



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de Ilha Solteira

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

Síntese e aplicação de nanopartículas de lignina contendo auxina vegetal como *nanopriming* de sementes visando uma agricultura sustentável

Érica Rennó Biscalchim



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de Ilha Solteira

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

Síntese e aplicação de nanopartículas de lignina contendo auxina vegetal como *nanoprimer* de sementes visando uma agricultura sustentável

Érica Rennó Biscalchim

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais.

Área de conhecimento: Química dos Materiais

Orientador: Prof. Dr. Renato Grillo

FICHA CATALOGRÁFICA
Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

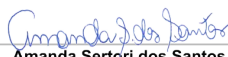
B621s Biscalchim, Érica Rennó.
Síntese e aplicação de nanopartículas de lignina contendo auxina vegetal como nanoprimer de sementes visando uma agricultura sustentável / Érica Rennó Biscalchim. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2024
58 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Química dos Materiais, 2024

Orientador: Renato Grillo

Inclui bibliografia

1. Nanotecnologia. 2. Agricultura sustentável. 3. Lignina. 4. Auxina vegetal.


Amanda Sertori dos Santos
Bibliotecária - CRB/8-9061
Seção Técnica de Referência, Atendimento ao
Usuário e Documentação
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação

Impacto potencial desta pesquisa

A combinação de tecnologias emergentes, como o *nanopriming* de sementes à base de nanoesferas de lignina associados a auxina vegetal, oferece uma nova fronteira para o aprimoramento do desempenho das sementes na agricultura. À medida que esses estudos avançam, espera-se que essas tecnologias se transformem em produtos que ajudem a enfrentar os desafios impostos pelas mudanças climáticas e pela degradação ambiental, promovendo uma agricultura mais sustentável e eficiente. O uso de materiais biodegradáveis, como a lignina, também proporciona uma abordagem ecológica, contribuindo para que as inovações não resultem em poluição ambiental ou acúmulo de resíduos tóxicos no solo.

Potential impacts of this research

The combination of emerging technologies, such as seed nanopriming based on lignin nanospheres combined with plant auxin, offers a new frontier for enhancing seed performance in agriculture. As these studies progress, it is expected that these technologies will evolve into products that help address the challenges posed by climate change and environmental degradation, promoting a more sustainable and efficient agriculture. The use of biodegradable materials, such as lignin, also provides an ecological approach, ensuring that innovations do not result in environmental pollution or the accumulation of toxic residues in the soil.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Ilha Solteira

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: SÍNTESE E APLICAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE LIGNINA CONTENDO AUXINA VEGETAL COMO *PRIMING* DE SEMENTES VISANDO UMA AGRICULTURA SUSTENTÁVEL

AUTORA: ÉRICA RENNÓ BISCALCHIM

ORIENTADOR: RENATO GRILLO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciência dos Materiais, área: Química dos Materiais pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. RENATO GRILLO (Participação Presencial)
Departamento de Física e Química / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNESP

Documento assinado digitalmente
RENATO GRILLO
Data: 13/11/2024 09:06:00-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dra. BEATRIZ ALINE RIGA ROCHA (Participação Presencial)
Departamento de Física e Química / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNI

Documento assinado digitalmente
BEATRIZ ALINE RIGA ROCHA
Data: 13/11/2024 09:18:28-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. ETENALDO FELIPE SANTIAGO (Participação Presencial)
Centro de Estudos em Recursos Naturais / Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul - UEMS

Documento assinado digitalmente
ETENALDO FELIPE SANTIAGO
Data: 13/11/2024 18:43:43-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Ilha Solteira, 12 de novembro de 2024

Dedicatória

Dedico esta dissertação aos meus pais, Lucimara e João Luis, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida, e aos meus sobrinhos, Arthur e Alice, com a esperança de que encontrem na ciência uma fonte de inspiração e verdade para iluminar seus caminhos.

AGRADECIMENTOS

À princípio, gostaria de agradecer a Deus, pela vida abençoada e privilegiada que tenho.

Aos meus pais, João e Lucimara, por proverem tudo por mim, por sempre acreditarem em mim, por terem me ensinado a aproveitar todas as oportunidades e sempre seguir o caminho do bem, e por sempre me incentivarem e me ajudarem a alcançar todos os meus objetivos.

Aos meus irmãos, Ana, Bia e Junior, que são fonte sem fim de inspiração para mim, por serem meus exemplos de vida e por sempre torcerem por mim. Também aos meus sobrinhos, Alice e Arthur, que com tanta doçura e carinho me motivam todos os dias a continuar.

Agradeço de uma forma geral a todos meus familiares, meus avôs, tios, primos e Vinicius, que sempre me apoiam e torcem por mim.

Aos meus amigos, por escolherem estar presentes na minha vida e serem minha companhia nas horas alegres e nos momentos difíceis, em especial às meninas quem não só dividiram uma casa comigo, mas também as conquistas e as tristezas. Muito obrigada, Karina, Mairê, Tamiris, Tati, Beatriz, Daniela, Victória, Noah, Danielle F., Bianca, Jéssica, Manu, Lara, Emilly e Luísa.

Ao Laboratório de NanoQuímica Ambiental e meus amigos de laboratório, Mariana, Débora, Luiz, Pedro, Geovanna, Rafaela, Julia e Beatriz. Muito obrigada pela ajuda imprescindível e todo companheirismo. Vocês foram essenciais para a realização desta pesquisa.

Ao meu orientador, Professor Dr. Renato Grillo, por toda oportunidade, experiências e conhecimentos adquiridos. Obrigada por confiar no meu potencial.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Materiais, UNESP-Ilha Solteira.

À Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira e o Departamento de Física e Química pela infraestrutura.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado concedida – Código de Financiamento 001, ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) (310846/2022-6) e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São

Paulo) (2022/03219-2, 2023/00541-3) pela manutenção da pesquisa científica e auxílios concedidos.

Ao Grupo de Polímeros (GPol) pelo auxílio e análise de TG e DSC, em especial ao Prof. Dr. Alex O. Sanches pelo auxílio nas análises. E aos Professores: Dr. José Antônio Malmonge, Dra. Rosangela da Silva de Laurentiz e Dr. Marcelo Minhoto Teixeira Filho pelos empréstimos de alguns equipamentos, tais como: centrífuga a 4°C, espectrofotômetro de UV-Visível e clorofilometro, respectivamente. Também, ao servidor Elton Jose de Souza pelas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

E a todos os colaboradores que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

“A educação não transforma o mundo. A educação transforma as pessoas. Pessoas transformam o mundo.”
- Paulo Freire

RESUMO

Fatores abióticos e bióticos, atrelados às mudanças climáticas, têm sido uma preocupação crescente para a produção agrícola, uma vez que causam estresses no desenvolvimento das culturas e acabam inibindo o seu crescimento e produtividade. Essas condições adversas, como secas, temperaturas extremas e a ocorrência de pragas, estão se tornando mais frequentes e severas, tornando necessária a busca por novas tecnologias que possam mitigar seus impactos. Nesse contexto, as nanopartículas têm atraído cada vez mais atenção no setor agrícola, devido ao seu potencial para melhorar a absorção de nutrientes pelas plantas, estimular o crescimento, aumentar a resistência a pragas e doenças, além de atuar na mitigação dos efeitos negativos das mudanças climáticas. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver nanopartículas orgânicas de lignina (NPsLig) contendo o sal de potássio de sódio do ácido indol-3-butírico (KAIB), para sua aplicação como *nanopriming* em sementes de alface (*Lactuca sativa* L. cv. Stella - Asteraceae). A lignina, sendo um polímero natural, oferece vantagens ambientais, como biodegradabilidade e disponibilidade, tornando esse tipo de nanopartículas uma solução sustentável. As nanopartículas foram preparadas pela metodologia de nanoprecipitação, e apresentaram distribuição de tamanho médio de 123 nm, sendo aplicadas em sementes de alface nas concentrações de 10, 20 e 40 µg/mL antes da germinação. Os resultados do experimento mostraram um aumento significativo na taxa de crescimento das sementes tratadas com as nanopartículas em comparação com o grupo controle. Em particular, as concentrações menores (10 e 20 µg/mL) apresentaram um crescimento radicular até 50 % superior ao controle, com diferenças estatisticamente significativas. Além disso, as plantas tratadas com NPsLig com e sem a auxina vegetal exibiram um aumento de 10 % nos índices de clorofilas totais em todas as concentrações testadas, indicando uma maior eficiência fotossintética. Outro aspecto relevante observado foi o aumento da resistência das culturas a estresses bióticos, especialmente em relação à incidência de fungos. As sementes tratadas com NPsLig, tanto com quanto sem o KAIB, apresentaram menor incidência de fungos em comparação ao controle. Esses resultados indicam que o uso das LigNPs não só promove o crescimento das plantas, mas também melhora sua defesa natural contra patógenos, reduzindo potencialmente a necessidade de outras aplicações químicas, como a de fungicidas. Portanto, este estudo sugere que as nanopartículas de lignina contendo KAIB podem ser uma ferramenta eficaz para promover uma agricultura mais sustentável, mesmo aplicando baixas doses deste produto. Essas nanopartículas, ao proporcionarem uma liberação gradual de ativos, têm o potencial de reduzir a dependência de

insumos agrícolas convencionais, oferecendo uma abordagem ecológica para mitigar os desafios que o setor agrícola enfrenta devido às mudanças climáticas e à crescente demanda por produtividade.

Palavras-chave: nanotecnologia, agricultura sustentável, lignina, auxina vegetal.

ABSTRACT

Abiotic and biotic factors, linked to climate change, have become an increasing concern for agricultural production, as they cause stress during crop development and ultimately inhibit growth and productivity. These adverse conditions, such as droughts, extreme temperatures, and pest outbreaks, are becoming more frequent and severe, making it necessary to seek new technologies to mitigate their impacts. In this context, nanoparticles have been gaining increasing attention in the agricultural sector due to their potential to enhance nutrient uptake by plants, stimulate growth, increase resistance to pests and diseases, and mitigate the negative effects of climate change. This study aimed to develop organic lignin nanoparticles (LigNPs) containing the potassium-sodium salt of indole-3-butyric acid (KAIB) for their application as nanoprimer in lettuce seeds (*Lactuca sativa* L. cv. Stella - Asteraceae). Lignin, being a natural polymer, offers environmental advantages such as biodegradability and availability, making these nanoparticles a sustainable solution. The nanoparticles were prepared using the nanoprecipitation method and showed an average size distribution of 123 nm. They were applied to lettuce seeds at concentrations of 10, 20, and 40 $\mu\text{g/mL}$ before germination. Experimental results demonstrated a significant increase in the growth rate of seeds treated with the nanoparticles compared to the control group. Specifically, lower concentrations (10 and 20 $\mu\text{g/mL}$) showed root growth up to 50% higher than the control, with statistically significant differences. Additionally, plants treated with LigNPs, with and without the plant auxin, exhibited a 10% increase in total chlorophyll indices at all tested concentrations, indicating greater photosynthetic efficiency. Another noteworthy aspect observed was the increased resistance of the crops to biotic stress, particularly fungal incidence. Seeds treated with LigNPs, both with and without KAIB, showed lower fungal incidence compared to the control. These results indicate that the use of LigNPs not only promotes plant growth but also enhances their natural defense against pathogens, potentially reducing the need for other chemical applications, such as fungicides. Therefore, this study suggests that lignin nanoparticles containing KAIB can be an effective tool for promoting more sustainable agriculture, even at low doses of the product. By providing a gradual release of active compounds, these nanoparticles have the potential to reduce dependency on conventional agricultural inputs, offering an ecological approach to mitigating the challenges faced by the agricultural sector due to climate change and the growing demand for productivity.

Keywords: Nanotechnology, sustainable agriculture, lignin, plant auxin.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação gráfica do número de artigos encontradas no site Web of Science relacionadas ao assunto “*nanoprimering*” ao longo dos anos. _____ 03
- Figura 2.** Ilustração de nanopartícula de lignina encapsulando o Indol-3-butirato de potássio (NPsLig + KAIB). _____ 04
- Figura 3.** Ilustração da aplicação de NPsLig + KAIB em sementes de alface (*Lactuca sativa* L. cv. Stella - Asteraceae), resultando em plantas mais resistentes a estresses bióticos e abióticos e em sustentabilidade ambiental. _____ 05
- Figura 4.** Ilustração da metodologia de padronização analítica utilizada para a auxina KAIB. _____ 07
- Figura 5.** Ilustração da síntese de nanopartículas de lignina com e sem a auxina KAIB. ____ 08
- Figura 6.** Ilustração da metodologia utilizada para a análise de EE da auxina KAIB. _____ 10
- Figura 7.** Ilustração da metodologia de cinética de liberação in vitro da auxina KAIB pelo modelo de dois compartimentos. _____ 11
- Figura 8.** Ilustração da metodologia de exposição das sementes nos diferentes tratamentos (Controle, solução de KAIB, NPs Lig e NPsLig + KAIB), e teste de germinação em ambiente controlado. _____ 13
- Figura 9.** A) Imagem de MEV das NPsLig com gráfico de distribuição de tamanho médio por DLS e imagem da formulação final; B) Imagem de MEV dos NPsLig + KAIB com gráfico de distribuição de tamanho médio por DLS e imagem da formulação final; C) Gráfico de FTIR demonstrando bandas de KAIB, Lignina, NPsLig e NPsLig + KAIB; D) Curva de calibração do KAIB. _____ 15
- Figura 10.** Gráfico de FTIR destacando os grupos funcionais dos elementos utilizados nos nanoprimering de lignina com e sem KAIB, utilizados em sementes de *L. sativa* cv. Stella. _____ 16

Figura 11. Perfil da análise termogravimétrica das nanopartículas de lignina com e sem auxina KAIB, mostrando a variação de massa (TG) e a taxa de decomposição (DTG) em função da temperatura, sendo: A e B) TG e DSC, respectivamente, das NPsLig, e C) DSC das NPsLig+KAIB. _____18

Figura 12. Perfil da porcentagem de liberação de KAIB em NPsLig e pura em função do tempo. _____18

Figura 13. Representação da regressão linear utilizada para identificar a curva de calibração da auxina KAIB. _____18

Figura 14. Modelo de ordem zero para os tratamentos de KAIB (A) e NPsLig + KAIB (B). _____21

Figura 15. Quantificação do aumento de massa (g) através do teste de entumescimento de sementes antes e após a exposição dos diferentes tratamentos em diferentes concentrações, sendo: 10 µg/mL (A), 20 µg/mL (B) e 40 µg/mL (C). _____23

Figura 16. Quantificação da porcentagem de germinação de sementes em diferentes tratamentos e concentrações ao longo de 7 dias. _____24

Figura 17. Imagem das plântulas de alface após o ensaio de exposição em sementes nos tratamentos de 10 µg/mL (A); 20 µg/mL (B) e 40 µg/mL (C) em diferentes tratamentos. _____26

Figura 18. Quantificação das medidas da parte aérea e raiz após o ensaio de exposição em sementes em diferentes tratamentos e concentrações de 10 µg/mL (A), 20 µg/mL (B) e 40 µg/mL (C); D) Quantificação da massa úmida após o ensaio de exposição em sementes em diferentes tratamentos e concentrações. Letras distintas (a e b) indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) comparando os tratamentos em relação ao grupo controle, c e d comparação entre os grupos NPsLig e NPsLig +KAIB, ambos para cada concentração conforme análise estatística. _____27

Figura 19. Quantificação das análises de dismutase (A) e peroxidase (B) em sementes após o ensaio de exposição em diferentes tratamentos e concentração de 20 µg/mL. Letras distintas (a

e b) indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) comparando os tratamentos em relação ao grupo controle, conforme análise estatística. _____29

Figura 20. Índice de clorofilas totais, a e b após o ensaio de exposição em sementes em diferentes tratamentos e concentrações. Letras distintas (a e b) indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) comparando os tratamentos em relação ao grupo controle para cada concentração, conforme análise estatística. _____30

Figura 21. A) Imagens das placas de Petri com diferentes tratamentos após ensaio de crescimento de fungos; B) Gráfico da incidência de fungos em diferentes tratamentos após o ensaio de exposição em sementes. Letras distintas (a, b e c) indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) comparando os tratamentos em relação ao grupo controle, conforme análise estatística. _____31

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Equações matemáticas utilizadas para cada Modelos cinéticos para perfil de liberação. _____ 11
- Tabela 2.** Análise de DLS e Potencial Zeta das Nanopartículas de lignina. _____ 15
- Tabela 3.** Análise de DLS e Potencial Zeta das Nanopartículas de lignina com auxina KAIB. _____ 16
- Tabela 4.** Modelos matemáticos aplicados ao perfil de cinética de liberação da auxina KIBA. _____ 19
- Tabela 5.** Valores obtidos, partir das curvas de cinética de liberação dos tratamentos de KAIB livre e associados a NPsLig + KAIB, para a constante de liberação k e equação da reta. ____ 21
- Tabela 6.** Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes submetidas a diferentes tratamentos (Controle, KAIB, NPsLig e NPsLig + KAIB) em três concentrações (10 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL). _____ 24

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ONU	Organização das Nações Unidas
NPs	Nanopartículas
AIB	Ácido indol-3-butírico
AIA	Ácido indol-3-acético
KAIB	Indol-3-butirato de potássio
NPsLig	Nanopartícula de lignina
NPsLig + KAIB	Nanopartícula de lignina associada ao Indol-3-butirato de potássio
PVP	Polivinilpirrolidona
PVA	Poliacetato de vinila
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
PDI	Índice de Polidispersidade
PZ	Potencial Zeta
TG	Termogravimetria
DTG	Derivada Termogravimétrica
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EE	Eficiência de encapsulação
IGV	Índice de velocidade de germinação
NBT	Azul de nitrotretazólio
CAT	Catalase
SOD	Superóxido dismutase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
POD	Peroxidase
ROS	Espécies reativas de oxigênio

Sumário

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 NANOTECNOLOGIA PARA SEMENTES NA AGRICULTURA	1
1.2 ESTRATÉGIA TECNOLÓGICA: NANOPARTÍCULAS DE LIGNINA CONTENDO HORMÔNIO VEGETAL.....	2
1.3 APLICANDO <i>NANOPRIMING</i> EM SEMENTES DE ALFACE	5
2. OBJETIVOS.....	6
2.1 Geral	6
2.2 Objetivos específicos.....	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS	7
3.1 Padronização da metodologia analítica para a auxina KAIB	7
3.2 Síntese das nanopartículas de lignina contendo KAIB	8
3.3 Caracterização físico-química das nanopartículas	8
3.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	8
3.3.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	8
3.3.3 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Índice de Polidispersidade (PDI)	9
3.3.4 Potencial Zeta (PZ).....	9
3.3.5 Termogravimetria (TG)	9
3.3.6 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	10
3.4 Eficiência de encapsulação (EE) de KAIB	10
3.5 Cinética de liberação <i>in vitro</i> da auxina.....	11
3.5.1 Modelagem matemática	11
3.6 Metodologia de tratamento das sementes e ensaios de eficiência de desenvolvimento.....	12
3.7 Testes Enzimáticos	13
3.8 Cultura de fungo em placa de Petri	14
3.9 Análises estatísticas	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1 Morfológico e físico-químico das nanopartículas.....	14
4.2 Eficiência de encapsulação (EE) e Teste de liberação <i>in vitro</i> do hormônio	18
4.3 NPs como <i>priming</i> de sementes de alface	21
4.3.1 Avaliação do teste de entumescimento e germinação de sementes	21
4.3.2 Avaliação do Tamanho e massa úmida das plântulas	25
4.3.3 Avaliação do teste enzimático	28
4.3.4 Índice de clorofila das plântulas	29
4.4 Atividade fúngicas.....	30

5.	<i>CONCLUSÃO</i>	31
6.	<i>REFERÊNCIAS</i>	33

1. INTRODUÇÃO

1.1 NANOTECNOLOGIA PARA SEMENTES NA AGRICULTURA

O aumento do estresse no desenvolvimento de sementes causado por fatores bióticos e abióticos, atrelado às mudanças no padrão climático e às perdas da produção devido a pragas, tem prejudicado o desenvolvimento de sementes no setor agrícola. Isso ocorre, porque tais fatores implicam em alterações fisiológicas, morfológicas, moleculares e bioquímicas no vegetal, impactando negativamente toda a produção agrícola, diminuindo a qualidade e quantidade do plantio¹. Além disso, com o aumento populacional e a expansão demográfica, sugeridos por projeções da ONU (2012)² de que até 2050 a população mundial deva chegar a 9,6 bilhões, implica a necessidade do aumento na produção de alimentos em 70% para garantir a segurança alimentar de toda a sociedade. Assim, estudos com intuito de melhorar o rendimento das colheitas, em especial os focados na eficiência da ação de sementes, vêm crescendo exponencialmente para reparar as consequências dos efeitos negativos que acometem a agricultura^{3,4}. Com isso, uma das soluções para melhorar a resiliência das plantas e otimizar a produção é o desenvolvimento de sementes mais robustas e de alta qualidade, sendo capazes de germinarem de maneira uniforme, desenvolverem raízes saudáveis e lidarem com estresses abióticos (como seca, salinidade e temperaturas extremas), além de resistir a pragas e patógenos. As sementes são componentes essenciais da cadeia de produção agrícola, pois seu desempenho inicial é determinante para a produtividade final das culturas.

Em resposta aos problemas globais enfrentados pela agricultura, há um crescente número de pesquisadores que buscam entender melhor o desenvolvimento de sementes e aplicar tecnologias emergentes para melhorar seu desempenho. Entre essas tecnologias, o uso de *priming* de sementes se destaca.

O *priming* de sementes é uma técnica que envolve o pré-tratamento das sementes com soluções de água ou outros agentes químicos, induzindo uma preparação fisiológica que acelera e uniformiza o processo de germinação. Isso melhora o crescimento das plantas, especialmente sob condições adversas^{5,6}. No entanto, os *primings* tradicionais apresentam limitações em termos de durabilidade e controle da liberação de compostos ativos, o que tem estimulado o desenvolvimento de métodos mais eficientes, como o *nanopriming*^{7,8}. A nanotecnologia é um dos campos da ciência em expansão devido às suas diversas aplicações e vem demonstrando um avanço significativo para o setor agrícola⁹.

Pesquisas baseadas em nanopartículas como sistemas de entrega para tratamento de sementes revelam melhoras expressivas na germinação de sementes^{9,10}. Isso se dá graças à capacidade das nanopartículas protegerem moléculas orgânicas de sua degradação físico-química, bem como, favorecerem a internalização de nutrientes nas sementes, além de liberarem o insumo internalizado de forma lenta e gradativa^{11,12}. Assim, o *nanoprimering* refere-se ao uso de nanopartículas no tratamento de sementes.

Nanopartículas são materiais de escala nanométrica (1-100 nm) com propriedades físicas e químicas distintas¹³, incluindo uma alta área superficial e capacidade de penetrar nas membranas celulares. O *nanoprimering* envolve a utilização de nanopartículas para entregar compostos bioativos diretamente nas sementes, promovendo melhor germinação e crescimento inicial. Um dos principais benefícios do *nanoprimer* é a capacidade de encapsular substâncias bioativas (como hormônios vegetais, nutrientes e agentes antimicrobianos) nas nanopartículas, o que permite a liberação controlada e gradativa desses compostos ao longo do tempo. Essa liberação lenta melhora a eficiência do tratamento e oferece uma proteção mais duradoura contra condições adversas¹⁴.

Diversos estudos têm demonstrado que nanopartículas de materiais como óxido de zinco, prata, sílica e polímeros orgânicos, quando aplicadas em sementes, podem aumentar as taxas de germinação, crescimento radicular e resistência a estresses ambientais⁷. No entanto, o uso de materiais biodegradáveis como veículos de entrega de nanopartículas tem atraído mais atenção devido às preocupações ambientais^{9-12,15}.

Com isso, nanopartículas (NPs) à base de polímeros naturais e associadas a nutrientes e hormônios vêm sendo utilizadas como *primer* de sementes, promovendo proteção e melhora da germinação das mesmas^{10, 16}. Além disso, com o uso do *nanoprimering* de sementes é possível reduzir a quantidade de defensivos agrícolas aplicados na cultura, uma vez que irá aumentar a resistência da cultura a estresses bióticos e abióticos, agregando um fator sustentável para esse sistema¹¹.

1.2 ESTRATÉGIA TECNOLÓGICA: NANOPARTÍCULAS DE LIGNINA CONTENDO HORMÔNIO VEGETAL

A lignina é um biopolímero complexo que está presente nas paredes celulares de plantas vasculares e é responsável pela rigidez e impermeabilidade das plantas. Quimicamente, a lignina é um polímero altamente ramificado composto de unidades fenólicas que lhe conferem grande estabilidade físico-química. Esse composto é um subproduto abundante das indústrias

de celulose e papel, sendo biodegradável e ecologicamente correto, o que o torna ideal para o desenvolvimento de nanocarreadores sustentáveis^{17,18}.

As nanoesferas de lignina podem ser usadas como sistemas de liberação controlada para compostos bioativos, como hormônios de crescimento vegetal e nutrientes^{17,18}. Sua natureza biocompatível e biodegradável permite o uso seguro na agricultura sem os efeitos colaterais de nanopartículas metálicas, que podem acumular-se no ambiente e apresentar toxicidade. As nanoesferas de lignina têm sido estudadas pela sua capacidade de encapsular compostos bioativos e liberá-los de forma controlada, aumentando a eficiência dos tratamentos de *priming* de sementes. No entanto, ainda há necessidade de mais pesquisas na área, já que, em uma pesquisa no site *Web of Science*, foram encontrados somente 121 artigos relacionados à palavra “*nanopriming*” aplicados em sementes (**Figura 1**), assim, destaca-se a necessidade urgente de mais investigações científicas para explorar os efeitos dessa abordagem. Além disso, é crucial entender como as nanopartículas, mesmo quando usadas de forma controlada, podem induzir estresse enzimático nas sementes. Esse estresse, embora possa parecer prejudicial, na verdade pode estimular as sementes a ativarem mecanismos de defesa e adaptação que resultam em promover a resiliência e crescimento mais vigoroso em ambientes adversos¹⁹⁻²².

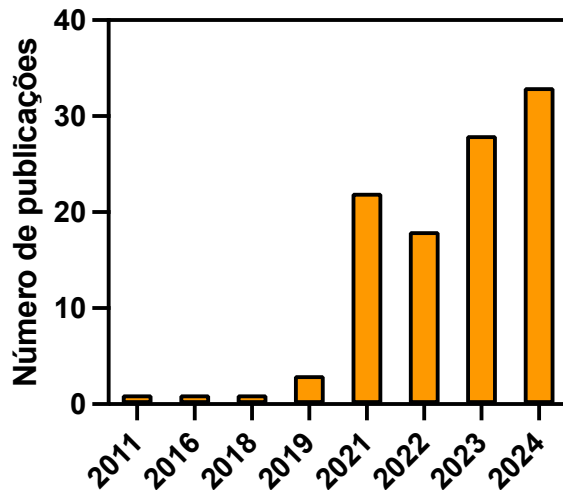


Figura 1. Representação gráfica do número de artigos encontrados no site *Web of Science* relacionados ao assunto “*nanopriming*” ao longo dos anos.

No contexto do *nanopriming*, a lignina pode atuar como um nanocarreador para substâncias como hormônios vegetais, nutrientes e agentes antimicrobianos, proporcionando uma liberação gradual e sustentada dos compostos durante as fases iniciais do desenvolvimento da planta. Isso oferece benefícios significativos em termos de germinação precoce, crescimento radicular e maior resistência a estresses ambientais^{10, 11 e 16}.

O ácido indol-3-butírico (AIB) é uma auxina sintética estruturalmente semelhante ao ácido indol-3-acético (AIA), o principal regulador de crescimento natural das plantas, amplamente utilizado em pesquisas e aplicações práticas na fisiologia vegetal devido à sua eficácia em promover o enraizamento de estacas e regeneração de tecidos²³. As auxinas são hormônios vegetais que desempenham papéis cruciais no crescimento celular, diferenciação, formação de raízes, dominância apical e respostas tropísticas (fototropismo e gravitropismo). Quando em forma salina, o AIB tem maior solubilidade em água, facilitando sua aplicação em soluções de tratamento para sementes e mudas. O AIB é amplamente utilizado no enraizamento de estacas e no *priming* de sementes, no qual promove a formação de raízes adventícias, otimizando o crescimento inicial da planta^{24,25}.

Recentemente, o uso de AIB em sua forma de sal de potássio (KAIB) associado a nanoesferas de lignina tem sido explorado em nosso grupo de pesquisa como uma forma eficaz de otimizar o *priming* de sementes (**Figura 2**). Nesse sistema, o KAIB é encapsulado nas nanoesferas de lignina, que permitem uma liberação gradual do hormônio durante o processo de germinação. Isso garante que o KAIB seja entregue à planta de maneira lenta, evitando picos de concentração que poderiam ser prejudiciais ao crescimento.

A lignina, como nanocarreador, protege o KAIB da degradação prematura e oferece uma liberação sustentada, promovendo o desenvolvimento de raízes de forma eficiente. Esse sistema tem o potencial de aumentar a taxa de germinação, melhorar o crescimento radicular e aumentar a resistência ao estresse durante as fases iniciais de crescimento da planta.

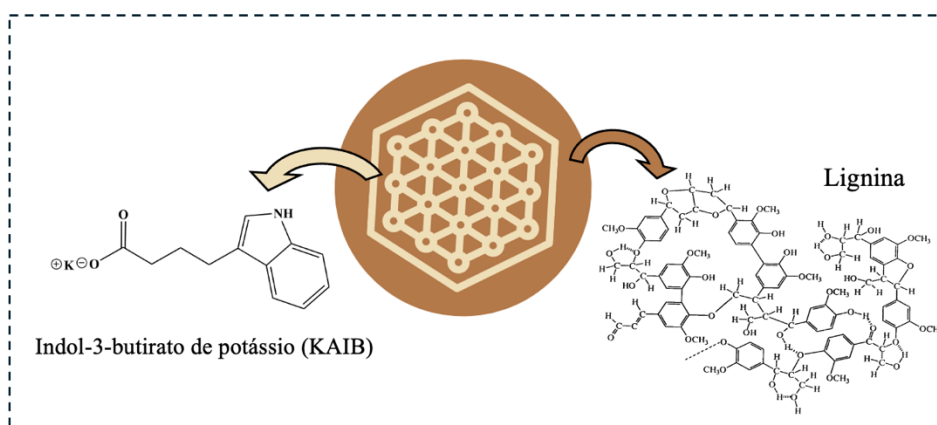


Figura 2. Ilustração de nanopartícula de lignina encapsulando o Indol-3-butirato de potássio (NPsLig + KAIB).

Fonte: Autoria Própria

Os estudos sobre o *nanopriming* utilizando insumos agrícolas encapsulado em nanoesferas de lignina são promissores. Resultados preliminares indicam que esse tratamento pode aumentar substancialmente a viabilidade das sementes, melhorar o estabelecimento das plântulas e permitir um crescimento mais rápido e vigoroso das raízes²⁶ (**Figura 3**). Além disso, essa abordagem pode ser particularmente útil em condições adversas, como em solos com deficiência de nutrientes ou sob condições de seca, no qual o *priming* convencional seria menos eficaz.^{17, 18}. Portanto, a tecnologia de *nanopriming* representa um avanço importante no desenvolvimento de sementes mais resilientes à estresses ambientais, contribuindo para um aumento sustentável da produtividade agrícola^{10, 11 e 16}.

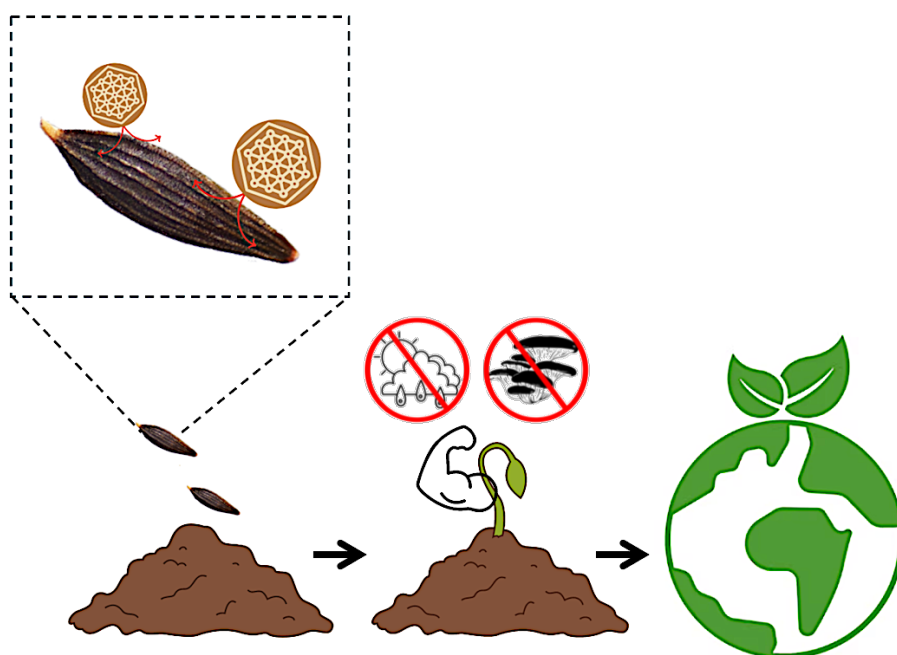


Figura 3. Ilustração da aplicação de NPsLig + KAIB em sementes de alface (*Lactuca sativa* L. cv. Stella), resultando em plantas mais resistentes a estresses bióticos e abióticos e em sustentabilidade ambiental.

Fonte: Autoria Própria

1.3 APLICANDO *NANOPRIMING* EM SEMENTES DE ALFACE

A alface (*Lactuca sativa* L. cv. Stella - Asteraceae) é uma das hortaliças folhosas mais cultivadas e consumidas no mundo. Sua ampla aceitação em diversas regiões e mercados, tanto para o consumo fresco quanto em indústrias de alimentos, a torna uma cultura de grande importância comercial. Melhorar o desempenho das sementes de alface pode ter impactos significativos na produção agrícola global, especialmente em termos de qualidade do produto e da eficiência no uso de insumos, como água e fertilizantes^{27,28}.

A alface é amplamente utilizada como planta modelo em pesquisas científicas devido ao seu ciclo de vida curto, o que facilita a observação rápida dos efeitos de tratamentos inovadores, como o *nanopriming*. Sementes de alface apresentam rápida resposta fisiológica, permitindo que os resultados do tratamento sejam visíveis em um curto período. Além disso, por ser uma cultura de germinação rápida, os estudos envolvendo nanopartículas para tratamento em sementes podem fornecer dados relevantes em fases iniciais do desenvolvimento, facilitando a análise de variáveis como taxa de germinação, vigor da plântula e desenvolvimento radicular²⁹.

O uso da alface (*Lactuca sativa* L. cv. Stella - Asteraceae) em estudos de *nanopriming* se justifica por sua importância econômica, sensibilidade a estresses ambientais, curto ciclo de vida e necessidade de aprimorar a qualidade das sementes. Essas características fazem as sementes de alface se tornarem adequadas para estudos sobre a eficiência de novos tratamentos tecnológicos, como o uso de KAIB encapsulado em nanoesferas de lignina, que pode melhorar o desempenho de germinação e crescimento inicial. Esses estudos têm o potencial de gerar avanços significativos tanto para a ciência agrícola quanto para a prática de cultivo, oferecendo soluções para enfrentar os desafios climáticos e melhorar a produtividade^{30, 31}.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma formulação de nanoesfera de lignina contendo moléculas orgânicas como o AIB, de tal forma que a liberação do ativo na semente seja facilmente controlada via de uma liberação lenta e gradativa do sistema por meio de estímulos presentes no meio, e testá-la por meio de sua aplicação em sementes de alface (*Lactuca sativa* L. cv. Stella - Asteraceae).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O presente trabalho prevê ampliar os conhecimentos acerca do *nanopriming* em sementes de alface (*Lactuca sativa* L. cv. Stella - Asteraceae) de modo a contribuir com os avanços da nanotecnologia na agricultura.

2.2 Objetivos específicos

- Otimizou e sintetizar as nanoesferas de lignina contendo KAIB;
- Realizou a caracterização físico-química e morfológica das nanoesferas;
- Avaliou a eficiência de encapsulamento das nanoesferas com hormônio KAIB;
- Avaliou a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L. cv. Stella - Asteraceae) quando expostas ao *nanopriming*;

- Avaliou características morfológicas e bioquímicas das plantas de alface (*Lactuca sativa* L. cv. Stella - Asteraceae) após a germinação das sementes expostas aos *nanoprímings*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Lignina Kraft, polivinilpirrolidona (PVP) e poliacetato de vinila (PVA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. O KAIB foi adquirido da TerraFarm. Agar-ágar e Azul de nitrotretazólio (NBT) foi adquirido da Êxodo Científica. Água utilizada foi obtida de um sistema de ultrafiltração Milli-Q com condutividade elétrica de $18,2 \Omega.m^{-2}$.

3.1 Padronização da metodologia analítica para a auxina KAIB

As curvas de calibração foram construídas utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (UV-1800 Shimadzu). Para a análise quantitativa da auxina KAIB foram preparadas soluções de concentrações de 2, 5, 10, 15, 25 e 30 mg/L e analisadas em triplicata, no comprimento de onda de máxima absorção do composto (280 nm), obtido através de uma varredura desde a região do visível ao ultravioleta (UV) (**Figura 4**). Todas as concentrações utilizadas para determinação da curva de calibração foram ajustadas de modo a apresentarem absorbância menor que 1, a fim de que se mantivessem na região das absorbâncias onde a Lei de Lambert-Beer se aplica sem desvios. Após a determinação das absorbâncias nas diversas concentrações, foi construído um gráfico de absorbância em função de concentração do hormônio vegetal, e em seguida realizou-se a análise do comportamento matemático da curva (regressão linear), utilizando o programa Prisma 9.0.

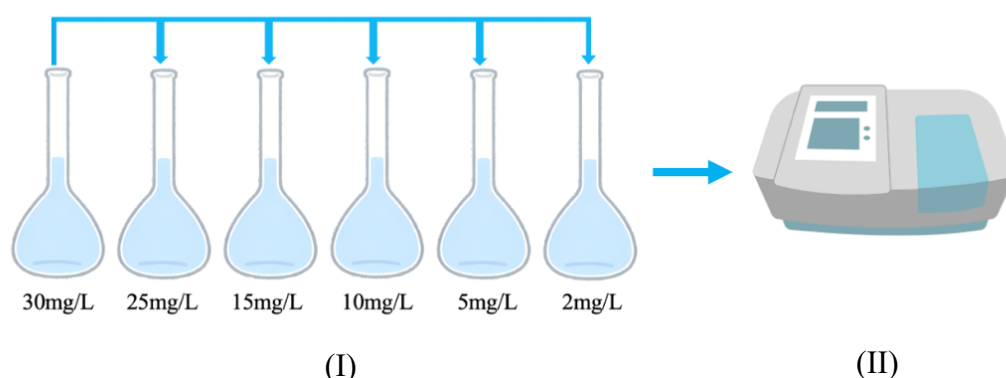


Figura 4. Ilustração da metodologia de padronização analítica utilizada para a auxina KAIB.

Fonte: Autoria Própria

3.2 Síntese das nanopartículas de lignina contendo KAIB

As nanoesferas de lignina com e sem o hormônio de crescimento KAIB foram sintetizadas a partir da metodologia de precipitação descrita por Dai (2017)³², com modificações. Inicialmente foi preparada uma solução contendo 27,5 mg de lignina e 10 mg de KAIB em 5 mL de metanol, a qual foi mantida, durante duas horas, sob agitação magnética. Após este período foi adicionado 50 mL de água deionizada gota-a-gota, deixando em agitação por mais 10 minutos e posteriormente foram levadas ao rotaevaporador (Marconi) para a evaporação do solvente orgânico até reduzir para 10 mL de formulação final (**Figura 5**).

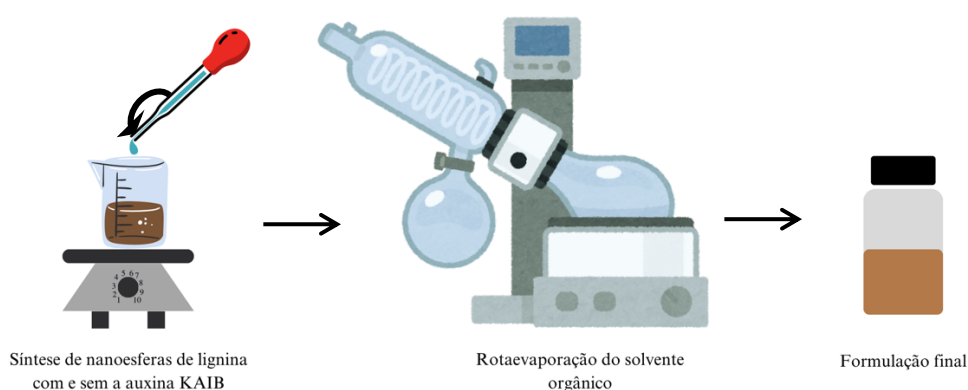


Figura 5. Ilustração da síntese de nanopartículas de lignina com e sem a auxina KAIB.

Fonte: Autoria Própria

3.3 Caracterização físico-química das nanopartículas

3.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (EVO-LS-15, Carls Zeiss) foi utilizada para caracterizar a morfologia das nanopartículas de lignina com e sem a auxina KAIB. Nesta técnica de caracterização, um feixe de elétrons foi projetado sobre a amostra previamente fixada em *grid* de silício previamente limpo e recoberto por uma fina camada de ouro, gerando imagens de alta resolução da superfície. Esse método permitiu observar detalhes da forma, estrutura e tamanho das nanopartículas, proporcionando uma análise visual de suas características físicas.

3.3.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (modelo Nicolet 5DXB FT-IR) foi empregada para identificar a presença de grupos funcionais nas nanopartículas de lignina com e sem a auxina KAIB e suas interações com o potássio de sódio do ácido indol-3-butírico

e a lignina pura. O espectrofotômetro FTIR foi utilizado em uma faixa de 400 a 4000 cm^{-1} , com 128 varreduras por amostra e uma resolução de 8 cm^{-1} . Esse procedimento permitiu identificar as ligações químicas presentes nas amostras por meio da absorção de radiação infravermelha.

3.3.3 *Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Índice de Polidispersidade (PDI)*

O Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS, Malvern) foi utilizado para medir a distribuição de tamanho das nanopartículas de lignina com e sem a auxina KAIB, além disso, foi repetido o teste para analisar a estabilidade das amostras em função do tempo (0, 15 e 35 dias). Nesse método, um feixe de luz é direcionado à amostra, e as flutuações de intensidade da luz dispersa pelas partículas em suspensão são analisadas. Com o DLS foi possível determinar o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas e obter informações sobre sua estabilidade coloidal. Além da distribuição de tamanho, o DLS também forneceu o Índice de Polidispersidade (PDI), que é uma medida da uniformidade da amostra, em adição, foram analisados a distribuição de tamanho e o PDI das formulações ao longo de 35 dias.

3.3.4 *Potencial Zeta (PZ)*

A análise do potencial zeta (Malvern) foi realizada para avaliar o comportamento e a estabilidade coloidal das nanopartículas de lignina com e sem a auxina KAIB. Assim, as amostras de NPsLig e NPsLig+KAIB foram dispersas em meio aquoso e adicionadas em uma célula de medição, com isso foi possível medir a carga superficial das partículas em suspensão, fornecendo dados sobre a repulsão eletrostática entre elas, o que é um indicador importante da estabilidade de dispersões coloidais. Essa análise foi repetida ao longo de 35 dias para averiguar a estabilidade coloidal da formulação,

3.3.5 *Termogravimetria (TG)*

A termogravimetria (SDT Q600 – TA Instruments) foi realizada a fim de determinar a transição de fase das nanopartículas de lignina com e sem a auxina vegetal entre um estado vítreo e um estado mais fluido. Para esta análise as amostras, de aproximadamente 10 mg foram aquecidas até 1000°C de forma controlada e a medição das mudanças em suas propriedades térmicas e mecânicas foram identificadas, assim, foi possível obter informações sobre a estabilidade térmica e a rigidez das nanopartículas.

3.3.6 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise de DSC foi realizada a fim de identificar as temperaturas de transição (como o ponto de fusão e a temperatura de cristalização) e as entalpias associadas aos eventos térmicos das nanopartículas de lignina com e sem a auxina KAIB. Assim, aproximadamente 10 mg das amostras secas foram pesadas e colocadas em um cadinho de alumínio. O equipamento de DSC (SDT Q600 – TA Instruments) foi calibrado e a faixa de temperatura foi definida de 0 a 100 °C. Após a análise, foram registrados os picos endotérmicos e exotérmicos das amostras.

3.4 Eficiência de encapsulação (EE) de KAIB

Para determinar a eficiência de incorporação do KAIB nas NPsLig, foi utilizado o método de ultrafiltração/centrifugação, que consiste em adicionar a nanoformulação em um dispositivo de ultrafiltração constituído de celulose regenerada de 30 KDa (Microcon-Millipore, Amicon) (**Figura 6-I**)³³. Após, a solução filtrada (**Figura 6-II**) foi analisada por espectrofotômetro UV-Vis (UV-1800 Shimadzu) (**Figura 6-III**). Pela membrana, só atravessa a auxina livre, sendo assim, a quantidade de ativo quantificada representa o que não está associado aos nanocarreadores. Assim, por diferença entre o 100 % teórico do KAIB e o não associado é possível quantificar a eficiência de encapsulação do KAIB. Diversos trabalhos empregam essa técnica para determinar a taxa de encapsulação de compostos bioativos em nanopartículas³⁴⁻³⁶.

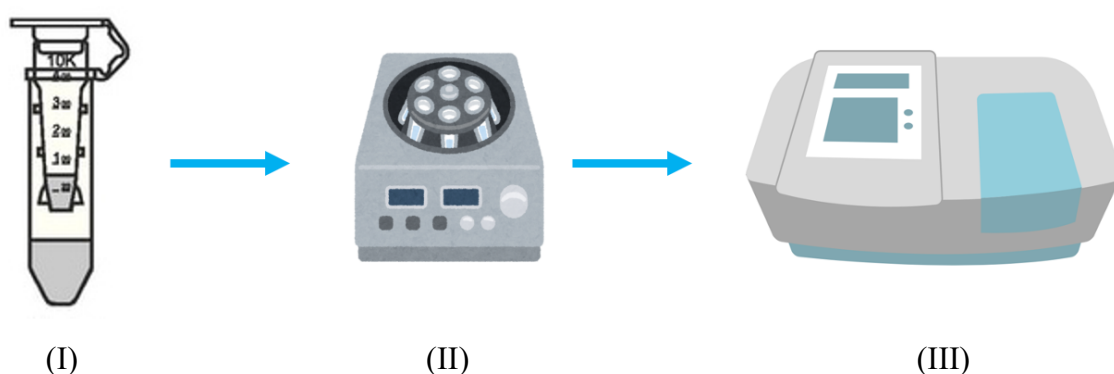


Figura 6. Ilustração da metodologia utilizada para a análise de EE da auxina KAIB.

Fonte: Autoria Própria

3.5 Cinética de liberação *in vitro* da auxina

Para verificar a cinética de liberação da KAIB livre e associada aos nanocarreadores foi utilizado um modelo de dois compartimentos (um compartimento doador e outro receptor), assim como descrito por Grillo *et al.* (2014)³⁷, no qualestes estão unidos por uma membrana de celulose (Spectrapore®, com poro para exclusão molecular de 1 KDa.), a qual permite atravessar por seus poros apenas a auxina livre para o compartimento receptor, enquanto a auxina que está associada às nanopartículas fica retida no compartimento doador (**Figura 7-I**). Assim, foi adicionado 1 mL das formulações de NPsLig + KAIB ou KAIB livre no doador, e 49 mL de água mili-Q (solvente) no receptor.

Alíquotas de 3 mL foram retiradas em intervalos de tempo durante cinco dias e a auxina foi quantificada por espectroscopia no UV-visível no comprimento de onda de 280 nm (**Figura 7-II**), os dados resultantes foram plotados em porcentagem de liberação em função do tempo (min) através do *software* Prisma 9.0 e todo experimento foi realizado em triplicata.

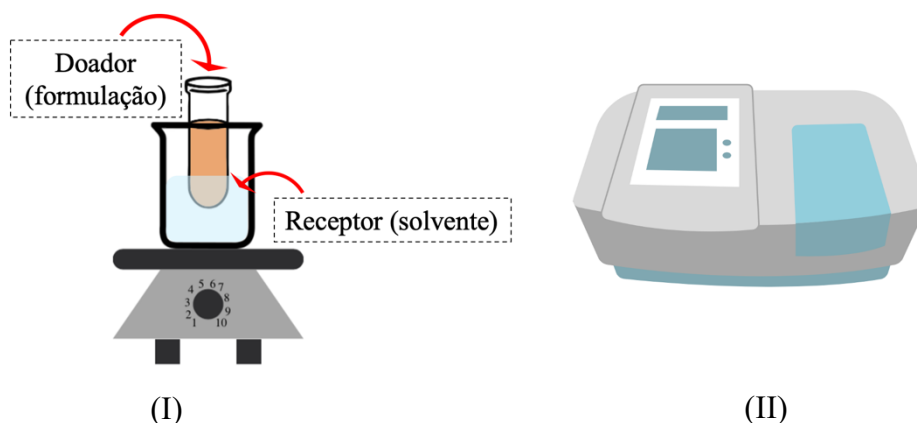


Figura 7. Ilustração da metodologia de cinética de liberação *in vitro* da auxina KAIB pelo modelo de dois compartimentos.

Fonte: Autoria Própria

3.5.1 Modelagem matemática

Os perfis de liberação dos íons de KAIB foram estudados por meio de modelagem matemática, a fim de identificar os mecanismos responsáveis pela liberação desta auxina ligada às NPsLig. Isso também foi realizado para a liberação do KAIB livre para comparar com a liberação da auxina associada às nanopartículas. As curvas de liberação obtidas foram analisadas utilizando o *software* KinetDS 3.0, permitindo a simulação de diversos modelos matemáticos de dissolução (**Tabela 1**), com o intuito de elucidar o perfil dos mecanismos de liberação desses tratamentos.

Tabela 1. Equações matemáticas utilizadas para cada um dos modelos cinéticos para perfil de liberação.

MODELO CINÉTICO	EQUAÇÕES MATEMÁTICAS
ORDEM ZERO	$Q_t = kt$
PRIMEIRA - ORDEM	$Q_t = e^{-kt}$
SEGUNDA - ORDEM	$1/Q_t = kt$
HIXSON - CROWELL	$Q_t = 100 [1 - (1 - kt)^3]$
KORSMEYER - PEPPAS	$Q_t/Q = kt^n$
ELOVICH	$Q_t = k \ln t$

*No qual Q_t é a quantidade de auxina liberada em um determinado tempo t , Q é quantidade de auxina liberada em um tempo infinito, k é a constante de cinética de liberação e n é o expoente de liberação.

3.6 Metodologia de tratamento das sementes e ensaios de eficiência de desenvolvimento

Sementes de alface (*Lactuca sativa* L. cv. Stella - Asteraceae) foram esterilizadas por hipoclorito de sódio (1,25 %) e expostas a diferentes concentrações de KAIB (10, 20 e 40 µg/mL) contendo como tratamento i) nanopartículas com KAIB, ii) nanopartículas sem KAIB, iii) KAIB em solução e iv) água como controle por três horas. Posteriormente, as sementes foram lavadas com água deionizada e secas em temperatura ambiente e em seguida, colocadas em tubos de ensaios contendo o substrato a base de ágar (2 %) e PVA (1 %), utilizando uma estufa de germinação da marca SolidSteel com temperatura de 23°C e fotoperíodo controlado durante 7 dias, sendo 15 horas no escuro e 9 horas no claro (**Figura 8**). Os experimentos foram realizados em triplicatas, utilizando dez sementes para cada tratamento.

Durante o ensaio de exposição, foi analisado o entumescimento final das sementes com intuito de identificar o aumento do volume e ganho de massa das amostras, que pode estar associado à absorção de água e dos *nanoprimings*. Além disso, durante o período de incubação, foi observado a germinação das sementes diariamente a fim de analisar o índice de germinação (%) e o índice de velocidade de germinação (IGV) de cada tratamento ao longo dos dias de acordo com Antunes *et al.* (2024)³⁸.

Após a germinação das sementes e crescimento das plântulas, parâmetros morfológicos (comprimento em centímetro, e massa úmida da raiz e da parte aérea), bem como análise do índice de crescimento de fungos e atividade fotossintética a partir do índice de pigmentos com uso do clorofilômetro (Falker) foram avaliados com o objetivo de compreender o efeito das

nanopartículas no crescimento das sementes/plântulas. Os dados foram plotados utilizando o *software* Graphpad Prisma 9.0.

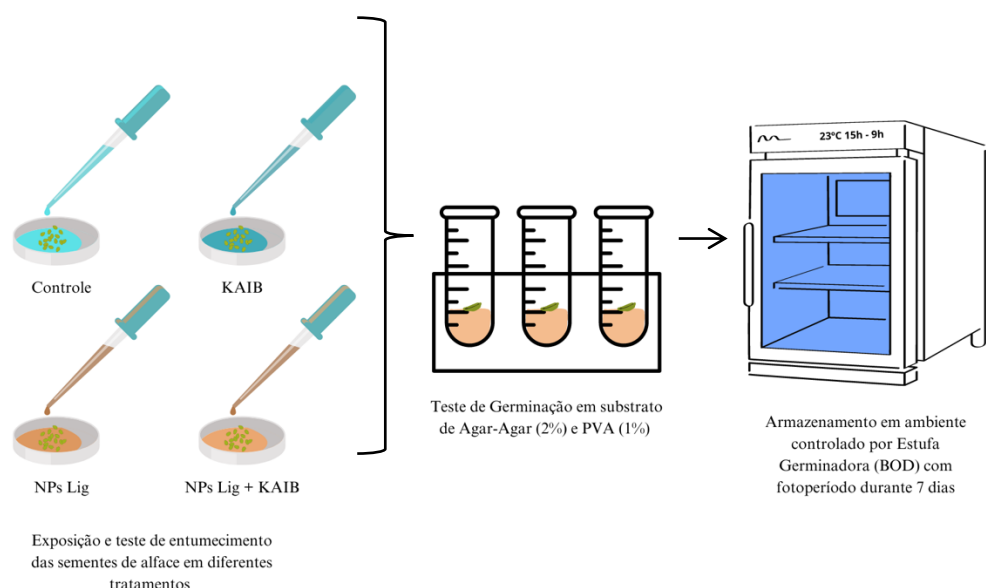


Figura 8. Ilustração da metodologia de exposição das sementes nos diferentes tratamentos (Controle, solução de KAIB, NPs Lig e NPsLig + KAIB), e teste de germinação em ambiente controlado.

Fonte: Autoria Própria

3.7 Testes Enzimáticos

Com intuito de medir o nível de estresse oxidativo e a capacidade de defesa antioxidante das sementes em resposta aos diferentes tratamentos de *nanoprimering* com e sem a auxina, foram realizados testes enzimáticos em sementes de alfaca. Para isso, foi utilizado 1 g de sementes de alfaca após a exposição a quatro tratamentos distintos: (1) *nanoprimering* de lignina com auxina KAIB, (2) *nanoprimering* de lignina sem auxina, (3) apenas auxina KAIB e (4) controle com água por três horas. Após a exposição aos tratamentos, as sementes foram trituradas em tampão de extração de fosfato (pH 7,0), PVP (4%) e nitrogênio líquido, e centrifugadas a 4°C durante 20 minutos para a obtenção do extrato enzimático. A atividade das enzimas antioxidantes foi medida com base na metodologia descrita por Silva Santos (2020)³⁹ com adaptações, assim: a atividade de superóxido dismutase (SOD) foi avaliada pela inibição da auto-oxidação do NBT a 560 nm⁴⁰, e a atividade de peroxidase (POD) foi quantificada pelo uso de H₂O₂ como substrato e monitorada a 470 nm⁴¹.

3.8 Cultura de fungo em placa de Petri

Com intuito de avaliar qualitativamente a interação das formulações utilizadas como *nanopriming* no desenvolvimento de fungos, foram realizados experimentos de crescimento de fungos em placa de petri. Assim, placas de petri esterilizadas receberam solução de Ágar-ágar e após sua gelificação receberam diferentes tratamentos, na concentração de 20 µg/mL, utilizados no ensaio de exposição em sementes, sendo eles: grupo controle apenas com água deionizada, solução de KAIB, NPsLig e NPsLig + KAIB, o experimento foi realizado em triplicata, e deixado nas mesmas condições do ensaio de exposição em sementes, ou seja, em estufa de germinação com temperatura de 23°C e fotoperíodo controlado durante 7 dias, sendo 15 horas no escuro e 9 horas no claro.

3.9 Análises estatísticas

A análise estatística dos resultados foi realizada usando análise de variância (Two-way ANOVA) quando possível, considerando diferenças significantes como $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Morfológico e físico-químico das nanopartículas

Por meio da análise de MEV (**Figura 9 – A e B**) foi possível identificar que as nanopartículas de lignina com e sem KAIB exibiram formato esférico, com um tamanho médio de 123 e 145 nm (**Figura 9 – C e D**), respectivamente, sugerindo que elas possuem um tamanho reduzido como desejado para aplicações em nanotecnologia. O índice de polidispersidade (PDI) das nanopartículas está abaixo de 0,4, o que indica uma distribuição de tamanho relativamente estreita, destacando a uniformidade das nanopartículas. O potencial zeta (PZ) das nanopartículas de lignina com e sem KAIB foi de -31 mV e -35 mV, respectivamente, indicando boa estabilidade coloidal, pois valores de PZ acima de -30 mV sugerem a presença de partículas carregadas que se repelem mutuamente, evitando a agregação¹⁷. Ao longo dos dias as NPsLig se mantiveram estáveis (**Tabela 2**), já as NPsLig + KAIB apresentaram uma pequena variação após 35 dias na distribuição do tamanho e PZ (**Tabela 3**), o que pode estar relacionado com as interações físico-químicas entre o KAIB livre e os nanocarreadores⁴².

Essas propriedades sugerem coletivamente que as nanopartículas de lignina com e sem KAIB possuem tamanho e uniformidade adequados, além de boa estabilidade coloidal para serem utilizadas como *priming* de sementes. Dessa forma, acreditamos que o tamanho pequeno e o elevado potencial zeta negativo das formulações possam favorecer a captação e translocação das substâncias nas sementes e plantas, aumentando sua biodisponibilidade no vegetal^{17,43}, já visto que estudos mostram que NPs carregadas negativamente interagem bem com sementes¹⁷.

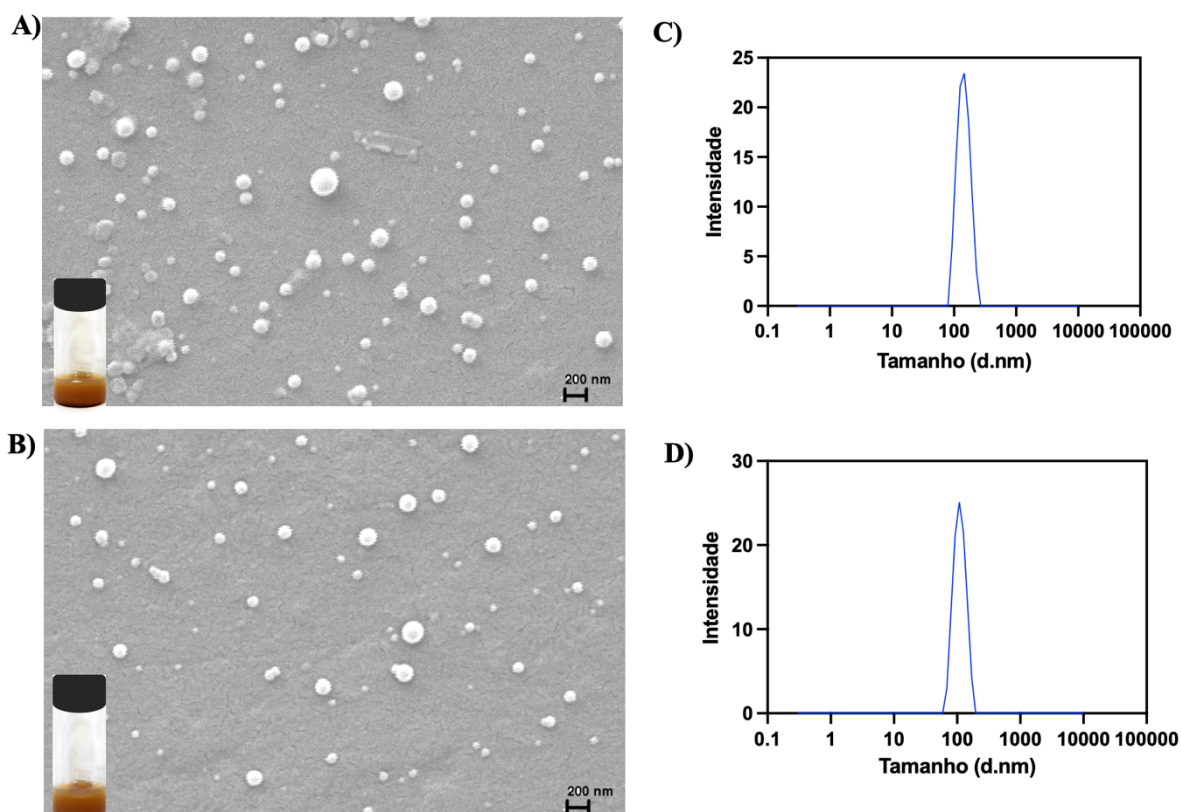


Figura 9. A) Imagem de MEV das NPsLig com gráfico de distribuição de tamanho médio por DLS e imagem da formulação final; B) Imagem de MEV dos NPsLig + KAIB com gráfico de distribuição de tamanho médio por DLS e imagem da formulação final; C) Gráfico de FTIR demonstrando bandas de KAIB, Lignina, NPsLig e NPsLig + KAIB; D) Curva de calibração do KAIB.

Tabela 2: Análise de DLS e Potencial Zeta das Nanopartículas de lignina, com o passar do tempo.

NPs LIG	TAMANHO (nm)	PDI	ZETA (mV)
0 DIAS	145	0,204	-31
15 DIAS	149	0,135	-43

35 DIAS | 151 0,155 -40

Tabela 3: Análise de DLS e Potencial Zeta das Nanopartículas de lignina com auxina KAIB, com o passar do tempo.

NP _s	LIG + TAMANHO	PDI	ZETA
KAIB	(nm)		(mV)
0 DIAS	123	0,302	-35
15 DIAS	123	0,149	-42
35 DIAS	173	0,388	-28

Utilizando a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) bandas características de grupos funcionais presentes na estrutura das nanopartículas de lignina Kraft com e sem o KAIB, da lignina pura, e do KAIB puro foram identificados com base em seus números de onda (**Figura 10**). Por exemplo, as bandas de 1450 a 1600 cm^{-1} , que apresentam múltiplos picos que estão associadas ao estiramento C=C nos anéis aromáticos da lignina, bem como a banda em 1270 cm^{-1} atribuída ao estiramento C-O no grupo funcional alcóxila, que está relacionado à porção guaiacila (G) da lignina⁴⁴. Já os sais de ácidos carbolixílicos como o do KAIB pode ser observado nas bandas de 1406 a 1579 cm^{-1} indicando a banda de C=O⁴⁵.

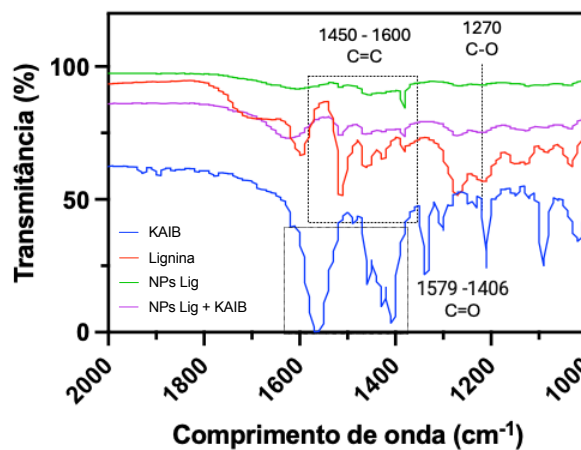


Figura 10. Gráfico de FTIR destacando os grupos funcionais dos elementos utilizados nos nanopriming de lignina com e sem KAIB, utilizados em sementes de *L. sativa* cv. Stella.

Com a análise de TG (**Figura 12 – A e C**) foi possível identificar que as nanopartículas de lignina com e sem auxina começaram a perder massa significativamente na faixa de temperatura entre 200 e 500 °C, com o ponto máximo de perda de massa em cerca de 350 °C.

Isso sugere que as NPsLig e NPsLig+KAIB começaram a decompor-se a partir de temperaturas acima de 200 °C, e que essas nanopartículas têm limite de temperatura de uso abaixo de 350°C, indicando boa estabilidade térmica para este tipo de material orgânico com potencial aplicação na agricultura. O pico da curva DTG em torno de 350°C confirma que a taxa mais alta de decomposição ocorre nesse ponto. Esse comportamento é típico de materiais orgânicos, como a lignina, que possui componentes voláteis e se decompõe com a liberação de gases ou perda de material volátil⁴⁶.

Já com o DSC (**Figura 12 – B e D**) foi possível observar que para ambos os tratamentos (NPsLig com e sem KAIB) as curvas apresentaram uma tendência decrescente, o que pode indicar a presença de um evento endotérmico (absorção de calor)⁴⁷ à medida que a temperatura aumenta. Bem como, provavelmente, após 100°C as curvas podem mudar de direção, e esses pontos podem corresponder às transições de fases específicas desses materiais.

Além disso, há uma pequena perda de massa antes de 200°C (**Figura 11-A e C**), o que pode ser atribuída à evaporação de solventes residuais, como água adsorvida ou componentes voláteis de baixa massa molecular.

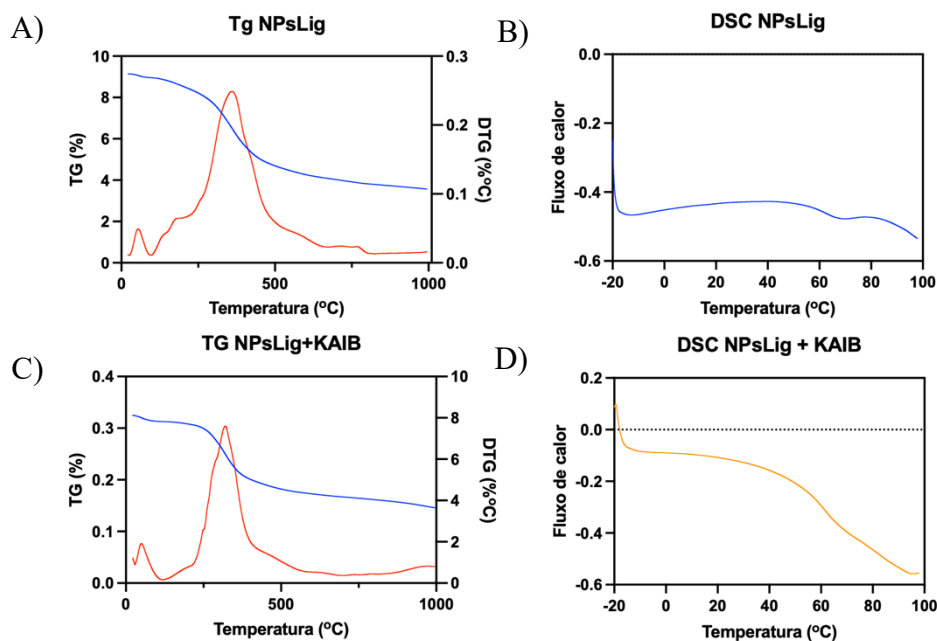


Figura 11. Perfil da análise termogravimétrica das nanopartículas de lignina com e sem auxina KAIB, mostrando a variação de massa (TG) e a taxa de decomposição (DTG) em função da temperatura, sendo: A e B) TG e DSC, respectivamente, das NPsLig, C e D) TG e DSC das NPsLig+KAIB.

4.2 Eficiência de encapsulação (EE) e Teste de liberação *in vitro* do hormônio

Por meio do teste de eficiência de encapsulação foi possível identificar uma eficiência de encapsulação do KAIB nas NPsLig de aproximadamente 33 %. Essa baixa porcentagem de EE pode estar relacionada à alta solubilidade do KAIB em água. Embora as nanoesferas apresentem estruturas mais hidrofílicas, uma parte do KAIB ainda permanece em solução. Entretanto, isto não foi um limitante para o estudo, uma vez que se espera uma ação do KAIB imediata durante as exposições das sementes e uma liberação mais lenta após a internalização das NPs nas sementes. Interessantemente, a liberação do KAIB na formulação de nanopartículas de lignina exibiu um perfil de liberação mais gradual em comparação à liberação do KAIB livre (**Figura 13**), demonstrando uma liberação mais rápida nos primeiros 300 minutos, seguida por uma liberação estável até atingir o 100%. Além disso, a metodologia analítica para a quantificação da auxina KAIB foi obtida por espectrofotometria de UV-Visível, e a equação da reta para obter o valor de concentração do KAIB nas formulações pode ser encontrado na **Figura 11**.

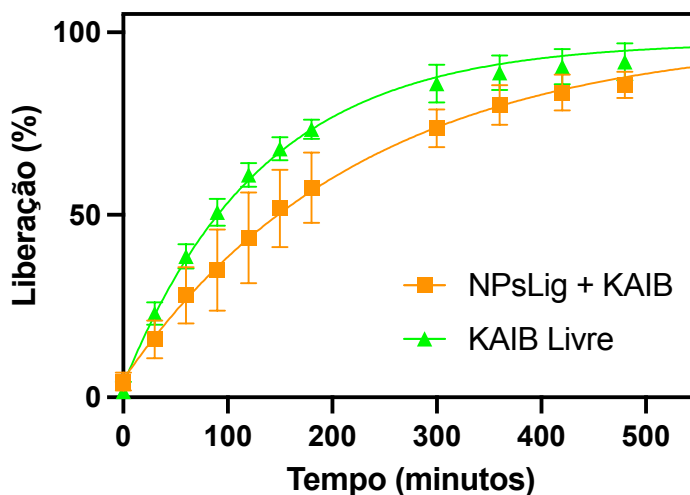


Figura 12. Perfil da porcentagem de liberação de KAIB em NPsLig e livre em função do tempo (minutos).

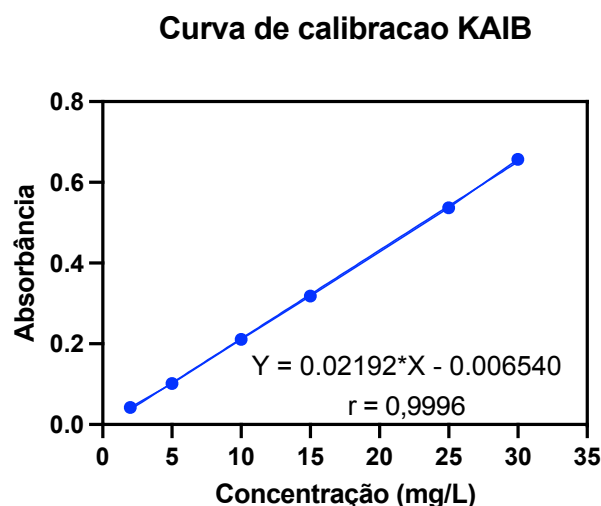


Figura 13. Representação da regressão linear utilizada para identificar a curva de calibração da auxina KAIB.

O uso de lignina como material de encapsulamento sustentável demonstrou propriedades superiores de liberação gradual, podendo proteger o agente ativo da degradação e garantindo uma entrega eficiente ao longo do tempo^{48,49}. Além disso, para ambos os tratamentos foi seguido o modelo matemático de cinética de liberação de ordem 0 por apresentar um coeficiente de correlação r^2 mais próximo de 1 (**Tabela 4**). Seguindo a equação da **Tabela 1**.

Tabela 4. Modelos matemáticos aplicados ao perfil de cinética de liberação da auxina KAIB com seus respectivos R^2 .

MODELO CINÉTICO	KAIB	NPSLIG + KAIB
ORDEM ZERO	0,9836	0,9869
PRIMEIRA-ORDEM	0,7873	0,8095
SEGUNDA-ORDEM	0,6325	0,5487
HIXSON-CROWELL	0,8692	0,8935
KORSMEYER-PEPPAS	0,9691	0,8198
ELOVICH	0,7437	0,5147

Assim, com os dados de concentração em função do tempo, a análise revelou um bom ajuste linear para ambos os conjuntos de dados. A constante de velocidade de liberação k_0 foi

determinada a partir da inclinação da linha de ajuste, usando a equação de cinética de ordem zero:

$$Q_t = Q_0 - k_0 \cdot t$$

No qual Q_t é a concentração do composto no tempo t , Q_0 é a concentração inicial, e k_0 representa a constante de liberação (mg/L.min).

O modelo de ordem zero é utilizado para descrever a liberação gradual de ingredientes ativos⁴⁹. Com isso, a constante de liberação é determinada pela inclinação do gráfico (**Figura 14**), enquanto o coeficiente de correlação indica se a liberação do ingrediente ativo segue a cinética de ordem zero⁵⁰.

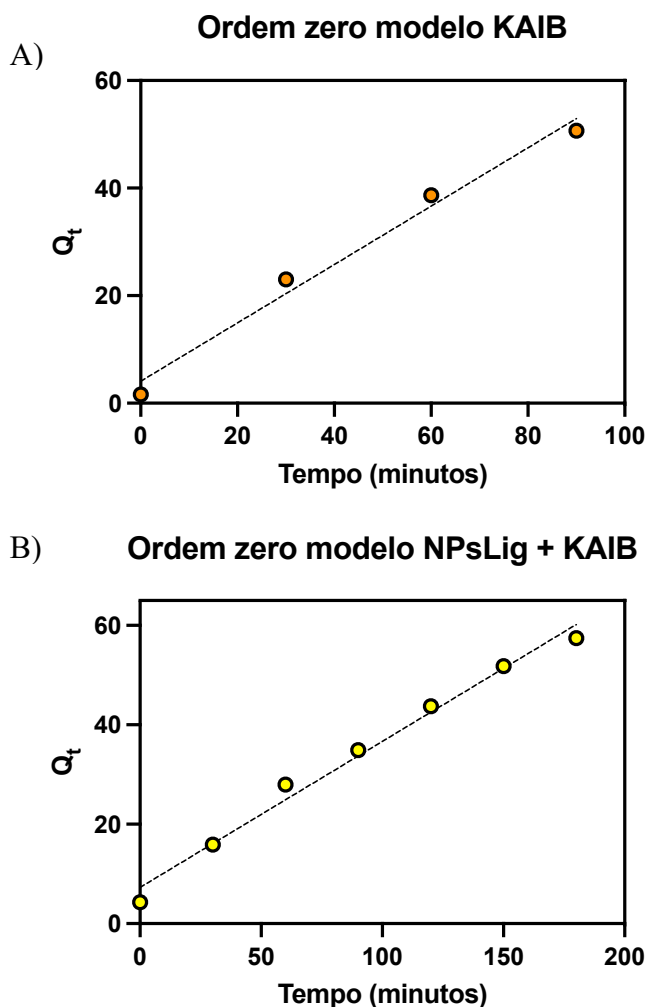


Figura 14. Modelagem matemática de ordem zero para os tratamentos de KAIB (A) e NPsLig + KAIB (B)

Tabela 5. Valores obtidos partir das curvas de cinética de liberação dos tratamentos de KAIB livre e associados a NPsLig + KAIB para a constante de liberação k e equação da reta.

	KAIB	NPSLIG + KAIB
Constante de liberação (k)	0,543	0,294
Equação da reta	$Y = 0,5426 \cdot X + 4,085$	$Y = 0,2939 \cdot X + 7,274$

Esses resultados sugerem que, em ambos os casos, a liberação do composto é independente da concentração remanescente, ocorrendo a uma taxa constante. No entanto, a diferença nas taxas de liberação entre os dois sistemas (**Tabela 5**) pode estar relacionada às interações entre os componentes, que influenciam a velocidade de liberação.

4.3 NPs como *priming* de sementes de alface

4.3.1 Avaliação do teste de entumescimento e germinação de sementes

O entumescimento é um processo importante no início da germinação das sementes. O aumento de massa está diretamente relacionado à absorção de água, que ativa as reações bioquímicas necessárias para a germinação. Esse processo hidrata o embrião, desperta as enzimas, e dissolve reservas nutritivas que serão usadas para o crescimento inicial⁵¹, e é neste processo que as nanopartículas adentram o tegumento das sementes. Assim, com o teste de entumescimento foi possível identificar o aumento da massa das sementes em mais de 100% em quase todos os tratamentos e suas respectivas concentrações (**Figura 15**).

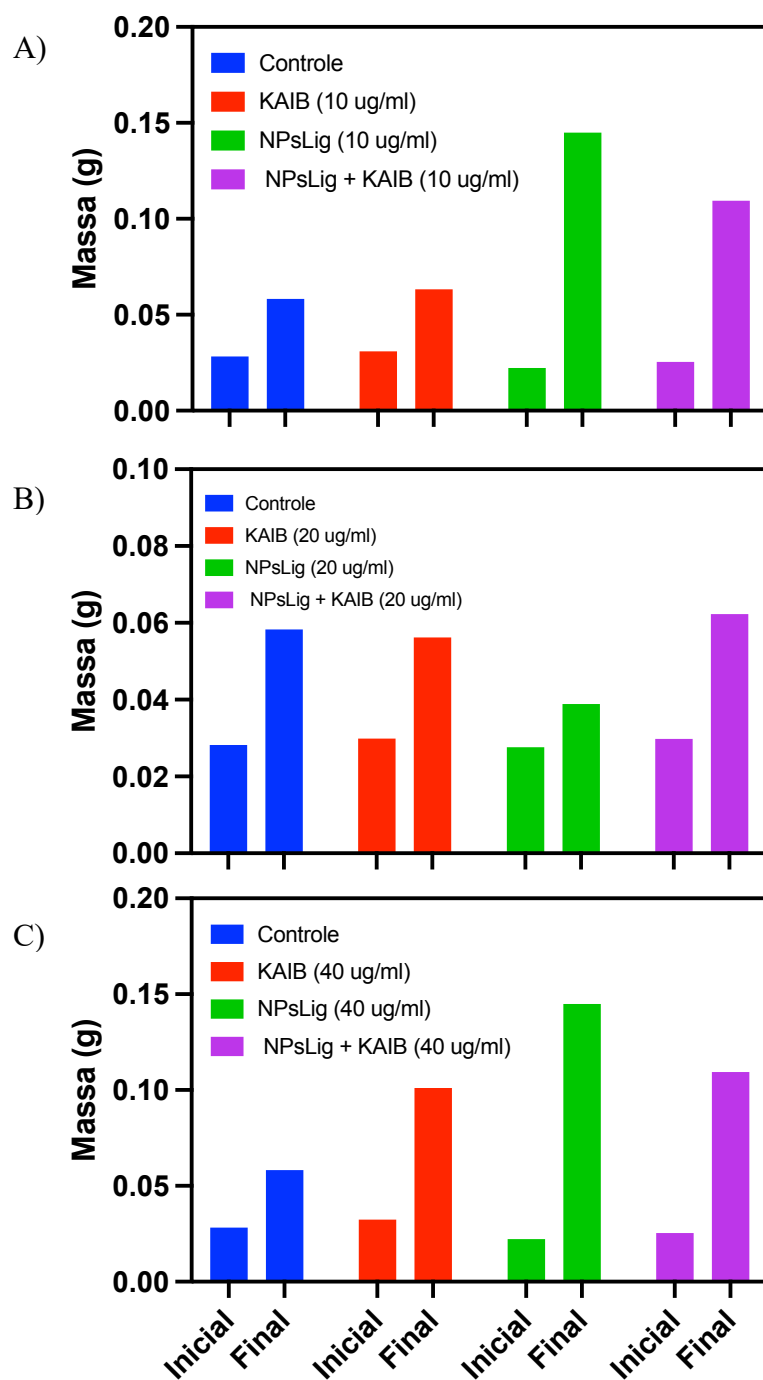


Figura 15. Quantificação do aumento de massa (g) através do teste de entumescimento de sementes antes e após a exposição dos diferentes tratamentos em diferentes concentrações, sendo: 10 µg/mL (A), 20 µg/mL (B) e 40 µg/mL (C).

Ademais, com o teste de germinação (**Figura 16**) foi possível observar que o grupo controle tem uma germinação mais uniforme e rápida comparada com os demais tratamentos, atingindo 100% da germinação mais rapidamente, e o tratamento com KAIB e NPsLig + KAIB,

em concentração mais alta (40 µg/mL) (**Figura 16 – C**), têm uma germinação mais demorada e não atingem 100%.

Esses dados se confirmam com o índice de velocidade de germinação (%) (**Tabela 6**), o qual é possível identificar que o grupo controle obteve um maior índice deste parâmetro em relação aos demais tratamentos. Além disso, é evidente uma estabilidade desta medida mais uniforme nos grupos controle e NPsLig, em relação aos tratamentos de KAIB e NPsLig + KAIB, o qual é notório uma queda acentuada do IGV conforme o aumento da concentração devido ao efeito tóxico da auxina em concentrações elevadas²⁶.

No entanto, os grupos tratados com NPsLig e NPsLig + KAIB (**Figura 16 – A e B**) que apresentaram uma germinação mais lenta em relação ao grupo controle, mas que resultam em plântulas que crescem mais em relação aos demais grupos, podem indicar um fenômeno relacionado à modulação do ajuste fisiológico das sementes. Ou seja, o atraso na germinação pode ser um reflexo de mudanças metabólicas mais intensas ou de um ajuste às condições químicas diferentes. As nanopartículas de lignina e o KAIB podem estar induzindo processos de reorganização celular, ajuste de metabolismo ou outros mecanismos de defesa que recondicionam o embrião. Estas alterações quando em nível inferior aos danos permanentes ou injúrias crônicas, podem resultar num crescimento mais vigoroso da plântula⁵². Por exemplo, Li *et al.* (2022)⁵³ sugerem que o atraso na germinação devido aos tratamentos pode melhorar o preparo fisiológico, levando a um melhor crescimento das plântulas por meio de ajustes metabólicos e mecanismos de defesa após a germinação, uma vez que o atraso na germinação 1 (DOG1) desta pesquisa desempenha um papel significativo na integração dos sinais fitohormonais, como o das giberelinas e ácido abscísico (ABA), afetando a dormência e potencialmente influenciando as vias metabólicas que preparam as sementes para a germinação.

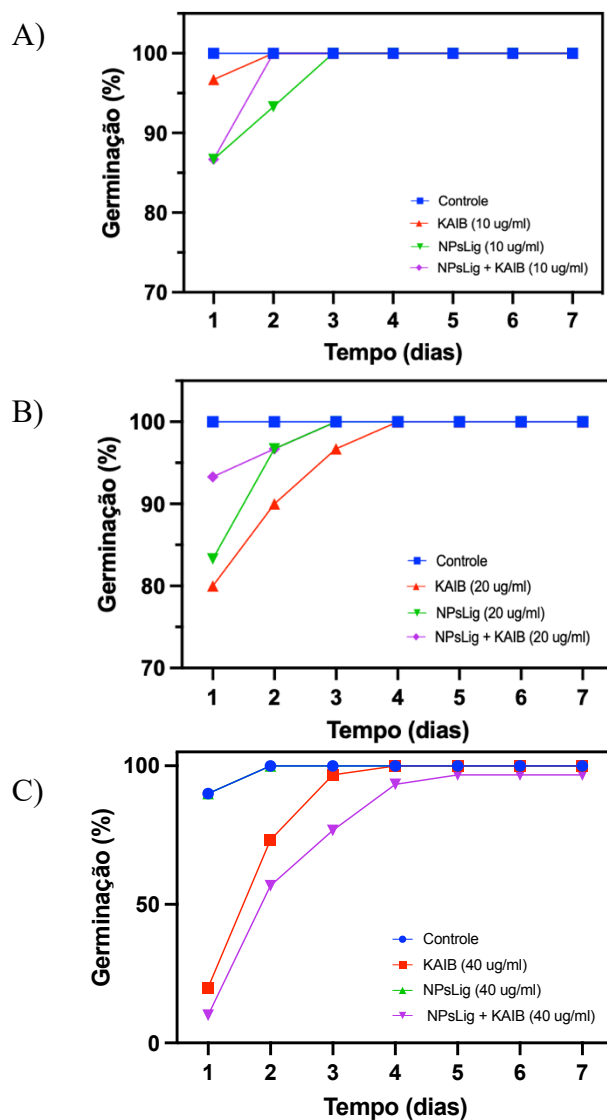


Figura 16. Quantificação da porcentagem de germinação de sementes em diferentes tratamentos e concentrações, sendo: 10 µg/mL (A), 20 µg/mL (B) e 40 µg/mL (C), ao longo de 7 dias.

Tabela 6. Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes submetidas a diferentes tratamentos (Controle, KAIB, NPsLig e NPsLig + KAIB) em três concentrações (10 µg/mL, 20 µg/mL e 40 µg/mL).

IGV	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml
CONTROLE	77,79	77,79	74,79
KAIB	76,79	69,62	49,45
NPSLIG	72,79	72,29	74,79
NPSLIG + KAIB	73,79	75,29	40,94

4.3.2 Avaliação do Tamanho e massa úmida das plântulas

As sementes, após exposição às nanopartículas, foram germinadas por 07 dias, permitindo observar o desenvolvimento de cada grupo experimental na **Figura 17**. As análises de tamanho das plântulas (**Figura 18 – A, B e C**) revelaram que os tratamentos com nanopartículas de lignina combinadas com a auxina KAIB nas concentrações de 10 e 20 µg/mL promoveram um crescimento radicular significativo em comparação com o grupo controle. Este maior crescimento pode estar associado à ação das nanopartículas de lignina e a auxina, uma vez que esses resultados sugerem coletivamente que a aplicação de nanopartículas de lignina, especialmente em combinação com hormônio vegetal, pode estimular o crescimento das raízes em plantas de alface em pequenas concentrações de formulação, oferecendo uma abordagem promissora para melhorar o desenvolvimento da planta e a absorção de nutrientes²⁶.



Figura 17. Imagem das plântulas de alface após o ensaio de exposição em sementes nos tratamentos de 10 µg/mL (A); 20 µg/mL (B) e 40 µg/mL (C) em diferentes tratamentos.

No entanto, na concentração de 40 µg/mL tanto a NPsLig + KAIB quanto a solução de KAIB livre (**Figura 18 – C**) obtiveram um menor crescimento de raiz em relação ao grupo

controle, o que pode estar associado a um excesso de hormônio na planta, prejudicando seu desenvolvimento, já que altas concentrações da auxina pode atuar como herbicidas²⁶. Já a NPsLig demonstrou crescimento significativo de raiz em todas as concentrações e maior crescimento de parte aérea na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$, uma vez que a lignina pode promover um melhor desenvolvimento da semente através de aprimoração nas respostas metabólicas da planta desde a sua germinação¹⁸. No entanto, existem diferenças estatísticas para o tratamento em relação ao NPsLig e NPsLig + KAIB nas medidas de 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 18 – A e B**), indicando que baixas concentrações do *nanopriming* com auxina vegetal podem ser mais vantajosas já que demonstram maior crescimento da plântula, reduzem custos de insumo e podem beneficiar mais o meio ambiente.

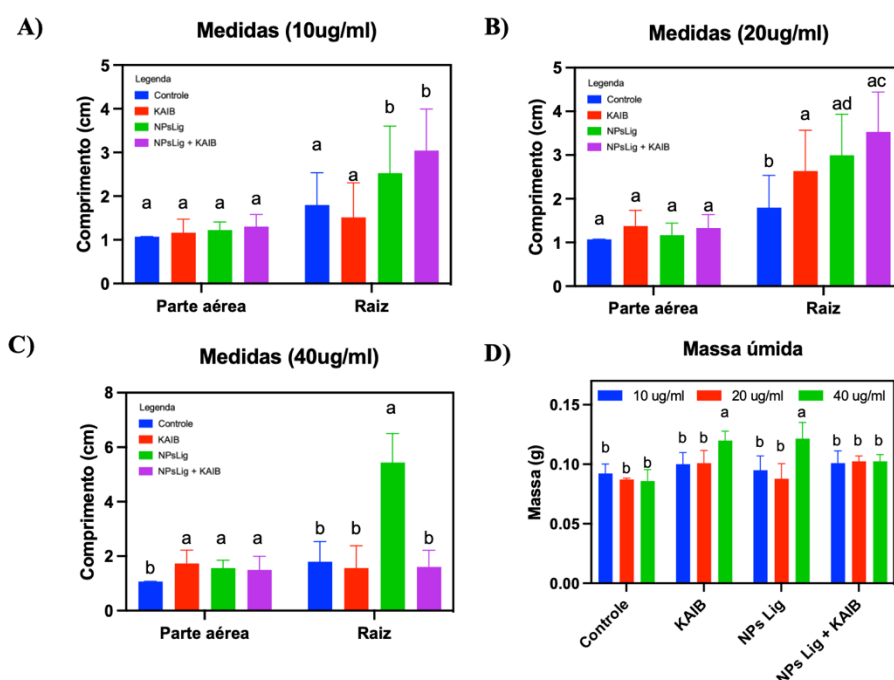


Figura 18. Quantificação das medidas da parte aérea e raiz após o ensaio de exposição em sementes em diferentes tratamentos e concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$ (A), 20 $\mu\text{g/mL}$ (B) e 40 $\mu\text{g/mL}$ (C); D) Quantificação da massa úmida após o ensaio de exposição em sementes em diferentes tratamentos e concentrações. Letras distintas (a e b) indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) comparando os tratamentos em relação ao grupo controle, c e d comparação entre os grupos NPsLig e NPsLig +KAIB, ambos para cada concentração conforme análise estatística.

A quantificação de massa úmida (**Figura 18 - D**) está relacionada com o crescimento de plantas, no qual as plantas que obtiveram maior desenvolvimento de parte aérea e raiz, também obtiveram maior índice de massa úmida, principalmente para 40 µg/mL.

4.3.3 Avaliação do teste enzimático

Os testes enzimáticos foram feitos a fim de obter dados sobre o estresse que os tratamentos utilizados podem causar nas plantas de alface e como isso pode afetar seu desenvolvimento. A inibição da dismutase indica uma menor capacidade de neutralizar os radicais livres, expondo o vegetal ao estresse oxidativo. O que pode ser prejudicial ao metabolismo celular, retardando o crescimento e comprometendo a viabilidade das sementes em níveis muito elevados, especialmente em condições de estresse ambiental. Em condições ou processos capazes de elevar as espécies reativas de oxigênio (ROS), como durante a germinação, a falta de atividade adequada da SOD pode ser fatal para o desenvolvimento inicial da planta⁵⁴.

Assim, os dados referentes à dismutase (**Figura 19 – A**) sugerem que o tratamento com KAIB sozinho não parece ter um impacto tão grande na atividade desta enzima em relação ao controle. Já as nanopartículas com lignina reduzem mais significativamente a atividade enzimática, sugerindo uma interferência mais forte. Assim como o tratamento de NPsLig + KAIB parece causar a maior redução na atividade enzimática, indicando uma possível interação entre o KAIB e as nanopartículas de lignina que leva a uma inibição ainda maior da dismutase.

A peroxidase é uma enzima que ajuda a decompor o peróxido de hidrogênio em água, protegendo as células contra os efeitos prejudiciais das ROS. Quando a atividade da peroxidase aumenta, isso significa que a planta está respondendo ao aumento de ROS e tentando neutralizá-las para evitar danos maiores⁵⁵. Os dados referentes à peroxidase (**Figura 19 – B**) sugerem que os tratamentos com NPsLig e NPsLig + KAIB induzem estresse oxidativo considerável nas sementes, levando a uma maior ativação da enzima peroxidase para lidar com o aumento na produção de peróxido de hidrogênio. O KAIB sozinho também aumenta a atividade da peroxidase, mas em um nível mais modesto. A combinação de nanopartículas e KAIB parece não aumentar mais a atividade antioxidante em relação às nanopartículas sozinhas, indicando um efeito similar no combate ao estresse oxidativo.

No entanto, com os tratamentos de NPsLig e NPsLig + KAIB foram aqueles nos quais se verificou um maior crescimento de raiz em relação ao grupo controle. Assim, esses dados sugerem que em baixas concentrações desses tratamentos, o estresse oxidativo pode servir

como um sinalizador que ativa as defesas da planta, preparando-a para resistir a estresses futuros. Sendo o processo de "*priming*", um processo em que a planta é "preparada" para lidar melhor com o estresse⁵⁶⁻⁵⁹. Logo, nesse interim pode ser inferido que este processo ocorreu de forma eficiente.

Segundo BAI, Bing *et al.* (2023)⁵⁹ o ROS em sementes são moléculas de sinalização importantes para quebrar a dormência das sementes, enquanto o acúmulo excessivo de ROS pode desencadear processos de envelhecimento que levam à deterioração e morte das sementes. Portanto, sugere-se que este aumento de tamanho nas plântulas pode estar relacionado a um maior estresse no processo de germinação quando em presença de NPs, o que parece interessante, visto que, após a germinação, a plântula encontrará nutrientes e se desenvolverá.

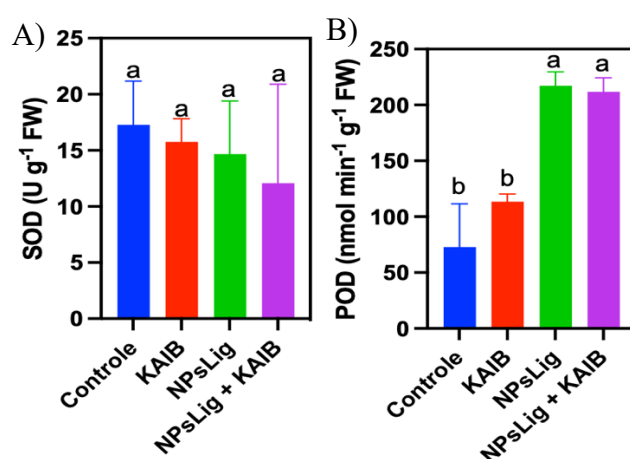


Figura 19. Quantificação das análises de dismutase (A) e peroxidase (B) em sementes após o ensaio de exposição em diferentes tratamentos e concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$. Letras distintas (a e b) indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) comparando os tratamentos em relação ao grupo controle, conforme análise estatística.

4.3.4 Índice de clorofila das plântulas

Os tratamentos que receberam nanopartículas de lignina com e sem KAIB obtiveram um índice de clorofila total significativamente maior em relação aos que não receberam este tratamento (**Figura 20-A**). Ter um índice de clorofila mais alto em plantas tratadas com nanopartículas de lignina pode indicar maior capacidade fotossintética e saúde geral da planta. Estudos mostraram que nanopartículas de lignina, como micropartículas de lignina nanoestruturadas (LNP) e nanopartículas de carbono carregadas de lignina (L-CNPs), influenciam positivamente o conteúdo de pigmentos nas plantas, levando ao aumento dos níveis

de carotenóides e antocianinas⁶⁰. Descobriu-se que estes tipos de nanopartículas estimulam respostas biológicas benéficas no milho, promovendo o crescimento, o desenvolvimento e a atividade antioxidante em mudas quando aplicadas em dosagens apropriadas^{18,60}. Além disso, a presença de nanopartículas à base de lignina tem sido associada à melhoria dos pigmentos de clorofila (a, b) e carotenóides nas plantas, contribuindo para o aumento do crescimento vegetal e da maquinaria fotossintética⁶⁰. Portanto, um índice de clorofila mais alto resultante dos tratamentos de nanopartículas de lignina significa uma planta mais saudável e robusta com capacidade fotossintética aprimorada.

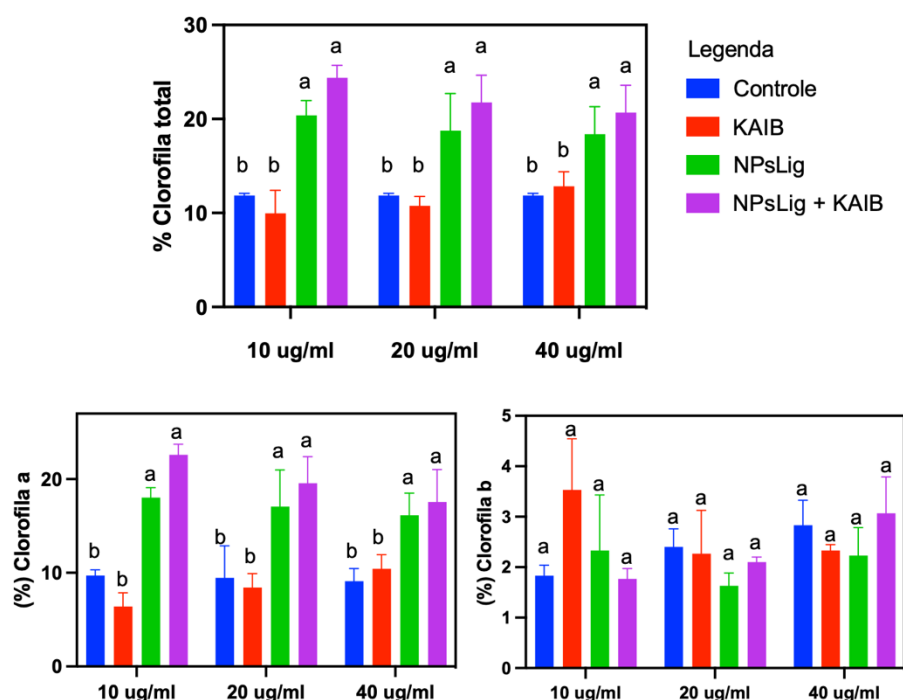


Figura 20. Índice de clorofilas totais, a e b após o ensaio de exposição em sementes em diferentes tratamentos e concentrações. Letras distintas (a e b) indicam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) comparando os tratamentos em relação ao grupo controle para cada concentração, conforme análise estatística.

4.4 Atividade fúngicas

Pesquisas indicam que estruturas relacionadas à lignina contendo unidades de guaiacila e p-hidroxifenila exibem propriedades antifúngicas, com carbonila e ligações duplas conjugadas aumentando a inibição do crescimento fúngico⁶¹. Bem como, a lignina demonstra multifuncionalidade como fotocatalisador, participando de reações químicas redox que geram H_2O_2 e podem contribuir para inibir o crescimento de fungos em sementes⁶¹. Assim, as

Além dos efeitos na germinação das sementes, NPs de lignina inibiram o crescimento de fungos em sementes, uma vez que foi possível observar um menor crescimento de fungos no substrato das plantas de alface que receberam tratamento com a nanopartículas de lignina com e sem KAIB (**Figura 21-A**). Atrelado a isto, ensaio de crescimento de fungos em placa de Petri evidenciaram a incidência no crescimento de fungos (**Figura 21-B**).

A)

Controle KAIB

NPs Lig NPs Lig + KAIB

B)

% fungos em cada tratamento

Treatment	% fungos em cada tratamento	Significance
Controle	~75	a
KAIB (20 ug/ml)	~75	a
NPsLig (20 ug/ml)	~48	c
NPsLig + KAIB (20 ug/ml)	~55	b

● Controle
■ KAIB (20 ug/ml)
▲ NPsLig (20 ug/ml)
▼ NPsLig + KAIB (20 ug/ml)

5. CONCLUSÃO

31

sementes. As NPsLig, tanto com quanto sem KAIB, apresentaram estrutura esférica e tamanhos em nanoescala (123 nm e 145 nm, respectivamente) com uma distribuição de tamanho uniforme e boa estabilidade coloidal, com baixa dispersividade e elevado potencial zeta. Essas características são favoráveis para sua aplicação em nanotecnologia agrícola, pois podem facilitar a absorção e translocação de nutrientes e agroquímicos nas plantas, aumentando sua eficácia. Embora a eficiência de encapsulação do KAIB nas NPsLig tenha sido relativamente baixa (cerca de 33 %), o perfil de liberação do KAIB encapsulado foi mais lento em relação ao KAIB não associado às NPs. Isso indica que, com melhorias na técnica de encapsulação, as NPsLig podem se tornar veículos ainda mais eficazes para a liberação gradual de hormônios vegetais, protegendo os compostos ativos de degradação prematura e garantindo sua disponibilização ao longo do tempo.

Na aplicação prática em sementes de alface, as NPsLig combinadas com KAIB promoveram um crescimento radicular significativo e aumentaram o índice de clorofila das plantas, indicando uma melhora na capacidade fotossintética e na saúde geral das plantas. Bem como, a aplicação de NPsLig + KAIB demonstrou que mesmo em concentrações reduzidas (10 e 20 $\mu\text{g/mL}$) é possível obter aumentos significativos no crescimento radicular em comparação aos outros grupos de tratamentos. Essa eficiência em doses baixas pode ser mais benéfica tanto para os produtores quanto para o meio ambiente. Do ponto de vista do produtor, o uso de nanopartículas em doses menores reduz os custos com insumos agrícolas, já que a menor quantidade aplicada pode implicar em resultados otimizados, aumentando a produtividade sem a necessidade de altas concentrações de fertilizantes ou hormônios. Isso também pode facilitar a adoção dessa tecnologia por pequenos agricultores, que podem obter benefícios econômicos e operacionais significativos com a redução da dependência de insumos convencionais.

Além disso, as NPsLig com e sem a auxina vegetal demonstraram propriedades antifúngicas eficazes, reduzindo o crescimento de fungos nas sementes tratadas. Isso sugere que as NPsLig podem não apenas promover o crescimento das plantas, mas também protegê-las contra patógenos.

Inferese, portanto, que as propriedades de liberação gradual da NPsLig + KAIB, estabilidade física e química, e eficácia prática em promover o crescimento e proteger as plantas indicam que, com otimizações adicionais, este material pode oferecer uma abordagem inovadora e sustentável para a agricultura moderna.

6. REFERÊNCIAS

1. Kandhol, N., Singh, V. P., Ramawat, N., Prasad, R., Chauhan, D. K., Sharma, S., Grillo, R., Sahi, S., Peralta Vide, J., & Tripathi, D. K. (2022). Nano-priming: Impression on the beginner of plant life. *Plant Stress*, 5, 100091.
2. Grillo, R., Mattos, B. D., Antunes, D. R., Forini, M. M., Monikh, F. A., & Rojas, O. J. (2021). Foliage adhesion and interactions with particulate delivery systems for plant nanobionics and intelligent agriculture. *Nano Today*, 37, 101078.
3. ONU, Organização das Nações Unidas. População mundial chegará a 8 bilhões em novembro de 2022. **Nações Unidas Brasil**, 2022. Disponível em <https://brasil.un.org/pt-br/189756-populacao-mundialchegara-8-bilhoes-em-novembro-de-2022>. Acesso em 15 de janeiro de 2023.
4. Ferreira, T. C., & Perez-Marin, A. M. (2022). Priming em sementes: uma revisão bibliográfica concisa e atualizada. *BIOFIX Scientific Journal*, v. 7, n. 1, p. 27-36.
5. Rhaman, M. S., Imran, S., Rauf, F., Khatun, M., Baskin, C. C., Murata, Y., & Hasanuzzaman, M. (2020). Seed priming with phytohormones: An effective approach for the mitigation of abiotic stress. *Plants*, 10(1), 37.
6. Devika, O. S., Singh, S., Sarkar, D., Barnwal, P., Suman, J., & Rakshit, A. (2021). Seed priming: a potential supplement in integrated resource management under fragile intensive ecosystems. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 654001.
7. do Espirito Santo Pereira, A., Caixeta Oliveira, H., Fernandes Fraceto, L., & Santaella, C. (2021). Nanotechnology Potential in Seed Priming for Sustainable Agriculture. *Nanomaterials*, 11(2), 267.
8. Shukla, P., Chaurasia, P., Younis, K., Qadri, O. S., Faridi, S. A., & Srivastava, G. (2019). Nanotechnology in sustainable agriculture: studies from seed priming to post-harvest management. *Nanotechnology for Environmental Engineering*, 4(1).
9. Grillo, R., Fraceto, L. F., Amorim, M. J., Scott-Fordsmand, J. J., Schoonjans, R., & Chaudhry, Q. (2021). Ecotoxicological and regulatory aspects of environmental sustainability of nanopesticides. *Journal of Hazardous Materials*, 404, 124148.
10. Rifna, E. J., Ramanan, K. R., & Mahendran, R. (2019). Emerging technology applications for improving seed germination. *Trends in Food Science & Technology*, 86, 95-108.
11. Guha, T., Mukherjee, A., & Kundu, R. (2021). Nano-scale zero valent iron (nZVI) priming enhances yield, alters mineral distribution and grain nutrient content of *Oryza sativa* L. cv. Gobindobhog: a field study. *Journal of plant growth regulation*, 1-24.

12. Afzal, S., Sharma, D., & Singh, N. K. (2021). Eco-friendly synthesis of phytochemical-capped iron oxide nanoparticles as nano-priming agent for boosting seed germination in rice (*Oryza sativa* L.). *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 40275-40287.
13. Asha, A. B., & Narain, R. (2020, January 1). *Chapter 15 - Nanomaterials properties* (R. Narain, Ed.). ScienceDirect; Elsevier.
14. Shukla, P., Chaurasia, P., Younis, K., Qadri, O. S., Faridi, S. A., & Srivastava, G. (2019). Nanotechnology in sustainable agriculture: studies from seed priming to post-harvest management. *Nanotechnology for Environmental Engineering*, 4(1).
15. Lima, P. H. C., Antunes, D. R., Forini, M. M. L., Pontes, M. S., Mattos, B. D., Grillo, R. (2021). Recent advances on lignocellulosic-based nanopesticides for agricultural applications. *Frontiers in Nanotechnology*, v. 3, p. 809329, 2021.
16. Fraceto, L. F., Grillo, R., de Medeiros, G. A., Scognamiglio, V., Rea, G., & Bartolucci, C. (2016). Nanotechnology in agriculture: which innovation potential does it have?. *Frontiers in Environmental Science*, 4, 186737.
17. Santo Pereira, A. D. E., de Oliveira, J. L., Savassa, S. M., Rogerio, C. B., de Medeiros, G. A., & Fraceto, L. F. (2022). Lignin nanoparticles: New insights for a sustainable agriculture. *Journal of Cleaner Production*, 345, 131145.
18. Del Buono, D., Luzi, F., & Puglia, D. (2021). Lignin nanoparticles: A promising tool to improve maize physiological, biochemical, and chemical traits. *Nanomaterials*, 11(4), 846.
19. Wang, S., Yeh, Y., Sridhar, K., & Tsai, P. (2022). Effect of stress on germination of dajulis (*Chenopodium formosanum* Koidz.) sprouts: a natural alternative to enhance the betacyanin and phenolic compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(11), 4561–4569.
20. Yousif, L., Al-Hazmi, N. E., & Naguib, D. M. (2024). Rhizobacteria-priming improves common bean seeds germination under different abiotic stresses through improving hydrolysis and antioxidant enzymes kinetics parameters. *Rhizosphere*, 29, 100842–100842.
21. Yadav, N., Monika, Kumar, A., Kumar, N., Mamta, Heena, Kumar, S., & Arya, S. (2022). *Impacts on Plant Growth and Development Under Stress*.
22. Zhang, P., Jiang, Y., Schwab, F., Fazel Abdolapur Monikh, Grillo, R., White, J. C., Guo, Z., & Lynch, I. (2024). Strategies for Enhancing Plant Immunity and Resilience Using Nanomaterials for Sustainable Agriculture. *Environmental Science & Technology*, 58(21), 9051–9060.
23. Khadr, A., Wang, G. L., Wang, Y. H., Zhang, R. R., Wang, X. R., Xu, Z. S., Tian, Y. S., & Xiong, A. S. (2020). Effects of auxin (indole-3-butyric acid) on growth characteristics,

- lignification, and expression profiles of genes involved in lignin biosynthesis in carrot taproot. *PeerJ*, 8, e10492.
24. Lesmes-Vesga, R. A., Chaparro, J. X., Sarkhosh, A., Ritenour, M. A., Cano, L. M., & Rossi, L. (2021). Effect of Propagation Systems and Indole-3-Butyric Acid Potassium Salt (K-IBA) Concentrations on the Propagation of Peach Rootstocks by Stem Cuttings. *Plants*, 10(6), 1151.
 25. Johnson, E. P., Preece, J. E., Aradhya, M., & Gradziel, T. (2020). Rooting response of *Prunus* wild relative semi-hardwood cuttings to indole-3-butyric acid potassium salt (KIBA). *Scientia Horticulturae*, 263, 109144.
 26. Butova, V. V., Bauer, T. V., Polyakov, V. A., & Minkina, T. M. (2023). Advances in nanoparticle and organic formulations for prolonged controlled release of auxins. *Plant Physiology and Biochemistry*, 201, 107808.
 27. Wei, J., Zhang, Q., Zhang, Y., Yang, L., Zeng, Z., Zhou, Y., & Chen, B. (2024). Advance in the Thermoinhibition of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Seed Germination. *Plants*, 13(15), 2051–2051.
 28. Zhou, W., Yang, T., Zeng, L., Chen, J., Wang, Y., Guo, X., You, L., Liu, Y., Du, W., Yang, F., Hua, C., Cai, J., Hintum, T. van, Liu, H., Gu, Y., Wei, X., & Wei, T. (2024). LettuceDB: an integrated multi-omics database for cultivated lettuce. *Database*, 2024.
 29. Wu, H., Wan, X., Niu, J., Xu, H., Zhang, Y., Xue, X., Li, Y., Li, Q., Lu, T., Yu, H., & Jiang, W. (2023). Enhancing lettuce yield via Cu/Fe-layered double hydroxide nanoparticles spraying. *Journal of Nanobiotechnology*, 21(1).
 30. Khaled, Alghuthaymi, M. A., Mayada Mahdy, Mekkawy, S. A., Hassan, M. N., Ibrahim, A. A., & Tawfik, E. (2023). *Advances in Lettuce (Lactuca spp.) Molecular Breeding Strategies*. 251–277.
 31. Liu, R., Zhang, H., & Lal, R. (2016). Effects of Stabilized Nanoparticles of Copper, Zinc, Manganese, and Iron Oxides in Low Concentrations on Lettuce (*Lactuca sativa*) Seed Germination: Nanotoxicants or Nanonutrients? *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(1).
 32. Dai, L., Liu, R., Hu, L. Q., Zou, Z. F., & Si, C. L. (2017). Lignin nanoparticle as a novel green carrier for the efficient delivery of resveratrol. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(9), 8241–8249.
 33. López-Cabeza, R., Kah, M., Grillo, R., Bílková, Z., & Hofman, J. (2021). Is centrifugal ultrafiltration a robust method for determining encapsulation efficiency of pesticide nanoformulations? *Nanoscale*, 13(10), 5410–5418.
 34. Grillo, R., Pereira, A., Caroline Sayuri Nishisaka, Renata de Lima, Oehlke, K., Greiner, R., & Leonardo Fernandes Fraceto. (2014). *Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles loaded with paraquat herbicide: An environmentally safer alternative for weed control*. 278, 163–171.

35. Grillo, R., Santos, Cintia Rodrigues Maruyama, André Henrique Rosa, Renata de Lima, & Leonardo Fernandes Fraceto. (2012). *Poly(ϵ -caprolactone)nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation*. 231-232, 1–9.
36. Grillo, R., Rosa, A. H., & Fraceto, L. F. (2014). Poly(ϵ -caprolactone) nanocapsules carrying the herbicide atrazine: effect of chitosan-coating agent on physico-chemical stability and herbicide release profile. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 11(6), 1691–1700.
37. Grillo, R., Pereira, A., Caroline Sayuri Nishisaka, Renata de Lima, Oehlke, K., Greiner, R., & Leonardo Fernandes Fraceto. (2014). *Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles loaded with paraquat herbicide: An environmentally safer alternative for weed control*. 278, 163–171.
38. Antunes, D. R., Mariana, Coqueiro, Y. A., Pontes, M. S., Lima, P. H. C., Cavalcante, L. A. F., Sanches, A. O., Caires, A. R. L., Santiago, E. F., & Grillo, R. (2024). Effect of hyaluronic acid-stabilized silver nanoparticles on lettuce seed germination. *Chemosphere*, 364, 143080–143080.
39. Silva Santos, J., da Silva Pontes, M., Grillo, R., Fiorucci, A. R., José de Arruda, G., & Santiago, E. F. (2020). Physiological mechanisms and phytoremediation potential of the macrophyte *Salvinia biloba* towards a commercial formulation and an analytical standard of glyphosate. *Chemosphere*, 259, 127417.
40. Giannopolitis, C. N., & Ries, S. K. (1977). Superoxide Dismutases. *Plant Physiology*, 59(2), 309–314.
41. Chance, B., maehly, A. C. (1955) Assay of catalases and peroxidases. 136.
42. Clemente, I., Menicucci, F., Colzi, I., Sbraci, L., Benelli, C., Giordano, C., Giordano, C., & Petruccelli, R. (2018). Unconventional and sustainable nanovectors for phytohormone delivery: Insights on *Olea europaea*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(11), 15022-15031.
43. Falsini, S., Clemente, I., Papini, A., Tani, C., Schiff, S., Salvatici, M. C., Petruccelli, R., Benelli, C., Giordano, C., Gonnelli, C., & Ristori, S. (2019). When sustainable nanochemistry meets agriculture: lignin nanocapsules for bioactive compound delivery to plantlets. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(24), 19935-19942.
44. Yang, W., Fortunati, E., Gao, D., Balestra, G. M., Giovanale, G., He, X., Torre, L., Kenny, J., & Puglia, D. (2018). Valorization of acid isolated high yield lignin nanoparticles as innovative antioxidant/antimicrobial organic materials. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(3), 3502-3514.
45. Max, J. J., & Chapados, C. (2004). Infrared spectroscopy of aqueous carboxylic acids: comparison between different acids and their salts. *The Journal of Physical Chemistry A*, 108(16), 3324-3337.

46. Murugan, P., Mahinpey, N., Johnson, K. E., & Wilson, M. (2008). Kinetics of the Pyrolysis of Lignin Using Thermogravimetric and Differential Scanning Calorimetry Methods. *Energy & Fuels*, 22(4), 2720–2724.
47. Morad, S., Babapoor, A., Azizi, M. M., & Movasaghi, M. (2023). Potential for Application of Lignin Based Micro/Nanostructures as a Micro/Nanocarrier in the Controlled Release Systems: A Review. *Current Nanoscience*, 19(2), 220-239.
48. Yin, J. M., Wang, H. L., Yang, Z. K., Wang, J., Wang, Z., Duan, L. S., Li, Z. H., & Tan, W. M. (2020). Engineering lignin nanomicroparticles for the antiphotolysis and controlled release of the plant growth regulator abscisic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(28), 7360-7368.
49. Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm*, 67(3), 217-223.
50. Bhasarkar, J., & Bal, D. (2019). Kinetic investigation of a controlled drug delivery system based on alginate scaffold with embedded voids. *Journal of applied biomaterials & functional materials*, 17(2), 2280800018817462.
51. Rosental, L., Nonogaki, H., & Fait, A. (2014). Activation and regulation of primary metabolism during seed germination. *Seed Science Research*, 24(1), 1–15.
52. Yang, L., Zhang, L., Zhang, Q., Wei, J., Zhao, X., Zheng, Z., Chen, B., & Xu, Z. (2024). Nanoprimer boost seed vigor: Deeper insights into the effect mechanism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 214, 108895.
53. Li, Q., Chen, X., Zhang, S., Shan, S., & Xiang, Y. (2022). DELAY OF GERMINATION 1, the Master Regulator of Seed Dormancy, Integrates the Regulatory Network of Phytohormones at the Transcriptional Level to Control Seed Dormancy. *Current Issues in Molecular Biology*, 44(12), 6205–6217.
54. Ashraf, M. A., Rasheed, R., Shad, M. I., Hussain, I., & Iqbal, M. (2023). *Role of Nutrients in the ROS Metabolism in Plants*. 30–53.
55. Marks, Z., Cowley, J. M., Bianco-Miotto, T., & Burton, R. A. (2022). The role of oxidative stress in seed priming to improve germination and vigour. *BioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)*.
56. Yiğit, İ., & Atici, Ö. (2021). Seed priming with nitric oxide mitigates exogenous methylglyoxal toxicity by restoring glyoxalase and antioxidant systems in germinating maize (*Zea mays* L.) seeds. *Cereal Research Communications*. 50 (4), 811-820.
57. Imtiaz, H., Shiraz, M., Anayat Rasool Mir, Siddiqui, H., & Hayat, S. (2023). Nano-Priming Techniques for Plant Physio-Biochemistry and Stress Tolerance. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(11), 6870–6890.

- 58.Nile, S. H., Thiruvengadam, M., Wang, Y., Samynathan, R., Shariati, M. A., Rebezov, M., Nile, A., Sun, M., Venkidasamy, B., Xiao, J., & Kai, G. (2022). Nano-priming as emerging seed priming technology for sustainable agriculture—recent developments and future perspectives. *Journal of Nanobiotechnology*, 20(1).
- 59.Bai, B., Bastian Schiffthaler, van, Willems, L., Vergara, A., Karlström, J., Niklas Mähler, Delhomme, N., Léonie Bentsink, & Hanson, J. (2022). SeedTransNet: a directional translational network revealing regulatory patterns during seed maturation and germination. *Journal of Experimental Botany*, 74(7), 2416–2432.
- 60.Del Buono, D., Luzi, F., Tolisano, C., Puglia, D., & Di Michele, A. (2022). Synthesis of a lignin/zinc oxide hybrid nanoparticles system and its application by nano-priming in maize. *Nanomaterials*, 12(3), 568.
- 61.Cabral Almada, C., Montibus, M., Ham-Pichavant, F., Tapin-Lingua, S., Labat, G., Silva Perez, D. D., & Grelier, S. (2021). Growth inhibition of wood-decay fungi by lignin-related aromatic compounds. *European Journal of Wood and Wood Products*, 79(5), 1057-1065.