco em folhas devido à ativação de diferentes vias metabólicas (Zhang et al. 2020). No presente estudo, a concentração de cálcio nos tecidos não foi mensurada; entretanto, considerando os estudos que reportam aumento na concentração de cálcio após aplicação de IMI (Zhang et al. 2020), é provável que essa situação possa ter ocorrido em plantas de *C. annuum* e *S. aethiopicum*. Uma evidência de que plantas de *C. annuum* e *S. aethiopicum* apresentaram elevação na concentração de cálcio é o aumento da densidade de idioplastos com cristais de oxalato de cálcio no mesofilo de plantas que foram tratadas com IMI. Estudos tem demonstrado que o excesso de cálcio causa toxicidade às células e tecidos vegetais e que o excedente desse elemento tende a ser imobilizado na forma de cristais em diferentes tecidos (Zindler-Frank et al. 2001; Mazen et al. 2003; Franceschi and Nakata 2005; Smith et al. 2009). Nossos resultados mostraram que folhas de *S. aethiopicum* e *C. annuum* apresentam capacidade de absorção de substâncias através de sua superfície. Entretanto, no que se refere à molhabilidade, observamos diferenças entre as espécies estudadas. Segundo Fernández et al. (2021) o ângulo de contato formado entre gota e superfície pode indicar sua capacidade de molhamento. Em situações em que o ângulo de contato entre gota e superfície é menor que 90°, a superfície é considerada molhável (Moia Neto 2006). Assim, as folhas glabras de *C. annuum* onde o ângulo de contato entre gota e superfície foliar foi de 86° podem ser consideradas molháveis, enquanto as folhas pilosas de *S. aethiopicum* que apresentaram ângulo de contato entre gota e superfície maior que 90° apresentariam superfície com maior hidrofobicidade. Sabe-se que as características estruturais da superfície foliar podem interferir na taxa de molhabilidade das folhas e atuar na absorção ou repelência de líquidos (Alves 2017; Schreel et al. 2020), sendo que a atração pela água precisa ser maior que sua tensão superficial para uma boa molhabilidade (Lo and Hopkinson 1995; Moia Neto 2006). Nossos dados mostram que as folhas de *C. annuum* apresentam estriações da cutícula e superfície com relevo irregular passíveis de acúmulo de substâncias líquidas, enquanto a superfície foliar de *S. aethiopicum* se apresenta mais regular e lisa. Tais características podem colaborar com a maior molhabilidade de *C. annuum*. Além disso, as folhas de *S. aethiopicum* apresentam diferentes morfotipos de tricomas tectores e glandulares que podem interferir na tensão

superficial do líquido na superfície foliar e consequentemente na molhabilidade dessa espécie. Estudos em andamento (Nicolai and Rodrigues *in prep*) tem mostrado por meio de testes histoquímicos que o corpo e os braços dos tricomas tectores nas folhas de *S. aethiopicum* são formados por células com paredes lignificadas, o que poderia interferir na molhabilidade dessa espécie e dificultar a absorção de substâncias hidrofílicas, tais como o IMI, pela superfície foliar.

O emprego de adjuvantes em associação com defensivos químicos melhora o desempenho das substâncias pulverizadas, apresentando ações como tamponantes, dispersantes, emulsificantes, molhantes, adesivos e espalhantes (Oliveira, 2011). Essa última. Dessa forma observamos através dos testes de molhabilidade em conjunto com o adjuvante, que mesmo que as folhas de *S. aethiopicum*, espécie que apresentou propriedades que as caracterizou como não-molhável, a ação do adjuvante a tornou molhável, fazendo com que a gota se espalhasse pela superfície foliar. Adjuvantes surfatantes, como o utilizado no experimento, facilitam o espalhamento da gota sobre a folha, pois diminui o ângulo de contato da gota com a superfície foliar, fazendo com que percam a conformação esférica (Singh and Mack 1993).

Em síntese, nossos resultados indicam que o IMI pode causar alterações em aspectos estruturais, fisiológicos e bioquímicos em *S. aethiopicum* e *C. annuum*, assim como observado para outras espécies vegetais (Gonias et al. 2008; Dar et al. 2015; Homayoonzadeh et al. 2020; Zhang et al. 2020; Shahid et al. 2021; Zhang et al. 2022). Assim, independentemente do grau de molhabilidade, parece haver penetração foliar de IMI suficiente para causar alterações estruturais e funcionais em ambas as espécies. Entretanto, nossos resultados indicam que as folhas glabras de *C. annuum* parecem ser mais susceptíveis à ação do IMI, uma vez que alterações funcionais e estruturais mais intensas foram observadas nessa espécie em comparação com *S. aethiopicum* que possui folhas pilosas. É importante reforçar que ambas as espécies estudadas possuem folhas anfistomáticas com células epidérmicas revestidas por cutícula lisa e delgada. Entretanto, diferenças na micromorfologia da superfície foliar foram observadas, o que pode justificar as diferenças nas condições de molhabilidade entre as espécies. Enquanto *S. aethiopicum* apresenta abundância de tricomas tectores constituídos por células com paredes lignificadas, *C. annuum* apresenta superfície foliar com relevo irregular formando depressões onde substâncias líquidas poderiam se acumular favorecendo a absorção foliar. Assim, embora a presença/ausência de tricomas pareça ser um dos fatores interferindo na molhabilidade foliar das espécies estudadas, outros aspectos

morfológicos parecem interferir de forma efetiva nas condições de absorção pela superfície foliar, como a própria constituição dos apêndices epidérmicos e o relevo da superfície foliar. Estudos envolvendo um maior número de espécies vegetais filogeneticamente relacionadas são necessários para entender o papel dos tricomas na absorção de substâncias pela superfície foliar.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa de Desenvolvimento (CQNP) pela bolsa de doutorado concedida a J. Nicolai (Processo: 140744/2019-3) e à bolsa de produtividade concedida a T.M. Rodrigues (Processo:312900/2021-0); e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001; ao Centro de Microscopia Eletrônica, IBB UNESP-Botucatu pelo processamento do material para análises ultraestruturais; a Profa. Dra. Regiane Cristina de Oliveira pelas dicas para instalação do experimento; a Isabelly Cristina da Silva Marques, Eduardo Santana Aires, Francisco Gilvan Borges Ferreira Freitas Júnior, pelo auxílio no processamento do material para as análises fisiológicas e bioquímicas; ao Prof. Dr. Marcelo de Almeida Silva e Hariane Luis Santos, pelo empréstimo do equipamento para análise fisiológica; e ao Prof. Dr. Fernando Ferrari Putti pelo auxílio com as análises estatísticas.

Referências Bibliográficas

- Aguilar-Rincón, V.H., Corona-Torres, T., López-López, P., Latournerie-Moreno, L., Ramírez-Meraz, M., Villarón-Mendoza, H., Aguilar-Castillo, J.A. 2010. **Los chiles de México y sudistribución**. SINAREFI, Colegio de Postgraduados, INIFAP, IT-Conkal, UANL, UAN, Montecillo, Texcoco estado de México, p. 114.
- Aires, E. S., Ferraz, A. K. L., Carvalho, B. L., Teixeira, F. P., Rodrigues, J. D., Ono, E. O. 2022. Foliar application of salicylic acid intensifies antioxidant system and photosynthetic efficiency in tomato plants. **Bragantia**, **81**.
- Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, **53**:1331–1341.

Alves, J.C. 2017. **Hidrofóbicas ou hidrofílicas: como as folhas de espécies caducifólias e sempre verdes da caatinga se comportam?** Trabalho de Conclusão de Curso Universidade Federal do Ceará – UECE, Ceará, Brasil. 35pp.

Antonious, G.F., Snyder, J.C. 1993. Trichome density and pesticide retention and half-life. **Journal of Environmental Science and Health**, **28**: 205-219.

Araujo, W.L. 2015. **Toxicidade de neonicotinoides sobre abelhas (*Apis mellífera*)**. Dissertação de Mestrado – UFCG/PB. 49pp.

Baker, N.R., Rosenqvist, E. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **J. Exp. Bot.**, **55**: 1607-1621.

Barthlott, W., Mail, M., Bhushan, B., Koch, K. 2017. Plant surfaces: structures and functions for biomimetic innovations. **Nano-Micro Letters**, **9**: 1-40.

Bello, A.O., Oladipo, O.T., Saheed, S.A. 2017. Leaf epidermal studies of some *Solanum* (Solanaceae) species in Nigeria. **Phytologia Balcanica**, **23**: 55-63.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, **72**: 248-254.

Busch, F. A. 2020. Photorespiration in the context of Rubisco biochemistry, CO₂ diffusion and metabolism. **The Plant Journal**, **101**: 919-939.

Chebli, Y., Bidhendi, A.J., Kapoor, K., Geitmann, A. 2021. Cytoskeletal regulation of primary plant cell wall assembly. **Current Biology**, **31**: R681-R695.

Coskun, Y., Kilic, S., Duran, R.E. 2015. The effects of the insecticide pyriproxyfen on germination, development, and growth responses of maize seedlings. **Fresenius Environment Bulletin**, **24**: 278-284.

Çavuşoğlu, K., Yalçın, E., Türkmen, Z., Yapar, K., Sağır, S. 2012. Physiological, anatomical, biochemical, and cytogenetic effects of thiamethoxam treatment on *Allium cepa* (Amaryllidaceae) L. **Environmental Toxicology**, **27**: 635-643.

Chowański, S., Adamski, Z., Marciniak, P., Rosiński, G., Büyükgüzel, E., Büyükgüzel, K., Bufo, S. 2016. A Review of Bioinsecticidal Activity of Solanaceae Alkaloids. **Toxins**, **8**: 60.

Dar, M.I., Khan, F.A., Rehman, F. 2015. Responses of antioxidative defense system and composition of photosynthetic pigments in *Brassica juncea* L. upon imidacloprid treatments. **Abiotic and Biotic Stress Journal**, **1**:3-15.

Díaz-Espejo, A., Cuevas, M. V., Ribas-Carbo, M., Flexas, J., Martorell, S., Fernández, J. E. 2012. The effect of strobilurins on leaf gas exchange, water use efficiency and ABA content in grapevine under field conditions. **Journal of Plant Physiology**, **169**: 379-386.

Dousseau, S., Rodrigues, A.C., Lira, J.M.S., Ribeiro Júnior, P.M., Pacheco, F.V., Alvarenga, A.A., Resende, M.L.V., De Paula, A.C.C.F.F. 2016. Aplicação exógena de quitosana no sistema antioxidante de jaborandi. **Ciência Rural**, **46**: 191-197.

Ennajeh, M., Vadel, A.M., Cochard, H., Khemira, H. 2010. Comparative impacts of water stress on the leaf anatomy of a drought-resistant and a drought-sensitive olive cultivar. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology** **85**: 289–294.

Fernández, V., Bahamonde, H.A., Peguero-Pina, J.J., Gil-Pelegrín, E., Sancho-Knapik, D., Gil, L., Goldbach, H.E. Eichert, T. 2017. Physicochemical properties of plant cuticles and their functional and ecological significance. **Journal of Experimental Botany**, **68**:5293–5306.

Fernández, V., Gil-Pelegrín, E., Eichert, T. 2021. Foliar water and solute absorption: an update. **The Plant Journal**, **105**: 870-883.

Ford, K.A., Casida, J.E., Chandran, D., Gulevich, A.G., Okrent, R.A., Durkin, K.A., Wildermuth, M.C. 2010. Neonicotinoid insecticides induce salicylate-associated plant defense responses. **PNAS**, **107**: 17527–17532.

Franceschi, V.R., Nakata, P.A. 2005. Calcium oxalate in plants: formation and function. **Annual Review of Plant Biology**, **56**: 41–71.

Gao, L., Li, S., Zhang, J., Liang, C., Chen, E., Zhang, S., Yang, X. 2016. Excess Imidacloprid Exposure Causes the Heart Tube Malformation of Chick Embryos. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, **64**: 9078–9088.

Gerrits, P.O. 1991. The application of glycol methacrylate in histotechnology; some fundamental principles. Department of Anatomy and Embryology State University Groningen, Netherlands in the wound-associated phloem of *Eucalyptus globules*: chemistry and histology. **Trees**, **18**: 204-210.

Giannopolitis, C.N., Ries, R.K. 1977. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, **59**: 309-314.

Gonias, E.D., Oosterhuis, D.M., Bibi, A.C. 2008. Physiologic Response of Cotton to the Insecticide Imidacloprid under High-Temperature Stress. **Journal of Plant Growth and Regulation**, **27**: 77–82.

Hernandez, J.A., Jiménez, A., Mullineaux, P., Sevilla, F. 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. **Plant, Cell and Environment**, **23**: 853-862.

Homayoonzadeh, M., Moeini, P., Talebi, K., Roessner, U., Hosseiniaveh, V. 2020. Antioxidant system status of cucumber plants under pesticides treatment. **Acta Physiologiae Plantarum**, **42**: 1-11.

Jayaraj, R., Megha, P., Sreedev, P. 2016. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. **Interdisciplinaire Toxicology**, **9**: 90-100.

Jensen, W.A. 1962. Botanical histochemistry, principles and practice. San Francisco: W. H. Freeman, p. 408.

Johansen, D.A. 1940. **Plant microtechnique**. McGraw-Hill: New York.

Juan, C.A., Pérez de la Lastra, J.M., Plou, F.J., Pérez-Lebeña, E. 2021. The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. **International Journal of Molecular Sciences**, **22**: 4642.

Kagabu, S. 2003. Molecular design of neonicotinoids: Past present and future. **Chemistry of Crop Protection**, eds Voss A, Ramos G (Wiley-VCH, Weinheim, Germany), pp 193–212.

Kar, M., Mishra, D. 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, **57**: 315-319.

Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, **27**: 137–138.

Lester, R.N., Daunay, M.C. 2003. Diversity of African vegetable *Solanum* species and its implications for a better understanding of plant domestication. **Schriften zu Genetischen Ressourcen**, **22**: 137–152.

Liang, Y.C., Chen, Q., Liu, Q., Zhang, W.H., Ding, R.X. 2003. Exogenous silicon (Si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.). **Plant Physiology**, **160**: 1157– 1164.

Lo, C.C., Hopkinson, M., Gaskin, R.E. 1995. **Influence of adjuvants on droplet spreading**. In *Proc. Fourth Int. Symp. On Adjuvants for Agrochemicals. NZ FRI Bull* (No. 193, pp. 144-149).

Marques, R.P., Rodella, R.A., Martins, D. 2012. Características da anatomia foliar de espécies de braquiária e sua relação com a sensibilidade a herbicidas. **Planta Daninha**, **30**: 809-816.

Matos, I.S., Rosado, B.H.P. 2016. Retainorrepel? Droplet volume does matter when measuring leaf wetness traits. **Annals of Botany**, **117**:1045-1052.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Coordenação-Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/DAS. Disponível em: (www.gov.br/agricultura/pt-br) Acesso em: 10.01.2023.

Maxwell, K., Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. **J. Exp. Bot.**, **51**: 659-668.

Mazen, A.M.A, Zhang, D., Franceschi, V.R. 2003. Calcium oxalate formation in *Lemna minor*: physiological and ultrastructural aspects of high capacity calcium sequestration. **New Phytologist**, **161**: 435–448.

Milanez, C.R., Machado, S.R. 2008. Leaf emergences in *Microlepisoleaefolia* (DC.) Triana (Melastomataceae) and their probable function: An anatomical and ultrastructural study. **Micron**, **39**: 884-890.

Moita Neto, J.M. 2006. Molhamento e ângulo de contato. Teresina: FAPEPI, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí.

Mukherjee, S., Tripathi, S., Mukherjee, A.K., Bhattacharyya, A., Chakrabarti, K. 2016. Persistence of the herbicides florasulam and halauxifen-methyl in alluvial and saline alluvial soils, and their effects on microbial indicators of soil quality. **European Journal of Soil Biology**, **73**: 93-99.

Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Schmuck, R. 2001. Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Pest Management Science**, **57**: 577-586.

Nwadinigwe, A.O. 2010. Effects of the Insecticide, Lambda-cyhalothrin on the Growth, Productivity and Foliage Anatomical Characteristics of *Vigna unguiculata* (L) Walp. **Bio-Research**, **8**: 583-587.

O'Brien, T.P., Feder, N., McCully, M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma**, **59**: 368-373.

Parrini, R., Pardo, C.S., Pacheco, J.F. 2017. Conhecendo as plantas cujos frutos e recursos florais são consumidos pelas aves na Mata Atlântica do Parque Nacional da Serra dos Órgãos. **Atualidades Ornitológicas**, **199**: 38-136.

Petit, A. N., Fontaine, F., Vatsa, P., Clément, C., Vaillant-Gaveau, N. 2012. Fungicide impacts on photosynthesis in crop plants. **Photosynthesis research**, **111**: 315-326.

Rama Devi, S., Prasad, M.N.V. 1998. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: Response of antioxidant enzymes and antioxidants. **Plant Science**, **138**:157-165.

Ramos, A.R.P., Amaro, A.C.E., Macedo, A.C., Souza, E.R., Rodrigues, J.D.; Ono, E.O. 2015. Acúmulo de carboidratos no desenvolvimento de tomateiro tratado com produtos químicos. **Semina: Ciências Agrárias**, **36**: 705-718.

Rocha, D.C. 2001. **Caracterização morfo-anatômica e genética de quatro espécies invasoras de *Commelina* L.** 110 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas/Botânica) - Instituto de Biociência, Universidade Estadual de Paulista, Botucatu, 2001.

Schmuck, R., Schoning, R., Stork, A., Schramel, O. 2001. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L., Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. **Pest Management Science**, **57**: 225-238.

Schreel, J.D., Leroux, O., Goossens, W., Brodersen, C., Rubinstein, A., Steppe, K. 2020. Identifying the pathways for foliar water uptake in beech (*Fagus sylvatica* L.): a major role for trichomes. **Plant Journal**, **103**: 769–780.

Schreiber, U. 1986. Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer. **Photosynthesis Research**, **9**: 261-271.

Shahid, M., Nayak, A.K., Puree, C., Tripathi, R., Lal, B., Gautam, P., Bhattacharyya, P., Mohanty, S., Kumar, A., Panda, B.B. Kumar, U., Shukla, A.K. 2017. Carbon and nitrogen fractions and stocks under 41 years of chemical and organic fertilization in a sub-humid tropical rice soil. **Soil and Tillage Research**, **170**: 136-146.

Shahid, M., Khan, M.S., Ahmed, B., Syed, A., Bahkali, A.H. 2021. Physiological disruption, structural deformation and low grain yield induced by neonicotinoid insecticides in chickpea: A long term phytotoxicity investigation. **Chemosphere**, **262**: 128388.

Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of botany**: 1-26.

Sharma, A., Kumar, V., Kanwar, M.K., Thukral, A.K., Bhardwaj, R. 2017. Ameliorating imidacloprid induced oxidative stress by 24-epibrassinolide in *Brassica juncea* L. **Russian Journal of Plant Physiology**, **64**: 509-517.

Shobharani, M., 2019. Field evaluation of imidacloprid and thiamethoxam against sucking insect pests of blackgram. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, **8**: 764-1766.

Silva, L.Q., Araújo, A.C.F., Almeida, G.M., Crispin-Filho, A.J., Jakelaitis, A. 2016. Modificações fisiológicas em folhas de pequi (*Caryocar brasiliense*) causadas pela aplicação de glyphosate. **Revista Brasileira de Herbicidas**, **15**: 184-194.

Singh, M., Mack, R.E. 1993. Effect of organosilicone-based adjuvants on herbicide efficacy. **Pesticide science**, **38**: 219-225.

Smith, K.T., Shortle, W.C., Connolly, J.H., Minocha, R., Jellison, J. 2009. Calcium fertilization increases the concentration of calcium in sapwood and calcium oxalate in foliage of red spruce. **Environmental and Experimental Botany**, **67**: 277–283.

Szczepaniec, A., Raupp, M.J., Parker, R.D., Kerns, D., Eubanks, M.D. 2013. Neonicotinoid insecticides alter induced defenses and increase susceptibility to spider mites in distantly related crop plants. **PloSone**, **8**:62620.

Teisseire, H., Guy, V. 2000. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds duckweed (*Lemna minor*). **Plant Science**, **153**: 65-72.

Tiyagi, S.A., Ajaz, S., Azam, M.F. 2004. Effect of some pesticides on plant growth, root nodulation and chlorophyll content of chickpea. Arch. **Agronomy Soil Science**, **50**: 529-533.

Toscano, S., Ferrante, A., Tribulato, A., Romano, D. 2018. Leaf physiological and anatomical responses of *Lantana* and *Ligustrum* species under different water availability. **Plant Physiology and Biochemistry**, **127**: 380–392.

Tuffi Santos, L.D., Sant'Anna-Santos, B.F., Meira, R.M.S.A., Ferreira, F.A., Tiburcio, R.A.S., Machado, A.F.L. 2009. Leaf anatomy and morphometry in three eucalypt clones treated with glyphosate. **Brazilian Journal of Biology**, **69**: 129-136.

Vialet-Chabrand, S.R.M., Matthews, J.S.A., McAusland, L., Blatt, M.R., Griffiths, H., Lawson, T. 2017. Temporal Dynamics of Stomatal Behavior: Modeling and Implications for Photosynthesis and Water Use. **Plant Physiology**, **174**: 603–613.

Wagner, E.C. 1939. Effects of certain insecticides and inert materials upon the transpiration rate of bean plants. **Plant Physiology**, **14**: 717.

Watts, S., Kariyat, R. 2021. Morphological characterization of trichomes shows enormous variation in shape, density and dimensions across the leaves of 14 *Solanum* species. **AoB Plants**, **13**:plab071.

Weryszko-Chmielewska, E., Michalajc, Z. 2009. Anatomical features of leaves of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) fed with calcium using foliar nutrition. **Acta Agrobotanica**, **62**.

Whitehorn, P.R., O'connor, S., Wackers, F.L., Goulson, D. 2012. Neonicotinoid pesticide reduces bumble bee colony growth and queen production. **Science**, **336**: 351-352.

Zindler-Frank, E., Honow, R., Hesse, A. 2001. Calcium and oxalate content of the leaves of *Phaseolus vulgaris* at different calcium supply in relation to calcium oxalate crystal formation. **Journal of Plant Physiology**, **158**: 139–144.

Zaller, J.G., König, N., Tiefenbacher, A., Muraoka, Y., Querner, P., Ratzenböck, A., Bonkowski, M., Koller, R., 2016. Pesticide seed dressings can affect the activity of various soil organisms and reduce decomposition of plant material. **BMC Ecology**, **16**: 2-11.

Zhang, X., Chen, L., Leng, R., Zhang, J., Zhou, Y., Zhang, Y., Yang, S., He, K., Huang, B. 2020. Mechanism study of the beneficial effect of sodium selenite on metabolic disorders in imidacloprid-treated garlic plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, **200**: 110736.

Zhang, Y., Huang, L., Liu, L., Cao, X., Sun, C., Lin, X. 2022. Metabolic disturbance in lettuce (*Lactuca sativa*) plants triggered by imidacloprid and fenvalerate. **Science of The Total Environment**, **802**:149764.

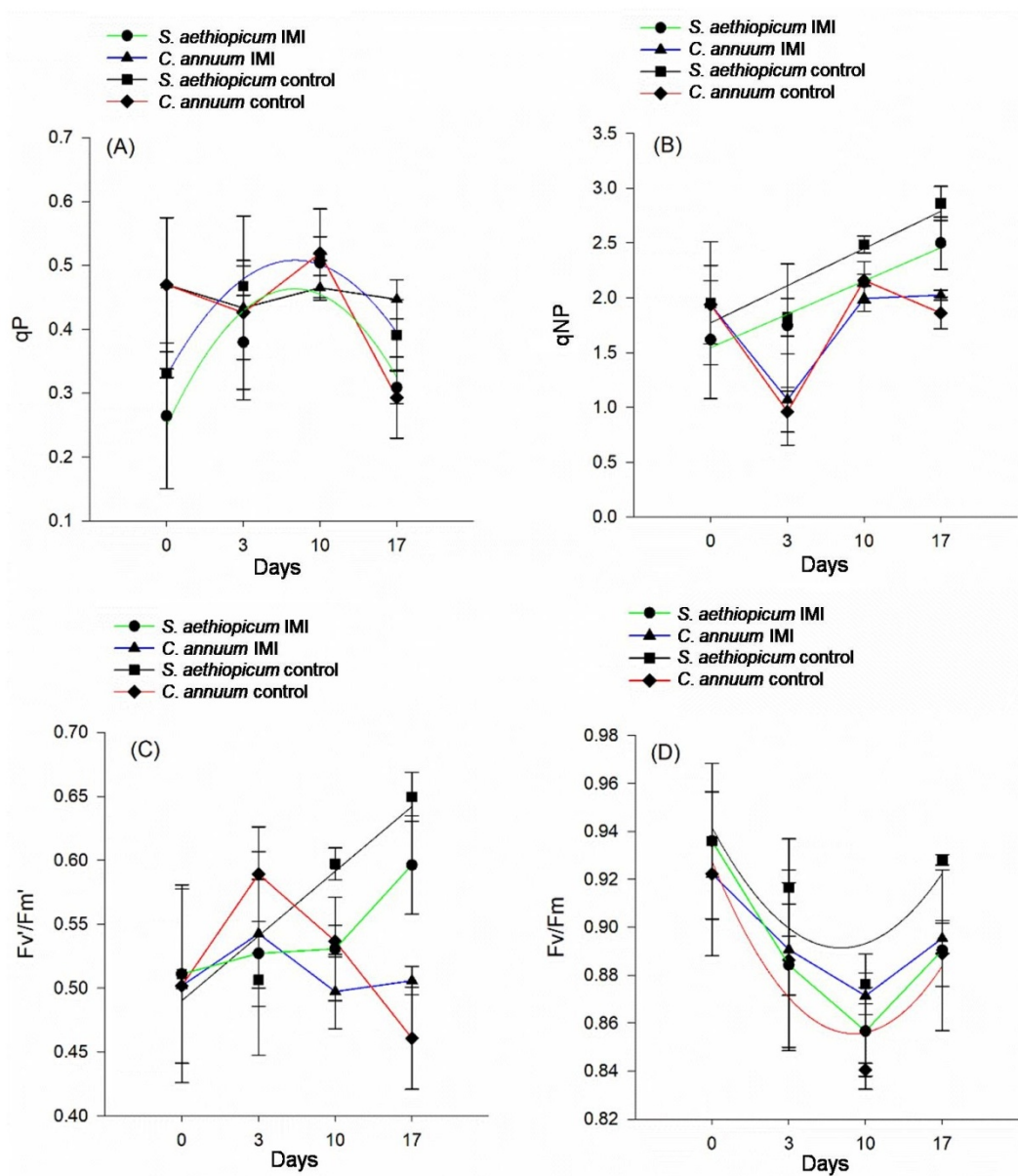


Figura 1. Representação gráfica do efeito do imidacloprido (IMI) na fluorescência da clorofila *a* em plantas de *Solanum aethiopicum* e *Capsicum annuum* ao longo do período experimental. *qP*: quenching fotoquímico; *qNP*: quenching não-fotoquímico; *Fv'/Fm'*: rendimento quântico efetivo do PSII; *Fv/Fm*: rendimento quântico máximo variável do PSII.

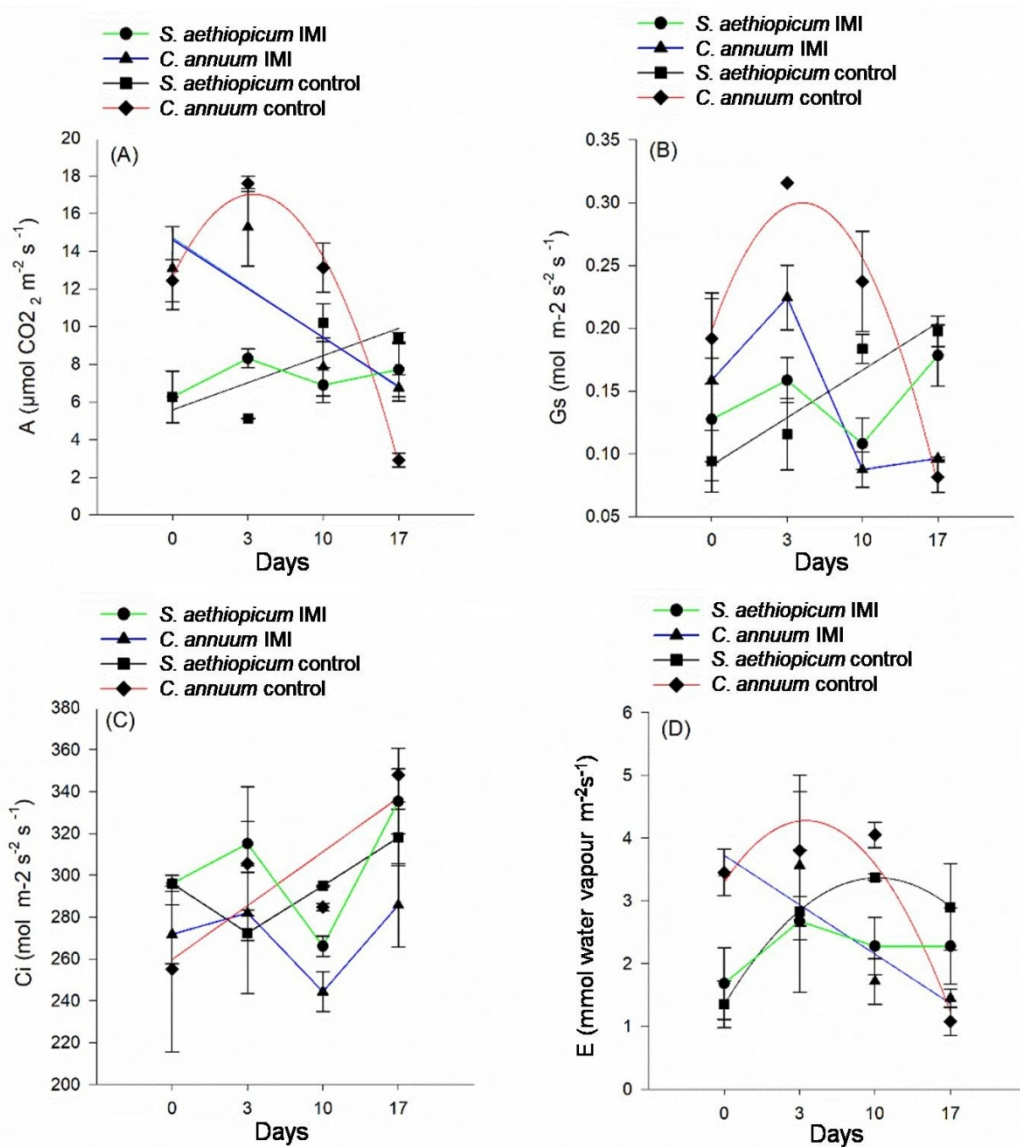


Figura 2. Representação gráfica do efeito do imidacloprido (IMI) nos índices de trocas gasosas de plantas de *Solanum aethiopicum* e *Capsicum annuum* ao longo do período experimental. A : taxa de assimilação de CO_2 ; g_s : condutância estomática; C_i : concentração interna de CO_2 ; E : taxa de transpiração. A/C_i : eficiência instantânea de carboxilação.

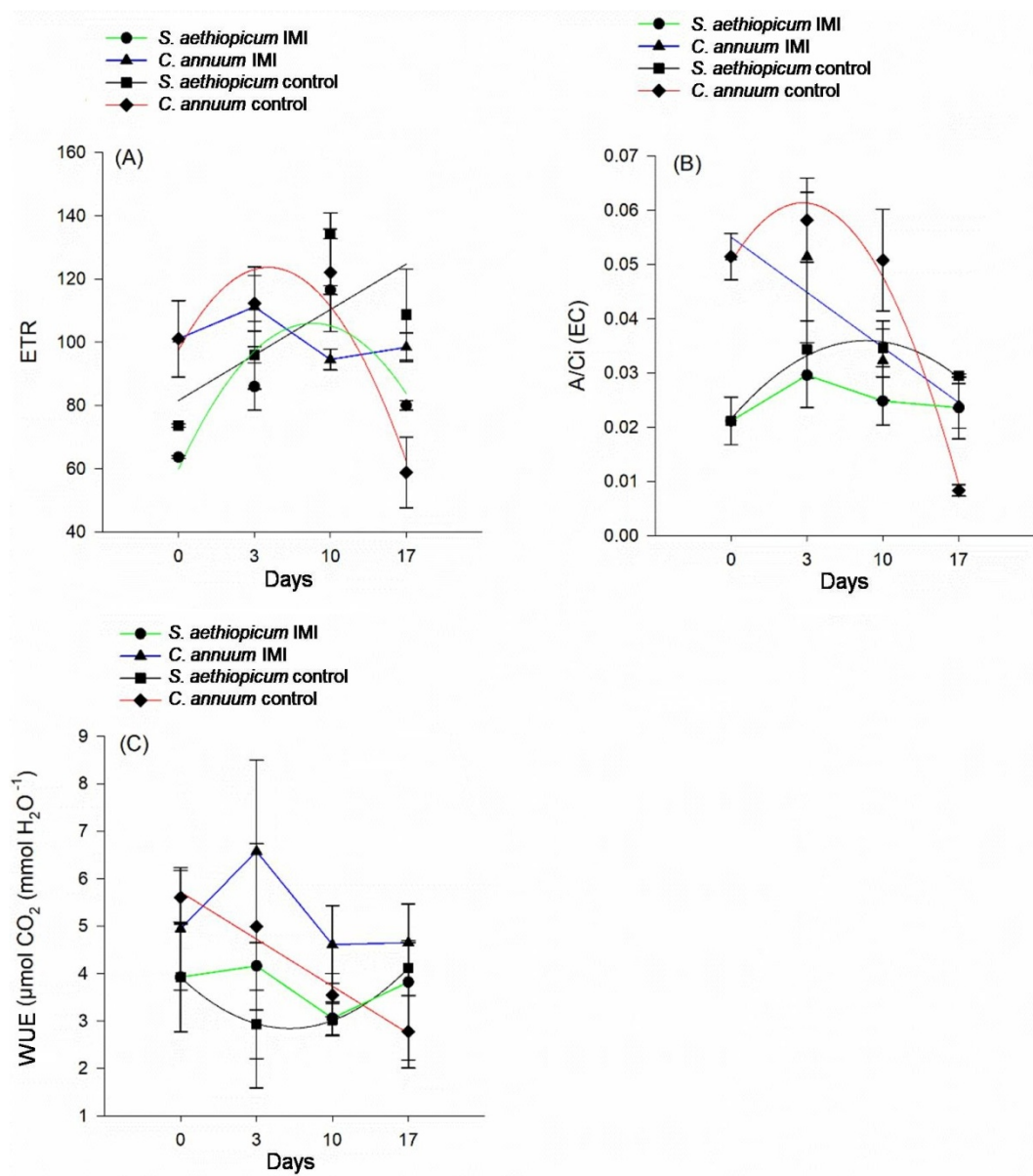


Figura 3: Representação gráfica do efeito do imidacloprido (IMI) nos índices de trocas gasosas de plantas de *Solanum aethiopicum* e *Capsicum annuum* ao longo do período experimental. *ETR*: taxa relativa do transporte de elétrons; *A/Ci*: eficiência instantânea de carboxilação; *WUE*: Eficiência do uso da água.

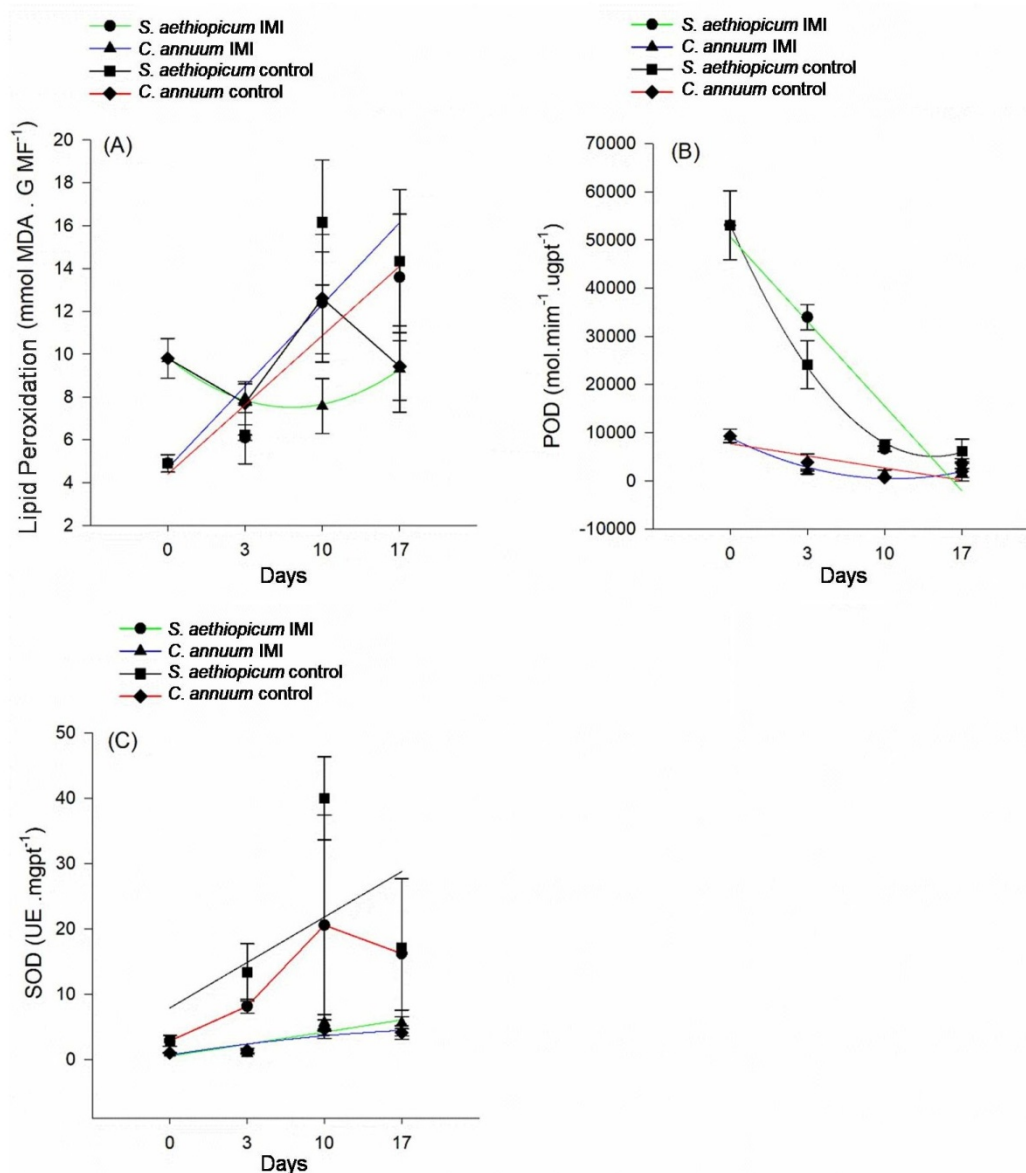


Figura 4. Representação gráfica do efeito do imidacloprido (IMI) na atividade da peroxidação lipídica (A), e das enzimas oxidativas peroxidase (POD) (B) e superóxido dismutase (SOD) (C), em plantas de *Solanum aethiopicum* e *Capsicum annuum* ao longo do período experimental.

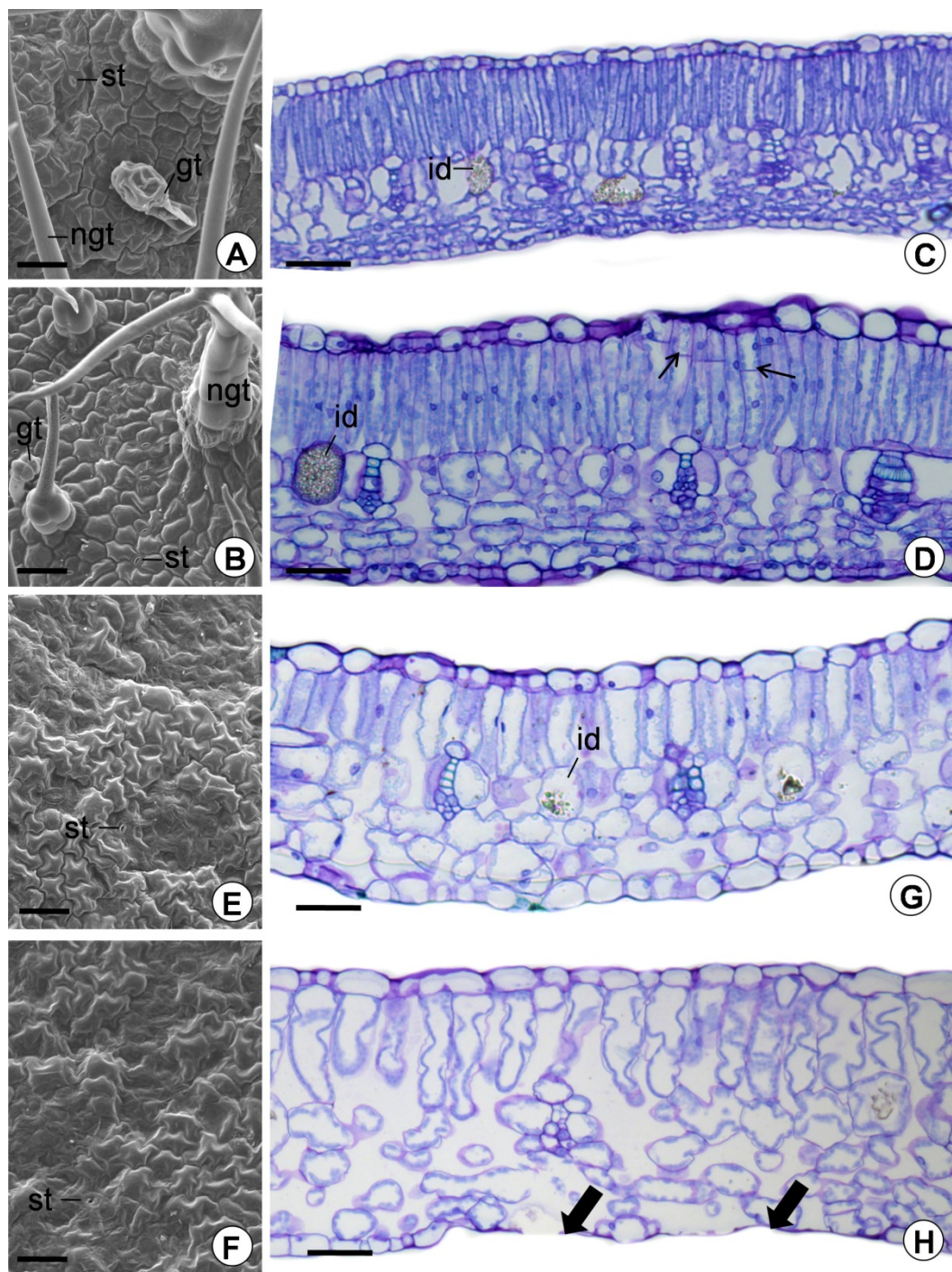


Figura 5. Eletronmicrografias de varredura da face adaxial (A, B, E, F) e fotomicrografias de secções transversais (C, D, G, H) do limbo foliar de *Solanum aethiopicum* (A-D) e *Capsicum annuum* (E-H). Plantas controle (A, C, E, G). Plantas tratadas com imidacloprido (B, D, F, H). st: estômato; id: idioblasto; gt: tricoma glandular; ngt: tricoma tector; setas finas: divisão periclinal; setas grossas: descontinuidade da epiderme na secção transversal causada pela irregularidade do relevo na superfície foliar. **Barras:** 150µm (A, B, E, F); 100µm (C, D, G, H).

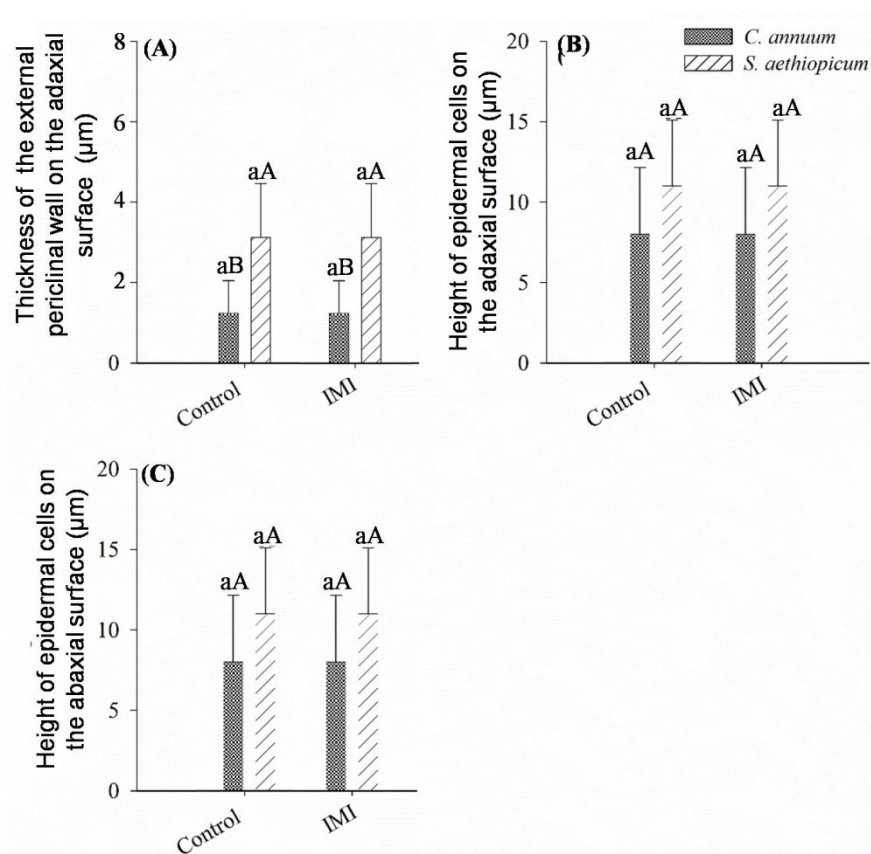


Figura 6: Dados morfométricos de plantas de *Solanum aethiopicum* e *Capsicum annuum* tratadas com imidacloprido (IMI) e plantas do grupo controle. Letras minúsculas indicam comparação entre tratamentos e letras maiúsculas indicam comparação entre espécies. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey.

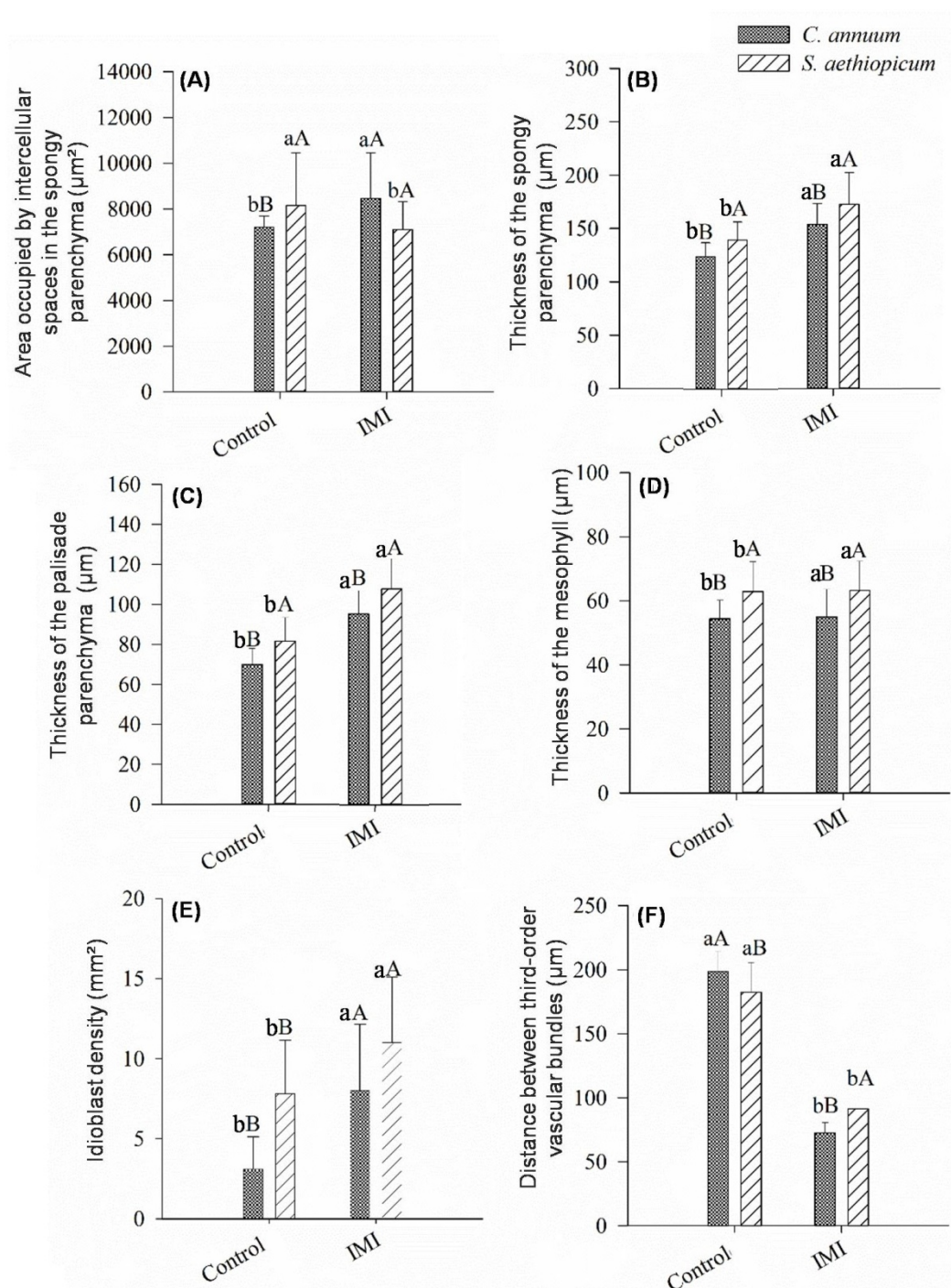


Figura 7. Dados morfométricos de plantas de *Solanum aethiopicum* e *Capsicum annuum* tratadas com imidacloprido (IMI) e plantas do grupo controle. Letras minúsculas indicam comparação entre tratamentos e letras maiúsculas indicam comparação entre espécies. Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey.

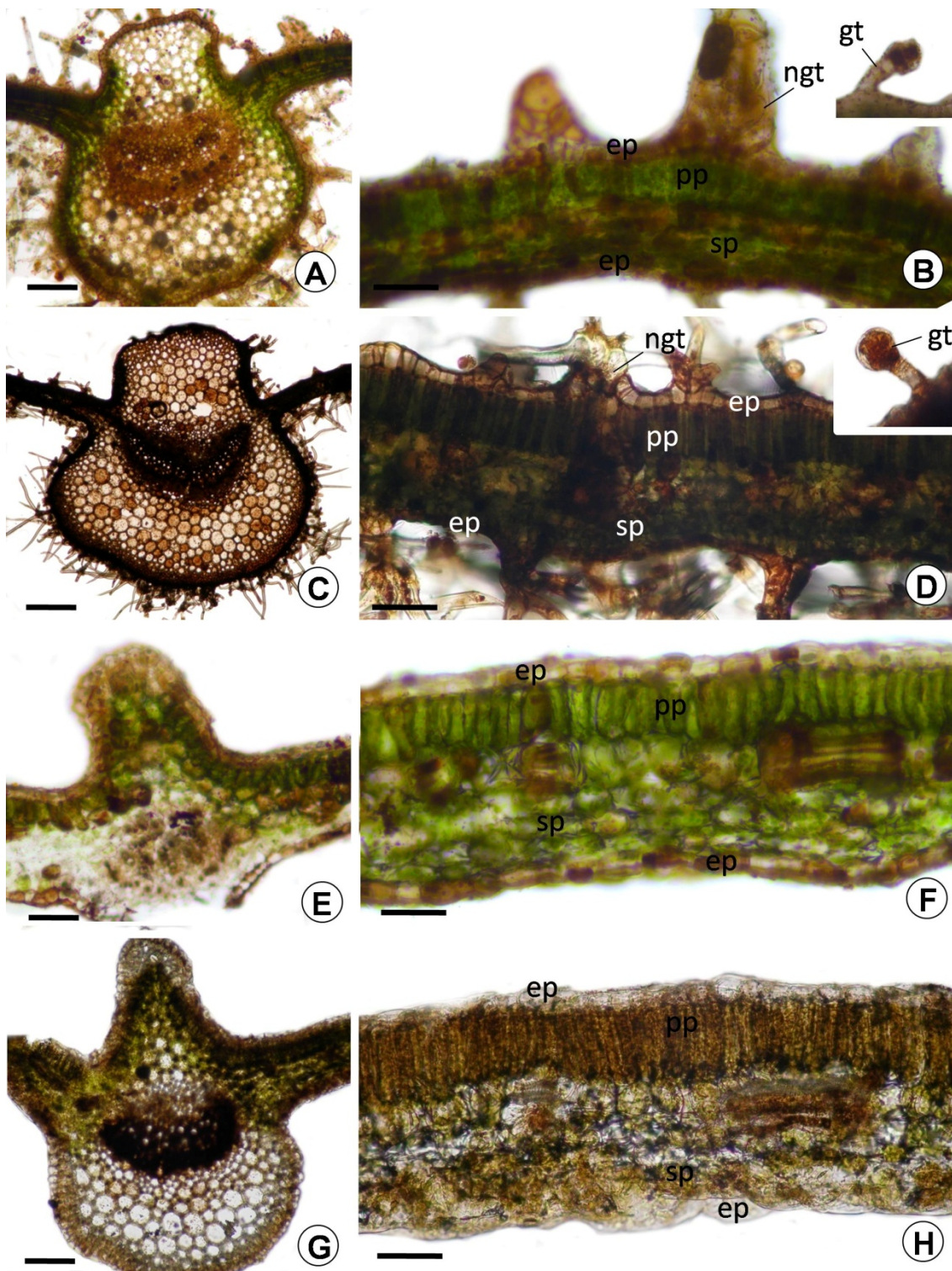


Figura 8. Fotomicrografias de secções transversais de folhas de *Solanum aethiopicum* (A- D) e *Capsicum annuum* (E- H) tratadas com DAB para detecção de espécies reativas de oxigênio. Plantas do grupo controle (A, B, E, F). Plantas tratadas com imidacloprido (C, D, G, H). ep: epiderme; sp: parênquima esponjoso; pp: parênquima paliçádico; gt: tricomas glandulares; ngt: tricomas tectores. **Barras:** 250µm (A, C, G); 100µm (B, D, E, F, H).

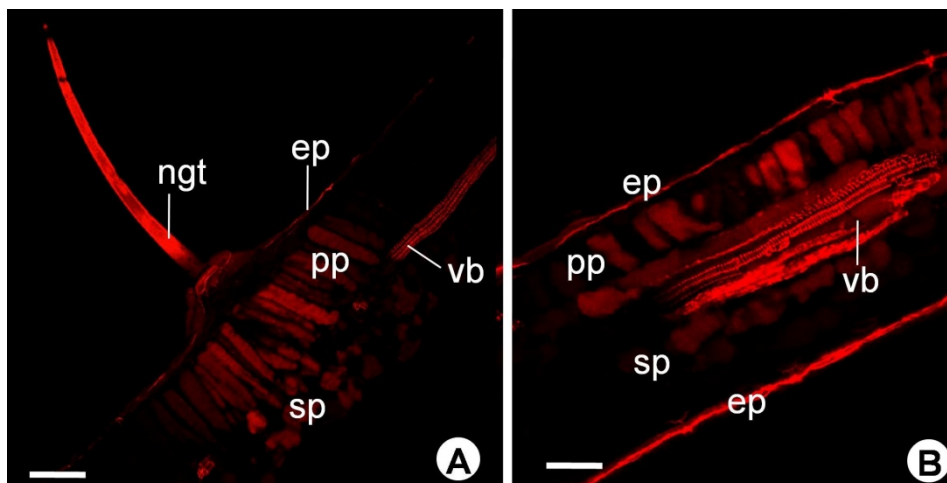


Figura 9. Fotomicrografias em microscópio confocal de folhas de *Solanum aethiopicum* (A) e *Capsicum annuum* (B). **A, B:** Folhas tratadas com Safranina aquosa a 1%. ep: epiderme; vb: feixe vascular; sp: parênquima esponjoso; pp: parênquima paliçádico; ngt: tricoma tector. **Barras:** 50µm.

Considerações finais

- A aplicação foliar do imidacloprido (IMI), um inseticida da classe dos neonicotinóides dos mais utilizados em lavouras do Brasil, pode causar alterações em aspectos estruturais, fisiológicos e bioquímicos em folhas de *S. aethiopicum* e *C. annuum*.

- Embora ambas as espécies apresentem capacidade de absorção foliar conforme demonstrado pelo teste com Safranina, *C. annuum* apresentou folhas molháveis segundo teste realizado.

- Folhas de *S. aethiopicum* se mostraram não-molháveis o que parece ter relação com a presença de tricomas tectores com células com paredes lignificadas e, portanto, com propriedades hidrofóbicas.

- A molhabilidade das folhas de *C. annuum* pode estar relacionada à ausência de tricomas ou outros apêndices com células com propriedades hidrofóbicas e à ocorrência de relevo irregular na superfície foliar que permite o acúmulo de substâncias líquidas. Esses aspectos poderiam levar à maior absorção de substâncias líquidas hidrofílicas como o IMI.

- Alterações em aspectos anatômicos e funcionais foram observadas em plantas de ambas as espécies estudadas tratadas com IMI, porém, alterações mais pronunciadas foram observadas em *C. annuum*, especialmente no que se refere às taxas de assimilação de CO₂, condutância estomática, taxa de transpiração e eficiência instantânea de carboxilação. Plantas de *C. annuum* tratadas com IMI também apresentaram alterações estruturais bastante evidentes como a maior sinuosidade no contorno das células do parênquima paliádico

- No presente estudo, a presença/ausência de tricomas parece ser um dos fatores interferindo na molhabilidade foliar das espécies estudadas e consequente absorção de substâncias hidrofílicas como o IMI. Entretanto, outros aspectos morfológicos da superfície foliar, como a irregularidade do relevo, também parecem ter o potencial de interferir na maior ou menor absorção de tais substâncias.

- Estudos envolvendo um maior número de espécies vegetais filogeneticamente relacionadas são necessários para entender o papel da presença/ausência dos tricomas na /absorção de substâncias pela superfície foliar.