

FERNANDA CAMILA CRUZ

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO A BASE DE
ÁCIDO GIBERÉLICO NANOENCAPSULADO EM
ASSOCIAÇÃO COM BACTÉRIA PARA TRATAMENTO DE
SEMENTES**

Sorocaba
2026

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

*ciências
ambientais*

FERNANDA CAMILA CRUZ

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO A BASE DE ÁCIDO
GIBERÉLICO NANOENCAPSULADO EM ASSOCIAÇÃO COM
BACTÉRIA PARA TRATAMENTO DE SEMENTES**

Dissertação apresentada como requisito
para a obtenção do título de Mestra em
Ciências Ambientais da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho” na Área de Concentração
Diagnóstico, Tratamento e Recuperação
Ambiental

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Fernandes
Fraceto

Sorocaba
2026

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

ciências
ambientais



unesp
Sorocaba

C957d	Cruz, Fernanda Camila Desenvolvimento de formulação a base de ácido giberélico nanoencapsulado em associação com bactéria para o tratamento de sementes / Fernanda Camila Cruz. -- Sorocaba, 2026 106 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba Orientador: Leonardo Fernandes Fraceto 1. Agricultura. 2. Nanotecnologia. 3. Azospirillum. 4. Giberelina. I. Título.
-------	--



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Sorocaba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Desenvolvimento de formulação a base de ácido giberélico nanoencapsulado em associação com bactéria para tratamento de sementes

AUTORA: FERNANDA CAMILA CRUZ

ORIENTADOR: LEONARDO FERNANDES FRACETO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Ambientais, área: Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. LEONARDO FERNANDES FRACETO (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia Ambiental / UNESP / Câmpus de Sorocaba - ICTS

Prof. Dr. ANDRÉ LUIZ MARTINEZ DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Bioquímica e Biotecnologia / Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. ADRIANO ARRUE MELO (Participação Virtual)
Defesa Fitossanitária / Universidade Federal de Santa Maria

Sorocaba, 02 de março de 2026.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, pela oportunidade de realizar o mestrado e a bolsa concedida durante todo ele. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto, pelos valiosos ensinamentos transmitidos ao longo desta trajetória acadêmica, não apenas de natureza científica, mas também relacionados à formação ética e ao trabalho em grupo, bem como pela empatia demonstrada nos momentos de dificuldade.

Ao grupo de pesquisadores do Laboratório de Nanotecnologia Ambiental da Unesp/Sorocaba, em especial à Estefânia Campos. Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e da UNESP, de maneira geral, pela gentileza e colaboração prestadas de diferentes formas. Expresso também meu carinho e agradecimento à Lucimara Kurokawa Shinoda, pelo atendimento sempre muito atencioso na biblioteca e pela amizade que se iniciou ao longo desse percurso.

Aos meus pais, Claudia Regina (*in memoriam*) e Luiz Fernando, pelo apoio incondicional, pelos conselhos sempre sábios e pela presença constante em minha vida. À minha filha, Claudia Luiza, por ser minha inspiração em tudo o que faço. Sua doçura, alegria e compreensão me fortaleceram nos momentos mais desafiadores.

A Deus, por ter me concedido o dom da vida e a oportunidade de trilhar um caminho que me enche de propósito e alegria.

*“As leis da natureza são dadas,
não nos cabe criá-las ou
modificá-las. Temos de agir de
forma benéfica para todos os
participantes, todos os atingidos,
de modo a voltarmos a ser
considerados seres úteis e
bem-vindos no sistema”
(Ernst Gotsch)*

RESUMO

Abordagens inovadoras voltadas à agricultura sustentável, como o uso de bioinsumos e bioestimulantes aplicados no tratamento de sementes e potencializados pela nanotecnologia, representam alternativas promissoras para favorecer o desenvolvimento inicial das plantas, aumentar a eficiência no uso de recursos e reduzir os impactos ambientais da atividade agrícola. Nesse contexto, o presente estudo avaliou o crescimento de *Azospirillum brasilense* (hm053) e a sua produção de exopolissacarídeos (EPS) *in vitro*, e o desenvolvimento de nanopartículas de alginato de sódio e quitosana contendo ácido giberélico (GA₃) encapsulado. A estabilidade físico-química desses sistemas e seus efeitos sobre o desenvolvimento inicial de plantas de milho (*Zea mays* L.) também foram avaliados. O crescimento bacteriano foi monitorado em meio DYGS, sob condições controladas, observando-se crescimento acentuado entre 6 e 8 horas de incubação e produção de aproximadamente 0,81 g.L⁻¹ de EPS em meio FORM15. As nanopartículas foram caracterizadas quanto ao diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, concentração de partículas e eficiência de encapsulação, utilizando-se as técnicas de DLS, NTA, FTIR e AFM, além de análises estatísticas para avaliação da estabilidade sob diferentes condições de armazenamento. Os resultados indicaram boa estabilidade físico-química das formulações, com maior homogeneidade e estabilidade para o sistema contendo GA₃, apresentando diâmetro hidrodinâmico médio de 438 nm, Pdl de 0,373, potencial zeta de -21,23 mV e eficiência de encapsulação de 95,45%. Os ensaios de germinação e cultivo em vasos demonstraram que os tratamentos contendo GA₃, isolado ou encapsulado, promoveram maior desenvolvimento inicial das plântulas, enquanto a aplicação isolada de *A. brasilense* não apresentou efeito positivo significativo. O tratamento com 75 mg de GA₃/Ab apresentou os maiores valores de altura da parte aérea e raiz. De modo geral, os resultados evidenciam o potencial das nanopartículas contendo GA₃ para aplicação no tratamento de sementes de milho.

Palavras-chave: *Azospirillum brasilense*. Nanopartículas. Giberelina. Milho.

ABSTRACT

Innovative approaches aimed at sustainable agriculture, such as the use of bioinputs and biostimulants applied in seed treatment and enhanced by nanotechnology, represent promising alternatives to promote early plant development, increase resource-use efficiency, and reduce the environmental impacts of agricultural activity. In this context, the present study evaluated the in vitro growth of *Azospirillum brasilense* (hm053) and its production of exopolysaccharides (EPS), as well as the development of sodium alginate and chitosan nanoparticles containing encapsulated gibberellic acid (GA₃). The physicochemical stability of these systems and their effects on the early development of maize (*Zea mays* L.) were also evaluated. Bacterial growth was monitored in DYGS medium under controlled conditions, observing sharp growth between 6 and 8 hours of incubation and an EPS production of approximately 0.81 g.L⁻¹ in FORM15 medium. The nanoparticles were characterized by hydrodynamic diameter, polydispersity index (Pdl), zeta potential, pH, particle concentration, and encapsulation efficiency, using DLS, NTA, FTIR, and AFM techniques, in addition to statistical analyses to evaluate stability under different storage conditions. The results indicated good physicochemical stability of the formulations, with greater homogeneity and stability for the system containing GA₃ presenting an average hydrodynamic diameter of 438 nm, a Pdl of 0.373, a zeta potential of -21.23 mV, and an encapsulation efficiency of 95.45%. Germination and pot culture assays demonstrated that treatments containing GA₃ (whether isolated or encapsulated) promoted greater initial seedling development, while the isolated application of *A. brasilense* showed no significant positive effect. The treatment with 75 mg of GA₃ /Ab yielded the highest values for shoot and root height. Overall, the results highlight the potential of GA₃ loaded nanoparticles for application in maize seed treatment.

Keywords: *Azospirillum brasilense*. Nanoparticles. Gibberellin. Maize.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema conceitual do tratamento de sementes com bioinsumos e nanopartículas aplicados à agricultura sustentável.....23
- Figura 2.** Curvas de crescimento de *Azospirillum brasilense* (hm053) cultivado em meio DYGS (28 °C ± 2, 160 RPM). (A) Relação entre a concentração de células viáveis (UFC/mL) e o tempo de incubação (h). (B) Relação entre a concentração de células viáveis [$\log_{10}(\text{UFC/mL})$] e a densidade óptica a 600 nm (OD_{600}).....41
- Figura 3.** Exopolissacarídeo (EPS) obtido por meio do cultivo de *Azospirillum brasilense* (hm053) em meio FORM15.....43
- Figura 4.** Caracterização da estabilidade das partículas armazenadas à temperatura ambiente ao longo do tempo (0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias). (A) diâmetro hidrodinâmico (B) índice de polidispersão (Pdl) (C) potencial zeta das nanopartículas controle (ALG/CS) e contendo ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃)..... 45
- Figura 5.** Distribuição do tamanho de partículas por intensidade das nanopartículas ALG/CS e ALG/CS-GA₃ armazenadas à temperatura ambiente, obtida por espalhamento de luz dinâmico (DLS) nos tempos de 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias. A) nanopartículas controle (ALG/CS) B) Nanopartícula com ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃).....48
- Figura 6.** Caracterização da estabilidade das partículas em estufa (40 °C) em função do tempo: 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias. (A) diâmetro hidrodinâmico (B) índice de polidispersão (Pdl) (C) potencial zeta para as nanopartículas controle (ALG/CS) e com ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃).....50

Figura 7. Caracterização da estabilidade das partículas em bloco digestor (65 °C) em função do tempo: 0, 7, 15, 21 e 30 dias. (A) diâmetro hidrodinâmico (B) índice de polidispersão (Pdl) (C) potencial zeta para as nanopartículas controle (ALG/CS) e com ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃)52

Figura 8. Caracterização da estabilidade das partículas sob refrigeração (4 °C) por 24 horas. (A) diâmetro hidrodinâmico (B) índice de polidispersão (Pdl) (C) potencial zeta para as nanopartículas controle (ALG/CS) e com ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃),.....54

Figura 9. Caracterização das nanopartículas controle (ALG/CS) e contendo ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃) por análise de rastreamento em nanopartículas ao longo do armazenamento à temperatura ambiente (24 °C). (A) Diâmetro médio das partículas (nm) e (B) Concentração de partículas (partículas/mL) determinados nos tempos de 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão.....57

Figura 10. Caracterização das nanopartículas controle (ALG/CS) e contendo ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃) por análise de rastreamento em nanopartículas ao longo do armazenamento em estufa (40°C). (A) Diâmetro médio das partículas (nm) e (B) Concentração de partículas (partículas/mL) determinados nos tempos de 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão.....58

Figura 11. Caracterização das nanopartículas controle (ALG/CS) e contendo ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃) por Análise por Rastreamento de Nanopartículas (NTA) ao longo do armazenamento em bloco digestor (65 °C). (A) Diâmetro médio das partículas (nm) e (B) Concentração de partículas (partículas/mL) determinados nos tempos de 0, 7, 15 e 30 dias. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão.....59

Figura 12. Caracterização das nanopartículas controle (ALG/CS) e contendo ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃) por Análise por Rastreamento de Nanopartículas (NTA) ao longo do armazenamento refrigerado com temperatura de 4 °C. (A) Diâmetro médio das partículas (nm) e (B) Concentração de partículas (partículas/mL) determinados nos tempos de 0 e 24 horas. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão..... 60

Figura 13. Variação do pH das formulações de nanopartículas controle (ALG/CS) e contendo ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃) durante 60 dias de armazenamento (0, 15, 30, 45 e 60 dias). Os valores representam a média ± desvio padrão62

Figura 14. Curva do ácido giberélico (GA₃), com a equação de regressão obtida e seu respectivo coeficiente de determinação (R²).....63

Figura 15. Eficiência de encapsulação da formulação nanoparticulada de ALG/CS-GA₃ monitorada durante o armazenamento em (A) temperatura ambiente - 60 dias, (B) estufa - 60 dias, (C) bloco digestor - 30 dias e (D) refrigeração - 24 horas..... 64

Figura 16. Espectros de FTIR sobrepostos, obtidos na faixa de 4000–1000 cm⁻¹, do ácido giberélico (GA₃), alginato de sódio (ALG), cloreto de cálcio (CaCl₂), quitosana (CS), nanopartículas de alginato/quitosana (Np ALG/CS) e nanopartículas de alginato/quitosana contendo GA₃ (Np ALG/CS-GA₃)..... 68

Figura 17. Imagens topográficas obtidas por microscopia de força atômica (AFM) das nanopartículas de alginato e quitosana contendo ácido giberélico (ALG/CS-GA₃), evidenciando a morfologia e a distribuição das partículas.....70

Figura 18. Comprimento de raiz de plântulas de milho germinadas em papel Germitest, oriundas de sementes tratadas com: água (controle negativo); *Azospirillum brasilense*; solução de GA₃ (75 mg/100 g de sementes); nanopartículas ALG/CS-GA₃ contendo 75, 62,5 ou 50 mg de GA₃/100 g de sementes associadas à inoculação com *A. brasilense*; e nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas mesmas concentrações, porém aplicadas na ausência de *A. brasilense*. Dados obtidos no teste de germinação em papel.....72

Figura 19. Altura da parte aérea de plântulas de milho germinadas em papel Germitest, oriundas de sementes tratadas com: água (controle negativo); *Azospirillum brasilense*; solução de GA₃ (75 mg/100 g de sementes); nanopartículas ALG/CS-GA₃ contendo 75, 62,5 ou 50 mg de GA₃/100 g de sementes associadas à inoculação com *A. brasilense*; e nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas mesmas concentrações, porém aplicadas na ausência de *A. brasilense*. Dados obtidos no teste de germinação em papel.....73

Figura 20. Massa fresca de plântulas de milho germinadas em papel Germitest, oriundas de sementes tratadas com: água (controle negativo); *Azospirillum brasilense*; solução de GA₃ (75 mg/100 g de sementes); nanopartículas ALG/CS-GA₃ contendo 75, 62,5 ou 50 mg de GA₃/100 g de sementes associadas à inoculação com *A. brasilense*; e nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas mesmas concentrações, porém aplicadas na ausência de *A. brasilense*. Dados obtidos no teste de germinação em papel.....74

Figura 21. Dados da taxa de germinação, em papel Germitest, de sementes tratadas com: água (controle negativo); *Azospirillum brasilense*; solução de GA₃ (75 mg/100 g de sementes); nanopartículas ALG/CS-GA₃ contendo 75, 62,5 ou 50 mg de GA₃/100 g de sementes associadas ou não à inoculação com *A.*

Figura 22. Comprimento da raiz de plântulas de milho cultivadas em vasos com substrato comercial, provenientes de sementes tratadas com: controle negativo(água); *Azospirillum brasilense*; solução de GA₃ (75 mg/100 g de sementes); nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas concentrações de 75, 62,5 e 50 mg de GA₃/100 g de sementes, todas com *A. brasilense*; e nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas mesmas concentrações, porém sem *A. brasilense*.....76

Figura 23. Altura da parte aérea de plântulas de milho cultivadas em vasos com substrato comercial, provenientes de sementes tratadas com: controle negativo (água); *Azospirillum brasilense*; solução de GA₃ (75 mg/100 g de sementes); nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas concentrações de 75, 62,5 e 50 mg de GA₃/100 g de sementes, todas com *A. brasilense*; e nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas mesmas concentrações, porém sem *A. brasilense*.....77

Figura 24. Massa fresca da raiz de plântulas de milho cultivadas em vasos com substrato comercial, provenientes de sementes tratadas com: (1) água (controle negativo); (2) *Azospirillum brasilense*; (3) solução de GA₃ (75 mg/100 g de sementes); (4–6) nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas concentrações de 75, 62,5 e 50 mg de GA₃/100 g de sementes, todas com *A. brasilense*; e (7–9) nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas mesmas concentrações, porém sem *A. brasilense*.....77

Figura 25. Massa fresca da parte aérea de plântulas de milho cultivadas em vasos com substrato comercial, provenientes de sementes tratadas com: (1) água (controle negativo); (2) *Azospirillum brasilense*; (3) solução de GA₃ (75 mg/100 g de sementes); (4–6) nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas concentrações

de 75, 62,5 e 50 mg de GA₃/100 g de sementes, todas com *A. brasilense*; e (7–9) nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas mesmas concentrações, porém sem *A. brasilense*.....78

Figura 26. Massa seca da raiz de plântulas de milho cultivadas em vasos com substrato comercial, provenientes de sementes tratadas com: (1) água (controle negativo); (2) *Azospirillum brasilense*; (3) solução de GA₃ (75 mg/100 g de sementes); (4–6) nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas concentrações de 75, 62,5 e 50 mg de GA₃/100 g de sementes, todas com *A. brasilense*; e (7–9) nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas mesmas concentrações, porém sem *A. brasilense*.....79

Figura 27. Massa seca da parte aérea de plântulas de milho cultivadas em vasos com substrato comercial, provenientes de sementes tratadas com: (1) água (controle negativo); (2) *Azospirillum brasilense*; (3) solução de GA₃ (75 mg/100 g de sementes); (4–6) nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas concentrações de 75, 62,5 e 50 mg de GA₃/100 g de sementes, todas com *A. brasilense*; e (7–9) nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas mesmas concentrações, porém sem *A. brasilense*.....80

Figura 28. Aspecto visual das plântulas de milho submetidas aos diferentes tratamentos aplicados às sementes: (A) controle negativo (água); (B) *Azospirillum brasilense*; (C) GA₃ (75 mg de GA₃/100 kg de sementes); (D) nanopartículas ALG/CS-GA₃ (75 mg de GA₃/100 kg de sementes); (E) nanopartículas ALG/CS-GA₃ (75 mg de GA₃/100 kg de sementes) associadas a *Azospirillum brasilense*.....81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.b: *Azospirillum brasilense*

AFM: Microscopia de Força Atômica

AIA: Ácido indol acético

ALG: Alginato de sódio

BPCV: bactérias promotoras do crescimento vegetal

CS: Quitosana

DLS: Espalhamento de Luz Dinâmico

EPS: Exopolissacarídeos

FAO: *Food and Agriculture Organization*

FTIR: Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

GA₃: ácido giberélico

MPCV: Microrganismos promotores do crescimento vegetal

NTA: Análise de Rastreamento de Nanopartículas

PdI: Índice de Polidispersão

pH: Potencial Hidrogeniônico

PZ: Potencial Zeta

UFC: *Unidade formadora de colônia*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1 Agricultura sustentável e o uso de bioinsumos.....	24
2.2 Microrganismos promotores do crescimento vegetal (MPCV).....	26
2.2.1 <i>Azospirillum</i> : mecanismos de interação com plantas e o papel dos exopolissacarídeos (EPS).....	27
2.3 Fitormônios vegetais e o ácido giberélico (GA ₃)	28
2.4 Nanopartículas poliméricas de alginato (ALG) e quitosana (CS).....	30
3. OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivos específicos.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1 Crescimento da <i>Azospirillum brasilense</i>	32
4.1.1 Inóculo e origem.....	32
4.1.2 Meio de cultivo e condições de incubação.....	33
4.1.3 Monitoramento do crescimento.....	33
4.2 Produção de exopolissacarídeos.....	33
4.2.1 Meio de cultivo e condições de incubação.....	33
4.2.2 Isolamento e purificação de exopolissacarídeos.....	34
4.3 Preparo de nanopartículas de alginato/quitosana contendo ácido giberélico..	34
4.4 Caracterização das nanopartículas.....	35
4.4.1 Espalhamento dinâmico da luz (DLS).....	35
4.4.2 Técnica de Rastreamento de Nanopartículas (NTA).....	35

4.4.3 Estabilidade química dos polímeros (pH).....	35
4.4.4 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	36
4.4.5 Microscopia de Força Atômica (AFM).....	36
4.5 Eficiência de encapsulação.....	36
4.5.1 Quantificação de GA ₃	37
4.6 Ensaios de bioatividade em sementes.....	38
4.6.1 Teste de germinação.....	39
4.6.2 Desenvolvimento das plantas de milho em vaso.....	39
4.7 Análise dos dados.....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 Curva de crescimento bacteriano.....	40
5.2 Exopolissacarídeos bacterianos.....	42
5.3 Caracterização físico-química e avaliação da estabilidade das nanopartículas.....	44
5.3.1 Diâmetro médio, índice de polidispersão e potencial zeta	44
5.3.2 Concentração e tamanho das partículas.....	56
5.3.3 Potencial hidrogeniônico (pH).....	61
5.3.4 Eficiência de encapsulação.....	63
5.3.5 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	66
5.3.6 Microscopia de Força Atômica (AFM).....	70
5.4 Germinação e desenvolvimento vegetal.....	71
5.4.1 Ensaios de germinação.....	71
5.4.2 Desenvolvimento das plantas de milho.....	76
6. CONCLUSÃO.....	82
REFERÊNCIAS.....	84
APÊNDICE A - Dados de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as amostras ALG/CS mantidas em temperatura ambiente (24 °C), com medições de tamanho	

hidrodinâmico, índice de polidispersão (Pdl), potencial zeta e potencial hidrogeniônico (pH), nos tempos de 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão..... 98

APÊNDICE B - Dados de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as amostras ALG/CS-GA₃ mantidas em temperatura ambiente (24 °C), com medições de tamanho hidrodinâmico e índice de polidispersão (Pdl), potencial zeta, potencial hidrogeniônico e eficiência de encapsulação, nos tempos de 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.... 98

APÊNDICE C - Dados de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as amostras ALG/CS mantidas em estufa (40°C), com medições de tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão(Pdl) e potencial zeta, nos tempos de 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão..... 99

APÊNDICE D - Dados de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as amostras ALG/CS-GA₃ mantidas em estufa (40°C), com medições de tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão (Pdl), potencial zeta e eficiência de encapsulação, nos tempos de 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão..... 99

APÊNDICE E - Dados de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as amostras ALG/CS mantidas em bloco digestor (65°C), com medições de tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão (Pdl) e potencial zeta nos tempos de 0, 7, 15 e 30 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão..... 100

APÊNDICE F - Dados de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as amostras ALG/CS-GA₃ mantidas em bloco digestor (65°C), com medições de tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão (Pdl), potencial zeta e eficiência de encapsulação, nos tempos de 0, 7, 15 e 30 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão..... 100

APÊNDICE G - Dados de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as amostras ALG/CS mantidas sob refrigeração (4°C), com medições de tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão (Pdl) e potencial zeta, após 24 horas. Os

dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão..... 101

APÊNDICE H - Dados de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as amostras ALG/CS-GA₃ mantidas sob refrigeração (4°C), com medições de tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão (Pdl) e potencial zeta, após 24 horas. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão..... 101

APÊNDICE I - Caracterização das nanopartículas por análise de rastreamento em nanopartículas durante o armazenamento à temperatura ambiente (24 °C). (A) Diâmetro médio das partículas e (B) concentração de partículas (partículas/mL) das nanopartículas controle (ALG/CS) e das nanopartículas contendo ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃), avaliadas nos tempos de 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão..... 101

APÊNDICE J - Caracterização das nanopartículas por análise de rastreamento em nanopartículas durante o armazenamento em estufa 40 °C. (A) Diâmetro médio das partículas e (B) concentração de partículas (partículas/mL) das nanopartículas controle (ALG/CS) e das nanopartículas contendo ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃), avaliadas nos tempos de 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão..... 102

APÊNDICE K - Caracterização das nanopartículas por análise de rastreamento em nanopartículas durante o armazenamento em bloco digestor (65 °C). (A) Diâmetro médio das partículas e (B) concentração de partículas (partículas/mL) das nanopartículas controle (ALG/CS) e das nanopartículas contendo ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃), avaliadas nos tempos de 0, 7, 15, 30 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão..... 103

APÊNDICE L - Caracterização das nanopartículas por análise de rastreamento em nanopartículas durante o armazenamento sob refrigeração (4 °C). (A) Diâmetro médio das partículas e (B) concentração de partículas (partículas/mL) das nanopartículas controle (ALG/CS) e das nanopartículas contendo ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃), avaliadas nos tempos de 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão..... 103

APÊNDICE M - Dados da altura, comprimento e massa fresca de plântulas de milho germinadas obtidos no teste de germinação em papel Germitest, oriundas de sementes tratadas com: água (controle negativo); *Azospirillum brasilense*; solução de GA₃ (75 mg/100 g de sementes); nanopartículas ALG/CS-GA₃ contendo 75, 62,5 ou 50 mg de GA₃/100 g de sementes associadas à inoculação com *A. brasilense*; e nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas mesmas concentrações, porém aplicadas na ausência de *A. brasilense*..... 104

APÊNDICE N - Altura da parte aérea e comprimento da raiz e massa fresca e seca da parte aérea e da raiz de plântulas de milho cultivadas em vasos com substrato comercial, provenientes de sementes tratadas com: controle negativo (água); *Azospirillum brasilense*; solução de GA₃ (75 mg/100 g de sementes); nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas concentrações de 75, 62,5 e 50 mg de GA₃/100 g de sementes, todas com *A. brasilense*; e nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas mesmas concentrações, porém sem *A. brasilense*..... 104

1. INTRODUÇÃO

A agricultura representa um dos principais pilares da economia e é fundamental para a produção de alimentos, energia e outras *commodities* essenciais à segurança alimentar e ao desenvolvimento econômico (Grisa e Porto, 2023). Nas últimas décadas, no entanto, o setor tem enfrentado desafios crescentes associados à degradação ambiental e às mudanças climáticas, que afetam diretamente a produtividade e a estabilidade dos sistemas agrícolas.

Esses fatores têm impactado de forma significativa o estabelecimento inicial das culturas, etapa considerada crítica para o sucesso produtivo. Problemas relacionados à germinação, emergência e vigor inicial das plântulas podem comprometer o desenvolvimento das plantas e reduzir sua produtividade, especialmente em ambientes sujeitos a condições adversas.

Nesse contexto, o tratamento de sementes destaca-se como uma estratégia fundamental para promover a uniformidade da emergência, aumentar a tolerância a estresses e favorecer o desenvolvimento inicial da cultura. Ao atuar diretamente sobre as fases de germinação e estabelecimento, essa prática melhora o desempenho fisiológico das plantas, reduz perdas e otimiza o uso de insumos, contribuindo para a obtenção de lavouras mais uniformes (Paravar et al., 2023). Além disso, o uso de tecnologias inovadoras tem sido amplamente estudado como uma alternativa promissora para a aplicação direcionada de bioinsumos, microrganismos e reguladores de crescimento. Essas inovações favorecem interações positivas entre a planta e o ambiente, mesmo sob condições adversas (Campos et al., 2010; Cardarelli et al., 2022), resultando em sistemas de produção mais eficientes e sustentáveis.

Como consequência, essa prática contribui para a redução da dependência de insumos químicos aplicados ao solo e para o desenvolvimento de uma agricultura mais alinhada aos princípios ambientais, econômicos e sociais da sustentabilidade (Maitra *et al.*, 2024). Sabe-se que o solo abriga uma ampla diversidade de microrganismos que interagem direta e indiretamente com as plantas ao longo de seu desenvolvimento. No entanto, a atividade biológica do solo pode ser significativamente afetada por

interferências antrópicas, resultando em impactos negativos sobre o crescimento e a saúde vegetal (Mahmood *et al.*, 2016). Esse conjunto de microrganismos, denominado microbioma do solo, concentra-se principalmente na rizosfera, região influenciada pelas raízes onde são liberadas substâncias como fitormônios, moléculas quelantes e compostos envolvidos na nutrição e proteção das plantas (Lakshmanan *et al.*, 2015).

Considerando as funções desempenhadas pelo microbioma do solo, microrganismos benéficos associados às plantas têm sido isolados e utilizados na agricultura sob a forma de bioinsumos, com aplicação crescente no tratamento de sementes (Andrade *et al.*, 2022; Souza, 2023). Entre esses microrganismos, destaca-se o gênero *Azospirillum*, especialmente a espécie *Azospirillum brasilense*, que coloniza a rizosfera e é favorecida pela intensa atividade radicular (Bashan, 1999).

Essa bactéria é reconhecida como uma Bactéria Promotora do Crescimento Vegetal (BPCV), desempenhando funções como a fixação biológica de nitrogênio e a estimulação da produção de fitormônios pelas plantas (Hungria, 2011). Estudos demonstram que a inoculação de *A. brasilense* em sementes de milho resulta em melhorias no crescimento vegetal, maior absorção de nutrientes e aumento da tolerância ao déficit hídrico (Marques *et al.*, 2020), evidenciando o potencial dessa estratégia como eficiente e alinhada aos princípios da sustentabilidade.

Grande parte dos efeitos benéficos associados à ação de microrganismos promotores de crescimento está relacionada à modulação do balanço hormonal vegetal, seja pela produção direta de fitormônios ou pela indução de vias metabólicas envolvidas na sua síntese e sinalização (Becker *et al.*, 2018). Nesse contexto, essas substâncias assumem papel central na regulação do desenvolvimento, especialmente nas fases iniciais do ciclo de vida das culturas.

Quando aplicados de forma sintética, esses reguladores estimulam a germinação, o vigor inicial das plântulas e a tolerância das plantas a estresses ambientais (Chen; Pang, 2023). Nesse sentido, diferentes estratégias de

aplicação direcionadas às sementes têm sido investigadas com o objetivo de potencializar os efeitos dessas substâncias ao longo do desenvolvimento vegetal.



Figura 1. Esquema conceitual do tratamento de sementes com bioinsumos e nanopartículas aplicados à agricultura sustentável.

Nesse contexto, o ácido giberélico (GA₃) destaca-se como um regulador de crescimento amplamente utilizado no tratamento de sementes, em função de seus efeitos sobre a germinação, o vigor inicial das plântulas e o desenvolvimento vegetal (Nambara, 2013; Bose *et al.*, 2013). Entretanto, sua aplicação convencional é limitada pela baixa estabilidade e pela rápida degradação causada por fatores ambientais, como temperatura, umidade e radiação ultravioleta (Pereira *et al.*, 2019). Como alternativa, a nanotecnologia aplicada à agricultura tem ampliado as possibilidades de incorporação de reguladores de crescimento e microrganismos benéficos, por meio do desenvolvimento de sistemas nanoestruturados capazes de proteger os bioativos e potencializar sua eficiência nas fases iniciais da cultura (Fraceto *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2021). Nesse sentido, o uso de biopolímeros biodegradáveis, como alginato de sódio e quitosana, tem sido investigado

como estratégia promissora para a encapsulação do GA₃, visando aumentar sua estabilidade e eficácia quando aplicado via sementes.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo sintetizar e caracterizar nanopartículas de alginato de sódio e quitosana contendo ácido giberélico encapsulado, bem como produzir *Azospirillum brasilense* hm053, para aplicação conjunta no tratamento de sementes de milho (*Zea mays* L.).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Agricultura sustentável e uso de bioinsumos

A agricultura insere-se no setor primário da economia, desempenhando um papel essencial na produção de alimentos e de matérias-primas destinadas a diferentes cadeias produtivas. Assim, configurara-se como um dos principais pilares da segurança alimentar e do desenvolvimento econômico no Brasil. Nesse contexto, o desempenho produtivo e a sustentabilidade dos sistemas agrícolas tornam-se fatores determinantes para atender à crescente demanda por alimentos de forma eficiente (Abdelkader, 2005).

Sob a perspectiva da sustentabilidade, a atividade agrícola deve ser fundamentada na integração de três pilares principais: a conservação ambiental, a responsabilidade social e a viabilidade econômica (Velten *et al.*, 2015). Para a consolidação desses pilares, é necessário a adoção de soluções tecnológicas e estratégias de manejo capazes de aumentar a eficiência dos sistemas produtivos, reduzir os impactos ambientais e garantir a estabilidade da produção ao longo do tempo.

Dessa forma, os bioinsumos emergem como ferramentas promissoras para a promoção de práticas agrícolas mais sustentáveis. São definidos como produtos de base biológica aplicados com o objetivo de melhorar o estabelecimento e o desenvolvimento inicial das plantas, além de atuarem no controle fitossanitário e contribuírem para a saúde do solo (Brasil, 2020). Eles têm demonstrado potencial para promover melhorias na qualidade do solo, principalmente por estimularem a atividade microbiana benéfica e aumentarem

a retenção de nutrientes, fatores essenciais para a manutenção dos ecossistemas ao longo do tempo (Adal, 2024).

Sob essa perspectiva, os bioinsumos compreendem um conjunto diversificado de produtos e tecnologias obtidos a partir de recursos biológicos, como microrganismos, extratos vegetais e outras substâncias de origem natural, empregados com a finalidade de otimizar a produtividade agrícola e aumentar a sustentabilidade dos sistemas de produção. De modo geral, esses insumos apresentam benefícios ambientais superiores quando comparados aos produtos químicos convencionais, incluindo menor toxicidade e maior potencial de contribuição para a conservação dos ecossistemas. No entanto, sua aplicação deve ser precedida por avaliações específicas quanto à segurança, eficiência agrônômica e possíveis impactos ecológicos, bem como por adequada regulamentação, a fim de garantir seu uso responsável na agricultura (Silva *et al.*, 2025).

Diante disso, a incorporação de bioinsumos em sistemas agrícolas configura-se como uma abordagem complementar para o enfrentamento dos desafios atuais da produção de alimentos. A incorporação dessas práticas favorece a conservação dos recursos naturais, a mitigação dos impactos ambientais e o fortalecimento da equidade social no meio rural (FAO, 2021).

O milho se destaca como a segunda cultura mais cultivada no planeta, superada apenas pelo trigo, com uma área de cultivo de cerca de 197 milhões de hectares (Erenstein *et al.*, 2022). A cultura possui grande relevância no consumo em países da América Latina e da Ásia, onde representa cerca de 20% das calorias alimentares (Shiferaw *et al.*, 2011).

Altas doses de fertilizantes nitrogenados sintéticos são comumente necessárias para se obter um alto rendimento do milho, tornando a cultura dependente deste insumo para o seu desenvolvimento (Rodriguez, *et al.*, 2024). Algumas alternativas têm buscado uma forma de se obter uma eficiência mais elevada com relação ao uso do nitrogênio para uma maior produtividade do milho, por meio da inoculação com microrganismos como o *Azospirillum brasilense*. De acordo com Oliveira *et al.* (2017), foi possível reduzir 80% na adubação nitrogenada, por meio da inoculação das plantas

com *Azospirillum brasilense*, que apresentaram produtividade semelhante às plantas totalmente adubadas.

Nesse cenário de transição para práticas mais sustentáveis, os microrganismos promotores do crescimento vegetal (MPCV), como bactérias do gênero *Azospirillum* e fungos micorrízicos, têm se destacado por evidenciarem o potencial de aumento a produtividade agrícola com menor impacto ambiental (Kumar *et al.*, 2019).

2.2 Microrganismos promotores do crescimento vegetal (MPCV)

Existe uma grande variedade de microrganismos no solo, tais como bactérias, fungos, arqueas, algas e pequenos protistas (Berg *et al.*, 2020), que compõem o microbioma do solo e atuam ativamente em ecossistemas terrestres e agrícolas. A atividade metabólica desses microrganismos é responsável pelos serviços ecossistêmicos essenciais à saúde do solo e a produtividade das plantas (Marchesi e Ravel, 2015). Nesse sentido, estudos com microrganismos associados aos sistemas agrícolas têm despertado interesse na aplicação de estratégias que favoreçam o estabelecimento inicial das culturas e reduzam a dependência de insumos sintéticos, especialmente quando aplicadas nas fases iniciais do ciclo produtivo (Magalhães *et al.*, 2024).

Os microrganismos do solo, especialmente bactérias e fungos, desempenham papel central em processos metabólicos e na ciclagem de nutrientes, influenciando diretamente a disponibilidade de elementos essenciais às plantas. Alterações nas comunidades microbianas no solo podem impactar o funcionamento dos sistemas agrícolas, reforçando o interesse no uso de microrganismos benéficos como estratégia para favorecer o estabelecimento inicial das culturas e reduzir a dependência de insumos sintéticos (Nottingham *et al.*, 2018; Cavalcante *et al.*, 2023).

Algumas bactérias e fungos, além de participar dos ciclos biogeoquímicos, são capazes de sintetizar fitormônios, como o ácido giberélico e o ácido indol acético (AIA), bem como produzir exopolissacarídeos (EPS), antibióticos, etileno endógeno, entre outras moléculas (Magalhães *et al.*, 2024).

Tratam-se de microrganismos promotores do crescimento vegetal (MPCV) com taxonomia e metabolismo diversos, que possuem habilidade de se estabelecerem principalmente na rizosfera (Singh *et al.*, 2023). Essa zona do solo ao redor das raízes, a rizosfera, liberam exsudatos - compostos orgânicos derivados da fotossíntese (Prashar *et al.*, 2013). Alguns exemplos de MPCVs presentes em insumos agrícolas são *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Paenobacillus macerans*, *Pseudomonas fluorescens*, entre outros (Oliveira *et al.*, 2017). Dentre esses microrganismos, o gênero *Azospirillum* tem recebido destaque devido à sua ampla aplicação agrícola e aos efeitos positivos sobre o desenvolvimento inicial das plantas, o que justifica sua abordagem específica neste estudo.

2.2.1 O gênero *Azospirillum*: mecanismos de interação e o papel dos exopolissacarídeos (EPS)

O gênero *Azospirillum* compreende bactérias amplamente estudadas como promotoras do crescimento vegetal, especialmente pela capacidade de colonizarem a rizosfera e estabelecerem interações benéficas com diferentes espécies de plantas (Bashan; de-Bashan, 2010). Essas bactérias atuam por múltiplos mecanismos, incluindo a fixação biológica de nitrogênio, a produção de fitormônios e a síntese de metabólitos que favorecem o estabelecimento e o desenvolvimento inicial das plantas (Backer *et al.*, 2018). Entre esses mecanismos, destaca-se a produção de exopolissacarídeos (EPS), que desempenham papel fundamental na interação bactéria-planta e na adaptação do microrganismo ao ambiente do solo.

Os exopolissacarídeos (EPS) são polímeros biodegradáveis, de alto peso molecular, formados por resíduos de monossacarídeos e seus derivados, secretados por bactérias (Sanlibaba e Cakmak, 2016). O EPS forma uma barreira protetora para os microrganismos, contra dissecação, e também pode auxiliar na adesão à superfície de sementes (Milani *et al.*, 2013). Essa capacidade adesiva, por sua vez, contribui para o uso dos EPS como agentes

primários de recobrimento, promovendo melhores condições para a germinação (Tewari; Arora, 2018).

Eles atuam entre as raízes das plantas e as rizobactérias, por meio de uma barreira física que garante a estruturação dos agregados do solo, auxiliando no crescimento e no rendimento das plantas, além de beneficiar a colonização por outros microrganismos (Qurash e Sabri, 2012; Silva, 2014). A associação com EPS também tem sido relatada positivamente na absorção de Ca^{2+} e K^{+} pelas plantas (Egamberdieva *et al.*, 2019). Dessa forma, os EPS têm sido associados à melhoria nutricional e à tolerância a estresses abióticos, como seca e salinidade (Vaishnav *et al.*, 2016 e Kasim *et al.*, 2016).

O estudo de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV), produtoras de exopolissacarídeos impulsiona o desenvolvimento de estratégias voltadas ao tratamento de sementes, visando favorecer a colonização microbiana, o estabelecimento inicial das plantas e a eficiência agrônômica das culturas.

2.3 Fitormônios vegetais e o ácido giberélico (GA_3)

Entre os fatores que influenciam o desempenho das culturas agrícolas, as condições iniciais de germinação e de emergência das plântulas são determinantes para o estabelecimento das plantas. Alterações físicas, químicas ou biológicas no ambiente de cultivo podem comprometer essas fases iniciais, que são altamente sensíveis, reforçando a necessidade de estratégias que favoreçam o desenvolvimento inicial das plantas desde a semente (Lal, 2015).

Diante desse cenário, práticas direcionadas ao tratamento de sementes podem favorecer a proteção do embrião, o aumento do vigor inicial e o estabelecimento mais eficiente das plantas, inclusive em condições edáficas menos favoráveis. Nesse contexto, os fitormônios – compostos produzidos pelas plantas em baixas concentrações que modulam processos metabólicos e fisiológicos – podem ser aplicados via semente para mitigar limitações ambientais (Kerbaui, 2008; Dias, 2020). Essas substâncias são classificadas em diferentes grupos, com destaque para as auxinas, citocininas, giberelinas

(GA), que atuam no alongamento e na divisão celular; o ácido abscísico (ABA), que participa do fechamento estomático; e o etileno, relacionado à maturação de frutos (ri & Mitra, 2001; Taiz; Zeiger, 2010). Outras classes também vêm sendo reconhecidas, como os jasmonatos, os brassinosteroides e o ácido salicílico. A partir desse conhecimento sobre o papel fisiológico dos fitormônios, seu potencial passou a ser amplamente explorado na agricultura por meio do uso de reguladores vegetais. Essas ferramentas permitem modular o crescimento e o desenvolvimento das plantas, contribuindo para a melhoria do desempenho produtivo das culturas (Dias, 2020). Entre os reguladores mais conhecidos e utilizados destacam-se, as giberelinas (Castro; Vieira, 2001).

As giberelinas (GAs) foram descobertas por pesquisadores japoneses no início do século XX (Stowe e Yamaki, 1957). Essa descoberta foi obtida durante os estudos sobre uma doença comum no arroz *bakanae*, causada por um fungo chamado *Fusarium fujikuroi* (Piombo *et al.*, 2020). Quando infectada, a planta de arroz produz giberelina em excesso e passa a apresentar caules alongados e finos, o que ocasiona o seu estiolamento e infertilidade (Hedden, Sponsel, 2015). De acordo com Dar, *et al.* (2015), as GA pertencem à classe dos diterpenóides tetracíclicos. Para classificar os diferentes tipos de giberelina, utilizam-se as siglas GA₁, GA₂ e GA₃, etc que estão de acordo com a ordem da sua descoberta (Hedden & Sponsel, 2015).

As giberelinas têm despertado amplo interesse na agricultura devido ao seu papel central na regulação hormonal vegetal, ao destaque histórico durante a Revolução Verde e à sua atuação em processos-chave do desenvolvimento das plantas, como a germinação de sementes, o crescimento radicular, o alongamento do caule e a expansão da área foliar (Peng *et al.*, 1999; Nambara, 2013; Bose *et al.*, 2013).

Entretanto, a suscetibilidade à degradação por fatores ambientais compromete a eficácia do composto quando aplicado às plantas (Pereira *et al.*, 2019). Diante disso, a encapsulação do GA₃ em polímeros naturais, como alginato e quitosana, constitui uma estratégia para aumentar sua estabilidade e modular sua liberação após a aplicação. (Pereira, 2017; Fregonezi *et al.*, 2023).

2.4 Nanopartículas poliméricas de alginato(ALG) e quitosana (CS)

A microencapsulação é uma técnica que envolve pequenas porções de um ingrediente ativo (sólido, líquido ou gasoso), as quais são recobertas por uma camada bem fina de um material polimérico, formando uma cápsula em torno delas. Esse sistema, após o revestimento, apresenta a morfologia de pequena esfera, permitindo proteger e controlar a liberação de substâncias solúveis tanto em água quanto em lipídios (Munin; Edwards-Lévy, 2011; Jyothi, *et al.*, 2012).

Por meio da microencapsulação, formam-se partículas denominadas microcápsulas ou microesferas, que medem entre 1 e 1000 μm (Castelo *et al.*, 2020). Essas estruturas possuem uma camada externa, denominada agente encapsulante, matriz ou material de revestimento, que envolve o componente interno, conhecido como núcleo, recheio ou ingrediente ativo (Champagne, 2007).

A encapsulação contribui para a proteção do ingrediente ativo frente a fatores ambientais, como exposição à luz, temperatura e umidade, preservando suas propriedades físico-químicas. Esse processo também reduz a perda de compostos por volatilização e possibilita a liberação controlada dos ingredientes ativos, contribuindo para o desenvolvimento de formulações mais estáveis e eficientes. (Cominian; Favaro-Trindade, 2016).

A escolha da técnica de microencapsulação depende da aplicação, do tamanho de partícula desejado, do perfil de liberação e das propriedades físico-químicas dos materiais envolvidos (Castelo *et al.*, 2020). As técnicas de encapsulação podem ser agrupadas em duas categorias principais: (i) métodos químicos, incluindo gelificação iônica, emulsificação e coacervação; e (ii) métodos físicos, como secagem por atomização(*spray drying*), liofilização e extrusão (Campos-Espinoza *et al.*, 2022).

A gelificação iônica baseia-se na formação de uma rede polimérica tridimensional resultante da interação entre polímeros aniônicos e íons multivalentes em solução aquosa. Esse processo promove a imobilização do

composto de interesse no interior da matriz polimérica, formando uma membrana que confere proteção e estabilidade ao material encapsulado. (Mukai-Correa *et al.*, 2005; Pagani *et al.*, 2014). Atualmente, existe uma grande variedade de polímeros, naturais ou sintéticos, que podem ser empregados neste revestimento, sendo que a escolha do material está diretamente relacionada à estabilidade desejada para o composto encapsulado e ao ambiente de aplicação (Huynh *et al.*, 2008).

Nesse contexto, biopolímeros como o alginato de sódio e a quitosana têm sido amplamente utilizados em sistemas de encapsulação, especialmente devido à sua resistência estrutural e estabilidade mecânica quando empregados pelo método de gelificação iônica (Castelo *et al.*, 2020). No âmbito agrícola, esses materiais vêm sendo explorados como sistemas carreadores para fitormônios, incluindo o ácido giberélico. Estudos demonstram que o tratamento de sementes de *Phaseolus vulgaris* com ácido giberélico encapsulado em nanopartículas de alginato de sódio e quitosana resultou em melhorias no desenvolvimento das plantas, evidenciando o potencial desses sistemas para aplicações em sementes (Pereira *et al.*, 2017a; Pereira *et al.*, 2017b).

3. OBJETIVOS

O trabalho visa o estabelecimento de condições para o cultivo de *A. brasilense* (hm053) e o desenvolvimento de nanopartículas de alginato (ALG) e quitosana (CS) para serem utilizados como uma nova estratégia de uso destes bioativos no tratamento de sementes de milho (*Zea mays* L.).

3.1 Objetivos específicos

- 1 Fornecer condições para o crescimento do *Azospirillum brasilense* (hm053) e produção de exopolissacarídeos (EPS);

- 2 Preparar nanopartículas de alginato (ALG), quitosana (CS), contendo ácido giberélico (GA₃) encapsulado;
- 3 Caracterizar as nanopartículas de alginato (ALG), quitosana (CS) contendo ácido giberélico (GA₃) encapsulado;
- 4 Otimizar as condições em laboratório para formulação das nanopartículas de alginato (ALG), quitosana (CS) com ácido giberélico (GA₃) encapsulado e o cultivo de *Azospirillum brasilense*, visando o tratamento de sementes de milho (*Zea mays* L.).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados os seguintes materiais: alginato de sódio (Sigma-Aldrich®); quitosana (Sigma-Aldrich®); cloreto de cálcio (Dinâmica®); ácido giberélico (Sigma-Aldrich®); glicose (Êxodo®, 99,7%), peptona bacteriana (Kasvi), dihidrogenofosfato de potássio (Dinâmica®, 98%), sulfato de magnésio pentahidratado (Dinâmica®, 98%), glicerol (Neon®, 99,7%), sacarose (Dinâmica®), extrato de levedura (Precelys®), mono-hidrogenofosfato de potássio (Dinâmica®, 98%), molibdato de sódio di-dratado (Sigma-Aldrich®), sulfato de manganês di-hidratado (Neon®, 99,98%), ácido bórico (Êxodo®), sulfato de cobre penta-hidratado (Synth®, 98%), sulfato de zinco hepta-hidratado (Êxodo®, 92,3%).

4.1 Crescimento da *Azospirillum brasilense*

4.1.1 Inóculo e origem

Foi utilizada a bactéria *Azospirillum brasilense*, identificada por hm053, cedida pelo Professor André Luiz Martinez de Oliveira do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR, Brasil.

4.1.2 Meio de cultivo e condições de incubação

Para o preparo do inóculo contendo *Azospirillum brasilense*, foi utilizado meio de cultura, conhecido como DYGS, composto por: 2 g de glicose, 1,5 g de peptona bacteriana, 2 g de extrato de levedura, 0,5 g de dihidrogenofosfato de potássio, 0,5 g de sulfato de magnésio pentahidratado, dissolvidos em 1 L de água deionizada (Rodrigues Neto *et al.*, 1986; Fukami *et al.*, 2018). Para o crescimento da *Azospirillum brasilense*, foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 100 mL e uma incubadora *shaker* com temperatura ajustada de 28 ± 2 °C e agitação rotacional de 150 rpm.

4.1.3 Monitoramento do crescimento

A densidade populacional bacteriana foi determinada de forma direta, por meio da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), e indiretamente, utilizando a espectrofotometria no UV-Visível com comprimento de onda igual a 600 nm.

4.2 Produção de exopolissacarídeos

A linhagem *Azospirillum brasilense* (hm053) foi utilizada para a produção de exopolissacarídeos (EPS) em meio FORM15. Após o cultivo, o EPS presente no meio de cultura foi extraído, isolado e purificado.

4.2.1 Meio de cultivo e condições de incubação

Para a produção de exopolissacarídeos (EPS), utilizou-se o meio FORM15 composto por: glicerol 3,0% (m/v), açúcar cristal 5,0% (m/v), extrato de levedura 5,0% (m/v) e mono-hidrogenofosfato de potássio 0,15% (m/v). O meio foi suplementado com $0,1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ de solução de micronutrientes ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de molibdato de sódio di-hidratado, $1,18 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de sulfato de manganês di-hidratado, $1,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de ácido bórico, $0,04 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de sulfato de cobre penta-hidratado e $1,2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de sulfato de zinco hepta-hidratado), com pH ajustado para 6,5 com hidróxido de potássio. O inóculo de *A. brasilense* (hm053) foi transferido para frascos Erlenmeyer de 100 mL contendo meio FORM15 e incubado em agitador orbital a 28 ± 2 °C, sob agitação de 150 rpm, por 96 horas (Oliveira *et al.*, 2017).

4.2.2 Isolamento e purificação de exopolissacarídeos

As células bacterianas foram separadas do meio de cultura por centrifugação ($14.000 \times g$, 15 min, 4 °C). Ao sobrenadante, adicionou-se etanol frio em volume equivalente a três vezes o volume da amostra, promovendo a precipitação dos exopolissacarídeos (EPS) solúveis. A mistura foi incubada a -20 °C por 24 h e, posteriormente, centrifugada novamente ($10.000 \times g$, 15 min, 4 °C). O precipitado contendo o EPS foi ressuspensionado no menor volume possível de água ultrapura (Meneses *et al.*, 2009). A amostra foi submetida à diálise contra água destilada por 48 h a $4 \pm 2^\circ\text{C}$, visando à remoção de sais e açúcares residuais. Por fim, o EPS foi liofilizado, e sua concentração expressa em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de meio de cultura (Milani *et al.*, 2013).

4.3 Preparo de nanopartículas de alginato/quitosana contendo ácido giberélico

Para a síntese das nanopartículas de alginato de sódio (ALG) e quitosana (CS), contendo ácido giberélico (GA_3) encapsulado, este trabalho adotou a metodologia descrita por Pereira *et al.* (2017) e Sarmento *et al.* (2003).

As nanopartículas (NPs) de ALG/CS foram sintetizadas pelo método de pré-gelificação iônica, com algumas modificações, utilizando soluções de alginato de sódio e quitosana de baixo peso molecular (Sarmento *et al.*, 2003). Para isso, 3,75 mL de CaCl_2 (18 mM) foram adicionados a 59 mL da solução de alginato de sódio (0,063%, pH 4,9) por 60 minutos, sob agitação vigorosa, utilizando uma bomba peristáltica. Em seguida, adicionou-se 3,75 mg de ácido giberélico (GA_3), mantendo a agitação constante. Posteriormente, foram adicionados 12,5 mL de quitosana (0,07%, pH 4,6), preparada em solução aquosa de ácido acético (5,7%), por 90 minutos, também sob agitação vigorosa com auxílio da bomba peristáltica, à solução contendo CaCl_2 , alginato de sódio e ácido giberélico.

4.4 Caracterização das nanopartículas

4.4.1 Espalhamento dinâmico da Luz (DLS)

A caracterização físico-química das nanopartículas, incluindo o tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão (Pdl) e o potencial zeta, foi realizada por espalhamento dinâmico de luz (DLS). Essa análise permite avaliar a estabilidade coloidal, a homogeneidade do sistema e o comportamento das partículas em suspensão.

As medições foram conduzidas em um aparelho ZetaSizer Nano ZS 90 (Malvern), operando a 25 °C. Para cada análise, 1 mL das suspensões ALG/CS-GA₃ e ALG/CS (controle) foi analisado, sem qualquer ajuste prévio de pH ou diluição. A determinação do potencial zeta foi realizada utilizando uma cubeta específica equipada com eletrodos integrados, necessária para a leitura baseada na mobilidade eletroforética. As análises foram conduzidas ao longo do armazenamento sob diferentes condições: temperatura ambiente e em estufa (40 °C) por até 60 dias, bloco digestor (65 °C) por 30 dias e refrigeração a 4 °C por 24 horas.

4.4.2 Técnica de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

A análise por rastreamento de nanopartículas foi empregada para quantificar a concentração e caracterizar a distribuição de tamanhos das nanopartículas produzidas.

As amostras das formulações ALG/CS-GA₃ e ALG/CS (controle), armazenadas em temperatura ambiente, foram previamente diluídas em água deionizada na razão 1:1000. Em seguida, 1 mL de cada suspensão diluída foi transferido para leitura no sistema NanoSight LM10, equipado com laser verde (532 nm) e câmera sCMOS. As aquisições foram conduzidas a 25 °C, utilizando o software NanoSight 3.1. Para cada amostra, foram obtidos cinco registros de vídeo de 60 segundos.

4.4.3 Estabilidade química dos polímeros (pH)

A determinação do pH foi utilizada para avaliar a estabilidade coloidal, realizada com um potenciômetro digital (Ohaus, Starter 2100, Cial). Foram realizadas três medições independentes à temperatura ambiente.

4.4.4 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização das interações químicas entre os componentes das nanopartículas foi realizada por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). As análises foram conduzidas em um espectrofotômetro Agilent Technologies, modelo Cary 630, equipado com cristal de diamante ($2,2 \times 3,0$ mm), operando no modo ATR.

Para o preparo das amostras, as suspensões de nanopartículas ALG/CS-GA₃ e o controle ALG/CS foram inicialmente centrifugadas, com remoção completa do sobrenadante. Os pellets obtidos foram então mantidos em dessecador por aproximadamente sete dias, garantindo a secagem completa do material antes das análises.

Os espectros foram adquiridos na faixa de 4000 a 600 cm^{-1} , empregando resolução de 2 cm^{-1} .

4.4.5 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A análise morfológica das nanopartículas ALG/CS-GA₃ foi realizada por Microscopia de Força Atômica (AFM) utilizando o equipamento Nanosurf EasyScan 2 Basic AFM (Pattern BT02217, Nanosurf, Suíça), operando no modo de varredura não-contato (non-contact mode). Esse modo foi selecionado por permitir a obtenção de imagens de alta resolução sem causar deformações na superfície das nanopartículas. As formulações foram diluídas 20.000 vezes em água deionizada e depositadas sobre substratos de silício para aquisição das imagens.

4.5 Eficiência de encapsulação

A concentração de ácido giberélico (GA₃) encapsulado foi determinada pelo método de ultrafiltração/centrifugação, seguido de análise espectrofotométrica no UV-Visível. Para isso, uma alíquota de $400\text{ }\mu\text{L}$ da

suspensão ALG/CS-GA₃ foi submetida à ultrafiltração em filtros de celulose regenerada com ponto de corte de 10 kDa (Microcon–Millipore), em centrífuga refrigerada, por 10 minutos a 7.000 rpm a 10 °C.

As nanopartículas ficaram retidas no filtro, enquanto o GA₃ livre (não encapsulado) passou para o filtrado. A quantificação seguiu o método descrito por Holbrook *et al.* (1961), por Espectroscopia UV-Vis (50 Conc, Varian) com comprimento de onda igual a 254 nm. Uma alíquota de 250 uL do filtrado obtido foi diluído em 250 uL de água destilada (diluição 2x). Após isso, 0,5 mL desta mistura foi transferido para um balão volumétrico de 5 mL, avolumado com solução de ácido clorídrico com concentração igual a 3,75 M. A leitura foi realizada cerca de 1 hora depois.

O cálculo para a determinação da quantidade de ácido giberélico não encapsulado foi obtido pela diferença com a quantidade total adicionada no momento da síntese da nanopartícula de ALG/CIT/GA₃, considerando 100% como sendo 50 µg/mL de ácido giberélico, de acordo com a Equação 1 (Pereira *et al.*, 2017).

$$EE\% = (W_t / W_i) \times 100\% \text{ (Eq. 1)}$$

W_t é a quantidade total do material incorporado, W_i é a quantidade total de material incorporado adicionado inicialmente.

4.5.1 Quantificação do GA₃

Para a determinação da concentração de GA₃ não encapsulado, foi construída uma curva de calibração a partir de uma solução padrão-mãe de 1.012 µg/mL. Essa solução foi preparada pela dissolução de 25,3 mg de ácido giberélico (GA₃) em um balão volumétrico de 25,0 mL, completando-se o volume com etanol absoluto (99,5%). A partir da solução padrão-mãe, foram

preparadas soluções padrão de trabalho por diluição sucessiva, obtendo-se concentrações finais de 50, 30, 20, 10, 5, 1, 0,5 e 0,2 µg/mL.

Após a preparação, alíquotas de 0,5 mL de cada solução padrão (1–8) foram transferidas para balões volumétricos de 5,0 mL, avolumadas com solução de HCl 3,5 M, homogeneizadas e, após 1 hora, analisadas por espectroscopia UV-Vis (50 Conc, Varian) a 254 nm, conforme descrito por Holbrook, Edge e Baily (1961).

4.6 Ensaios de bioatividade em sementes comerciais

Para avaliar o efeito das formulações nanoparticuladas e de sua interação com *Azospirillum brasilense* sobre a germinação e o desenvolvimento inicial do milho (*Zea mays* L.), foram estabelecidos nove tratamentos experimentais: (i) água (controle negativo); (ii) *A. brasilense*; (iii) 75 mg·L⁻¹ de ácido giberélico/100 kg de sementes (iv) *A. brasilense* associado a nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas concentrações de 75, 62,5 e 50 mg·L⁻¹ de ácido giberélico/100 kg de sementes; (v) nanopartículas ALG/CS-GA₃ isoladas, nas mesmas concentrações.

As doses de ácido giberélico (GA₃) foram definidas com base na recomendação do bioestimulante comercial Stimulate®, cuja bula indica a aplicação de 1,0 a 1,5 L por 100 kg de sementes de milho, contendo 50 mg·L⁻¹ de GA₃. Dessa forma, as concentrações adotadas no presente estudo refletem valores compatíveis com o uso agrícola, permitindo investigar potenciais efeitos bioestimulantes e sinergias com a inoculação bacteriana.

A padronização das doses de *Azospirillum brasilense*, cultivada em meio DYGS e aplicadas nas sementes de milho, foi definida com base em estudos prévios que utilizaram aproximadamente 15 mL de inoculante (10⁹ UFC·mL⁻¹) por kg de sementes (Oliveira *et al.*, 2017). A aplicação do inoculante foi realizada após o tratamento prévio das sementes com as soluções de nanopartículas ALG/CS-GA₃ e sua completa secagem, garantindo que não houvesse interferência física entre os tratamentos. As sementes não tratadas com nanopartículas receberam uma solução de água deionizada antes da inoculação, seguindo a mesma metodologia.

4.6.1 Teste de germinação

Para avaliar os efeitos iniciais das formulações sobre a germinação e o vigor das sementes, foi conduzido um ensaio de germinação, sob condições controladas, seguindo as Regras para Análise de Sementes (RAS).

Para isso, foram utilizadas 50 sementes de milho para cada repetição, totalizando quatro repetições por tratamento. No experimento também foram utilizados papel do tipo Germitest, previamente umedecido com água destilada na proporção de 2,5 vezes a sua massa seca, garantindo condições adequadas de hidratação para a germinação. As sementes foram distribuídas uniformemente sobre o papel, mantendo o espaçamento suficiente para o desenvolvimento das plântulas. Os rolos de papel foram dispostos na posição vertical dentro de sacos plásticos transparentes fechados, para reduzir a perda de umidade e câmara de germinação tipo BOD, sob temperatura constante de 25 ± 2 °C e ausência de luz durante sete dias.

Ao final do período experimental, foram avaliados o percentual de germinação, considerando sementes que apresentaram plântulas normais e o comprimento de parte aérea e raiz primária e o peso da massa fresca.

4.6.2 Desenvolvimento vegetal das plantas de milho em vaso

Para a aplicação dos tratamentos, as sementes foram acondicionadas em sacos plásticos contendo as respectivas soluções e submetidas à agitação manual, a fim de garantir o recobrimento homogêneo. O procedimento foi realizado separadamente para cada tratamento, incluindo o controle, *Azospirillum brasilense*, a associação com nanopartículas ALG/CS-GA₃ e as nanopartículas isoladas.

As variáveis avaliadas neste ensaio foram a taxa de germinação, o desenvolvimento radicular (comprimento da raiz primária e da parte aérea), assim como a massa fresca e a massa seca, das raízes e da parte aérea.

Foram inseridas 2 sementes de milho em cada vaso de planta com capacidade de 1L, preenchido com substrato comercial. Para cada tratamento foram utilizadas seis repetições. A duração total do ensaio foi de 23 dias, sendo no 8º dia avaliada a germinação de sementes e no 14º dia feito a retirada de uma das plantas de milho por meio do seu corte. Todos os vasos foram regados diariamente com o mesmo volume de água.

4.7 Análise de dados

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. As comparações entre tratamentos ou tempos de armazenamento foram realizadas por ANOVA one-way, seguida do teste de Tukey quando aplicável; para delineamentos em blocos casualizados, os blocos foram considerados como fator de controle, e comparações entre dois grupos foram feitas pelo teste t de Student não pareado. O nível de significância adotado foi de $p < 0.05$, e as análises foram realizadas no software GraphPad Prism (v. 10.1.2).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

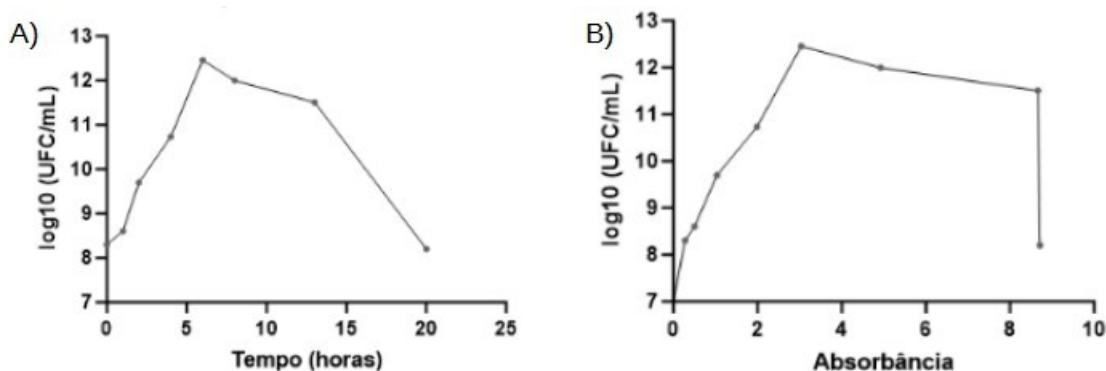
Nesta seção, são apresentados os resultados das curvas de crescimento bacteriano e da produção de exopolissacarídeos (EPS), bem como a caracterização físico-química das nanopartículas sintetizadas neste estudo e os efeitos de sua aplicação no tratamento de sementes de milho.

5.1 Curva de crescimento bacteriano

A curva de crescimento bacteriano é uma ferramenta para compreender o comportamento fisiológico dos microrganismos em condições laboratoriais controladas, permitindo identificar as fases de adaptação(*lag*), exponencial(*log*), estacionária e de declínio (Madigan *et al.*, 2018).

A Figura 2 apresenta a variação da concentração de células viáveis de *Azospirillum brasilense* hm053 expressa em $\log_{10}$ (UFC/mL), em função do tempo de cultivo (A) e da densidade óptica 600 nm (B).

Figura 2. Curvas de crescimento de *Azospirillum brasilense* (hm053) cultivado em meio DYGS (28 °C $\pm$ 2, 160 RPM). (A) Relação entre a concentração de células viáveis (UFC/mL) e o tempo de incubação (h). (B) Relação entre a concentração de células viáveis [$\log_{10}$ (UFC/mL)] e a densidade óptica a 600 nm (OD_{600}).



Observa-se que, nas primeiras horas de cultivo, ocorreu um aumento progressivo da concentração celular, atingindo valores máximos próximos a 12 $\log_{10}$ (UFC·mL⁻¹), característicos da fase de crescimento exponencial. Posteriormente, registrou-se uma redução no número de células viáveis, indicando a transição para a fase estacionária, seguida do início da fase de declínio.

No presente estudo, *A. brasilense* apresentou fase exponencial concentrada nas primeiras 6–8 horas de cultivo. Esse comportamento difere do observado por Fukami *et al.* (2018), que relataram uma fase exponencial mais prolongada, estendendo-se até aproximadamente 30–36 horas em meio DYGS. Essas diferenças podem estar associadas à variabilidade entre estirpes, às condições de cultivo e à dinâmica metabólica da bactéria, evidenciando que a cinética de crescimento de *A. brasilense* é altamente dependente do sistema experimental.

O rápido aumento da concentração celular indica que *A. brasilense* (hm053) adaptou-se prontamente ao meio DYGS, estabelecendo uma fase exponencial precoce. Os valores máximos atingidos e o reduzido tempo de geração caracterizam a alta eficiência do processo de biofabricação desta

estirpe. De acordo com Souza et al. (2015), a eficácia de um inoculante no campo depende diretamente de uma colonização radicular bem-sucedida, que exige a presença de altas populações bacterianas metabolicamente ativas no momento da aplicação. Além disso, a relação observada entre a absorbância e o número de células viáveis (Figura 2B) confirma que a espectrofotometria é um método indireto rápido e confiável para o monitoramento desse processo em tempo real. Essa correlação é fundamental para a viabilidade produtiva, pois permite que a espectrofotometria seja utilizada como um método indireto, rápido e confiável para a avaliação do crescimento bacteriano em tempo real, otimizando o monitoramento em processos de larga escala.

5.2 Exopolissacarídeos bacterianos

A estirpe *A. brasilense* (hm053) apresentou produção significativa de exopolissacarídeos (EPS) quando cultivada em meio FORM15 (Figura 3). A síntese de polímeros extracelulares, como o EPS, auxilia na formação de biofilmes e contra dessecação e variação osmótica, como também na viabilidade da bactéria no campo e em processos de promoção de crescimento vegetal (Souza, et al., 2015).

Figura 3. Exopolissacarídeo (EPS) obtido por meio do cultivo de *Azospirillum brasilense* (hm053) em meio FORM15.



Fonte: autora

No presente estudo, o cultivo da estirpe hm053 em meio FORM15 por 96 horas resultou em uma produção de 0,81 g/L de exopolissacarídeo. Ao comparar com os achados de Milani *et al.* (2013), que obtiveram 1,56 g/L utilizando a estirpe Ab-V5 em meio LGI sob tempo de incubação similar (até 120h), observa-se que, embora ambos os processos foquem no acumulo tardio de polímeros, a composição do meio de cultura exerce influência determinante no rendimento final.

Além das diferenças nas condições de cultivo, a divergência nos rendimentos de EPS pode ser atribuída à especificidade genética das estirpes utilizadas. Enquanto este estudo empregou a estirpe hm053, Milani *et al.* (2013) utilizaram a estirpe Ab-V5, amplamente reconhecida e utilizada em inoculantes comerciais no Brasil por sua elevada capacidade de síntese de exopolissacarídeos e de formação de biofilmes (Hungria, 2010).

5.3 Caracterização físico-química e avaliação da estabilidade das nanopartículas

5.3.1 Diâmetro médio, Índice de polidispersão e Potencial Zeta

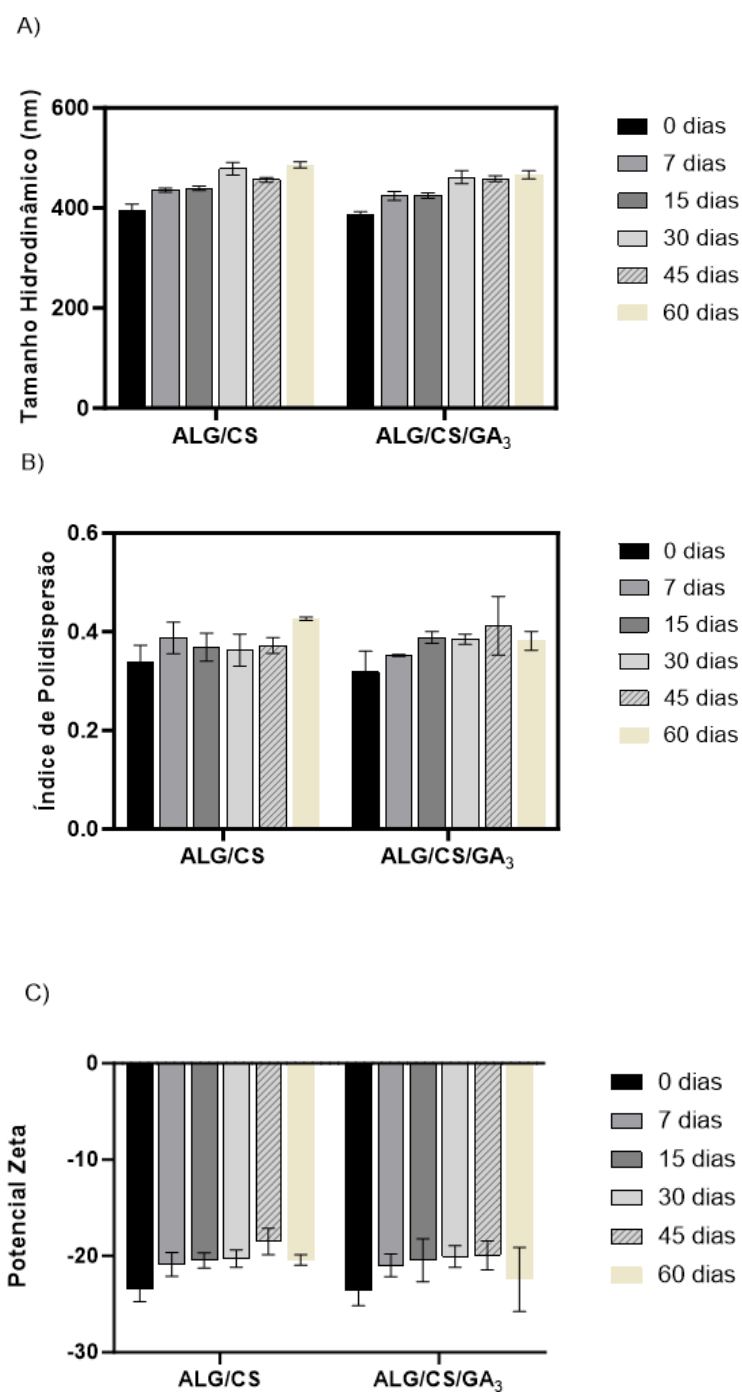
O diâmetro médio, o índice de polidispersão (Pdl) e o potencial zeta das nanopartículas foram analisados como indicadores da estabilidade físico-química do sistema ao longo do armazenamento, bem como de possíveis alterações estruturais sob diferentes condições térmicas. A análise da distribuição de tamanho por intensidade permitiu identificar mudanças no perfil das partículas, refletindo processos de agregação ou reorganização do sistema nanoparticulado.

Nesse contexto, as nanopartículas de alginato de sódio e quitosana (ALG/CS) e aquelas contendo ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃) apresentaram comportamentos distintos quando submetidas a diferentes temperaturas de armazenamento: temperatura ambiente (24 °C), refrigeração (4 °C), estufa (40 °C) e em bloco digestor (65 °C). Os dados completos obtidos por meio do espalhamento de luz dinâmico (DLS) podem ser consultados no Apêndice A e B.

a) Avaliação da estabilidade das nanopartículas armazenadas à temperatura ambiente ao longo do tempo (0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias).

Os valores médios do diâmetro das nanopartículas, do Pdl e do potencial zeta das formulações ALG/CS e ALG/CS-GA₃, armazenadas em temperatura ambiente de aproximadamente 24 °C estão apresentados na Figura 4, que ilustra o comportamento desses parâmetros ao longo do tempo.

Figura 4. Caracterização da estabilidade das nanopartículas armazenadas à temperatura ambiente (24 °C) ao longo do tempo (0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias) (A) diâmetro hidrodinâmico (B) índice de polidispersão (Pdl) (C) potencial zeta das nanopartículas controle (ALG/CS) e contendo ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃).



Como observado na Figura 4, o diâmetro hidrodinâmico um aumento inicial seguido de estabilização durante os 60 dias de análise, tanto no sistema controle quanto naquele contendo GA₃.

A análise de variância unidimensional indicou efeito altamente significativo do tempo sobre o tamanho hidrodinâmico médio das nanopartículas, tanto no tratamento controle quanto no tratamento contendo GA₃, ao longo dos 60 dias de armazenamento. Para o controle, observou-se efeito significativo do tempo ($F(5,12) = 44,14$; $p < 0,0001$; $R^2 = 0,9484$), com homogeneidade de variâncias (teste de Brown–Forsythe, $p = 0,5844$), sendo o tamanho inicial (0 dias) significativamente menor em relação aos demais tempos, o que indica aumento progressivo do diâmetro nas fases iniciais do armazenamento.

De forma semelhante, as nanopartículas contendo GA₃ apresentaram efeito significativo do tempo ($F(5,12) = 42,19$; $p < 0,0001$; $R^2 = 0,9462$), com variâncias homogêneas ($p = 0,9481$). As comparações múltiplas indicaram crescimento inicial seguido de estabilização nos períodos finais (30, 45 e 60 dias), que não diferiram estatisticamente entre si.

O índice de polidispersidade (Pdl) também foi influenciado pelo tempo de armazenamento. A ANOVA revelou efeito significativo do tempo tanto para as nanopartículas controle ($F(5,12) = 3,575$; $p = 0,0328$; $R^2 = 0,5983$) e para as contendo GA₃ ($F(5,12) = 3,281$; $p = 0,0426$; $R^2 = 0,5776$). As comparações de Tukey indicaram diferenças estatisticamente significativas apenas nos tempos pontuais: aumento do Pdl aos 60 dias no tratamento controle ($p = 0,0174$) e aos 45 dias no tratamento com ácido giberélico ($p = 0,0304$). As demais variações sugerem oscilações localizadas sem uma tendência de instabilidade consistente.

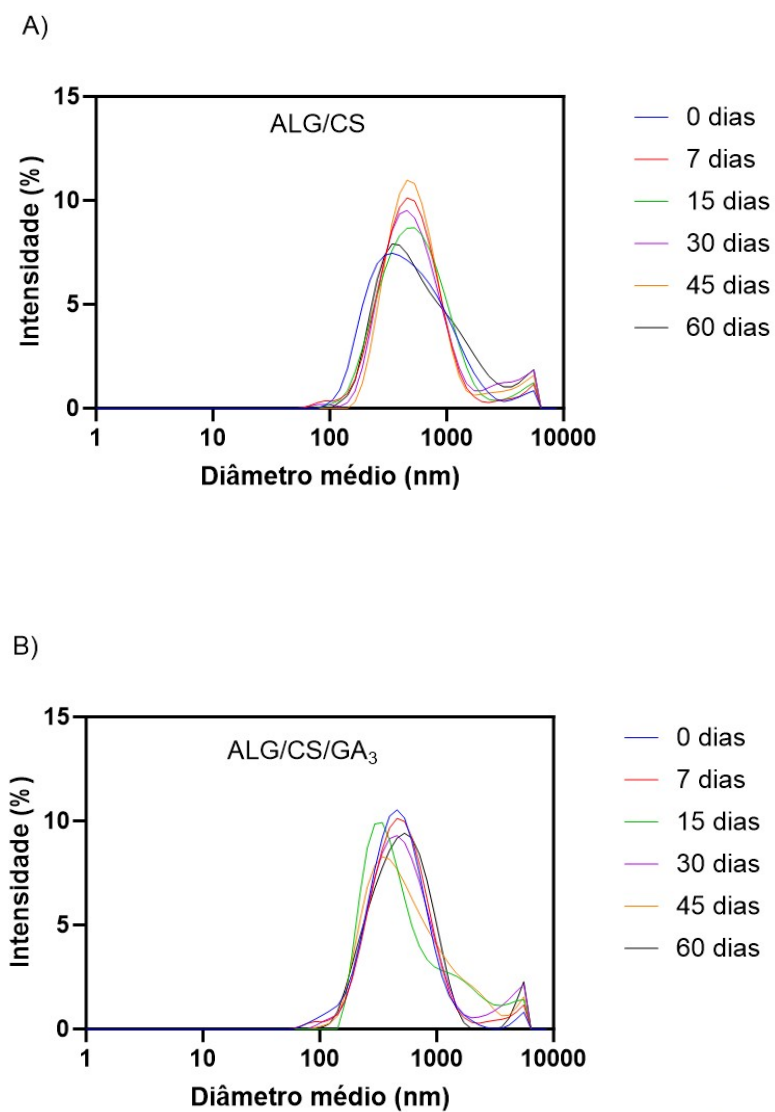
Esses resultados indicam boa estabilidade físico-química do sistema em temperatura ambiente, uma vez que não ocorreram variações significativas no tamanho médio ou no Pdl, parâmetros diretamente relacionados à agregação de partículas e estão de acordo com o que foi reportado por Pereira (2017), em que se obteve partículas de 450 ± 10 nm e Pdl de 0.3, utilizando nanopartículas de alginato e quitosana para encapsular o ácido giberélico. É interessante notar que essa semelhança também ocorre com o trabalho de Silva *et al.* (2010), que encontrou tamanhos entre 450 e 650 nm ao encapsular o herbicida clomazone.

Quanto ao potencial zeta (PZ), a ANOVA indicou efeito significativo do tempo apenas para as nanopartículas controle ($F(5,12) = 6,640$; $p = 0,0035$; $R^2 = 0,7345$), com variâncias homogêneas entre os tempos (teste de Brown–Forsythe, $p = 0,9246$). O teste de Tukey revelou diferenças significativas entre o tempo inicial (0 dias) e os tempos de 15, 30, 45 e 60 dias, caracterizadas por redução progressiva do módulo do potencial zeta, sendo a maior diferença observada aos 45 dias ($p = 0,0012$). Em contraste, para o tratamento contendo GA_3 , não foi observado efeito significativo do tempo sobre o PZ ($F(5,12) = 1,668$; $p = 0,2166$; $R^2 = 0,4100$), e as comparações múltiplas não indicaram diferenças entre os tempos ($p > 0,05$), evidenciando maior estabilidade eletrostática do sistema ao longo do armazenamento.

Esse comportamento evidencia maior estabilidade eletrostática do sistema ao longo do período de armazenamento, sugerindo que a presença do GA_3 contribui para a manutenção das cargas superficiais das nanopartículas, possivelmente por interações eletrostáticas ou estruturais com a matriz polimérica de alginato e quitosana. Em relação ao potencial zeta (PZ), no tempo inicial ($t = 0$) o sistema apresentou valor de $-23,6 \pm 1,6$ mV, próximo ao reportado por Pereira (2017), que obteve $-29 \pm 0,5$ mV para nanopartículas de ALG/CS, indicando estabilidade coloidal associada à repulsão eletrostática entre as partículas.

Além dos valores médios de diâmetro e Pdl, a distribuição do tamanho de partículas por intensidade foi avaliada para verificar a homogeneidade do sistema e a presença de possíveis populações secundárias ao longo do armazenamento, como pode ser visto na Figura 5.

Figura 5. Distribuição do tamanho de partículas por intensidade das nanopartículas ALG/CS e ALG/CS-GA₃ armazenadas à temperatura ambiente (24 °C), obtida por espalhamento de luz dinâmico (DLS) nos tempos de 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias. (A) nanopartículas controle (ALG/CS) (B) Nanopartículas com ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃).



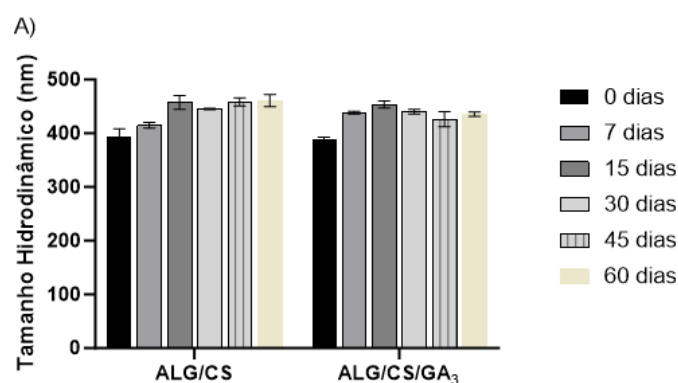
As distribuições de tamanho por intensidade obtidas por DLS evidenciaram diferenças no comportamento de estabilidade entre os sistemas. As nanopartículas controle (ALG/CS) apresentaram picos assimétricos com cauda longa em direção a maiores diâmetros, especialmente nos períodos finais de armazenamento, indicando a presença de partículas maiores ou agregados, sugerindo uma tendência à instabilidade coloidal ao longo do tempo.

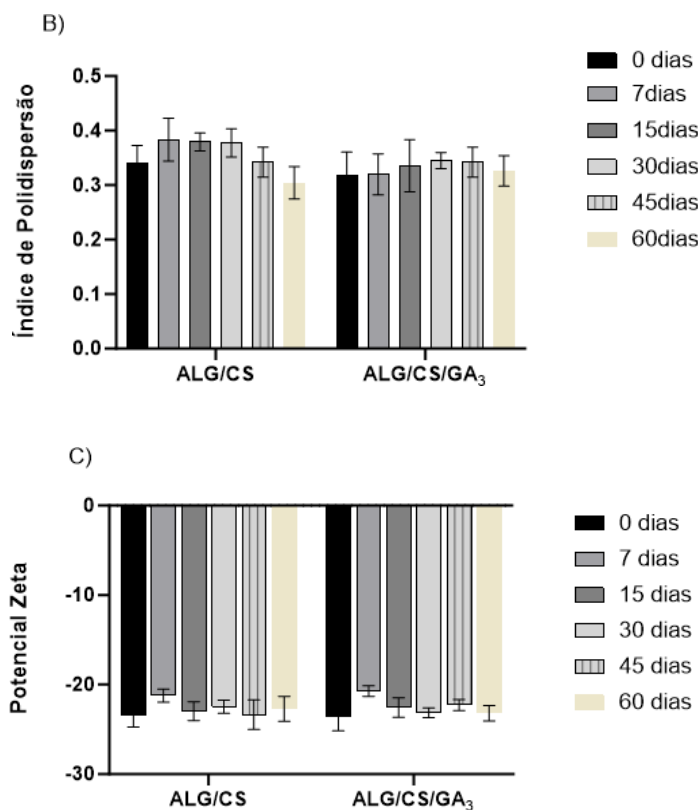
Em contraste, as nanopartículas contendo GA₃ (ALG/CS-GA₃) exibiram distribuições unimodais, com picos bem definidos e perfis sobrepostos entre diferentes tempos de armazenamento. Esse comportamento indica maior homogeneidade e estabilidade do sistema, confirmando que a incorporação do ácido giberélico favorece a manutenção da estrutura nanoparticulada.

b) Avaliação da estabilidade das nanopartículas armazenadas à 40 °C (0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias).

Os valores médios do diâmetro das nanopartículas, do Pdl e do potencial zeta das formulações ALG/CS e ALG/CS-GA₃, armazenadas em estufa a 40 °C durante 60 dias, estão apresentados na Figura 6, que ilustra o comportamento desses parâmetros ao longo do tempo. Os dados completos obtidos por meio do espalhamento de luz dinâmico (DLS) podem ser consultados no Apêndice C e D.

Figura 6. Caracterização da estabilidade das partículas em estufa (40 °C) em função do tempo: 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias. (A) diâmetro hidrodinâmico (B) índice de polidispersão (Pdl) (C) potencial zeta em função do tempo para as nanopartículas controle (ALG/CS) e com ácido giberélico encapsulado (ALG/CS/GA₃).





Conforme apresentado na Figura 6, as nanopartículas mantidas na estufa (40 °C) apresentaram valores de diâmetro hidrodinâmico relativamente constantes ao longo do período de 60 dias, tanto para o sistema controle quanto para o sistema contendo GA₃.

A análise de variância unidimensional indicou efeito altamente significativo do tempo sobre o tamanho de partícula tanto no tratamento controle (ANOVA one-way, $F(5,12) = 24,01$; $p < 0,0001$) quanto na formulação com ácido giberélico ($F(5,12) = 30,09$; $p < 0,0001$), com homogeneidade das variâncias em ambos os casos. No controle, observou-se aumento significativo do tamanho nos primeiros 15 dias de armazenamento em estufa, seguido por estabilização, uma vez que não foram detectadas diferenças significativas entre os tempos de 15, 30, 45 e 60 dias pelo teste de Tukey. De forma semelhante, a formulação ativa apresentou aumento significativo do tamanho

já nos primeiros 7 dias, mantendo-se relativamente estável até 60 dias, com apenas variações pontuais.

Para o tratamento controle, a ANOVA one-way indicou efeito significativo do tempo sobre o índice de polidispersidade ($F(5,12) = 3,377$; $p = 0,039$). No entanto, o teste de Tukey não identificou diferenças estatisticamente significativas entre os tempos avaliados ($p > 0,05$), apesar de se observar uma tendência de redução do Pdl aos 60 dias em relação aos períodos iniciais.

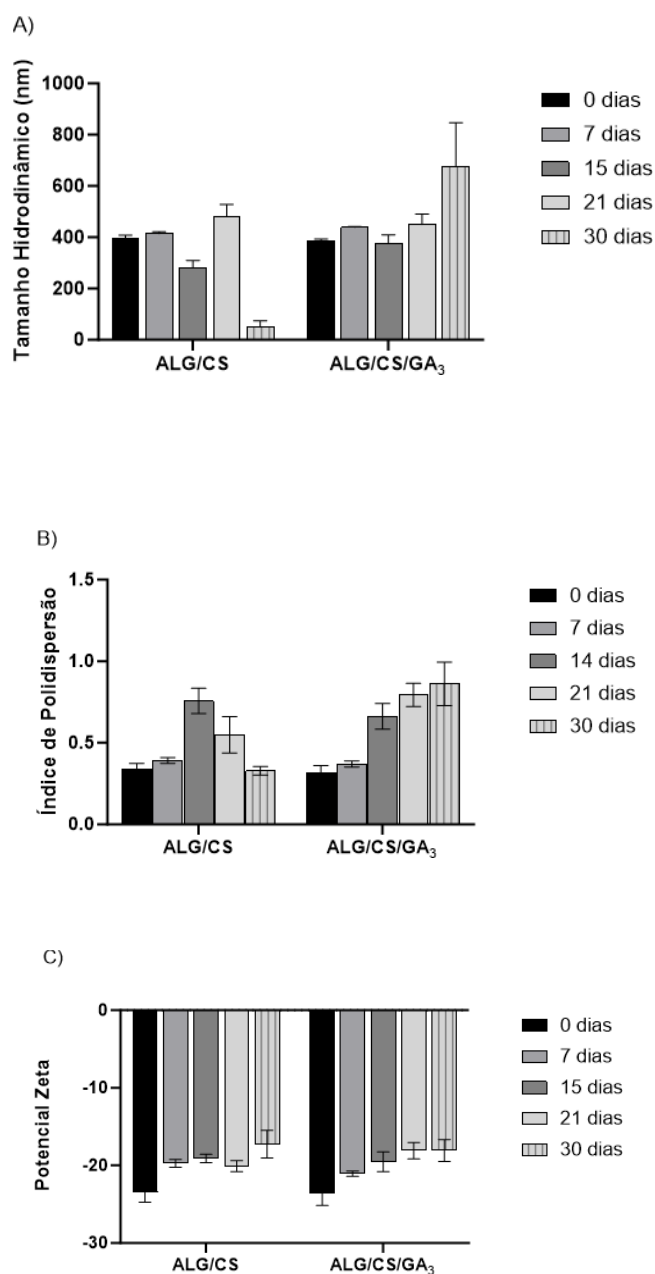
Em contraste, a formulação com ácido giberélico não apresentou efeito significativo do tempo sobre o Pdl ($F(5,12) = 0,3176$; $p = 0,8929$), mantendo valores estáveis ao longo de todo o período de armazenamento em estufa. De forma comparativa, esses resultados indicam que, enquanto o controle apresentou maior sensibilidade temporal na distribuição de tamanhos, a presença do ativo contribuiu para a manutenção de uma polidispersidade mais constante, refletindo maior estabilidade coloidal.

No tratamento controle, a análise de variância não indicou efeito significativo do tempo sobre o potencial zeta (ANOVA one-way, $F(5,12) = 1,373$; $p = 0,3013$), com variâncias homogêneas (Brown–Forsythe, $p = 0,9378$), e o teste de Tukey não revelou diferenças entre os tempos avaliados ($p > 0,05$). Os valores permaneceram próximos a -23 mV, indicando estabilidade da carga superficial. Por outro lado, a formulação com ácido giberélico apresentou efeito significativo do tempo sobre o potencial zeta ($F(5,12) = 3,537$; $p = 0,0339$), com diferença significativa detectada apenas entre 0 e 7 dias ($p = 0,0270$), caracterizada por redução em módulo do potencial zeta. Após esse período inicial, os valores permaneceram estáveis até os 60 dias. Esses resultados sugerem que a formulação ativa passou por uma reorganização inicial da superfície das partículas, seguida por estabilização sustentada do potencial zeta.

c) Avaliação da estabilidade das nanopartículas armazenadas à 65 °C (0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias).

Os valores médios do diâmetro das nanopartículas, do Pdl e do potencial zeta das formulações ALG/CS e ALG/CS-GA₃, armazenadas em bloco digestor (65 °C), por 30 dias, estão apresentados na Figura 7. Esta figura ilustra o comportamento desses parâmetros ao longo do tempo.

Figura 7. Caracterização da estabilidade das partículas em bloco digestor (65 °C) em função do tempo: 0, 7, 15, 21 e 30 dias (A) diâmetro hidrodinâmico (B) índice de polidispersão (Pdl) (C) potencial zeta em função do tempo para as nanopartículas controle (ALG/CS) e com ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃).



Conforme apresentado na Figura 7, as nanopartículas mantidas a 65 °C exibiram comportamentos distintos: o sistema controle (ALG/CS) apresentou valores de diâmetro hidrodinâmico acentuadamente baixos ao final do período, enquanto o sistema contendo ALG/CS-GA₃ apresentou aumento de tamanho aos 30 dias.

A análise de variância unidimensional indicou efeito significativo do tempo sobre o tamanho das partículas no tratamento controle (ANOVA one-way, $F(3,8) = 197,9$; $p < 0,0001$; $R^2 = 0,9867$) e na formulação ativa ($F(3,8) = 8,035$; $p = 0,0085$; $R^2 = 0,7508$). No controle, o teste de Tukey revelou redução progressiva e significativa do tamanho das partículas, com diferenças marcantes entre os tempos iniciais e os tempos de 15 e 30 dias ($p < 0,001$). Em contraste, a formulação ativa permaneceu estável até os 15 dias, exibindo um aumento significativo de tamanho aos 30 dias ($p < 0,05$), sugerindo uma reorganização estrutural ou agregação tardia induzida pelo calor.

Para o índice de polidispersidade, a ANOVA one-way indicou efeito altamente significativo em ambos os grupos. No controle, o teste de Tukey demonstrou aumento acentuado e transitório do Pdl aos 15 dias, com valores significativamente superiores aos observados em 0, 7 e 30 dias ($p < 0,0001$), seguido de redução ao final do período avaliado. Já a formulação ativa apresentou aumento progressivo do Pdl ao longo do tempo, com valores significativamente maiores aos 15 e 30 dias em comparação aos tempos iniciais (0 e 7 dias), sem diferença entre 15 e 30 dias, indicando estabilização da polidispersidade após esse período. Esses resultados sugerem que, embora ambos os sistemas tenham apresentado variações temporais na distribuição de tamanhos, o tratamento ativo exibiu um comportamento mais consistente ao longo do tempo.

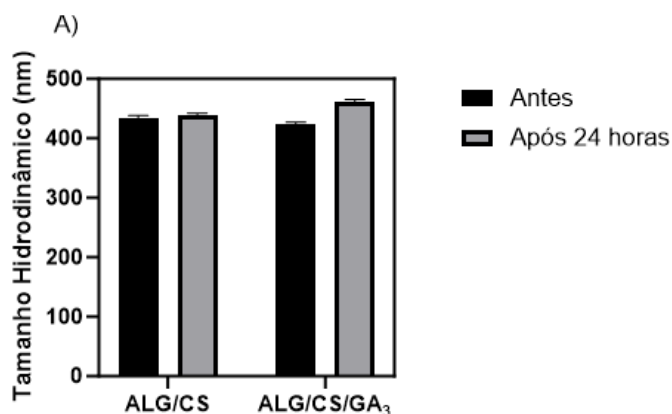
A análise de variância de uma via indicou efeito significativo do tempo sobre o potencial zeta tanto no tratamento controle ($F(3,8) = 14,91$; $p = 0,0012$; $R^2 = 0,8482$) quanto no tratamento ativo ($F(3,8) = 10,87$; $p = 0,0034$; $R^2 = 0,8030$),

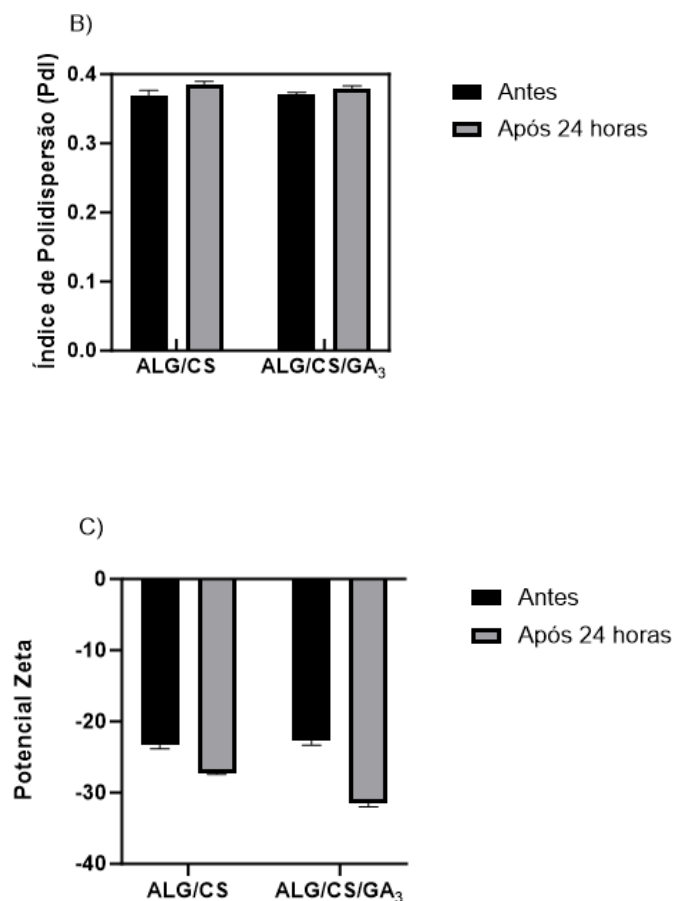
com variâncias homogêneas entre os grupos (Brown–Forsythe, $p > 0,05$). No controle, o teste de Tukey revelou diferenças significativas entre o tempo inicial (0 dias) e os tempos de 7, 15 e 30 dias ($p < 0,05$), enquanto não foram observadas diferenças entre os períodos posteriores, indicando alteração inicial do potencial zeta seguida de estabilização. De forma semelhante, a formulação ativa apresentou diferenças significativas entre 0 e 15 dias e entre 0 e 30 dias ($p < 0,05$), sem variações adicionais entre os tempos subsequentes. Esse comportamento indica que as altas temperaturas promovem alterações nas interações eletrostáticas entre o alginato e a quitosana na superfície das nanopartículas.

d) Avaliação da estabilidade das nanopartículas armazenadas à 4 °C (0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias).

Os valores médios do diâmetro das nanopartículas, do Pdl e do potencial zeta das formulações ALG/CS e ALG/CS-GA₃, armazenadas sob refrigeração (4 °C), por 24 horas, estão apresentados na Figura 8, que ilustra o comportamento desses parâmetros neste intervalo.

Figura 8. Caracterização da estabilidade das partículas sob refrigeração (4 °C) por 24 horas. (A) diâmetro hidrodinâmico (B) índice de polidispersão (C) potencial zeta para as nanopartículas controle (ALG/CS) e com ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃).





No sistema controle, não foi observada diferença estatisticamente significativa no tamanho médio de partícula entre 0 e 24 horas (teste t não pareado, $t_4 = 1,571$; $p = 0,1914$), indicando estabilidade dimensional durante o período *overnight*. Em contraste, a formulação ativa apresentou aumento significativo do tamanho de partícula nesse mesmo intervalo, passando de 424,7 nm para 462,3 nm ($p < 0,0001$), o que sugere uma reorganização estrutural inicial do sistema na presença do ativo sob baixa temperatura.

Quanto ao índice de polidispersidade, observou-se aumento discreto, porém estatisticamente significativo, tanto no controle (de 0,3697 para 0,3860; $p = 0,0213$) quanto na formulação ativa (de 0,3710 para 0,3797; $p = 0,0314$) ao longo das primeiras 24 horas. Apesar da significância estatística, os valores de Pdl permaneceram inferiores a 0,4 em ambos os sistemas, indicando a manutenção de uma distribuição de tamanhos relativamente homogênea.

Em relação ao potencial zeta, verificou-se aumento significativo da magnitude (valor absoluto da carga) em ambos os sistemas após 24 horas. No controle, o potencial zeta passou de $-23,32$ mV para $-27,31$ mV ($p = 0,0002$), enquanto na formulação ativa a redução foi mais acentuada, de $-22,63$ mV para $-31,43$ mV ($p < 0,0001$).

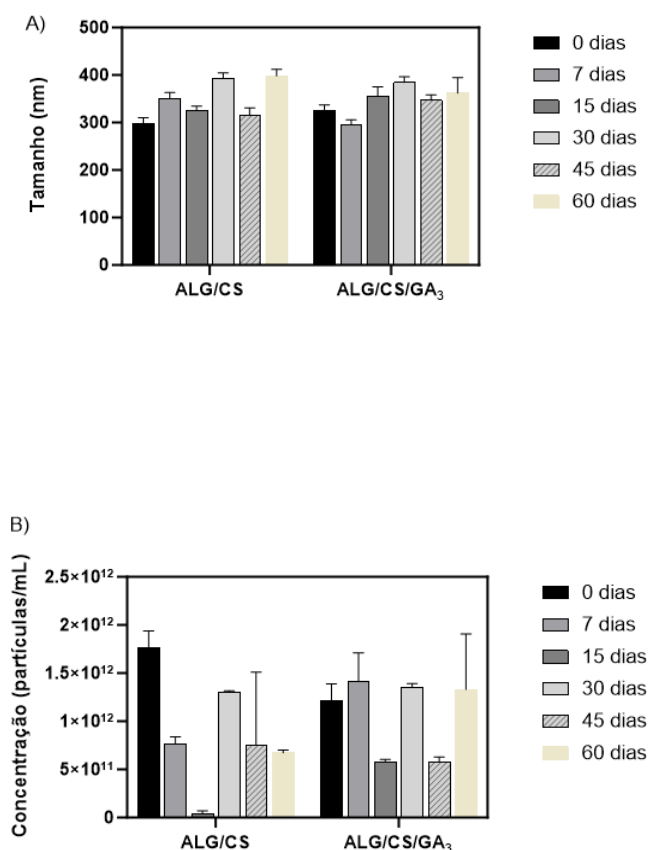
Esses resultados indicam excelente estabilidade físico-química do sistema sob refrigeração, uma vez que não ocorreram variações significativas no tamanho médio ou no Pdl, parâmetros diretamente relacionados à agregação de partículas, sugerindo que a baixa temperatura pode favorecer a compactação e o rearranjo das cadeias poliméricas na interface da nanopartícula.

5.3.2 Concentração e tamanho das nanopartículas

A caracterização do tamanho médio de partícula e da concentração de partículas foi realizada por Análise por Rastreamento de Nanopartículas (NTA), com o objetivo de avaliar a estabilidade físico-química das nanopartículas controle (ALG/CS) e daquelas contendo ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃) sob diferentes condições de armazenamento.

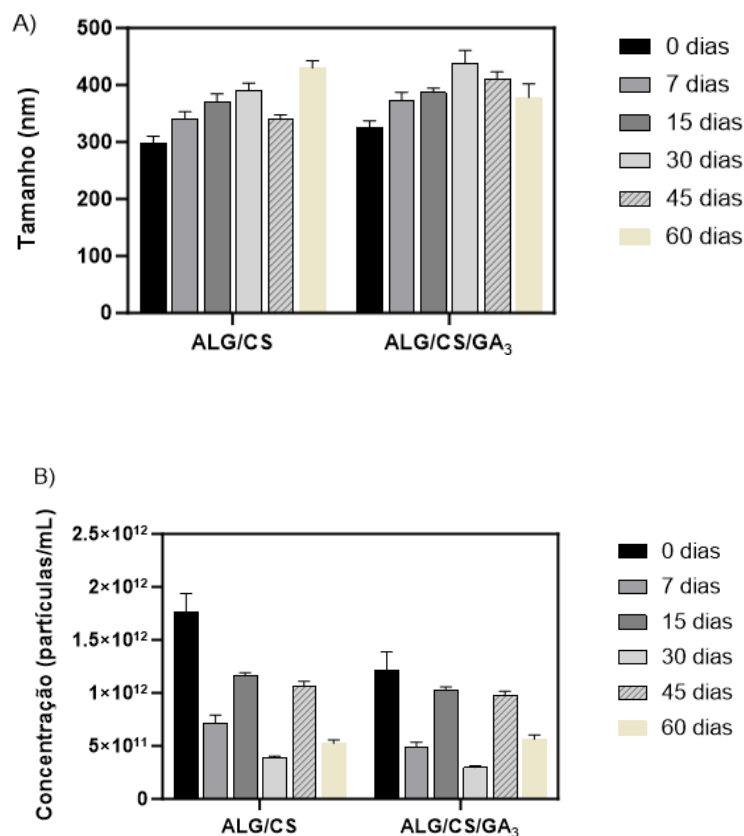
As amostras foram mantidas à temperatura ambiente (24 °C), em estufa (40 °C), bloco digestor (65 °C) e sob refrigeração (4 °C), de forma análoga às análises conduzidas por DLS. As medições foram realizadas nos tempos de 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias, permitindo o acompanhamento de possíveis alterações no tamanho médio das partículas e na concentração ao longo do tempo. Os dados completos obtidos por meio desta técnica podem ser consultados nos Apêndices J a L.

Figura 9. Caracterização das nanopartículas controle (ALG/CS) e contendo ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃) por Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) ao longo do armazenamento à temperatura ambiente (24 °C). (A) Diâmetro médio das partículas (nm) e (B) Concentração de partículas (partículas/mL) determinados nos tempos de 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão.



Conforme apresentado na Figura 9, as nanopartículas mantidas à temperatura ambiente apresentaram valores de diâmetro médio relativamente constantes ao longo do período de 60 dias, tanto para o sistema controle quanto para o sistema contendo GA₃. Esse resultado é particularmente relevante para a formulação ALG/CS-GA₃, pois demonstra que a presença do ativo não induz processos de precipitação ou degradação acelerada das partículas, mantendo a integridade do sistema coloidal por até dois meses.

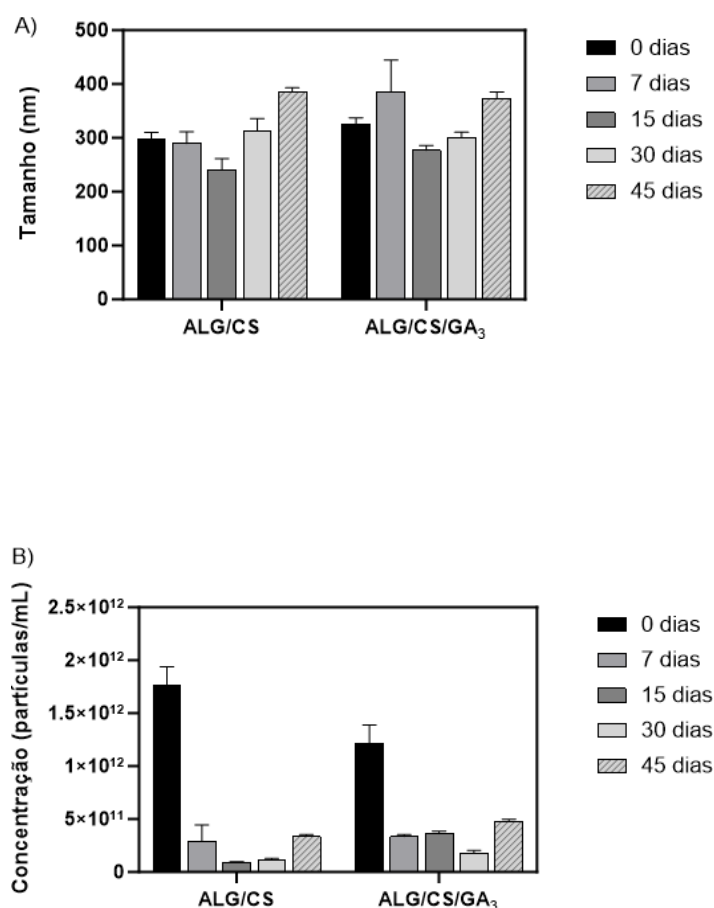
Figura 10. Caracterização das nanopartículas controle (ALG/CS) e contendo ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃) por Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) ao longo do armazenamento em estufa (40 °C). (A) Diâmetro médio das partículas (nm) e (B) Concentração de partículas (partículas/mL) determinados nos tempos de 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão.



Conforme apresentado na Figura 10, as nanopartículas mantidas em estufa (40 °C) apresentaram valores de diâmetro médio que mostraram variação ao longo do período de 60 dias, tanto para o sistema controle quanto para o sistema contendo GA₃. No gráfico de diâmetro (Figura 10A), observa-se uma tendência de aumento gradual no tamanho médio das partículas até os 30 dias, seguida de uma relativa estabilização ou leve oscilação nos tempos finais (45 e 60 dias). Esse comportamento sugere que a temperatura moderada de 40 °C promove uma reorganização estrutural das partículas. Em relação à

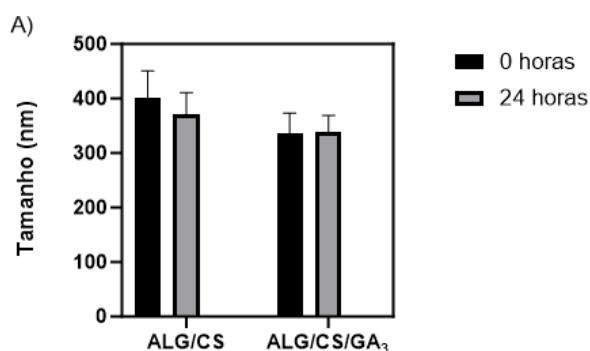
concentração de partículas (Figura 10B), nota-se uma redução em comparação ao tempo inicial (0 dias) para ambas as formulações. No sistema controle (ALG/CS), houve uma queda acentuada na contagem de partículas nos primeiros 7 dias, enquanto a formulação ativa (ALG/CS-GA₃) demonstrou uma redução mais progressiva. A diminuição da concentração concomitante ao aumento do diâmetro médio pode ser um indicativo de processos de agregação, onde partículas menores se unem para formar estruturas maiores.

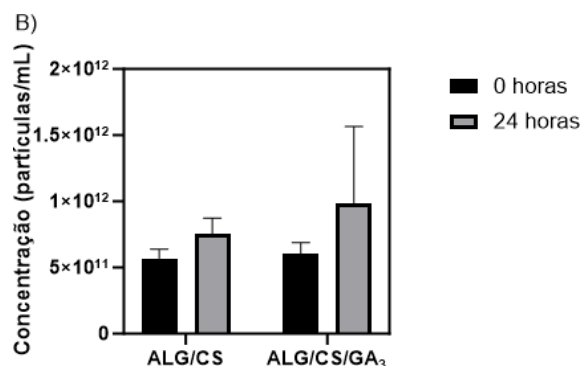
Figura 11. Caracterização das nanopartículas controle (ALG/CS) e contendo ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃) por Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) ao longo do armazenamento em bloco digestor (65°C). (A) Diâmetro médio das partículas (nm) e (B) Concentração de partículas (partículas/mL) determinados nos tempos de 0, 7, 15 e 30 dias. Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão.



Conforme apresentado na Figura 11, as nanopartículas mantidas em bloco digestor (65 °C) apresentaram valores de diâmetro médio com variações distintas entre os sistemas ao longo de 30 dias. No sistema controle (ALG/CS), observa-se uma tendência de redução do diâmetro médio nos tempos finais, o que pode estar associado à degradação térmica da matriz polimérica. Em contrapartida, o sistema contendo GA₃ manteve uma estabilidade dimensional superior nos primeiros 15 dias, apresentando oscilações apenas no período final. Em relação à concentração de partículas (Figura 11B), o estresse severo a 65 °C provocou uma redução acentuada na quantidade de partículas/mL para ambos os tratamentos logo após o sétimo dia.

Figura 12. Caracterização das nanopartículas controle (ALG/CS) e contendo ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃) por Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA) ao longo do armazenamento refrigerado (4 °C). (A) Diâmetro médio das partículas (nm) e (B) concentração de partículas (partículas/mL) determinados nos tempos de 0 e 24 horas. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão.





Conforme apresentado na Figura 12, as nanopartículas mantidas sob refrigeração (4 °C) apresentaram valores de diâmetro médio relativamente constantes ao longo do período de 24 horas, tanto para o sistema controle quanto para o sistema contendo GA₃.

Esses resultados indicam boa estabilidade físico-química do sistema sob refrigeração, uma vez que não ocorreram variações significativas no tamanho médio ou no Pdl, parâmetros que são indicadores de processos de agregação.

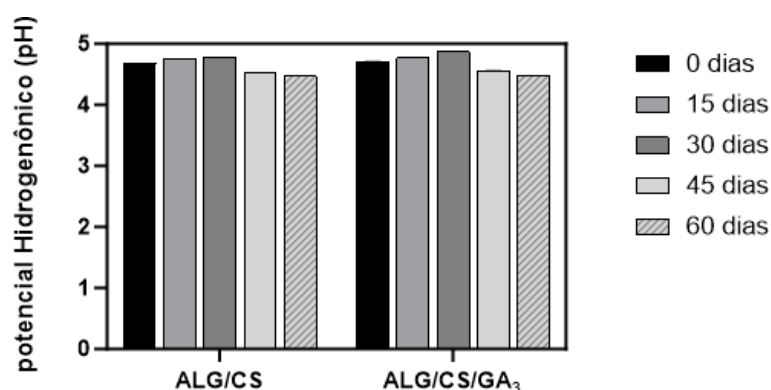
Comparando os resultados obtidos para as nanopartículas mantidas à temperatura ambiente, observou-se uma concentração de $1,76 \times 10^{12} \pm 1,79 \times 10^{11}$ partículas/mL para o tratamento controle e de $1,21 \times 10^{12} \pm 1,79 \times 10^{11}$ partículas/mL para o sistema ALG/CS-GA₃. Esses valores são superiores aos reportados por Pereira *et al.* (2017), que observaram uma concentração de $1,92 \times 10^{11}$ partículas/mL para nanopartículas ALG/CS (controle) e $1,52 \times 10^{11}$ partículas/mL para nanopartículas ALG/CS/GA₃.

5.3.3 Potencial hidrogeniônico (pH)

O monitoramento do potencial hidrogeniônico (pH) das formulações de nanopartículas foi realizado ao longo de 60 dias, com o objetivo de avaliar a estabilidade dos polímeros alginato de sódio e quitosana em temperatura

ambiente. Os resultados obtidos estão na Figura 13, que ilustra o comportamento desse parâmetro ao longo do tempo.

Figura 13. Variação do pH das formulações de nanopartículas de alginato de sódio/quitosana sem ativo (ALG/CS) e contendo ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃) durante 60 dias de armazenamento (0, 15, 30, 45 e 60 dias). Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão (n = 3).



A análise de variância unidimensional indicou efeito altamente significativo do tempo sobre o pH tanto no tratamento controle ($F(4,10) = 132,5$; $p < 0,0001$; $R^2 = 0,9815$) quanto na formulação ativa ($F(4,10) = 915,5$; $p < 0,0001$; $R^2 = 0,9973$), com homogeneidade de variâncias em ambos os casos (teste de Brown–Forsythe, $p > 0,05$).

No tratamento controle, observou-se aumento do pH entre o tempo inicial e 15–30 dias, seguido de redução significativa aos 45 e 60 dias, indicando mudança no comportamento do sistema ao longo do armazenamento. Já na formulação ativa, todas as comparações entre os tempos foram estatisticamente significativas, caracterizadas por um aumento progressivo do pH até 30 dias e posterior redução acentuada nos períodos finais.

De forma comparativa, embora ambos os sistemas apresentem padrão semelhante de variação temporal do pH, a formulação ativa exibiu alterações mais intensas, refletidas pelos maiores valores de F e R^2 . Esses resultados

sugerem que a presença do ativo intensifica as variações de pH, possivelmente devido a interações químicas ou reorganizações estruturais mais pronunciadas na matriz polimérica.

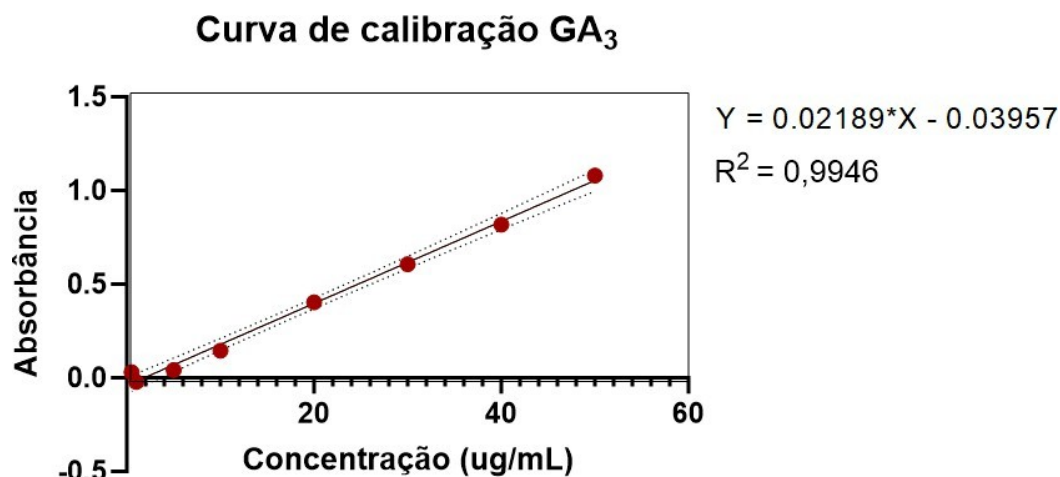
A média dos valores de pH nos períodos finais de armazenamento situaram-se em torno de 4,7 para os sistemas ALG/CS e ALG/CS-GA₃. Esses valores são semelhantes aos reportados por Pereira *et al.* (2017), que observaram pH médio de 4,9 para ambos os sistemas (ALG/CS e ALG/CS-GA₃).

5.3.4 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação é um parâmetro fundamental na caracterização de sistemas nanoparticulados, pois indica a capacidade da matriz polimérica em incorporar e reter o composto ativo em sua estrutura. Valores elevados de eficiência refletem uma maior estabilidade do sistema, sendo especialmente relevantes para aplicações que visam liberação controlada e proteção do ativo contra a degradação.

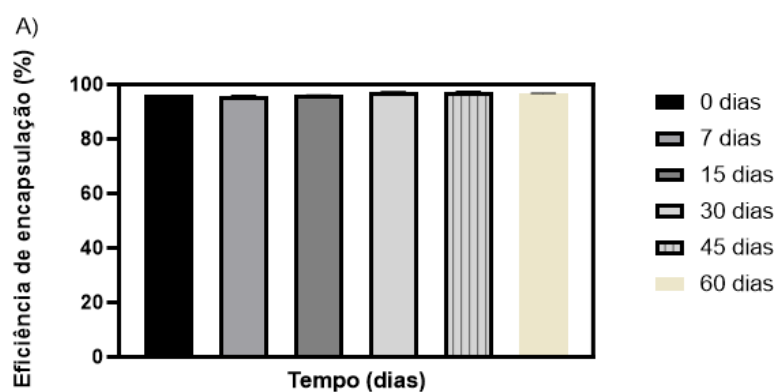
Neste contexto, a determinação da eficiência de encapsulação do ácido giberélico (GA₃) nas nanopartículas de alginato e quitosana foi realizada a partir da quantificação do ativo não encapsulado presente no sobrenadante. Para isso, foi previamente construída uma curva analítica do GA₃ por espectroscopia UV-visível, conforme apresentada na Figura 14.

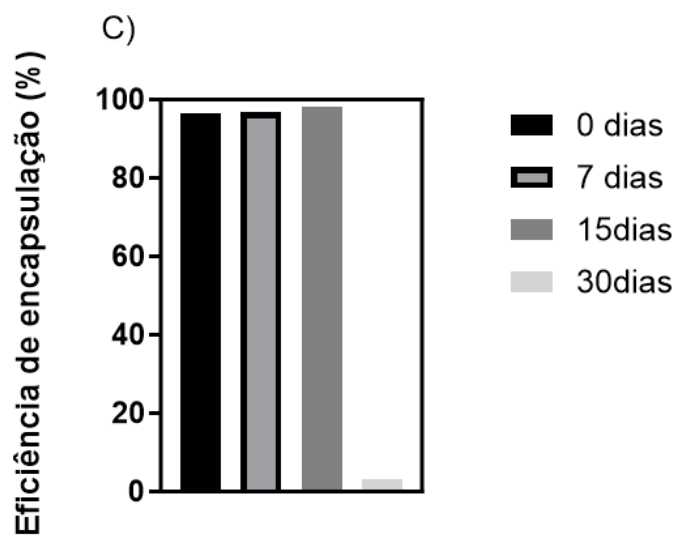
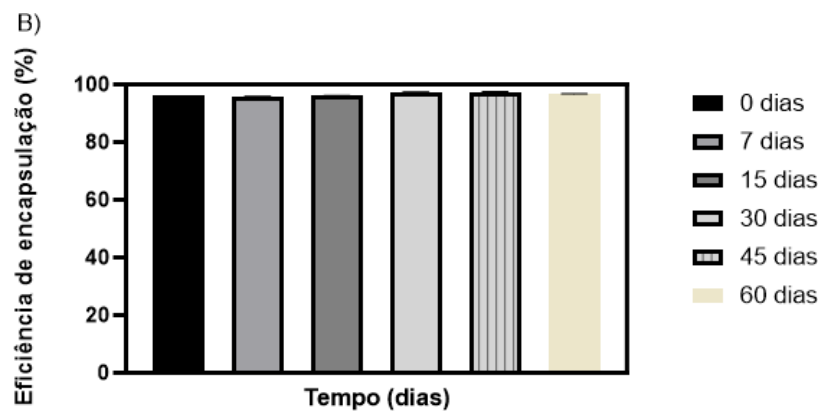
Figura 14. Curva analítica do ácido giberélico (GA₃), com a equação de regressão obtida e seu respectivo coeficiente de determinação (R^2).

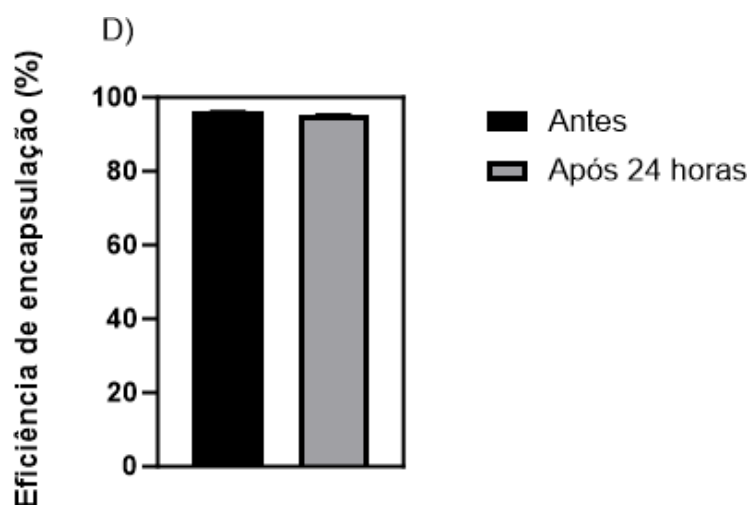


A curva apresentou linearidade conforme descrita pela equação média da reta $y = 0,02189x - 0,03957$ e coeficiente de determinação igual a 0,9946. A partir dessa curva, foi possível estimar a concentração de GA₃ livre nas amostras, permitindo o cálculo da eficiência de encapsulação do sistema ALG/CS-GA₃. Os dados completos obtidos podem ser consultados nos Apêndices B, D, F e H.

Figura 15. Eficiência de encapsulação da formulação nanoparticulada de ALG/CS-GA₃ monitorada durante o armazenamento em: (A) temperatura ambiente (60 dias), (B) estufa a 40 °C (60 dias), (C) bloco digestor a 65 °C (30 dias) e (D) refrigeração a 4 °C (24 horas).







De acordo com os resultados obtidos, as médias da eficiência de encapsulação (EE%) ao longo do tempo foram de 95,45% para temperatura ambiente, 96,56% para estufa (40 °C), 73,7% para bloco digestor (65 °C) e 95,85% para o armazenamento refrigerado (4 °C). Observa-se que a eficiência de encapsulação foi ligeiramente maior nas condições de 40 °C e 4 °C, quando comparadas à temperatura ambiente. E contrapartida, o bloco digestor (65 °C) apresentou a menor eficiência, indicando uma possível degradação do sistema encapsulante ou do próprio regulador vegetal sob temperaturas mais elevadas.

Ao comparar esses resultados com o estudo de Pereira *et al.* (2017), que reportou uma eficiência de encapsulação de 100%, os valores obtidos no presente trabalho ligeiramente inferiores, especialmente sob estresse térmico severo. No entanto, a manutenção de valores próximos a 95% na maioria das condições demonstra a robustez do método de gelificação ionotrópica utilizado.

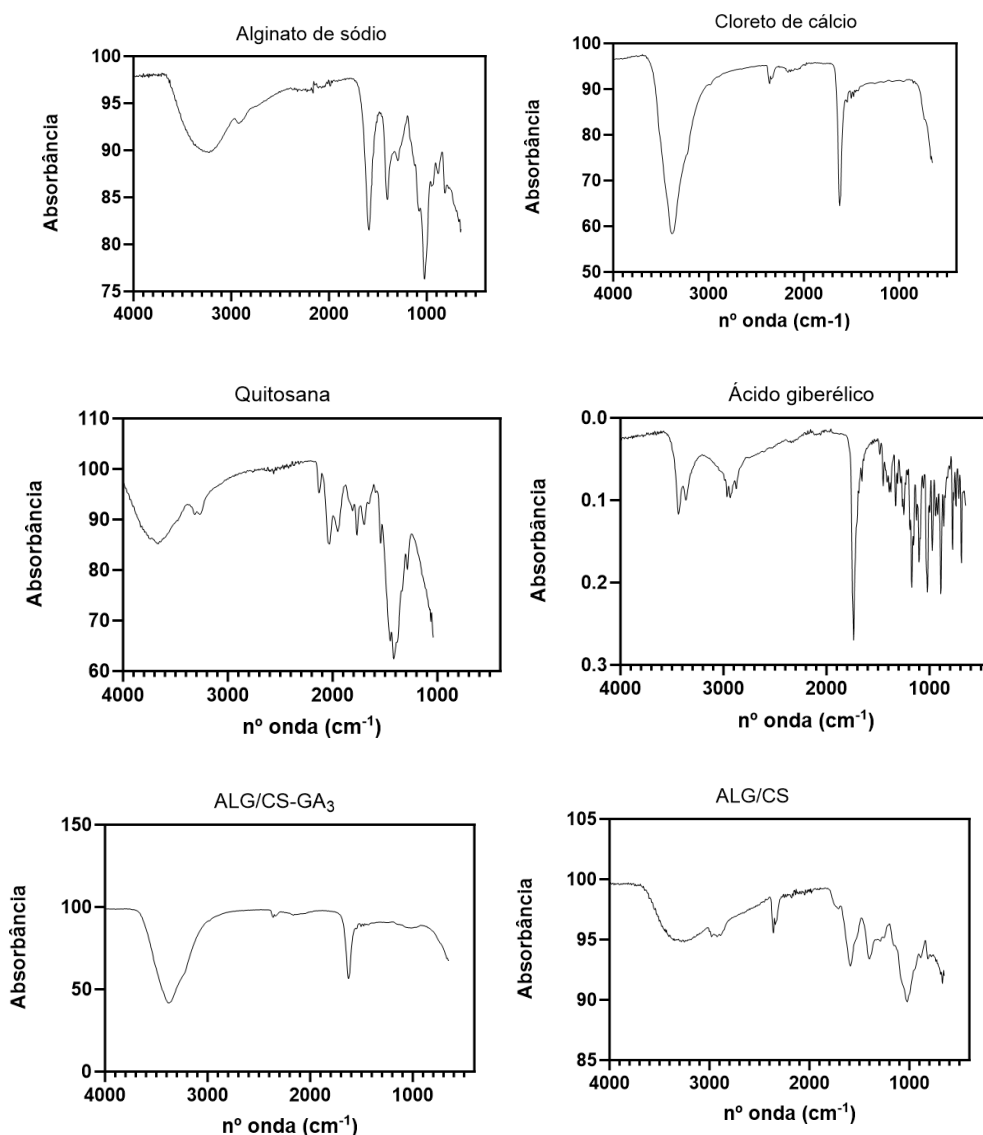
5.3.5 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi empregada com o objetivo de caracterizar os componentes do sistema, tais como alginato de sódio, quitosana, cloreto de cálcio e ácido giberélico, nanopartículas de alginato/quitosana (Np ALG/CS) e nanopartículas de

alginate/quitosana contendo GA₃ (Np ALG/CS-GA₃) e investigar possíveis interações entre eles. A análise dos espectros permitiu a identificação dos principais grupos funcionais presentes na solução de nanopartícula de ALG/CS/GA₃, bem como a avaliação de alterações nas bandas características, que podem indicar interações físicas ou químicas decorrentes do processo de formulação.

Dessa forma, os espectros obtidos foram comparados entre si a fim de verificar a manutenção da estrutura química dos componentes e a ocorrência de possíveis deslocamentos ou variações de intensidade das bandas, conforme pode ser visto na Figura 16.

Figura 16. Espectros de FTIR obtidos na faixa de 4000–1000 cm^{-1} do ácido giberélico (GA_3), alginato de sódio (ALG), cloreto de cálcio (CaCl_2), quitosana (CS), nanopartículas de alginato/quitosana (Np ALG/CS) e nanopartículas de alginato/quitosana contendo GA_3 (Np ALG/CS- GA_3).



Fonte: autora

A caracterização por FTIR das nanopartículas (Figura 16) confirmou a presença dos principais grupos funcionais dos polímeros constituintes e do ativo encapsulado. No espectro das NP ALG/CS (controle), as bandas em 1587 e 1401 cm^{-1} são atribuídas, respectivamente, aos estiramentos assimétrico e simétrico dos grupos carboxilato do alginato.

No espectro de FTIR da nanopartícula de alginato/quitosana (NP ALG/CS) controle, foram observadas bandas próximas a 1587 e 1401 cm^{-1} , além de uma banda larga na região entre 3250 e 3336 cm^{-1} , com intensidades variadas, e uma banda de baixa intensidade em torno de 1021 cm^{-1} .

De acordo com Lee e Mooney (2012), as bandas localizadas entre 1600 e 1410 cm^{-1} podem ser atribuídas às vibrações assimétrica e simétrica dos grupos carboxilato ($-\text{COO}^-$) do alginato de sódio, enquanto a banda larga em torno de 3300 cm^{-1} está associada ao estiramento dos grupos hidroxila ($-\text{OH}$). Para a quitosana, bandas nessa mesma região também estão relacionadas às vibrações dos grupos funcionais, além de uma banda larga próxima a 3300 cm^{-1} atribuída ao estiramento dos grupos hidroxila e amina ($-\text{OH}$ e $-\text{NH}$), conforme descrito por Rinaudo (2006).

O cloreto de cálcio, utilizado como agente de reticulação iônica, não apresenta bandas vibracionais intensas no espectro de FTIR. No entanto, sua presença pode ser inferida por alterações nas bandas associadas aos grupos carboxilato ($-\text{COO}^-$), decorrentes da formação de complexos entre o alginato e os íons Ca^{2+} , conforme relatado por Papageorgiou *et al.* (2010) e Lee e Mooney (2012).

O espectro de FTIR do ácido giberélico (GA_3) apresentou uma banda larga na região entre 3200 e 3400 cm^{-1} , atribuída ao estiramento dos grupos hidroxila ($-\text{OH}$), além de uma banda intensa em torno de 1700 cm^{-1} , correspondente ao estiramento do grupo carbonila ($\text{C}=\text{O}$) característico de ácidos carboxílicos. Bandas adicionais observadas entre 1050 e 1250 cm^{-1} estão associadas às vibrações $\text{C}-\text{O}$ da molécula, em concordância com dados descritos na literatura (Silverstein *et al.*, 2014).

Na nanopartícula contendo o ativo (ALG/CS/ GA_3), observou-se redução da intensidade da banda em torno de 1700 cm^{-1} , atribuída ao estiramento do grupo $\text{C}=\text{O}$ do ácido giberélico, quando comparada ao GA_3 livre. Além disso, foram observadas alterações nas bandas associadas aos grupos carboxilato e hidroxila da matriz polimérica.

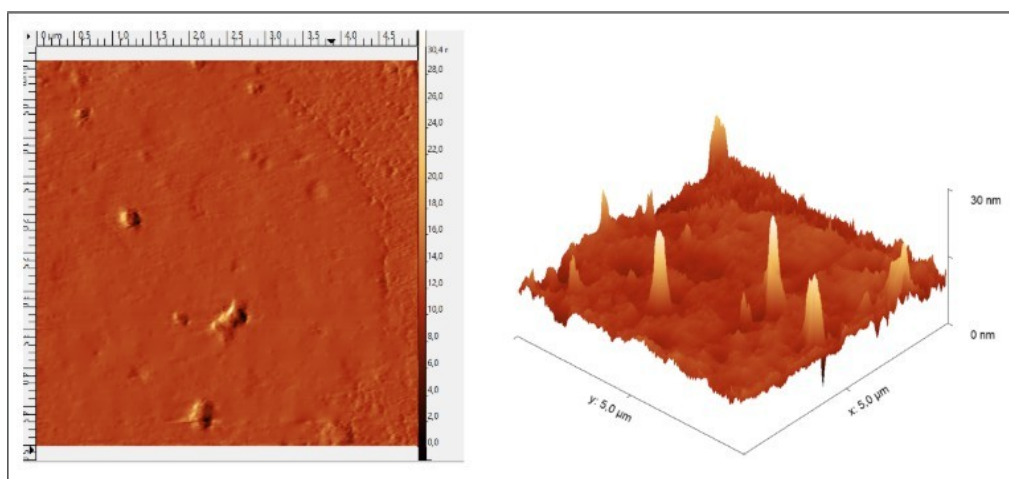
Portanto, os espectros de FTIR das nanopartículas controle e contendo GA_3 apresentaram bandas características do alginato e da quitosana, indicando a formação da matriz polimérica por interações eletrostáticas entre

os grupos carboxilato do alginato e os grupos amina da quitosana. A comparação entre os sistemas revelou que a incorporação do GA₃ também promoveu alterações espectrais, sem comprometer a estrutura da matriz, o que indica possivelmente o encapsulamento do ácido giberélico no sistema nanoparticulado.

5.3.6 Microscopia de Força Atômica (AFM)

As análises topográficas obtidas por microscopia de força atômica (AFM) foram realizadas com o objetivo de caracterizar a morfologia superficial e o tamanho das nanopartículas de alginato/quitosana contendo ácido giberélico (ALG/CS-GA₃). Essa técnica possibilita a visualização da topografia das partículas em escala nanométrica, fornecendo informações relevantes sobre a distribuição, a homogeneidade e a organização do sistema, conforme apresentado na Figura 17.

Figura 17. Imagens topográficas obtidas por microscopia de força atômica (AFM) das nanopartículas de alginato/quitosana contendo ácido giberélico (ALG/CS-GA₃), evidenciando a morfologia e a distribuição das partículas.



Ao comparar os valores de diâmetro obtidos por AFM, que apresentaram tamanho médio de $299,8 \pm 98,3$ nm (Figura 19), com aqueles determinados

pelas técnicas de DLS e NTA, observou-se que os resultados por AFM foram significativamente menores. Essa divergência de acordo com Rinaudo (2006) é comum em sistemas poliméricos, pode ser atribuída, primeiramente, ao estado de hidratação das partículas.

Enquanto no DLS e NTA as nanopartículas são medidas em suspensão, a análise de AFM é realizada após a deposição da amostra e evaporação do solvente. Esse processo de secagem causa o colapso da rede polimérica e a eliminação da camada de hidratação, resultando em dimensões reduzidas em comparação ao diâmetro hidrodinâmico.

Além do fator físico, essa diferença também está relacionada à representatividade estatística de cada técnica (Eaton *et al.*, 2017). O AFM baseia-se na avaliação de um número reduzido de partículas em uma área específica, ao passo que as técnicas de DLS e NTA utilizam populações significativamente maiores, oferecendo uma média baseada em bilhões de partículas em movimento browniano.

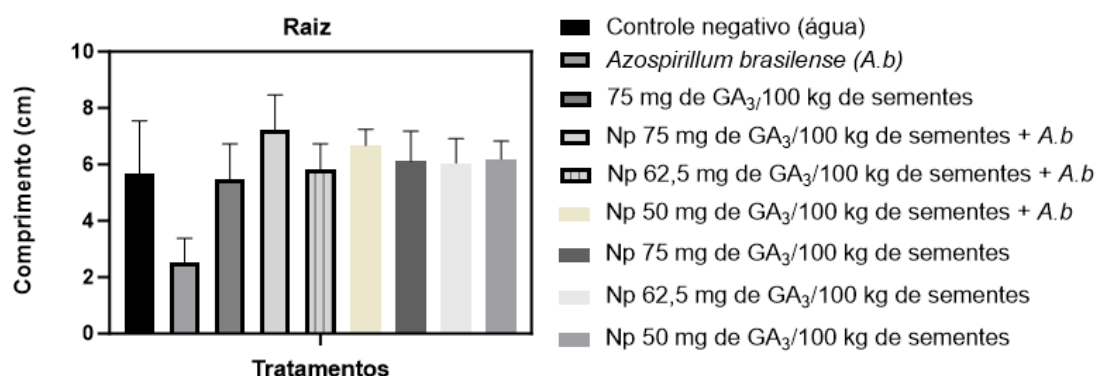
5.4 Germinação e desenvolvimento vegetal

Nesta etapa, são apresentados e discutidos os resultados obtidos a partir dos ensaios conduzidos com sementes de milho (*Zea mays L.*) tratadas de forma isolada e em combinação com GA₃, GA₃ encapsulado e inoculação de *A. brasilense* (hm053). As análises compreenderam ensaios de germinação e cultivo em vasos, visando à avaliação do desenvolvimento inicial e das respostas fisiológicas das plantas em função dos tratamentos realizados.

5.4.1 Ensaio de germinação

As análises nesta etapa visaram avaliar o desenvolvimento inicial e das respostas fisiológicas das plantas em função dos tratamentos realizados. As médias foram apresentadas com desvio padrão e os gráficos utilizaram erro padrão para representar a precisão da média. Os dados referentes ao comprimento de raiz das plântulas de milho germinadas estão apresentados na Figura 18. Os dados completos obtidos podem ser consultados no Apêndice M.

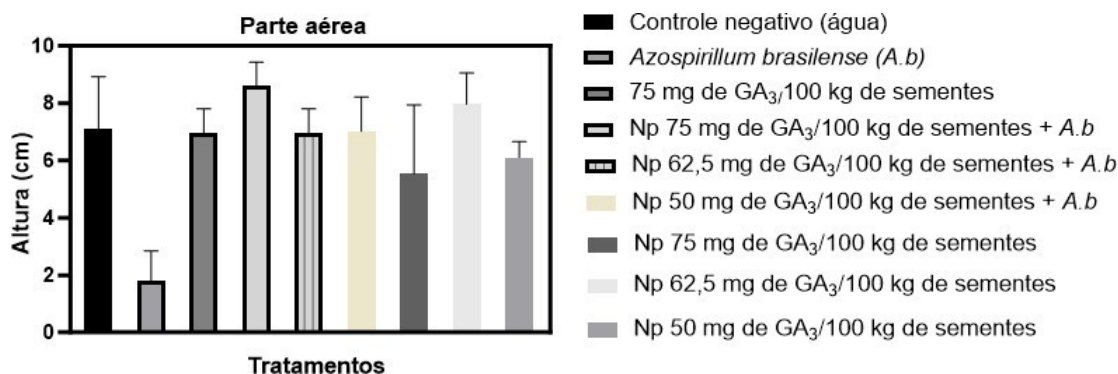
Figura 18. Comprimento de raiz de plântulas de milho germinadas em papel Germitest, oriundas de sementes tratadas com: água (controle negativo); *Azospirillum brasilense*; solução de GA₃ (75 mg/100 g de sementes); nanopartículas ALG/CS-GA₃ contendo 75, 62,5 ou 50 mg de GA₃/100 g de sementes associadas à inoculação com *A. brasilense*; e nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas mesmas concentrações, porém aplicadas na ausência de *A. brasilense*. Dados obtidos no teste de germinação em papel.



Conforme evidenciado na Figura 18, o tratamento com nanopartículas ALG/CS-GA₃ contendo 75 mg de GA₃ associadas a *A. brasilense* apresentou valores numericamente superiores de comprimento de raiz em relação ao controle negativo e demais tratamentos. Esse tratamento resultou na maior média de comprimento radicular entre os tratamentos avaliados, expressa como (7,20 ± 1,26 cm), indicando uma tendência de resposta positiva das plântulas à aplicação conjunta das nanopartículas e do microrganismo. Em contraste, o menor desenvolvimento radicular foi observado nas plântulas tratadas apenas com *A. brasilense*.

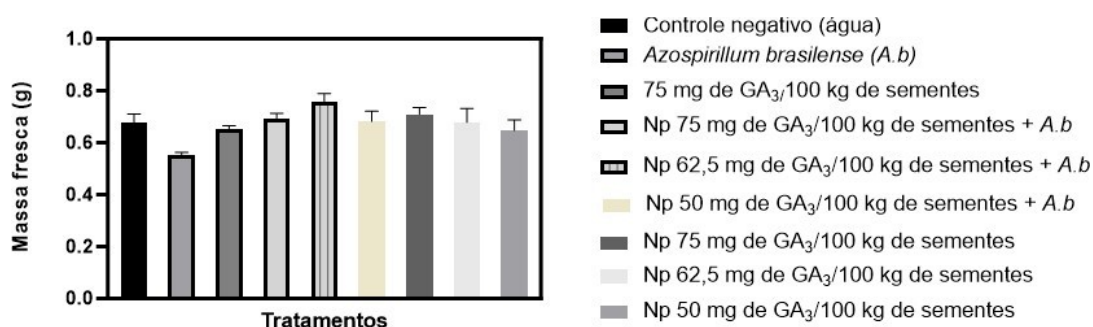
A Figura 18 ilustra visualmente o maior desenvolvimento radicular das plântulas submetidas ao tratamento com nanopartículas ALG/CS-GA₃ contendo 75 mg de GA₃ associadas a *A. brasilense*, bem como o menor comprimento de raiz observado nas plântulas tratadas apenas com *A. brasilense*.

Figura 19. Altura da parte aérea de plântulas de milho germinadas em papel Germitest, oriundas de sementes tratadas com: água (controle negativo); *Azospirillum brasilense*; solução de GA₃ (75 mg/100 g de sementes); nanopartículas ALG/CS-GA₃ contendo 75, 62,5 ou 50 mg de GA₃/100 g de sementes associadas à inoculação com *A. brasilense*; e nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas mesmas concentrações, porém aplicadas na ausência de *A. brasilense*. Dados obtidos no teste de germinação em papel.



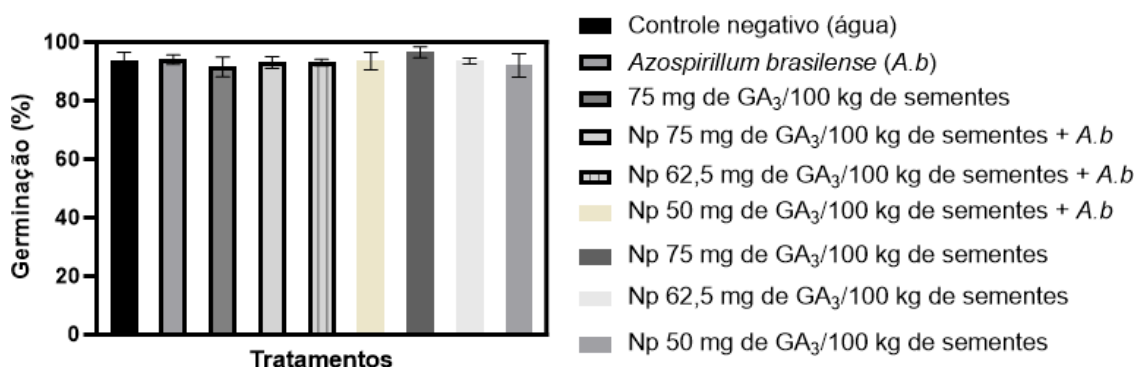
Em relação à altura da parte aérea (Figura 19), o tratamento com nanopartículas ALG/CS-GA₃ (75 mg de GA₃) associadas a *A. brasilense* apresentou valores numericamente superiores de altura de parte aérea em relação ao controle negativo (água) e demais tratamentos. Esse tratamento resultou na maior média de altura de parte aérea entre os tratamentos avaliados, expressa como (8,62 ± 0,81 cm), indicando uma tendência de resposta positiva das plântulas à aplicação conjunta das nanopartículas e do microrganismo, da mesma forma como foi observado no comprimento da raiz.

Figura 20. Massa fresca de plântulas de milho germinadas em papel Germitest, oriundas de sementes tratadas com: água (controle negativo); *Azospirillum brasilense*; solução de GA₃ (75 mg/100 g de sementes); nanopartículas ALG/CS-GA₃ contendo 75, 62,5 ou 50 mg de GA₃/100 g de sementes associadas à inoculação com *A. brasilense*; e nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas mesmas concentrações, porém aplicadas na ausência de *A. brasilense*. Dados obtidos no teste de germinação em papel.



Para a massa fresca (Figura 20), a formulação ALG/CS-GA₃ com 62,5 mg de GA₃ associadas a *A. brasilense* obteve o valor numericamente superior (0,7582 + 0,0317), sugerindo que concentrações intermediárias do regulador vegetal, quando nanoparticuladas, já são suficientes para promover incrementos significativos de biomassa.

Figura 21. Dados da taxa de germinação, em papel Germitest, de sementes tratadas com: água (controle negativo); *Azospirillum brasilense*; solução de GA₃ (75 mg/100 g de sementes); nanopartículas ALG/CS-GA₃ contendo 75, 62,5 ou 50 mg de GA₃/100 g de sementes associadas ou não à inoculação com *A. brasilense*.



A análise de variância mostrou que os tratamentos influenciaram significativamente a massa fresca, a altura da parte aérea e o comprimento da raiz ($p < 0,05$). Para a germinação (Figura 21), no entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$).

Os resultados indicam que a aplicação isolada de *Azospirillum brasilense* não favoreceu o desenvolvimento inicial das plântulas sob as condições de laboratório testadas, apresentando os menores valores de crescimento e diferindo significativamente do controle e dos tratamentos com GA₃ pelo teste de Tukey. Por outro lado, a presença de GA₃ foi o fator determinante para o vigor das plântulas, independentemente da forma de aplicação.

A ausência de efeito significativo na taxa de germinação sugere que as formulações não exerceram efeito fitotóxico, resultando em taxas de germinação semelhantes entre os grupos avaliados. Esse comportamento sugere que os tratamentos não exerceram efeito fitotóxico na fase inicial do processo germinativo. Em contraste, as respostas observadas concentraram-se predominantemente no desenvolvimento pós-germinativo das plântulas, indicando que os efeitos das formulações manifestam-se principalmente após a emergência, possivelmente associados à modulação do crescimento e à alongação celular, e não à germinação em si. De acordo com Fregonezi, *et al.* (2024), nanopartículas à base de alginato e quitosana contendo ácido giberélico promovem a liberação controlada, favorecendo a planta após a germinação, como no crescimento do sistema radicular e da parte aérea das

plântulas, principalmente, no crescimento do sistema radicular e da parte aérea das plântulas, sem promover alterações significativas na porcentagem de germinação. Dessa forma, nossos achados reforçam que os efeitos das formulações estão associados à modulação do crescimento das plântulas após a germinação, e não à interferência nos processos iniciais de germinação.

5.4.2 Desenvolvimento vegetal das plantas de milho

A avaliação do desenvolvimento vegetal das plantas de milho (*Zea mays* L.) foi realizada com o objetivo de investigar os efeitos dos diferentes tratamentos aplicados às sementes sobre o crescimento inicial em vasos com substrato comercial. Foram avaliados parâmetros como o comprimento da raiz, a altura da parte aérea, a massa fresca (da raiz e parte aérea), indicadores fundamentais do vigor e do desempenho fisiológico das plântulas. Os dados completos podem ser consultados no Apêndice N.

Figura 22. Comprimento da raiz de plântulas de milho cultivadas em vasos com substrato comercial, provenientes de sementes tratadas com: controle negativo(água); *Azospirillum brasilense*; solução de GA₃ (75 mg/100 g de sementes); nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas concentrações de 75, 62,5 e 50 mg de GA₃/100 g de sementes, todas com *A. brasilense*; e nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas mesmas concentrações, porém sem *A. brasilense*.

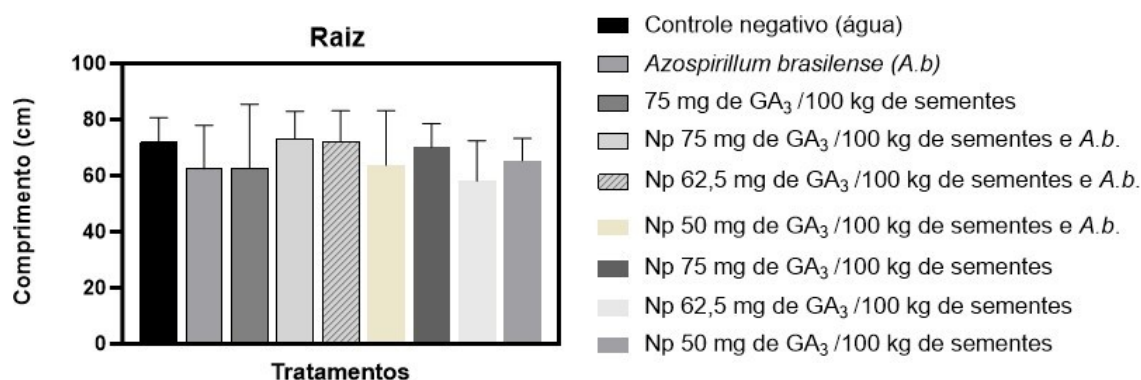
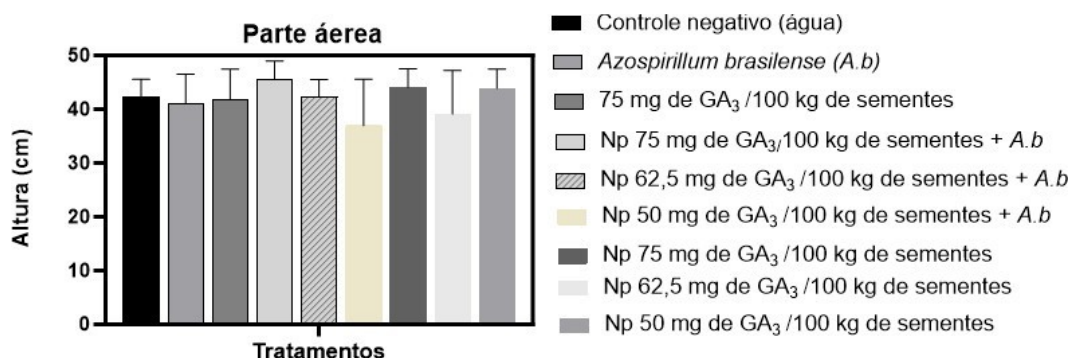


Figura 23. Altura da parte aérea de plântulas de milho cultivadas em vasos com substrato comercial, provenientes de sementes tratadas com: controle negativo (água); *Azospirillum brasilense*; solução de GA₃ (75 mg/100 g de sementes); nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas concentrações de 75, 62,5 e 50 mg de GA₃/100 g de sementes, todas com *A. brasilense*; e nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas mesmas concentrações, porém sem *A. brasilense*.



Para a altura da parte aérea, os valores médios variaram de $37,0 \pm 8,7$ cm (nanopartículas contendo 50 mg de GA₃ + a *A. brasilense*), a $45,6 \pm 3,4$ cm (nanopartículas contendo 75 mg de GA₃ associadas a *A. brasilense*). O controle negativo e os tratamentos contendo GA₃, isolado ou associado, apresentaram valores intermediários e próximos entre si. Em relação ao comprimento da raiz, os valores variaram de $58,1 \pm 14,4$ cm (nanopartículas contendo 62,5 mg de GA₃ aplicadas isoladamente), a $73,1 \pm 9,8$ cm (nanopartículas contendo 75 mg de GA₃ associadas a *A. brasilense*). De modo geral, as diferenças foram mais evidentes no sistema radicular do que na parte aérea.

Figura 24. Massa fresca da raiz de plântulas de milho cultivadas em vasos com substrato comercial, provenientes de sementes tratadas com: (1) água (controle negativo); (2) *Azospirillum brasilense*; (3) solução de GA₃ (75 mg/100 g de sementes); (4–6) nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas concentrações de 75, 62,5 e 50 mg de GA₃/100 g de sementes, todas com *A. brasilense*; e (7–9) nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas mesmas concentrações, porém sem *A. brasilense*.

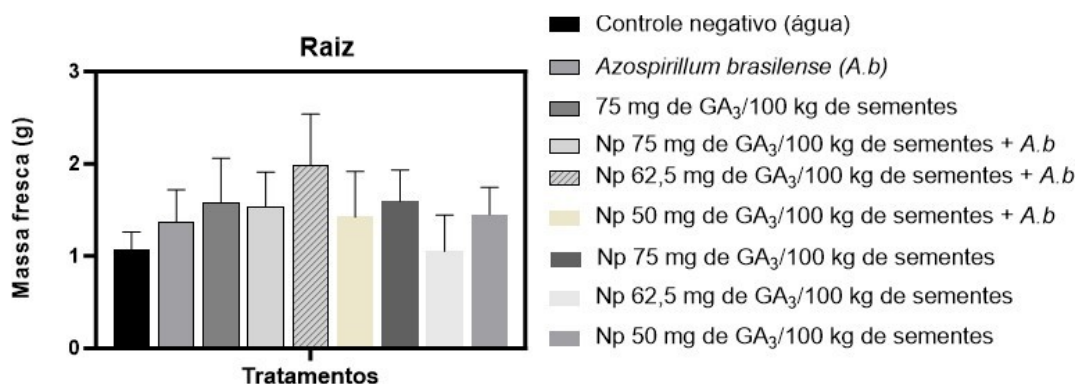
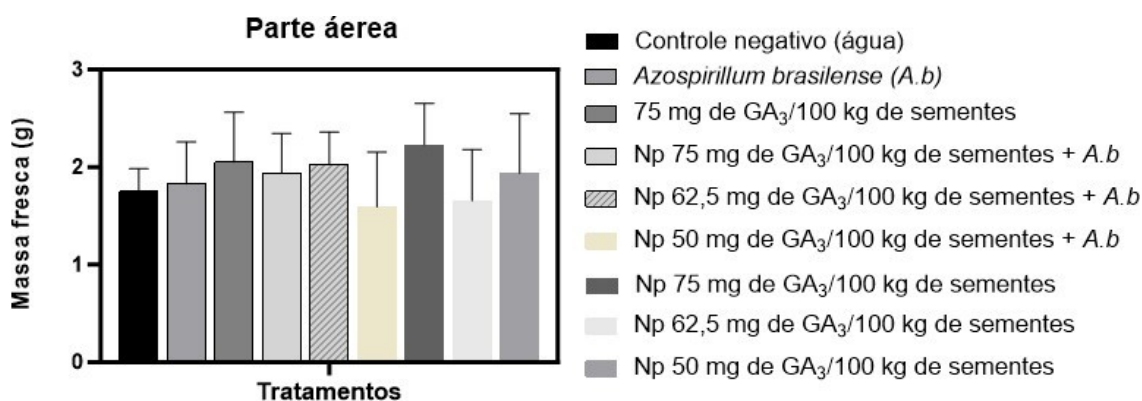


Figura 25. Massa fresca da parte aérea de plântulas de milho cultivadas em vasos com substrato comercial, provenientes de sementes tratadas com: (1) água (controle negativo); (2) *Azospirillum brasilense*; (3) solução de GA₃ (75 mg/100 g de sementes); (4–6) nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas concentrações de 75, 62,5 e 50 mg de GA₃/100 g de sementes, todas com *A. brasilense*; e (7–9) nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas mesmas concentrações, porém sem *A. brasilense*.



Para a massa fresca da parte aérea, as médias situaram-se entre 1,5912 (tratamento com nanopartículas contendo 50 mg de GA₃ associadas a *A. brasilense*) a 2,2286 (nanopartículas contendo 75 mg de GA₃ aplicadas isoladamente). Já a massa fresca da raiz, os valores médios variaram de 1,0510 (nanopartículas contendo 62,5 mg de GA₃ aplicadas isoladamente), a

1,9793 (nanopartículas contendo 62,5 mg de GA₃ associadas a *A. brasilense*). Os tratamentos contendo GA₃, isolado ou em associação com *A. brasilense*, tenderam a apresentar maiores valores de massa fresca da raiz quando comparados ao controle negativo e ao tratamento com *A. brasilense* aplicado isoladamente.

Figura 26. Massa seca da raiz de plântulas de milho cultivadas em vasos com substrato comercial, provenientes de sementes tratadas com: (1) água (controle negativo); (2) *Azospirillum brasilense*; (3) solução de GA₃ (75 mg/100 g de sementes); (4–6) nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas concentrações de 75, 62,5 e 50 mg de GA₃/100 g de sementes, todas com *A. brasilense*; e (7–9) nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas mesmas concentrações, porém sem *A. brasilense*.

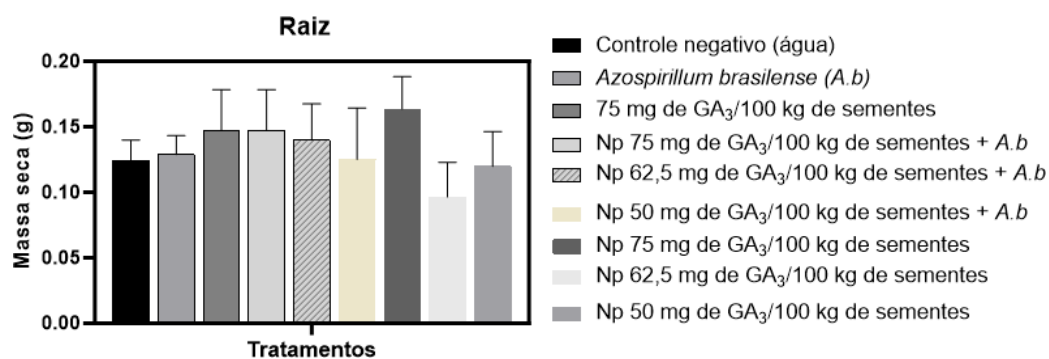
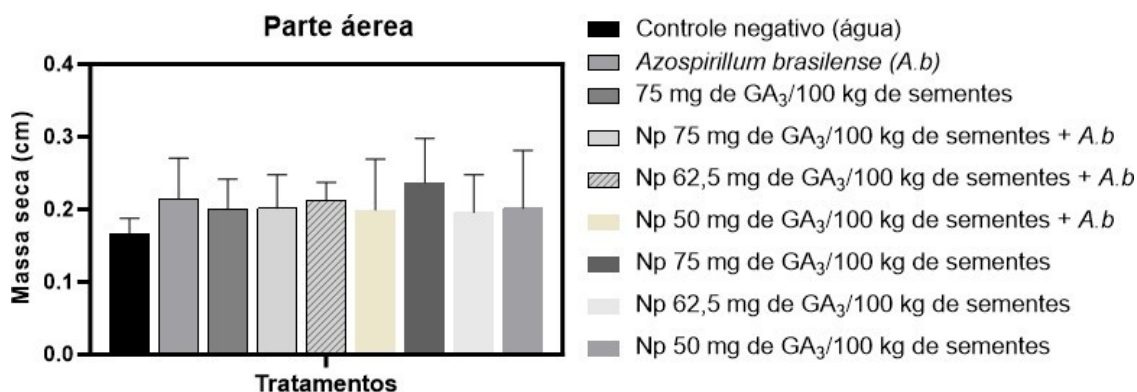


Figura 27. Massa seca da parte aérea de plântulas de milho cultivadas em vasos com substrato comercial, provenientes de sementes tratadas com: (1) água (controle negativo); (2) *Azospirillum brasilense*; (3) solução de GA₃ (75 mg/100 g de sementes); (4–6) nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas concentrações de 75, 62,5 e 50 mg de GA₃/100 g de sementes, todas com *A. brasilense*; e (7–9) nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas mesmas concentrações, porém sem *A. brasilense*.



Para a massa seca da parte aérea, os valores médios variaram de $0,1660 \pm 0,0214$ g, no tratamento com *Azospirillum brasilense* isolado, a $0,2396 \pm 0,0611$ g, no tratamento com nanopartículas contendo 75 mg de GA₃ aplicadas isoladamente. Os tratamentos contendo GA₃, isolado ou em associação com *A. brasilense*, apresentaram valores médios superiores ao controle negativo e ao tratamento com *A. brasilense* isolado, mas com pouca variação entre si.

Em relação à massa seca da raiz, os valores médios variaram de $0,0956 \pm 0,0264$ g, observados no tratamento com nanopartículas contendo 50 mg de GA₃ aplicadas isoladamente, a $0,1472 \pm 0,0332$ g, no tratamento com nanopartículas contendo 75 mg de GA₃ associadas a *A. brasilense*. Assim como observado para a parte aérea, os tratamentos com GA₃ (tanto isolados quanto combinados com *A. brasilense*), apresentaram valores médios mais elevados quando comparados ao controle negativo.

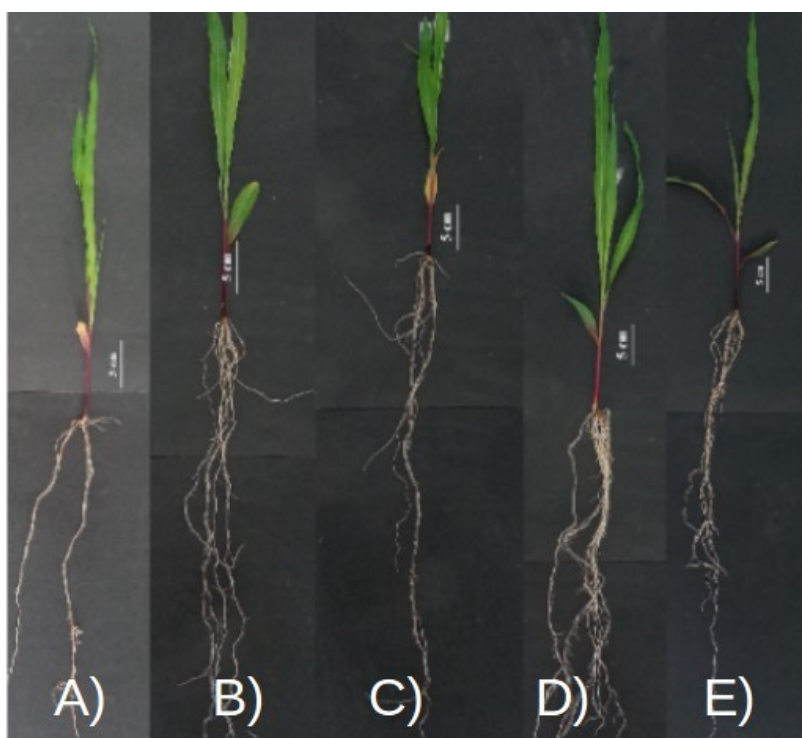
De maneira geral, os dados indicam variação na massa seca das plântulas em função dos tratamentos aplicados, com as diferenças mais expressivas observadas para a parte aérea, embora os tratamentos com GA₃, isolado ou combinado, mostrem-se consistentemente superiores aos outros.

A ANOVA não indicou efeito significativo dos tratamentos sobre o comprimento da raiz, a altura da parte aérea, a massa fresca da parte aérea e a massa seca da parte aérea ($p > 0,05$), sendo que os baixos valores de R² indicaram reduzida explicação da variabilidade pelos tratamentos. As premissas de homogeneidade de variâncias foram atendidas, e o teste de

Tukey não identificou diferenças significativas entre os tratamentos para essas variáveis.

Na Figura 28 são apresentados os aspectos visuais das plântulas de milho oriundas de sementes submetidas aos diferentes tratamentos aplicados, evidenciando diferenças no desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea durante a fase inicial de crescimento.

Figura 28. Aspecto visual das plântulas de milho submetidas aos diferentes tratamentos aplicados às sementes: **(A)** controle negativo (água); **(B)** *Azospirillum brasilense*; **(C)** GA₃ (75 mg de GA₃/100 kg de sementes); **(D)** nanopartículas ALG/CS-GA₃ (75 mg de GA₃/100 kg de sementes); **(E)** nanopartículas ALG/CS-GA₃ (75 mg de GA₃/100 kg de sementes) associadas a *Azospirillum brasilense*.



Observa-se que as plântulas do tratamento controle (A) apresentaram desenvolvimento radicular e da parte aérea menos expressivos em comparação aos demais tratamentos. As sementes tratadas isoladamente com *Azospirillum brasilense* (B) exibiram maior alongamento do sistema radicular, com um incremento no número de raízes laterais em relação ao controle.

O tratamento com ácido giberélico livre (C) promoveu incremento notável no crescimento da parte aérea, enquanto o uso de nanopartículas ALG/CS-GA

(D) resultou em plântulas com sistema radicular mais desenvolvido e melhor equilíbrio entre raiz e parte aérea.

De forma geral, o tratamento que associou nanopartículas ALG/CS-GA a *Azospirillum brasilense* (E) apresentou plântulas visualmente mais vigorosas, com maior comprimento radicular e maior densidade de raízes secundárias, quando comparado aos demais tratamentos, sugerindo um efeito sinérgico positivo entre a liberação controlada do hormônio e a atividade biológica do inoculante.

6. CONCLUSÃO

A caracterização físico-química das nanopartículas confirmou a obtenção de um sistema estável, assegurando a confiabilidade do material empregado nos ensaios biológicos. A partir dessa base, os tratamentos avaliados demonstraram efeitos positivos sobre o crescimento inicial das plântulas de milho, evidenciando que as respostas observadas estão associadas principalmente ao desenvolvimento após o estágio inicial de germinação, sem prejuízo à germinação das sementes.

Os resultados indicaram que os tratamentos contendo ácido giberélico (GA_3), tanto na forma isolada quanto encapsulado em nanopartículas de alginato e quitosana, promoveram incrementos significativos no crescimento radicular e da parte aérea, bem como no acúmulo de biomassa fresca e seca das plântulas. O tratamento com 75 mg de GA_3 e *Azospirillum brasilense* apresentou os maiores valores de altura da parte aérea e raiz.

A associação entre GA_3 e *A. brasilense*, especialmente na maior concentração avaliada, apresentou desempenho consistente e plântulas visualmente mais vigorosas, sugerindo uma interação positiva entre o regulador vegetal e o microrganismo. Esses resultados reforçam o papel central do ácido giberélico na modulação do crescimento inicial das plântulas, independentemente da forma de aplicação.

De modo geral, a encapsulação do regulador vegetal em nanopartículas mostrou-se uma estratégia promissora para o manejo fisiológico de sementes de milho, ao permitir a promoção do crescimento inicial sem comprometer a germinação. Sob uma perspectiva futura, esses achados abrem caminho para o desenvolvimento de tecnologias mais eficientes e sustentáveis de tratamento de sementes, bem como para estudos adicionais que explorem os mecanismos de liberação, interação planta–microrganismo e o desempenho dessas formulações em condições de campo.

REFERÊNCIAS

ABDELKADER, R. S. The role of agriculture in economic development. **Journal of Development Economics**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 100-115, 2005. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/237465723_The_role_of_agriculture_in_economic_development. Acesso em: 22 abr. 2024.

ADAL, Yimam Mekonen. The impact of beneficial microorganisms on soil vitality: a review. **Frontiers in Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 45-53, 2024. DOI: <https://doi.org/10.11648/j.fem.20241002.12>. Disponível em: <https://www.sciencepublishinggroup.com/article/10.11648/j.fem.20241002.12>. Acesso em: 20 jan. 2024.

ANDRADE, Solange Rocha Monteiro de; CHAGAS, Jorge Henrique. **Uso de *Azospirillum brasilense* na cultura do trigo**. Planaltina, DF: Embrapa, 2022. 27p. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1147512/1/Solange-Doc-394.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2024.

BACKER, R. *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 9, p. 1-17, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.01473/full>. Acesso em: 22 jun. 2025.

BASHAN, Y. Interactions of *Azospirillum* spp. in soils: a review. **Biology and Fertility of Soils**, [S. l.], v. 29, p. 246-256, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1007/s003740050549>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s003740050549>. link de acesso. Acesso em: 22 jun. 2025.

BASHAN, Yoav; DE-BASHAN, Luz E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. In: SPARKS, Donald L. (ed.). **Advances in Agronomy**. [S. l.]: Elsevier, 2010. v. 108, p. 77-136. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)08002-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08002-8). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065211310080028>. Acesso em: 26 abr. 2025.

BERG, G. *et al.* Definição de microbioma revisitada: conceitos antigos e novos desafios. **Microbiome**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1-22, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>. Disponível em: <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-020-00875-0>. Acesso em: 22 set. 2025.

BOSE, S. K. *et al.* Effect of gibberellic acid and calliterpenone on plant growth attributes, trichomes, essential oil biosynthesis and pathway gene expression in differential manner in *Mentha arvensis* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, [S. l.], v. 66, p. 150-158, maio 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.02.011>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S098194281300062X>. Acesso em: 01 out. 2025.

BRASIL. [Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento]. Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020. Institui o Programa Nacional de Bioinsumos e o Conselho Estratégico do Programa Nacional de Bioinsumos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p. 105-106, 27 maio 2020. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/decreto-n-10.375-de-26-de-maio-de-2020-258708176>. Acesso em: 01 abr. 2025.

CAMPOS, E. V. R. *et al.* Encapsulated plant growth regulators and associative microorganisms: nature-based solutions to mitigate the effects of climate change on plants. **Plant Science**, [S. l.], v. 331, jun. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111681>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016894522300088X>. Acesso em: 22 junh. 2025.

CAMPOS-ESPINOZA, Felipe; CASTAÑO-AGUDELO, Johanna; RODRIGUEZ-LLAMAZARES, Saddys. Polysaccharides systems for probiotic bacteria microencapsulation: mini review. **Food Science and Technology**, [S. l.], v. 42, p. 1-17, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.95121>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/X8q9f6zL7fXv9zL/>. Acesso em: 25 abr. 2025.

CASTELO, Raquel Menezes; SILVA, Luana Carvalho da; FURTADO, Roselayne Ferro. Geleificação iônica: técnica eficaz para encapsulamento de compostos ativos — uma revisão. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 18, n. 1, p. 1-12, set. 2020. Disponível em: <http://periodicos.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/view/6220>. Acesso em: 22 junh. 2025.

CASTRO, P. R. E.; VIEIRA, E. L. **Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical**. Guaíba: Agropecuária, 2001. 131 p.

CAVALCANTE, F. G. *et al.* Grupos Funcionais do Solo: papel das comunidades microbianas especializadas na ciclagem de nutrientes e sensores de distúrbios ambientais. **Cuadernos de Educación y Desarrollo**, [S. l.], v. 15, n. 9, p. 8676-8698, 2023. DOI: <https://doi.org/10.55905/cuadv15n9-019>. Disponível em: <https://ojs.cuadernosdeeducacion.com/ojs/index.php/ced/article/view/1715>.

Acesso em: 22 jun. 2025.

CHAMPAGNE, Charles P.; FUSTIER, Pascal. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Current Opinion in Biotechnology**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 184-190, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.03.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095816690700039X>. Acesso em: 21 set. 2025.

CHEN, J.; PANG, X. Phytohormones unlocking their potential role in tolerance of vegetable crops under drought and salinity stresses. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 14, p. 1-18, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1121780>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2023.1121780/full>. Acesso em: 05 abr. 2025.

COMUNIAN, T. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review. **Food Hydrocolloids**, Cambridge, v. 61, p. 442–457, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.06.014>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X1630248X>. Acesso em: 05 abr. 2025.

DAR, T. A. *et al.* Cumulative effect of gibberellic acid and phosphorus on crop productivity, biochemical activities and trigonelline production in *Trigonella foenum-graecum* L. **Cogent Food & Agriculture**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 995950, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1080/23311932.2014.995950>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23311932.2014.995950>. Acesso em: 22 abr. 2025.

DIAS, J. P. T. **Usos e aplicações de reguladores vegetais**. Belo Horizonte: Editora da Universidade do Estado de Minas Gerais, 2020. Disponível em: <https://educapes.capes.gov.br/handle/capes/585803>. Acesso em: 29 abr. 2025.

EGAMBERDIEVA, D. *et al.* Salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria for enhancing crop productivity of saline soils. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 10, p. 1-19, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02791>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02791/full>. Acesso em: 12 abr. 2025.

ERENSTEIN, O. *et al.* Global maize production, consumption and trade: trends and R&D implications. **Food Security**, [S. l.], v. 14, n. 5, p. 1295–1319, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12571-022-01288-7>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12571-022-01288-7>. Acesso em: 22 jun. 2025.

FRACETO, L. F. *et al.* Nanotechnology in Agriculture: which innovation potential does it have?. **Frontiers in Environmental Science**, [S. l.], v. 4, p. 1-5, 22 mar. 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fenvs.2016.00020>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/environmental-science/articles/10.3389/fenvs.2016.00020/full>. Acesso em: 22 jun. 2025.

FREGONEZI, B. F. *et al.* Seed Priming with Nanoencapsulated Gibberellic Acid Triggers Beneficial Morphophysiological and Biochemical Responses of Tomato Plants under Different Water Conditions. **Agronomy**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 1-22, 14 mar. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy14030588>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4395/14/3/588>. Acesso em: 22 jun. 2025.

FUKAMI, J. *et al.* Revealing different strategies of quorum sensing in *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6. **Archives of Microbiology**, [S. l.], v. 200, n. 1, p. 47-56, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1422-x>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00203-017-1422-x>. Acesso em: 22 jun. 2025.

GRISA, C.; PORTO, S. I. Políticas alimentares e referenciais setoriais na trajetória brasileira. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, [S. l.], v. 61, n. 3, p. 1-20, mar. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1590/1806-9479.2022.259390pt>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/resr/a/6R8mX7L4kZ8k8Y7/>. Acesso em: 22 abr. 2026.

HEDDEN, P.; SPONSEL, V. A Century of Gibberellin Research. **Journal of**

Plant Growth Regulation, [S. /], v. 34, p. 740–760, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00344-015-9546-1>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00344-015-9546-1>. Acesso em: 22 abr. 2026.

HOLBROOK, A.; EDGE, W.; BAILEY, F. Spectrophotometric method for determination of gibberellic acid. **Advances in Chemistry**, [S. /], v. 28, p. 159-167, 1961. DOI: <https://doi.org/10.1021/ba-1961-0028.ch018>. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ba-1961-0028.ch018>. Acesso em: 22 abr. 2026.

HUNGRIA, M. **Capacidade de síntese de exopolissacarídeos e de formação de biofilmes**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. (Circular Técnica, 78). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/883492>. Acesso em: 22 abr. 2024.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense***: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36 p. (Embrapa Soja. Documentos, 325). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/915729>. Acesso em: 30 abr. 2025.

HUYNH, T. V. *et al.* Optimization of the Microencapsulation of Lemon Myrtle Oil Using Response Surface Methodology. **Drying Technology**, [S. /], v. 26, n. 3, p. 357-368, 13 mar. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1080/07373930801898150>. Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07373930801898150>. Acesso em: 13 abr. 2025.

KASIM, W. A. *et al.* Effect of biofilm forming plant growth promoting rhizobacteria on salinity tolerance in barley. **Annals of Agricultural Sciences**, [S. l.], v. 61, n. 2, p. 217-227, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aos.2016.07.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S057017831630045X>. Acesso em: 02 set. 2025.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

LAKSHMANAN, V. *et al.* A natural rice rhizospheric bacterium abates arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa* L.). **Planta**, [S. l.], v. 242, n. 4, p. 1037-1050, 10 jun. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2340-2>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00425-015-2340-2>. Acesso em: 18 abr. 2024.

LAL, R. Restoring Soil Quality to Mitigate Soil Degradation. **Sustainability**, [S. l.], v. 7, n. 5, p. 5875-5895, 13 maio 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/su7055875>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2071-1050/7/5/5875>. Acesso em: 26 abr. 2025.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: Properties and biomedical applications.

Progress in Polymer Science, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 106-126, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S007967001100124X>. Acesso em: 28 abr. 2025.

LI, Y. P. *et al.* Extrapolymeric substances (EPS) in *Mucilaginibacter rubeus* P2 displayed efficient metal(loid) bio-adsorption and production was induced by copper and zinc. **Chemosphere**, [S. l.], v. 291, p. 132712, mar. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132712>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004565352103131X>. Acesso em: 03 abr. 2025.

MAHMOOD, A. *et al.* Seed biopriming with plant growth promoting rhizobacteria: a review. **FEMS Microbiology Ecology**, [S. l.], v. 92, n. 8, p. 1-14, 23 maio 2016. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw112>. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsec/article/92/8/fiw112/2198124>. Acesso em: 05 abr. 2024.

MAITRA, P. *et al.* Metabolic niches in the rhizosphere microbiome: dependence on soil horizons, root traits and climate variables in forest ecosystems. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 15, p. 1-15, 5 abr. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1344205>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2024.1344205/full>. Acesso em: 22 jan. 2025.

MARQUES, D. M. *et al.* *Azospirillum brasilense* favors morphophysiological characteristics and nutrient accumulation in maize cultivated under two water regimes. **Brazilian Journal of Maize and Sorghum**, [S. l.], v. 19, p. e1185,

2020. DOI: <https://doi.org/10.18512/rbms2020v19e1185>. Disponível em: <https://rbms.abms.org.br/index.php/rbms/article/view/1185>. Acesso em: 02 fev. 2025.

MENESES, C. H. S. G. *et al.* **Produção, extração e quantificação de exopolissacarídeos sintetizados por *G. diazotrophicus* PAL5T em meio de cultivo líquido**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2009. 4 p. (Comunicado Técnico, 122). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/626500>. Acesso em: 22 abr. 2025.

MUKAI-CORREA, R. *et al.* Caracterização de cápsulas contendo caseína e gordura vegetal hidrogenada obtidas por gelificação iônica. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 8, n. 1, p. 73-80, 2005. Disponível em: <https://bjft.ital.sp.gov.br/>. Acesso em: 22 abr. 2025.

MUNIN, A.; EDWARDS-LÉVY, F. Encapsulation of natural polyphenolic compounds: a Review. **Pharmaceutics**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 793-829, 2011. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3040793>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/3/4/793>. Acesso em: 22 jan. 2025.

NAMBARA, E. Plant Hormones. **Brenner's Encyclopedia of Genetics**, [S. l.], p. 346-348, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01160-X>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012374984001160X>. Acesso em: 20 jan. 2025.

NOTTINGHAM, A. T. *et al.* Nutrient limitations to bacterial and fungal growth during cellulose decomposition in tropical forest soils. **Biology and Fertility of Soils**, [S. l.], v. 54, n. 2, p. 219-228, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00374-017-1247-4>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00374-017-1247-4>. Acesso em: 20 fev. 2025.

OLIVEIRA, A. L. M. *et al.* Maize Inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 Cells Enriched with Exopolysaccharides and Polyhydroxybutyrate Results in High Productivity under Low N Fertilizer Input. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 8, art. 1873, p. 1-18, 26 set. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01873>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2017.01873/full>. Acesso em: 22 fev. 2025.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A ALIMENTAÇÃO E A AGRICULTURA (FAO). **FAO Strategic Framework 2022-2031**. Rome: FAO, 2021. Disponível em: <https://www.fao.org/documents/card/en/c/cb7099en>. Acesso em: 22 abr. 2025.

PAGANI, A. A. C. *et al.* Study of the process of getting the drops of papaya (*Carica papaya* L.) per basic spherification. **International Journal of Engineering and Innovative Technology**, [S. l.], v. 4, n. 6, p. 88-91, 2014. Disponível em: <https://www.ijeit.com>. Acesso em: 18 abr. 2025.

PAPAGEORGIU, S. K. *et al.* Interaction of Ca²⁺ ions with alginate chains: A fundamental study by FTIR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, [S. l.], v. 345, n. 4, p. 469-473, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.12.010>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000862150900570X>. Acesso em: 20 abr. 2025.

PENG, J. *et al.* 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. **Nature**, [S. l.], v. 400, p. 256–261, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1038/22307>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/22307>. Acesso em: 04 abr. 2025.

PEREIRA, A. E. S. **Nanocarreadores para o regulador de crescimento vegetal ácido giberélico**. 2017. 123 f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) — Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017a. Disponível em: <https://repositorio.unicamp.br/acervo/detalhe/985554>. Acesso em: 22 abr. 2025.

PEREIRA, A. E. S. *et al.* Chitosan nanoparticles as carrier systems for the plant growth hormone gibberellic acid. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 150, p. 141-152, fev. 2017b. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.11.027>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092777651630799X>. Acesso em: 22 abr. 2025.

PEREIRA, A. E. S.; OLIVEIRA, H. C.; FRACETO, L. F. Polymeric nanoparticles as an alternative for application of gibberellic acid in sustainable agriculture: a field study. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, art. 7135, p. 1-10, 9 maio 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43494-y>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-43494-y>. Acesso em: 22 abr. 2025.

PEREIRA, A. E. S. *et al.* Nanotechnology Potential in Seed Priming for Sustainable Agriculture. **Nanomaterials**, [S. l.], v. 11, n. 2, art. 267, p. 1-22, 20 jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/nano11020267>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-4991/11/2/267>. Acesso em: 22 abr. 2025.

PIOMBO, E. *et al.* Diferentes fenótipos, genomas semelhantes: três cepas de *Fusarium fujikuroi* recentemente sequenciadas induzem sintomas diferentes no arroz dependendo da temperatura. **Phytopathology**, [S. l.], v. 110, n. 3, p. 656–665, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-19-0359-R>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-09-19-0359-R>. Acesso em: 22 jan. 2024

PRASHAR, P.; KAPOOR, N.; SACHDEVA, S. Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and importance. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, [S. l.], v. 13, p. 63–77, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11157-013-9317-z>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11157-013-9317-z>. Acesso em: 22 abr. 2025.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, [S. l.], v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S007967000600057X>. Acesso em: 28 abr. 2025.

SHIFERAW, B. *et al.* Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. **Food Security**, [S. l.], v. 3, p. 307–327, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12571-011-0140-5>.

Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12571-011-0140-5>.

Acesso em: 18 mai. 2025.

APÊNDICE

APÊNDICE A. Dados de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as amostras ALG/CS mantidas em temperatura ambiente (24 °C), com medições de tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão (Pdl), potencial zeta e potencial hidrogeniônico (pH), nos tempos de 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

ALG/CS				
Dias	Tamanho hidrodinâmico (nm)	Índice de polidispersão (Pdl)	Potencial Zeta	potencial hidrogeniônico (pH)
0	393,9 $\pm$ 14,2	0,340 $\pm$ 0,033	-23,4 $\pm$ 1,3	4,69 $\pm$ 0,01
7	435,7 $\pm$ 3,9	0,387 $\pm$ 0,032	-20,9 $\pm$ 1,2	4,68 $\pm$ 0,01
15	438,0 $\pm$ 6,2	0,369 $\pm$ 0,029	-20,5 $\pm$ 0,8	4,76 $\pm$ 0,02
30	478,6 $\pm$ 12,7	0,363 $\pm$ 0,033	-20,3 $\pm$ 0,9	4,79 $\pm$ 0,01
45	456,4 $\pm$ 4,8	0,372 $\pm$ 0,016	-18,5 $\pm$ 1,4	4,54 $\pm$ 0,01
60	486,2 $\pm$ 6,0	0,426 $\pm$ 0,004	-20,4 $\pm$ 0,5	4,45 $\pm$ 0,04

APÊNDICE B. Dados de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as amostras ALG/CS-GA₃ mantidas em temperatura ambiente (24 °C), com medições de tamanho hidrodinâmico e índice de polidispersão (Pdl), potencial zeta, potencial hidrogeniônico e eficiência de encapsulação, nos tempos de 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

ALG/CS-GA ₃					
Dias	Tamanho hidrodinâmico (nm)	Índice de polidispersão (Pdl)	Potencial Zeta	potencial hidrogeniônico (pH)	Eficiência de encapsulação (%)
0	387,8 $\pm$ 5,1	0,319 $\pm$ 0,042	-23,6 $\pm$ 1,6	4,71 $\pm$ 0,01	96,38 $\pm$ 0,02
7	424,2 $\pm$ 8,8	0,352 $\pm$ 0,002	-21,0 $\pm$ 1,2	4,77 $\pm$ 0,01	95,78 $\pm$ 0,32
15	424,8 $\pm$ 5,4	0,388 $\pm$ 0,012	-20,4 $\pm$ 2,2	4,87 $\pm$ 0,01	95,11 $\pm$ 0,04
30	461,8 $\pm$ 12,8	0,385 $\pm$ 0,011	-20,1 $\pm$ 1,1	4,87 $\pm$ 0,01	95,41 $\pm$ 0,05
45	458,4 $\pm$ 5,8	0,412 $\pm$ 0,059	-19,9 $\pm$ 1,5	4,55 $\pm$ 0,01	93,40 $\pm$ 0,15
60	466,1 $\pm$ 8,2	0,382 $\pm$ 0,019	-22,4 $\pm$ 3,3	4,49 $\pm$ 0,01	96,63 $\pm$ 0,13

APÊNDICE C. Dados de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as amostras ALG/CS mantidas em estufa (40°C), com medições de tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão(PdI) e potencial zeta, nos tempos de 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

ALG/CS			
Dias	Tamanho hidrodinâmico (nm)	Índice de polidispersão (PdI)	Potencial Zeta
0	393,9 $\pm$ 14,2	0,340 $\pm$ 0,033	-23,4 $\pm$ 1,3
7	415,0 $\pm$ 5,1	0,383 $\pm$ 0,039	-21,2 $\pm$ 0,7
15	457,5 $\pm$ 12,6	0,379 $\pm$ 0,016	-23,0 $\pm$ 1,1
30	445,2 $\pm$ 1,3	0,378 $\pm$ 0,026	-22,5 $\pm$ 0,7
45	458,3 $\pm$ 7,6	0,342 $\pm$ 0,027	-23,4 $\pm$ 1,7
60	460,7 $\pm$ 11,4	0,304 $\pm$ 0,030	-22,71 $\pm$ 1,4

APÊNDICE D. Dados de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as amostras ALG/CS-GA₃ mantidas em estufa (40°C), com medições de tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão (PdI), potencial zeta e eficiência de encapsulação, nos tempos de 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

ALG/CS-GA ₃				
Dias	Tamanho hidrodinâmico (nm)	Índice de polidispersão (PdI)	Potencial Zeta	Eficiência de encapsulação (%)
0	387,8 $\pm$ 5,1	0,319 $\pm$ 0,042	-23,6 $\pm$ 1,6	96,35 $\pm$ 0,01
7	438,6 $\pm$ 2,5	0,320 $\pm$ 0,038	-20,7 $\pm$ 0,6	95,78 $\pm$ 0,21
15	453,6 $\pm$ 6,8	0,336 $\pm$ 0,048	-22,6 $\pm$ 1,1	96,11 $\pm$ 0,05
30	440,6 $\pm$ 4,4	0,345 $\pm$ 0,015	-23,1 $\pm$ 0,6	97,41 $\pm$ 0,07
45	426,4 $\pm$ 13,9	0,342 $\pm$ 0,027	-22,3 $\pm$ 0,6	97,40 $\pm$ 0,14
60	435,4 $\pm$ 4,0	0,326 $\pm$ 0,028	-23,2 $\pm$ 0,8	96,63 $\pm$ 0,16

APÊNDICE E. Dados de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as amostras ALG/CS mantidas em bloco digestor (65°C), com medições de tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão (Pdl) e potencial zeta nos tempos de 0, 7, 15 e 30 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

ALG/CS			
Dias	Tamanho hidrodinâmico (nm)	Índice de polidispersão (Pdl)	Potencial Zeta
0	393,9 $\pm$ 14,2	0,340 $\pm$ 0,033	-23,4 $\pm$ 1,1
7	413,6 $\pm$ 8,7	0,392 $\pm$ 0,017	-19,7 $\pm$ 0,5
15	281,0 $\pm$ 28,8	0,757 $\pm$ 0,078	-19,1 $\pm$ 0,5
30	49,8 $\pm$ 24,3	0,328 $\pm$ 0,027	-17,3 $\pm$ 1,9

APÊNDICE F. Dados de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as amostras ALG/CS-GA₃ mantidas em bloco digestor (65°C), com medições de tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão (Pdl), potencial zeta e eficiência de encapsulação, nos tempos de 0, 7, 15 e 30 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

ALG/CS-GA₃				
Dias	Tamanho hidrodinâmico (nm)	Índice de polidispersão (Pdl)	Potencial Zeta	Eficiência de encapsulação (%)
0	387,8 $\pm$ 5,1	0,319 $\pm$ 0,0416	-23,6 $\pm$ 1,6	96,61 $\pm$ 0,26
7	438,6 $\pm$ 2,5	0,371 $\pm$ 0,0186	-21,1 $\pm$ 0,4	96,72 $\pm$ 0,07
15	378,3 $\pm$ 31,5	0,662 $\pm$ 0,0783	-19,5 $\pm$ 1,3	98,36 $\pm$ 0,04
30	678,1 $\pm$ 169,0	0,861 $\pm$ 0,1334	-18,1 $\pm$ 1,4	3,13 $\pm$ 0,03

APÊNDICE G. Dados de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as amostras ALG/CS mantidas sob refrigeração (4°C), com medições de tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão (Pdl) e potencial zeta, após 24 horas. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

ALG/CS - Resfriamento			
	Tamanho hidrodinâmico	Índice de polidispersão	Potencial

Horas	(nm)	(Pdl)	Zeta
0	434,8 ± 3,26	0,369 ± 0,006	-23,3 ± 0,5
24	438,9 ± 3,19	0,386 ± 0,003	-27,3 ± 0,1

APÊNDICE H. Dados de espalhamento de luz dinâmico (DLS) para as amostras ALG/CS-GA₃ mantidas sob refrigeração (4°C), com medições de tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão (Pdl) e potencial zeta, após 24 horas. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão.

ALG/CS-GA ₃ - Resfriamento				
Horas	Tamanho hidrodinâmico (nm)	Índice de polidispersão (Pdl)	Potencial Zeta	Eficiência de encapsulação (%)
0	443,5 ± 2,21	2,21	-22,6 ± 0,7	96,32 ± 0,06
24	462,9 ± 2,86	2,86	-31,4 ± 0,6	95,38 ± 0,14

APÊNDICE I. Caracterização das nanopartículas por análise de rastreamento em nanopartículas durante o armazenamento à temperatura ambiente (24 °C). (A) Diâmetro médio das partículas e (B) concentração de partículas (partículas/mL) das nanopartículas controle (ALG/CS) e das nanopartículas contendo ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃), avaliadas nos tempos de 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão.

Dias	ALG/CS - T _{Amb}		ALG/CS - GA ₃ - T _{Amb}	
	Tamanho(nm)	Concentração(partículas /mL)	Tamanho(nm)	Concentração(partículas/mL)
0	298,9 ± 11,1	1,76E+12 ± 1,79E+11	325,1 ± 12,2	1,21E+12 ± 1,79E+11
7	341,4 ± 11,9	7,19E+11 ± 7,40E+10	373,6 ± 13,7	4,90E+11 ± 4,43E+10
15	371,1 ± 13,2	1,17E+12 ± 2,20E+10	386,8 ± 19,6	1,03E+12 ± 2,79E+10
30	390,5 ± 12,9	3,92E+11 ± 1,39E+10	438,5 ± 22,6	2,96E+11 ± 1,82E+10
45	341,6 ± 6,1	1,07E+12 ± 3,93E+10	411,3 ± 11,9	5,79E+11 ± 5,14E+10
60	429,9 ± 12,6	5,24E+11 ± 2,81E+10	378,3 ± 23,5	5,63E+11 ± 4,18E+10

APÊNDICE J. Caracterização das nanopartículas por análise de rastreamento em nanopartículas durante o armazenamento em estufa 40 °C. (A) Diâmetro médio das partículas e (B) concentração de partículas (partículas/mL) das nanopartículas controle (ALG/CS) e das nanopartículas contendo ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃), avaliadas nos tempos de 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão.

Dias	ALG/CS		ALG/CS - GA ₃	
	Tamanho (nm)	Concentração (partículas/mL)	Tamanho (nm)	Concentração (partículas/mL)
0	298,9 $\pm$ 11,1	1,76E+12 $\pm$ 1,79E+11	325,1 $\pm$ 12,2	1,21E+12 $\pm$ 1,79E+11
7	341,4 $\pm$ 11,9	7,19E+11 $\pm$ 7,40E+10	373,6 $\pm$ 13,7	4,90E+11 $\pm$ 4,43E+10
15	371,1 $\pm$ 13,2	1,17E+12 $\pm$ 2,20E+10	386,8 $\pm$ 19,6	1,03E+12 $\pm$ 2,79E+10

30	390,5 ± 12,9	3,92E+11 ± 1,39E+10	438,5 ± 22,6	2,96E+11 ± 1,82E+10
45	341,6 ± 6,1	1,07E+12 ± 3,93E+10	411,3 ± 11,9	5,79E+11 ± 5,14E+10
60	429,9 ± 12,6	5,24E+11 ± 2,81E+10	378,3 ± 23,5	5,63E+11 ± 4,18E+10

APÊNDICE K. Caracterização das nanopartículas por análise de rastreamento em nanopartículas durante o armazenamento em bloco digestor (65 °C). (A) Diâmetro médio das partículas e (B) concentração de partículas (partículas/mL) das nanopartículas controle (ALG/CS) e das nanopartículas contendo ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃), avaliadas nos tempos de 0, 7, 15, 30 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão.

	ALG/CS		ALG/CS - GA ₃	
Dias	Tamanho (nm)	Concentração (partículas/mL)	Tamanho (nm)	Concentração (partículas/mL)
0	298,9 ± 11,1	1,76E+12 ± 1,79E+11	325,1 ± 12,2	1,21E+12 ± 1,79E+11
7	289,3 ± 22,2	2,89E+11 ± 1,56E+11	386,0 ± 58,3	3,35E+11 ± 1,79E+10
15	241,0 ± 20,5	8,90E+10 ± 9,88E+9	277,3 ± 9,2	3,61E+11 ± 2,47E+10
30	314,1 ± 21,8	1,19E+11 ± 9,54E+9	372,8 ± 12,4	1,83E+11 ± 2,20E+10

APÊNDICE L. Caracterização das nanopartículas por análise de rastreamento em nanopartículas durante o armazenamento sob refrigeração (4 °C). (A) Diâmetro médio das partículas e (B) concentração de partículas (partículas/mL) das nanopartículas controle (ALG/CS) e das nanopartículas contendo ácido giberélico encapsulado (ALG/CS-GA₃), avaliadas nos tempos de 0, 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão.

	ALG/CS		ALG/CS - GA ₃	
Horas	Tamanho (nm)	Concentração (partículas/mL)	Tamanho (nm)	Concentração (partículas/mL)
0	400,0 ± 16,3	5,69E+11 ± 3,1E+10	337,0 ± 16,3	6,02E+11 ± 3,81E+10
24	371,3 ± 13,6	7,54E+11 ± 5,38E+10	338,4 ± 13,6	9,86E+11 ± 2,59E+11

APÊNDICE M. Dados da altura, comprimento e massa fresca de plântulas de milho germinadas obtidos no teste de germinação em papel Germitest, oriundas de sementes tratadas com: água (controle negativo); *Azospirillum brasilense*; solução de GA₃ (75 mg/100 g de sementes); nanopartículas ALG/CS-GA₃ contendo 75, 62,5 ou 50 mg de GA₃/100 g de sementes associadas à inoculação com *A. brasilense*; e nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas mesmas concentrações, porém aplicadas na ausência de *A. brasilense*.

Tratamento	Altura da parte aérea (cm)	Comprimento da raiz (cm)	Massa fresca (g)
Controle negativo(água)	7,09 ± 1,84	5,27 ± 1,38	0,6776 ± 0,0332
<i>Azospirillum brasilense</i> (A.b)	1,81 ± 1,04	2,51 ± 0,87	0,5510 ± 0,0118
75 mg de GA ₃ /100 kg de sementes	5,35 ± 0,50	5,45 ± 1,28	0,6504 ± 0,0152
Np 75 mg de GA ₃ /100 kg de sementes e A.b	8,62 ± 0,81	7,20 ± 1,26	0,6937 ± 0,0191
Np 62,5 mg de GA ₃ /100 kg de sementes e A.b	6,95 ± 0,81	5,83 ± 0,90	0,7582 ± 0,0317
Np 50 mg de GA ₃ /100 kg de sementes e A.b	7,02 ± 1,20	6,67 ± 0,57	0,6819 ± 0,0396
Np 75 mg de GA ₃ /100 kg de sementes	5,53 ± 2,40	6,11 ± 1,07	0,7092 ± 0,0256
Np 62,5 mg de GA ₃ /100 kg de sementes	7,96 ± 1,10	6,05 ± 0,86	0,6777 ± 0,0541
Np 50 mg de GA ₃ /100 kg de sementes	6,11 ± 0,56	6,20 ± 0,64	0,6471 ± 0,0412

APÊNDICE N. Altura da parte aérea e comprimento da raiz e massa fresca e seca da parte aérea e da raiz de plântulas de milho cultivadas em vasos com substrato comercial, provenientes de sementes tratadas com: controle negativo (água); *Azospirillum brasilense*; solução de GA₃ (75 mg/100 g de sementes); nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas concentrações de 75, 62,5 e 50 mg de GA₃/100 g de sementes, todas com *A. brasilense*; e nanopartículas ALG/CS-GA₃ nas mesmas concentrações, porém sem *A. brasilense*.

Tratamento	Altura da parte aérea (cm)	Altura da raiz (cm)	Massa fresca da parte aérea (cm)	Massa fresca da raiz (cm)	Massa seca da parte aérea (cm)	Massa seca da raiz (cm)
Controle negativo (água)	42,3 ± 3,4	71,9 ± 8,9	1,7540 ± 0,2307	1,0730 ± 0,1881	0,1660 ± 0,0214	0,1245 ± 0,0154
<i>Azospirillum brasilense</i> (A.b)	41,1 ± 5,4	62,4 ± 15,6	1,8256 ± 0,4332	1,3703 ± 0,3494	0,2148 ± 0,0557	0,1288 ± 0,0145
75 mg de GA ₃ /100 kg de sementes	41,8 ± 5,7	62,7 ± 22,8	2,0501 ± 0,5104	1,5790 ± 0,4830	0,2010 ± 0,0407	0,1422 ± 0,0331
Np 75 mg de GA ₃ /100 kg de sementes e A.b	45,6 ± 3,4	73,1 ± 9,8	1,9398 ± 0,4072	1,5388 ± 0,3733	0,2016 ± 0,0459	0,1472 ± 0,0312
Np 62,5 mg de GA ₃ /100 kg de sementes e A.b	42,3 ± 3,2	72,0 ± 11,1	2,0280 ± 0,3318	1,9793 ± 0,5599	0,2131 ± 0,0240	0,1398 ± 0,0277
Np 50 mg de GA ₃ /100 kg de sementes e A.b	37,0 ± 8,7	63,7 ± 19,5	1,5912 ± 0,5628	1,4203 ± 0,4949	0,1993 ± 0,0700	0,1251 ± 0,0394

Np 75 mg de GA ₃ /100 kg de sementes	44,1 ± 3,5	70,0 ± 8,5	2,2286 ± 0,4260	1,5928 ± 0,3402	0,2369 ± 0,0611	0,1636 ± 0,0247
Np 62,5 mg de GA ₃ /100 kg de sementes	39,1 ± 8,1	58,1 ± 14,4	1,6554 ± 0,5258	1,0510 ± 0,3952	0,1957 ± 0,0516	0,0965 ± 0,0264
Np 50 mg de GA ₃ /100 kg de sementes	43,9 ± 3,59	65,3 ± 8,0	1,9372 ± 0,6089	1,4491 ± 0,2967	0,2015 ± 0,0795	0,1198 ± 0,0265