



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Deise Munaro

**Desenvolvimento de nanolipossomas de quitosana contendo hidrolisado proteico de
Arthrospira platensis e aplicação como bioestimulante de tomateiros**

Florianópolis

2022

Deise Munaro

**Desenvolvimento de nanolipossomas de quitosana contendo hidrolisado proteico de
Arthrospira platensis e aplicação como bioestimulante de tomateiros**

Manuscrito de Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos à obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Maraschin

Coorientador: Prof. Dr. Sidnei Moura

Florianópolis

2022

**Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da
UFSC.**

Munaro, Deise

Desenvolvimento de nanolipossomas de quitosana contendo hidrolisado proteico de *Arthrospira platensis* e aplicação como bioestimulante de tomateiros / Deise Munaro; orientador, Marcelo Maraschin, coorientador, Sidnei Moura e Silva, 2022.

117 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Nanopartículas. 3. Bioestimulantes de plantas. 4. Hidrolisado proteico. I. Maraschin, Marcelo. II. Moura e Silva, Sidnei. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Deise Munaro

Título:

Desenvolvimento de nanolipossomas de quitosana contendo hidrolisado proteico de *Arthrospira platensis* e aplicação como bioestimulante de tomateiros

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Joséli Schwambach, Universidade de Caxias do Sul

Prof. Dr. Raul Antonio Sperotto, Universidade do Vale do Taquari

Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero, Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Biotecnologia e Biociências.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Marcelo Maraschin (Orientador)

Florianópolis, 2022

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais por todo o seu apoio e amor incondicional. Dedico também aos que lutam e defendem a ciência.

AGRADECIMENTOS

A maravilhosa dádiva chamada vida, que me permite sentir, compreender, compartilhar, amar e recomeçar, sou grata.

Agradeço à UFSC, universidade pública que cumpre com zelo sua missão científica e social contribuindo com a construção de uma sociedade justa e democrática. Foi gratificante passar por ela. Em continuidade, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (Fapesc) por conceder a bolsa de pesquisa, sem a qual não teria sido possível concluir minha formação. Agradeço também o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, e a todos os professores que de alguma maneira auxiliaram no meu desenvolvimento durante este processo.

Agradeço também a todos os integrantes do grupo do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV) que tive contato ao longo desta jornada e especialmente ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Maraschin, pela oportunidade valiosa e confiança depositada em mim desde de o primeiro contato. Sou muito feliz e agradecida por todas as oportunidades e aprendizados que proporcionastes a mim. Agradeço também pela sua amizade e pelo seu jeito sereno e otimista de ver o mundo, importante em muitos momentos.

Ao meu coorientador Professor Sidnei Moura e Silva, pela possibilidade de aprender junto a ele e de retornar à Universidade de Caxias do Sul, minha *alma mater*. Agradeço também ao professor Rosendo A. Yunes, que por mais que já tenha feito, segue disposto a contribuir com a ciência brasileira.

Agradeço à Nanoscopying Soluções em Nanotecnologia, em especial à Dra. Maria Beatriz Veleirinho e a Dra. Letícia Mazzarino, por terem aberto as portas daquela empresa e por dedicarem seu tempo à minha formação e desenvolvimento pessoal em um ambiente externo à academia.

Agradeço a amizade e as oportunidades que minha amiga Fernanda Ramlov trilhou para mim e por toda confiança que sempre depositou na minha pessoa. Agradeço a amizade e colaboração de uma das mulheres mais incríveis que conheci na academia, Eva Regina de Oliveira e as colegas que sempre estiveram empenhadas em ajudar tecnicamente neste trabalho, Daniela Souza Coelho e Cláudia Marlene Bauer.

Agradeço também aos funcionários do Parque Cidade das Abelhas que contribuíram na condução e execução dos experimentos, em especial a Márcia Tomaz, tornando-se uma amiga

querida. Agradeço as meninas Letícia da Silva Gomes e Emanuelle Bavaresco que iniciaram sua jornada acadêmica ao meu lado, demonstrando comprometimento e amor pela ciência.

Agradecimento especial aos meus amigos queridos, que sempre estiveram ao meu lado, nos bons e maus momentos, me dando apoio científico e emocional durante este desafio: Caroline Schmitz, Aline Nunes, Beatriz Rocha, Gadiel Azevedo, Bruna Rodrigues, Carolina Herrera Mazzo e Letícia Madureira, os levo em meu coração.

À minha família e aos amigos, que mesmo estando longe sei que sempre estão torcendo pelo meu melhor. Agradeço aos meus sogros Laureci e Edson, por todo apoio e incentivo durante este processo. Agradeço aos meus maiores exemplos, meus pais Gregório e Edília e a minha irmã Elaine, por todo amor e incentivo aos meus sonhos, sem vocês nada seria possível. E por fim ao meu companheiro de vida Felipe S. S. Schneider, meu copiloto na Apollo 14, que esteve todos os dias ao meu lado durante esta jornada e mais do que nunca durante os dias de confinamento, obrigada por tudo que fizestes por mim..

Muito Obrigada!

No puede impedirse el viento,
pero hay que saber hacer molinos.

Don Quijote de La Mancha

RESUMO

Hidrolisados proteicos podem atuar como bioestimulantes de plantas, promovendo efeitos positivos sobre o metabolismo de plantas. Nanopartículas desenvolvidas com polímeros naturais como quitosana apresentam características sustentáveis dada a sua biodegradabilidade. Assim, objetivou-se desenvolver um hidrolisado proteico a partir de *Arthrospira platensis* e nanopartículas de quitosana como carreadores deste, seguido da avaliação de seus efeitos no metabolismo e crescimento de tomateiros, cv. Itaipava. O hidrolisado proteico apresentou 68.9 mg. mL⁻¹ de aminoácidos livres, contendo 15 aminoácidos identificados. Duas formulações de nanopartículas com distintas proporções de lecitina (LC) e quitosana (QS) foram desenvolvidas e testadas. As formulações de nanopartículas contendo o hidrolisado não diferiram ($P < 0,05$) em relação ao índice de polidispersão (0,2), potencial zeta ($20,2 \pm 2,5$ mV) e tamanho médio de partícula ($120,1 \pm 2,0$ nm), após 120 dias de armazenamento. A eficiência de encapsulação média foi de $76.29\% \pm 1.63$, após 60 dias da formulação, e de $81.69\% \pm 1.58$ após os 120 dias para formulação 1 e 2 respectivamente. Para testar os efeitos do hidrolisado e nanopartículas sobre o metabolismo e crescimento de plantas, tomateiros foram transplantados em vasos e tratados semanalmente com o hidrolisado proteico (Hi) e sua forma nanoderivada (NP) da formulação 1 em diferentes concentrações de aminoácidos totais, a saber: controle (água destilada); NP1, NP2, NP3, NP4, NP5, PH e NP Controle, contendo respectivamente (0; 0,3; 0,8; 1,19; 1,6; 2,0; 2,0; e 0 mg.mL⁻¹ de aminoácidos totais). Ao final dos ensaios, foram avaliados em dois estádios fenológicos (vegetativo e de frutificação) a altura, área foliar e índice SPAD, além da massa fresca e seca de parte aérea. Nos tecidos foliares foram determinados o teor de clorofilas, carotenoides, compostos fenólicos e flavonoides totais, além das atividades de nitrato redutase e urease. Em plantas do estágio de frutificação os teores de epigalocatequina e licopeno foram determinados em frutos. Os tratamentos NP3, NP4, NP5, NP Controle e PH atuaram sobre a variável altura, incrementando em até 49,5% durante o estágio vegetativo. No período de frutificação os tratamentos NP3 e NP2 apresentaram os melhores efeitos, promovendo aumentos de conteúdos de clorofilas, carotenoides e flavonoides totais além de aumentar a síntese de epigalocatequinas nas folhas e de licopeno nos frutos. As atividades de nitrato redutase e de urease foram incrementadas pelas aplicações de NP3 e NP2 durante os dois estádios fenológicos avaliados. Conclui-se que a hidrólise ácida da biomassa de *A. platensis* gera um extrato de aminoácidos livres e de outras moléculas de interesse em formulações de bioestimulantes. Além disso, foi possível desenvolver um sistema de entrega do hidrolisado de *A. platensis* com nanolipossomas a partir quitosana. Concluindo-se que nanolipossomas contendo hidrolisado proteico de *A. platensis* possuem atividade de bioestimulante de plantas em tomateiros.

Palavras-chave: Hidrolisado proteico, nanopartículas, bioestimulantes, cianobacteria

ABSTRACT

Protein hydrolysates can act as plant biostimulants, promoting positive effects on plant metabolism. Nanoparticles developed with natural polymers such as chitosan have sustainable characteristics given their biodegradability. Thus, the objective was to develop a protein hydrolyzate from *Arthrospira platensis* and chitosan nanoparticles as its carriers, followed by the evaluation of its effects on metabolism and growth of tomato plants, cv. Itaipava. The protein hydrolyzate showed 68.9 mg. mL⁻¹ of free amino acids, containing 15 identified amino acids. Two nanoparticle formulations with different proportions of lecithin (LC) and chitosan (QS) were developed and tested. The nanoparticle formulations containing the hydrolyzate did not differ ($P < 0.05$) in terms of polydispersity index (0.2), zeta potential (20.2 ± 2.5 mV) and mean particle size (120.1 ± 2.0 nm), after 120 days of storage. The average encapsulation efficiency was $76.29\% \pm 1.63$ after 60 days of formulation and $81.69\% \pm 1.58$ after 120 days for formulation 1 and 2 respectively. To test the effects of hydrolyzate and nanoparticles on plant metabolism and growth, tomato plants were transplanted into pots and treated weekly with protein hydrolyzate (Hi) and its nanoderivative form (NP) of formulation 1 at different concentrations of total amino acids, namely: control (distilled water); NP1, NP2, NP3, NP4, NP5, PH and NP Control, containing respectively (0; 0.3; 0.8; 1.19; 1.6; 2.0; 2.0; and 0 mg.mL⁻¹ of total amino acids). At the end of the trials, height, leaf area and SPAD index were evaluated at two phenological stages (vegetative and fruiting), in addition to fresh and dry mass of shoots. In the leaf tissues, the content of chlorophylls, carotenoids, phenolic compounds and total flavonoids, in addition to the activities of nitrate reductase and urease, were determined. In plants at the fruiting stage, epigallocatechin and lycopene contents were determined in fruits. The treatments NP3, NP4, NP5, NP Control and PH acted on the height variable, increasing by up to 49.5% during the vegetative stage. In the fruiting period, the NP3 and NP2 treatments showed the best effects, promoting increases in the contents of chlorophylls, carotenoids and total flavonoids, in addition to increasing the synthesis of epigallocatechins in the leaves and lycopene in the fruits. Nitrate reductase and urease activities were increased by NP3 and NP2 applications during the two phenological stages evaluated. It is concluded that the acid hydrolysis of *A. platensis* biomass generates an extract of free amino acids and other molecules of interest in biostimulant formulations. Furthermore, it was possible to develop a delivery system for *A. platensis* hydrolyzate with nanoliposomes from chitosan. Concluding that nanoliposomes containing protein hydrolyzate from *A. platensis* have plant biostimulant activity in tomato plants.

Keywords: Protein hydrolyzate, nanoparticles, biostimulants, cyanobacteria

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processo ilustrativo à obtenção do hidrolisado proteico da cianobactéria <i>Arthrospira platensis</i>	40
Figura 2 – Aspectos visuais de <i>Arthrospira platensis</i> seca e dos produtos de hidrólise (<i>mHi</i> e <i>Hi</i>)	41
Figura 3 – Aspecto das formulações LC/QS com e sem agitação magnética. A imagem da direita caracteriza o fenômeno de opalescência	51
Figura 4 – Tamanho médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH das formulações LC/QS (10:1, 20:1) contendo o hidrolisado proteico e livres do ativo durante o ensaio de estabilidade por 120 dias	54
Figura 5 – Modelo elucidativo da estrutura de nanopartículas contendo o hidrolisado proteico de <i>Arthrospira platensis</i> e das interações entre cargas elétricas da lecitina, quitosana e dos aminoácidos presentes nas nanopartículas no sistema LC/QS	56
Figura 6 – Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas LC/QS contendo o hidrolisado proteico de <i>Arthrospira platensis</i> . A, B e C apresentam detalhes da estrutura das nanopartículas de LC/QS, evidenciando pelas setas a bicamada formada e o <i>core</i> apresentando contrastes na densidade do material adjacente. Na imagem D , observa-se a homogeneidade de tamanhos apresentados pelas nanopartículas.....	59
Figura 7 – Perfis espectrais de FT-IR das nanoformulações LC/QS 10: 1 contendo o hidrolisado proteico e do controle contendo o hidrolisado proteico de <i>Arthrospira platensis</i>	64
Figure 8 – FEG micrographs of LC/QS nanoparticles containing <i>Arthrospira platensis</i> protein hydrolysate. (A, B and C), show details of the structure of LC/QS nanoparticles, showing by the arrows the bilayer formed and the core showing contrasts in the density of the adjacent material. In image (D), the homogeneity of sizes presented by the nanoparticles can be observed	91
Figure 9 – Physicochemical evaluations of nanoparticles, formulations 1 and 2 containing <i>A. platensis</i> protein hydrolysate and their respective controls without the active Control 1 and 2. (A) Mean particle size measured in nm over 120 days of the formulation. (B) Average polydispersity index of the formulations over 120 days. (C) Mean zeta potential of the formulations over 120 days. (D) average pH of formulations over 120 days (E) Percentage of total amino acid encapsulation efficiency over 120 days.....	92

Figure 10 – Elucidating model of the structure of nanoparticles containing the protein hydrolysate of <i>Arthrospira platensis</i> and the interactions between electrical charges of lecithin, chitosan and amino acids present in the nanoparticles, typical of nanoliposomes.....	95
Figure 11 – Chlorophyll and carotenoids contents (means \pm S.E) of tomato leaves treated with the protein hydrolyzate and its nanoderivative. (A) Vegetative stage - total chlorophyll content, (B) Vegetative stage - total carotenoid content, (C) Ripening stage - total chlorophyll content, (D) Ripening stage - total carotenoid content	98
Figure 12 – Total phenolic contents (means \pm S.E) of tomato leaves treated with the protein hydrolyzate and its nanoderivative. (A) Vegetative stage - total phenolic content (B) Ripening stage - total phenolic content.....	100
Figure 13 – Flavonoid contents (means \pm S.E) of tomato leaves treated with the protein hydrolyzate and its nanoderivative. (A) Vegetative stage - total flavonoid content (B) Ripening stage - total flavonoid content	101
Figure 14 – Urease activity (means \pm S.E) of tomato leaves treated with the protein hydrolysate and its nanoderivative. (A) Vegetative stage - urease activity (B) Ripening stage - urease activity	103
Figure 15 – Nitrate reductase activity (means \pm S.E) of tomato leaves treated with the protein hydrolysate and its nanoderivative. (A) Vegetative stage - nitrate reductase activity (B) Ripening stage - nitrate reductase activity	104
Figure 16 – Epigallocatechin content (means \pm S.E) in leaves of tomato treated with treatments containing nanoparticles and protein hydrolysate, rated at ripening stage	106
Figure 17 – Lycopene content (means \pm S.E) in tomato fruits treated with the protein hydrolysate and its nanoderivative, rated at ripening stage	107
Figure 18 – Schematic view of nanoliposomes of microalgae Protein hydrolysate effects on tomato plants under in vegetative and ripening stage	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aplicações de <i>Arthrospira platensis</i> em cultivos.....	20
Tabela 2 – Nanopartículas formuladas a partir de polímeros utilizadas na agricultura	22
Tabela 3 – Formulações de nanopartículas contendo o hidrolisado e o controle e proporções das soluções de lecitina e quitosana adicionadas	44
Tabela 4 – Produtos comerciais oriundos de hidrólise proteica ou contendo aminoácidos em suas formulações, em relação ao observado ao hidrolisado proteico de <i>Arthrospira platensis</i>	48
Tabela 5 – Diâmetro, polidispersividade (PDI) e potencial zeta médios das formulações nanoparticuladas contendo o hidrolisado proteico de <i>Arthrospira platensis</i> e controle após 24 horas do preparo	50
Tabela 6 – Eficiência de encapsulação e teor de aminoácidos totais das formulações LC/QS 10:1 e 20:1 contendo o hidrolisado proteico de <i>A. platensis</i> ao longo de 120 dias de armazenamento das formulações	61
Tabela 7 – Quantificação de poliaminas no hidrolisado proteico de <i>Arthrospira platensis</i> através de cromatografia líquida de alta eficiência	63
Tabela 8 – Possíveis atribuições a grupos funcionais e compostos de bandas identificadas nos espectros de FT-IR de formulações de nanopartículas e hidrolisado proteico de <i>Arthrospira platensis</i>	66
Tabela 9 – Metabólitos identificados nos espectros de ¹ H-RMN do hidrolisado proteico de <i>Arthrospira platensis</i> . Os compostos foram identificados através da plataforma Bayesyl, sendo que a pontuação atribuída (0 a 10) para cada metabólito corresponde a probabilidade de o espectro amostral ser equivalente ao observado para determinado analito padrão	67
Table 10 - Treatments and concentrations of amino acids in tomato plants foliar applications	84
Table 11 – Identification and quantification of Amino acids and Polyamines to HPLC	88
Table 12 – Average plant height, average fresh weight and dry weight, average leaf blade area and SPAD index in the vegetative and ripening stage (n = 12) treated with <i>Arthrospira platensis</i> protein hydrolysate and with the nanoparticulate derivative	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
EE	Eficiência de Encapsulação
FTIR	Espectroscopia Vibracional de Infravermelho Médio com por Transformada de Fourier
Hi	Hidrolisado proteico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
GABA	ácido gama amino butírico
IN	Instrução Normativa
LC	Lecitina de soja
mHi	Solução de Hidrólise mãe
MS	Espectrometria de massa
mV	milivolt
NIR	Espectroscopia Vibracional no Infravermelho Próximo
NP	Nanopartículas
PDI	Índice de Polidispersão
PZ	Potencial zeta
QS	Quitosana
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SPAD	Soil Plant Analysis Development
TEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão
UE	União Europeia
UV-vis	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	12
1.1 BIOESTIMULANTES DE USO AGRÍCOLA.....	12
1.2 HIDROLISADOS PROTEICOS	14
1.3 MACROALGAS E MICROALGAS EM CULTIVOS AGRÍCOLAS	17
1.4 NANOTECNOLOGIA E SEU POTENCIAL DE USO NA AGRICULTURA	21
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3 ORGANIZAÇÃO DA TESE DOUTORAL	25
REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO 1	32
Metabolites produced by macro- and microalgae as plant biostimulants	32
CAPÍTULO 2	35
Desenvolvimento e caracterização da composição química de hidrolisado proteico de <i>Arthrospira platensis</i> e de produto nanoestruturado derivado	35
1 INTRODUÇÃO	36
2 MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1 OBTENÇÃO DO HIDROLISADO PROTEICO DE <i>ARTHROSPIRA PLATENSIS</i>	39
2.2 QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS TOTAIS EM HIDROLISADO PROTEICO (<i>HI</i>) DE <i>ARTHROSPIRA PLATENSIS</i> POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISÍVEL	41
2.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS NO HIDROLISADO PROTEICO DE <i>ARTHROSPIRA PLATENSIS</i> ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	42
2.3 OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO HIDROLISADO PROTEICO DE <i>ARTHROSPIRA PLATENSIS</i>	43
2.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ENSAIO DE ESTABILIDADE DAS NANOFORMULAÇÕES	44
2.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS NANOFORMULAÇÕES ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	44
2.6 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE) E DO TEOR DE AMINOÁCIDOS TOTAIS NAS NANOFORMULAÇÕES	45

2.7 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE POLIAMINAS E DE TRIPTOFANO CONTIDAS EM HIDROLISADO PROTEICO E NANOPARTÍCULAS ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	45
2.8 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) DO HIDROLISADO PROTEICO DE <i>ARTHROSPIRA PLATENSIS</i> E DAS NANOFORMULAÇÕES	46
2.9 ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DO HIDROLISADO PROTEICO DE <i>A. PLATENSIS</i>	46
2.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	47
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
3.1 QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS TOTAIS EM HIDROLISADO PROTEICO DE <i>ARTHROSPIRA PLATENSIS</i> POR ESPECTROSCOPIA UV-VISÍVEL	47
3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO HIDROLISADO PROTEICO DE <i>ARTHROSPIRA PLATENSIS</i> E ENSAIO DE ESTABILIDADE DAS NANOFORMULAÇÕES	49
3.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO HIDROLISADO PROTEICO DE <i>ARTHROSPIRA PLATENSIS</i> ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	58
3.4 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE%) E TEOR DE AMINOÁCIDOS TOTAIS NAS NANOFORMULAÇÕES LC/QS CONTENDO HIDROLISADO PROTEICO DE <i>ARTHROSPIRA PLATENSIS</i>	60
3.5 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE POLIAMINAS E DE TRIPTOFANO CONTIDAS EM HIDROLISADO PROTEICO ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA	62
3.6 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) DO HIDROLISADO PROTEICO DE <i>ARTHROSPIRA PLATENSIS</i> E NAS NANOFORMULAÇÕES	64
3.6 ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DE HIDROGÊNIO (¹ H-RMN) DO HIDROLISADO PROTEICO DE <i>A. PLATENSIS</i>	66
4 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70
CAPÍTULO 3	76

Análises bioquímicas e do crescimento vegetativo de plantas de tomate (<i>Lycopersicum esculentum</i>, cv. Itaipava) tratadas com hidrolisado proteico de <i>A. platensis</i> e seu nanoderivado.....	76
ABSTRACT.....	77
1 INTRODUCTION	77
2 MATERIALS AND METHODS.....	79
2.1 OBTENTION OF PROTEIN HYDROLYSATE AND CHARACTERIZATION	80
2.2 COMPOSITION OF PROTEIN HYDROLYSATE	80
2.3 IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF AMINO ACIDS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND BY THE NINHYDRIN METHOD	80
2.4 IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF POLYAMINES IN PROTEIN HIDROLYSATE	81
2.5 SYNTHESIS OF CHITOSAN NANOPARTICLES.....	81
2.6 PARTICLE SIZE, POLIDISPERSITY INDEX, ZETA POTENTIAL AND STABILITY	82
2.7 LOADING EFFICIENCY	82
2.8 HIGH RESOLUTION TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPE (HR-TEM) AND SCANNING ELECTRON MICROSCOPE/ FIELD EMISSION GUN (SEM/FEG) OF <i>A. PLATENSIS</i> BIOMASS AND NANOPARTICLES	83
2.9 PLANTS EXPERIMENT DESIGN, GROWTH CONDITION AND TREATMENTS....	83
2.10 TOTAL CHLOROPHYLL AND CAROTENOIDS.....	85
2.11 DETERMINATION OF TOTAL PHENOLICS COMPOUNDS AND FLAVONOIDS .	85
2.12 ENZYMATIC ACTIVITY OF NITRATE REDUCTASE AND UREASE.....	86
2.13 PHENOLICS COMPOUNDS HPLC EXTRACTION AND QUANTIFICATION IN LEAVES	86
2.14 LYCOPENE EXTRACTION AND QUANTIFICATION IN CONTENT FRUITS	87
2.15 STATISTICAL ANALYSES	87
3 RESULTS AND DISCUSION.....	88
3.1 PROTEIN HYDROLYSATE COMPOSITION OF NUTRIENTS, AMINO ACIDS AND POLYAMINES	88
3.2 CHARACTERIZATION OF CHITOSAN NANOPARTICLES AND LOADED (TOTAL AMINO ACID) EFFICIENCY.....	90
3.3 VEGETATIVE RESULTS	95
3.4 BIOCHEMICAL PARAMETERS	98

3.4.1 Chlorophyll and Carotenoids total	98
3.4.2 Phenolics and Flavonoids totals	99
3.4.3 Enzimatic urease and nitrato reductase activity	102
3.4.4 Epigallocatechin contentes in ripinig stage.....	105
3.4.5 Lycopene	106
4 CONCLUSIONS.....	108
REFERENCES	111
CONCLUSÃO GERAL.....	117

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 BIOESTIMULANTES DE USO AGRÍCOLA

Plantas são organismos sésseis constantemente expostos a variações ambientais causadoras de estresses ao longo de seu desenvolvimento. Nas últimas décadas, as mudanças climáticas aumentaram a frequência de eventos de estresse aos cultivos agrícolas, e.g., secas, inundações e salinização nos solos (DU JARDIN, 2015). A exposição das plantas a fatores estressores envolve respostas fisiológicas e metabólicas que podem resultar na inibição do crescimento e consequente redução de produtividade (DIEGO; SPÍCHAL, 2020). Além disso, com o aumento global da população e, conseqüentemente, das demandas por alimento, as práticas agrícolas são cada vez mais intensivas, criando pressões ao ambiente e implicando em mais condições estressoras para os cultivos (DU JARDIN, 2015).

Outra grande preocupação à produção agrícola envolve as perdas causadas por pragas e doenças, que já atingem 25% da produção global (FAO, 2015). O uso indiscriminado de pesticidas e agroquímicos nas práticas agrícolas, assim como a biomagnificação causada ao ecossistema, trazem conseqüências desastrosas para o equilíbrio ambiental.

Pesquisas recentes buscam o desenvolvimento e uso de novas fontes naturais de fertilizantes, biopesticidas e bioestimulantes, sob a ótica de obtenção de produtos de menor impacto ambiental, viabilizando a produção em sistemas orgânicos ou visando a redução de agrotóxicos em cultivos. Neste cenário, os bioestimulantes têm sido amplamente estudados, principalmente nos últimos anos, por serem substâncias de origem natural e microbiana já utilizadas em cultivos e com diversos efeitos metabólicos, e.g., estímulo ao crescimento, incremento da tolerância a estresses bióticos e abióticos, e indução de resistência a patógenos. Por esta exposição, bioestimulantes não estão necessariamente relacionados em sua composição ao conjunto de nutrientes fornecido às plantas, mas sim com a presença de moléculas estimulantes do desenvolvimento vegetal (DU JARDIN, 2015). Assim, bioestimulantes caracterizam-se tipicamente por conter compostos com efeitos regulatórios sobre o metabolismo e desenvolvimento das plantas, os quais, em grande extensão, precisam ainda ser elucidados.

De interesse, ressalta-se que alguns produtos bioestimulantes possuem atividade semelhante aos fitormônios. Todavia, formulações a base de matrizes quimicamente complexas, como extratos de algas marinhas, ácidos húmicos e hidrolisados proteicos usualmente apresentam mecanismos de ação distintos dos fitormônios, dada a diversidade de compostos bioativos presente (DU JARDIN, 2015).

As definições mais recentes para os bioestimulantes de plantas relacionam os efeitos que estes promovem no organismo vegetal (ROUPHAEL; COLLA, 2020; YAKHIN et al., 2017). O Conselho Europeu da Indústria de Bioestimulantes (EBIC) define bioestimulantes considerando sua função agrícola: “Bioestimulantes vegetais contêm substância(s) e/ou microrganismos cuja função, quando aplicada a plantas ou à rizosfera, é estimular processos naturais para aumentar/beneficiar a absorção/eficiência de nutrientes, tolerância ao estresse abiótico e qualidade da cultura” (EBIC, 2020). A legislação da União Europeia (UE) busca o reconhecimento de bioestimulantes através de categorias relacionadas à “função do produto” (BRASIL, 2003). De interesse, ressalta-se que a legislação de agroquímicos e de fertilizantes vigente no Brasil não traz citação do termo “bioestimulante” como classe de um tipo de produto. De outra forma, o Decreto 4.954 de 14 de janeiro de 2004 (BRASIL, 2004) que dispõe sobre a inspeção, fiscalização e comércio de produtos agrícolas define “biofertilizante” como:

Produto que contém princípio ativo ou agente orgânico, isento de substâncias agrotóxicas, capaz de atuar, direta ou indiretamente, sobre o todo ou parte das plantas cultivadas, elevando sua produtividade, sem ter em conta o seu valor hormonal ou estimulante (BRASIL, 2004).

A legislação brasileira referente à classificação dos produtos biofertilizantes não engloba todos os conceitos estabelecidos pela comunidade científica. Esta, por sua vez, define classes de bioestimulantes a partir da sua origem, sendo as principais: microbiana, de extratos de algas e plantas, hidrolisados proteicos e outras contendo compostos nitrogenados, polímeros naturais, substâncias húmicas e fúlvicas (DIEGO; SPÍNCHAL, 2020; DU JARDIN, 2015; YAKHIN et al., 2017).

Os benefícios proporcionados pelos bioestimulantes são determinados quantitativamente quando se referem ao rendimento de biomassa (crescimento, produtividade) sob diversas condições ambientais e sua relação com a eficiência no uso de nutrientes. De outra forma, a análise qualitativa dos efeitos bioestimulantes considera, por exemplo, composição de carboidratos, compostos fenólicos e carotenoides de

biomassa vegetais (GUTIÉRREZ-GAMBOA et al., 2019; JARDIN; XU; GEELEN, 2020).

Considerando os diversos efeitos de respostas metabólicas e fisiológicas proporcionados ao organismo por bioestimulantes, o grande desafio é atribuir a(s) atividade(s) biológica(s) pretendida(s) à(s) molécula(s) constituinte(s) destes, a partir de uma ou mais frações químicas (YAKHIN, 2017). De modo geral, os ensaios com compostos isolados não são suficientes para esclarecer como as bioatividades observadas nos cultivos ocorrem, devido ao provável efeito sinérgico de constituintes presentes nos produtos, uma condição não negligenciável em formulações bioestimulantes contendo diversas classes de compostos químicos, eventualmente de natureza orgânica e inorgânica (PAUL et al., 2019; POVERO, 2020). Porém, do ponto de vista prático, a caracterização dos principais constituintes bioativos é importante para otimizar e padronizar um produto especificamente, a fim de garantir a qualidade das matérias-primas e da conservação e validade a longo prazo, além de proporcionar avanços no que diz respeito à regulamentação e fiscalização deste específico grupo de produtos (JARDIN; XU; GEELEN; GELLEN, 2020).

1.2 HIDROLISADOS PROTEICOS

Hidrolisados proteicos fazem parte da categoria de bioestimulantes definidos por possuírem aminoácidos, peptídeos e oligopeptídeos em sua composição, sendo provenientes da hidrólise proteica de matriz de origem vegetal ou animal (COLLA et al., 2015). A hidrólise da matriz proteica é realizada com o uso de soluções de ácidos ou álcalis fortes, ou a partir da hidrólise enzimática, utilizando-se, na maioria das vezes, subprodutos ou rejeitos da indústria de carnes (como vísceras, penas e sangue), ou de biomassa vegetal (SCHIAVON; ERTANI; NARDI, 2008).

O processo de hidrólise proteica consiste na quebra das ligações peptídicas para a obtenção de aminoácidos livres e na geração de peptídeos de tamanhos menores. Há vantagens e desvantagens diante de cada protocolo de hidrólise proteica a ser empregado. Assim, a hidrólise enzimática apresenta a vantagem em relação à hidrólise química por ser específica à clivagem de ligações peptídicas, não causar destruição de aminoácidos, principalmente aqueles com cadeia lateral contendo grupo aromático, ser realizada à temperatura mais branda (60 °C), além de apresentar um meio de reação com baixa salinidade e de composição mais estável (KUNST; WHITAKER, 2003). Por outro lado,

a hidrólise enzimática apresenta um custo superior comparativamente à hidrólise química, sendo que as condições de acidez do meio de reação devem ser controladas para que não haja baixa eficiência do processo (TEIXEIRA, 2013).

Os protocolos de hidrólise química, por sua vez, apresentam distinções que influenciam a qualidade do produto final. Por exemplo, a hidrólise alcalina produz modificações e rearranjos de estrutura de certos aminoácidos, razão pelo qual é dada preferência à hidrólise ácida (WEIL, BONNET, BONNET, 1978), onde os ácidos clorídrico e sulfúrico são comumente os mais utilizados (PASUPULETI; DEMAIN, 2010). A hidrólise ácida é realizada a alta temperatura e pressão (121 °C e 220 kPa), comprometendo a estabilidade das ligações peptídicas, ocasionando a destruição total do triptofano e perdas parciais de cistina, cisteína, serina e treonina (COLLA et al., 2015). Além destes, asparagina e glutamina convertem-se em suas formas ácidas durante o processo de hidrólise ácida (PASUPULETI; DEMAIN, 2010).

Apesar de hidrolisados proteicos conterem quantidades significativas de compostos nitrogenados, sua ação em cultivos vai muito além do simples fornecimento de nitrogênio. Além de aminoácidos e de peptídeos encontrados nos hidrolisados proteicos, outros compostos de interesse são obtidos a partir do processo de hidrólise. Tais compostos incluem lipídios, carboidratos, compostos fenólicos, fitormônios, poliaminas e minerais. Assim, em hidrolisados proteicos de alfafa (*Medicago sativa*), Ertani et al. (2009) reportaram a identificação de ácido indol acético, da citocinina isopentenil adenosina e de triacontanol, um álcool primário de cadeia longa (C₃₀H₆₁OH), conhecido como potente promotor de crescimento em plantas.

Mógor et al. (2018) identificaram poliaminas em hidrolisado proteico oriundo de cianobactérias. Os autores compararam o teor de espermina livre no hidrolisado às quantidades da poliamina encontrada na biomassa não hidrolisada, demonstrando o aumento em 34% do composto no hidrolisado. Além disso, o estudo comprovou efeitos positivos no crescimento de mudas de alface (*Lactuca sativa*), após a aplicação do hidrolisado proteico contendo espermina.

Além das contribuições mencionadas, aplicações de hidrolisados proteicos têm a vantagem de evitar a catabolização de proteínas e economizar recursos de energia ao utilizar os aminoácidos disponibilizados para o metabolismo vegetal, sendo capazes também de fornecer outros componentes como fitormônios, ou análogos, que participam de vias metabólicas associadas a processos fisiológicos de desenvolvimento (ERTANI et al., 2009). Os efeitos desencadeados pela aplicação de hidrolisados proteicos são citados

comumente na literatura como atuantes na indução de tolerância à estresses salinos, seca, diminuição de efeitos adversos causados por baixas temperaturas, incremento em conteúdo de clorofilas e carotenoides, dentre outros metabólitos (COLLA et al., 2014).

Os efeitos positivos exercidos pelos hidrolisados proteicos sobre plantas em condições de estresses têm sido frequentemente associados à mitigação dos danos oxidativos, ajuste osmótico e a mudanças nas redes hormonais (COLLA et al., 2014). Outros efeitos envolvem a modulação da captação e assimilação do nitrogênio e da regulação de enzimas envolvidas nesse processo, que ocorrem através de ações nas vias de sinalização associadas à absorção radicular de nitrogênio (DU JARDIN, 2015).

São relatados efeitos quelantes para alguns aminoácidos como, por exemplo, a prolina, que podem proteger as plantas contra efeitos tóxicos de metais pesados, e também contribuem à absorção e mobilidade de micronutrientes (CALVO; NELSON; KLOEPPER, 2014). A atividade antioxidante é conferida pela eliminação de radicais livres por alguns dos compostos nitrosos, incluindo glicina betaína e prolina, que contribuem à mitigação do estresse ambiental, como o déficit hídrico, por exemplo (COLLA et al., 2015). Além disso, hidrolisados proteicos quando aplicados diretamente ao solo, aumentam a atividade da microbiota radicular, podendo gerar respostas positivas da simbiose destes microrganismos com as plantas (ERTANI et al., 2009). Este efeito impacta indiretamente na nutrição das plantas por aumentar a biomassa e a atividade microbiana, além da aeração e fertilidade do solo (ERTANI et al., 2009).

Considerando os produtos disponíveis no mercado, grande parte dos bioestimulantes utilizados atualmente são aplicados por via foliar (POVERO, 2020). Para que os compostos penetrem no tecido vegetal, estes devem atravessar a cutícula, a barreira primária da folha. A cutícula é uma estrutura delgada (0,1-10 μm) formada por cutina, uma matriz apolar constituída por substâncias de natureza lipídica associadas às paredes celulares de células epidérmicas, com função de redução da transpiração (SCHONHERR, 2006). Moléculas bioestimulantes contendo proteínas e peptídeos são polares e, principalmente, iônicas, de modo que, provavelmente, penetram através da cutícula por meio de poros e estômatos foliares. Com isso, a absorção de bioestimulantes pelos vegetais envolve um processo inicial de difusão de moléculas bioativas através da estrutura cuticular porosa, que forma uma barreira de menor resistência à absorção de compostos hidrofílicos, comparativamente à membrana plasmática (MAINI, 2006; SCHONHERR, 2006; FICH et al., 2020).

A fim de elucidar a absorção de aminoácidos e de bioestimulantes à base de peptídeos em tecidos foliares, Ferauge e Smal (1977, apud MAINI, 2006, p. 32) descrevem a absorção dos aminoácidos prolina e glicina presentes na composição de bioestimulante de origem animal. Os aminoácidos foram marcados com isótopo de ^{14}C e posteriormente o produto foi aplicado em folhas de cerejeira. Após sete dias da aplicação, a distribuição de radioatividade dos dois aminoácidos e de seus derivados foi examinada, constatando-se que o ^{14}C havia atingido todas as partes do ramo, e, ao final de dois meses, alcançado novas flores e raízes. Isso significa que os aminoácidos e os novos compostos oriundos de sua metabolização têm boa mobilidade e tendem a ser transportados entre os diversos tecidos vegetais.

Kolomaznik et al. (2012), utilizando modelagem matemática para compreender a dinâmica de absorção dos aminoácidos no tecido foliar e baseando-se no mecanismo de difusão, estimaram o tempo necessário à absorção de uma quantidade mínima do componente ativo de um bioestimulante, além de demonstrarem o processo de transporte desde o momento de absorção foliar até a chegada em tecidos mais distantes. A modelagem mostra que a penetração de hidrolisados proteicos no tecido vegetal ocorre por meio da difusão de moléculas através dos poros da membrana, além de serem influenciadas pelas propriedades físico-químicas dos compostos penetrantes, especialmente a lipofilicidade e tamanho da molécula. Com isto, nota-se que moléculas aplicadas na superfície foliar de plantas necessitam ultrapassar barreiras físicas, e que compatibilidades e características físico-químicas de ambas, são imprescindíveis para a absorção de determinada molécula em seu alvo.

1.3 MACROALGAS, MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS EM CULTIVOS AGRÍCOLAS

As algas, organismos fotossintetizantes, são consideradas as antecessoras primordiais das plantas eucarióticas. Pela proximidade filogenética, estes organismos possuem diversas propriedades compartilhadas com os vegetais: são autotróficas, possuem pigmentos acessórios, sendo capazes de sintetizar e armazenar substâncias orgânicas necessárias ao seu metabolismo (TEIXEIRA, 2013). Por estas características, algas apresentam um grande potencial biotecnológico na exploração de substâncias bioativas com aplicações industriais, incluindo o uso de extratos e compostos na agricultura (CRAIGIE, 2011).

Algas marinhas e de água doce têm sido utilizadas na agricultura há muito tempo, ainda com os romanos no primeiro século, que realizavam coberturas de solo com estas biomassas, fazendo uso de macroalgas marinhas incorporadas ao solo, juntamente com palha ou outros resíduos orgânicos (CRAIGIE, 2011).

Em tempos recentes, observa-se que o mercado de bioestimulantes vem sendo incentivado devido aos apelos à adoção de modelos de agricultura de baixo impacto ambiental, e ao desenvolvimento de produtos provenientes de processos via *green chemistry*. Neste contexto, extratos de macroalgas representam aproximadamente 95% do mercado bioestimulante à base de extratos de vegetais (STIRK et al., 2020). Sendo assim, é perceptível que há um enorme potencial ainda a explorar no que diz respeito aos extratos e compostos bioativos desses organismos ao uso em cultivos agrícolas.

Macroalgas apresentam diversos compostos com atividades bioestimulantes já comprovadas e descritas em diversas revisões de literatura (CRAIGIE, 2011; SANGHA et al., 2014; NABTI; JHA; HARTMAN, 2017). As principais atividades atribuídas aos extratos de algas já relatadas envolvem: (1) germinação e estabelecimento de plantas, (2) biofortificação e complementação nutricional, (3) minimização de efeitos de estresses abióticos (térmicos, salinos, déficit hídrico), (4) indução de resistência aos ataques de patógenos. É conhecido também que extratos de algas são matrizes quimicamente complexas, contendo diversas moléculas que também podem atuar de forma sinérgica, o que dificulta a atribuição de um efeito biológico a um único composto (CRAIGIE, 2011; ROUPHAEL et al., 2017).

Dentre os principais grupos de compostos presentes nos extratos de algas já identificados e com atribuição bioestimulante tem-se os promotores de crescimento de plantas com atividades semelhantes às citocininas, auxinas e giberelinas. Além desses, encontram-se metabólitos que atuam na sinalização em plantas, como os polissacarídeos, ácidos graxos, betaínas, esteróis e poliaminas (KHAN et al., 2009). Aminoácidos e vitaminas presentes em tecidos de macroalgas também são estimulantes do metabolismo vegetal e contribuem para a sustentação da microflora benéfica do solo (NABTI; JHA; HARTMAN, 2017). Extratos de macroalgas também são conhecidos por aumentar a resposta ao estresse oxidativo em plantas, principalmente devido à composição polifenólica de algumas espécies algais (STIRK et al., 2020).

De forma similar ao observado às macroalgas, as microalgas sintetizam diversas substâncias de interesse biotecnológico, atraindo o interesse de áreas de pesquisa científica associadas à produção de alimentos, por exemplo (ÖRDOG et al., 2004). A

biotecnologia associada ao cultivo das microalgas tem apresentado crescente importância nos últimos anos, principalmente devido à utilização destes organismos no setor alimentício e de nutrição, com produtos tecnológicos de alto valor econômico (RICHMOND, 2017). O interesse no cultivo e produção de microalgas está fortemente relacionado ao valor nutricional encontrado nestes organismos, além de possuírem crescimento bastante rápido em comparação às algas talosas. Assim, muitas espécies têm sido utilizadas na indústria alimentícia para a obtenção de vitaminas, sais minerais, pigmentos e ácidos graxos (poli)insaturados (BECKER, 2007). Outras aplicações biotecnológicas de microalgas são a detoxificação biológica, a remoção de metais pesados da água, a biorremediação do solo, a produção de biocombustíveis e a extração de pigmentos (RICHMOND, 2017). A vantagem da extração de compostos de microalgas e cianobactérias em relação à maioria das espécies macroalgais comercializadas deve-se ao processo de cultivo controlado e padronizado, o que garante características homogêneas de composição da biomassa frente às sazonalidades observadas nas regiões de cultivo de macroalgas (UYSAL; UYSAL; EKINCI, 2015).

Dentre as microalgas e cianobactérias que têm sido estudadas pela potencialidade em diversas áreas biotecnológicas, destaca-se uma delas, *Arthrospira platensis*, popularmente conhecida como espirulina. Este organismo procariótico pertence ao grupo das cianobactérias, caracterizada pela presença de tricomas vagamente espiralados dispostos em uma hélice aberta envolta em uma fina bainha mucilaginosa (HU, 2013). Estas cianobactérias são encontradas em uma variedade de ambientes, particularmente em águas alcalinas, salobras e salinas, onde frequentemente se tornam espécies predominantes e formam florações massivas (HU, 2013). Dentre as poucas cianobactérias com mais longa história na dieta humana, *A. platensis* foi a primeira cianobactéria a ser cultivada comercialmente como produto da biotecnologia moderna. De fato, seu conteúdo proteico na matéria seca pode alcançar até 70% do rendimento total da biomassa, além de conter oito dos nove aminoácidos essenciais aos seres humanos (BECKER, 2007). Assim, hidrolisados ácidos de *A. platensis* constituem uma fonte rica de aminoácidos e oligopeptídeos, moléculas com importantes efeitos regulatórios de vias do metabolismo primário e secundário vegetal.

Presentemente, para além do uso na nutrição humana, *A. platensis* tem sido utilizada como biofertilizante (Tabela 1) em cultivos agrícolas (GODLEWASLA et al., 2019; DINESHKUMAR et al., 2020) com diversas atividades bioestimulantes já elencadas (OSMAN; ABO-SHADY; EL-NAGAR, 2016; MÓGOR et al., 2018;

GODLEWSKA et al., 2019). O uso de produtos à base de espirulina é consistente com a ideia de agricultura sustentável que pode garantir a produção de alimentos para atender às necessidades da população crescente, com significativa redução do impacto ambiental observado nos modelos convencionais de cultivo.

Tabela 1 – Aplicações de *Arthospira platensis* em cultivos agrícolas e efeitos envolvidos com seu uso.

Tipo de extrato	Cultivo	Atividade	Referências
<i>A. platensis</i> em suspensão	<i>Vicia faba</i>	Melhoria dos efeitos nocivos de herbicida nas enzimas antioxidantes e redução da peroxidação lipídica; indução da biossíntese de aminoácidos com ação protetora ao estresse térmico; e aumento dos níveis de proteína e aminoácidos da raiz	Osman; Abo-Shady; El-Nagar (2016)
	Germinação de <i>Vicia radiata</i>	Indução de crescimento e maior rendimento de plantas	Aung (2011)
<i>A. platensis</i>	Sementes de <i>Amaranthus gangeticus</i> , <i>Phaseolus aureus</i> e tomate	Incremento dos níveis de Zn em todas as partes da planta	Anitha; Sai Bramari; Kalpana (2016)
	Aplicação no solo de mudas de <i>Phaseolus aureus</i> e <i>P. mungo</i>	Aumento do comprimento de brotos	Bhowmik; Dubey; Mehra (2010)
	<i>Amaranthus dubius</i>	Incremento na taxa de germinação; aumento no conteúdo de clorofilas; aumento no conteúdo proteico; e aumento na capacidade antioxidante	Mala et al. (2017)
	Videira cv. <i>Red Roomy</i>	Aumento no rendimento e na qualidade das bagas; aumento de açúcares solúveis totais e de antocianinas no mosto	Abou-Zaid; Shaaban (2019)
Cultivo de <i>A. platensis</i> em água para criação de peixes	Plantas de <i>Eruca sativa</i> , <i>Amaranthus gangeticus</i> , e <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>chinensis</i>	Aumentos do conteúdo de clorofilas, peso fresco e seco em todas as espécies testadas; aumento significativo do peso seco de plântulas de <i>B. rapa</i>	Wuang et al. (2016)
<i>A. platensis</i> extraídas com CO ₂ ; Supercríticas e enriquecidas com Zn, Cu, Mn	Milho	Rendimento de grãos superior	Tuhy et al. (2015)
Hidrolisado enzimático	<i>Lactuca sativa</i>	Incremento na área foliar de mudas de alface.	Mógor et al. (2018)

Fonte: Adaptado de Godlewska et al. (2019).

1.4 NANOTECNOLOGIA E SEU POTENCIAL DE USO NA AGRICULTURA

A nanotecnologia é definida como a ciência que estuda um conjunto de atividades ou mecanismos que ocorrem em uma escala extremamente pequena, i.e., nanométrica, permitindo aplicar a novos produtos conceitos associados ao comportamento da matéria em dimensões próximas à dimensão atômica (PUROHIT et al., 2017). Uma importante característica físico-química das nanopartículas está relacionada ao seu reduzido tamanho, agregados atômicos ou moleculares de 1 a 1000 nm de tamanho, e à capacidade de aumento de sua área superficial (ANDRE et al., 2006). Considerada uma área extremamente promissora, a nanotecnologia destaca-se pela imensa inter- e transdisciplinaridade, envolvendo temas relacionados à física, química e às áreas das ciências naturais e de materiais, por exemplo (SINGH et al., 2015).

A nanotecnologia possui uma importante função na transformação da agricultura e na produção de alimentos. Seu potencial está relacionado à possibilidade de modificar as práticas agrícolas convencionais. Neste contexto, destaca-se a performance que a maioria dos agroquímicos aplicados às culturas apresenta. Boa parte destes produtos não atinge o alvo biológico/molecular pretendido, devido a fatores como lixiviação, volatilização, derivação, hidrólise, fotólise e degradação microbiana (CHOWDHURY et al., 2008). Portanto, há necessidade de desenvolvimento de formulações com liberação controlada de agroquímicos para reduzir a poluição e os riscos à saúde humana e animal e aumentar a eficácia dos produtos. Desta forma, a nanotecnologia possibilita a produção de agroquímicos com perfis otimizados quanto à liberação controlada e com alta especificidade de alvos moleculares e de ação fisiológica, diminuindo o uso excessivo dessas moléculas no ambiente.

Nas últimas décadas, observa-se um interesse crescente na adoção da nanotecnologia para aplicações agroindustriais e novas formulações de pesticidas têm sido desenvolvidas, modificando o desempenho dos compostos ativos e, eventualmente, reduzindo seu impacto ambiental (KHOT et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2014; PETOSA et al., 2017). Todavia, muitos produtos nanoestruturados contendo pesticidas apresentam composições metálicas, podendo apresentar um potencial tóxico não desprezível ao ambiente (IAVICOLI et al., 2017).

Dessa maneira, alternativas que minimizem os danos de nanopartículas com composições metálicas têm sido buscadas. Dentre essas, destaca-se as oriundas de materiais poliméricos (Tabela 2) que podem ser utilizadas para a incorporação de pesticidas ou outros agentes bioativos (KUMAR et al., 2015). Assim, esses produtos nanoderivados biodegradáveis podem fornecer uma entrega eficiente de ativos, com a eventual redução de contaminação ambiental (NAIR et al., 2010).

Tabela 2 – Nanopartículas formuladas a partir de polímeros utilizadas na agricultura

Tipo de Polímero	Cultivo/uso	Ação	Referência
<i>Alginato</i>	Redução de lixiviação em solos	Nanopartículas de revestimento ao paraquat	Silva et al. (2011)
	Redução da lixiviação de herbicida no solo	Emulsificante para pesticida/inseticida/herbicida	Kumar et al (2015); Fernández-Perez; Garrido-Herrera; González-Pradas (2011)
<i>Carragenana</i>	Controle de <i>Helicoverpa zea</i> em milho	Emulsificante para pesticida/inseticida	Westgate; Schultz; Hazzard (2017)
<i>Nanopartículas poliméricas</i>	Inseticida	Encapsulamento de azadiractina	Da Costa et al (2014)
<i>Nanopartículas de quitosana</i>	Inseticida	Encapsulamento de rotenona	Lao et al. (2010)
	Inseticida e pesticida	Encapsulamento de carvacrol	Keawchaon; Yoksan (2011)
	Inseticida, bactericida e nematocida	Encapsulamento de eugenol	Woranuch; Yokasan (2013)
<i>Nanopartículas de zeína</i>	Bactericida	Encapsulamento de timol	Zhang et al. (2014)
	Inseticida	Encapsulamento de curcumina	Gomez-Estaca et al. (2012); Woranuch; Yoksan (2013)

Vários desses compostos poliméricos são oriundos exclusivamente de algas, a exemplo do alginato e da carragenana, explicando o crescente interesse da comunidade científica e da indústria nestes grupos taxonômicos. Além disso, nos últimos anos, oligossacarídeos e polissacarídeos algais vêm sendo estudados quanto ao seu efeito regulador do crescimento, desenvolvimento de plantas e na elicitação de mecanismos de defesa contra estresses bióticos (STADNIK; DE FREITAS, 2014). Embora a quitosana não seja uma molécula oriunda de algas, este polissacarídeo também apresenta efeitos fisiológicos positivos de seus oligômeros em plantas (COQUEIRO; MARASCHIN; DI PIERO, 2011; FELIPINI et al., 2016).

A quitosana é um derivado deacetilado do biopolímero quitina, um polissacarídeo predominante no exoesqueleto de crustáceos (YIN; DU; DONG, 2016). A

capacidade deste composto policatiônico de ligar-se a uma ampla gama de componentes celulares, incluindo DNA, membrana plasmática e constituintes da parede celular, atribuem-lhe propriedades físico-químicas interessantes do ponto de vista nanobiotecnológico (ALEJANDRO; RUBIALES, 2009; RAMPINO et al., 2013). Adicionalmente, a quitosana interage com receptores envolvidos na ativação de genes associados a mecanismos de defesa e indução de resistência a patógenos em espécies vegetais, conferindo-lhes maior proteção a agentes estressores bióticos (CHUN; CHANDRASEKARAN, 2019; LOPEZ-MOYA; SUAREZ-FERNANDEZ; LOPEZ-LLORCA, 2019).

Diante do exposto, este trabalho busca o desenvolvimento de um produto bioestimulante oriundo da hidrólise ácida de biomassa da cianobactéria *Arthrospira platensis*, uma espécie rica em proteínas, utilizando-se de nanoestruturas como componente de proteção aos compostos ativos presentes no hidrolisado e veículo de entrega. Diferentemente de trabalhos que descrevem apenas os efeitos sobre o desenvolvimento vegetal proporcionados por hidrolisados proteicos ou de produtos comerciais, este estudo visa a obtenção do hidrolisado proteico de *A. platensis*, sua caracterização química, a identificação de compostos com atividade bioestimulante e a testagem dos produtos aplicados em plantas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um produto nanotecnológico obtido a partir do hidrolisado proteico de *Arthrospira platensis* com ação bioestimulante para cultivos agrícolas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Revisar e publicar estudo sobre o uso de macroalgas, microalgas e cianobactéria como bioestimulantes de plantas;
- Desenvolver e otimizar protocolo para a obtenção de hidrolisado ácido proteico de *A. platensis*;

- Quantificar os macro e micro minerais presentes no hidrolisado ácido proteico de *A. platensis*;
- Identificar e quantificar os aminoácidos e as poliaminas na matriz do hidrolisado proteico, via técnicas espectroscópicas e cromatográficas;
- Formular nanopartículas com hidrolisado proteico de *A. platensis* e quitosana;
- Caracterizar morfológicamente as nanopartículas através de microscopia eletrônica de transmissão e de microscopia eletrônica de varredura;
- Caracterizar as nanopartículas quanto ao tamanho, potencial zeta e morfologia, além de avaliar a eficiência de encapsulação de aminoácidos totais e período de estabilidade das nanoformulações;
- Avaliar as respostas de crescimento (altura e área foliar média) e o rendimento de massa fresca e seca de plantas de *Solanum lycopersicum* em dois estágios fenológicos de desenvolvimento tratadas, com formulações do hidrolisado proteico de *A. platensis* e de seu nanoderivado;
- Determinar o teor de clorofilas, carotenoides totais e de compostos fenólicos e flavonoides totais de amostras foliares de *S. lycopersicum* em dois estágios fenológicos de desenvolvimento, tratadas com formulações do hidrolisado proteico de *A. platensis* e de seu nanoderivado;
- Determinar as atividades das enzimas nitrato redutase e urease em tecidos foliares de plantas de *S. lycopersicum* em dois estágios fenológicos de desenvolvimento, tratadas com formulações do hidrolisado proteico de *A. platensis* e de seu nanoderivado;
- Determinar o perfil de polifenóis e quantificar epigallocatequina em tecidos foliares de plantas de tomateiros (*S. lycopersicum*) do estágio de frutificação, tratadas com hidrolisado proteico e o derivado nanoformulado;
- Quantificar os teores de licopeno em frutos de plantas de tomateiros (*S. lycopersicum*), tratadas com hidrolisado proteico e o derivado nanoformulado;
- Elaborar documento reivindicatório de patente de invenção de processo junto ao INPI, relacionado à obtenção de nanopartículas contendo hidrolisado proteico da cianobactéria *A. platensis* e sua aplicação em cultivos agrícolas.

3 ORGANIZAÇÃO DA TESE DOUTORAL

Diante do exposto, este trabalho está organizado em três capítulos, contemplando os objetivos específicos elencados anteriormente. O primeiro capítulo, já publicado, compreende a revisão bibliográfica sobre o tema geral desta tese e os bioestimulantes oriundos de microalgas. No segundo capítulo estão descritos os ensaios relacionados à obtenção do hidrolisado proteico de *A. platensis*, sua descrição e caracterização química e a quantificação dos compostos de interesse para a obtenção de um produto bioestimulante de plantas, além do desenvolvimento das nanopartículas, sua descrição físico-química e estabilidade. O terceiro capítulo é apresentado em formato de artigo a ser submetido e descreve o desenvolvimento e a caracterização das nanopartículas de *A. platensis* e aplicação em cultivo de tomateiro, avaliando os efeitos biométricos e bioquímicos durante o desenvolvimento das plantas.

REFERÊNCIAS

- ALEJANDRO, P. D. L.; RUBIALES, D. Nanotechnology for parasitic plant control. **Pest Management Science**, v. 65, n. 5, p. 540–545, 2009.
- ABOU-ZAID, E. A. A.; SHAABAN, M. M. Growth, yield and berries quality in Red Roomy grapevines improved under different foliar application of Spirulina algae, zinc and boron. **Middle East Journal of Agriculture Research**, v. 8, n. 2, p. 654–661, 2019.
- ANITHA, L.; BRAMARI, G. S.; KALPANA, P. Effect of supplementation of Spirulina platensis to enhance the zinc status in plants of Amaranthus gangeticus, *Phaseolus aureus* and tomato. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 7, n. 6, p. 289–299, 2016.
- ANDRE, N. et al. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622–627, 2006.
- AUNG, K. L. N. Effect of Spirulina biofertilizer suspension on growth and yield of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. **Universities Research Journal**, v. 4, n. 1, p. 351–363, 2011.
- BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 207–210, 2007.
- BHOWMIK, D.; DUBEY, J.; MEHRA, S. Evaluating potential of Spirulina as inoculant for pulses. **Asian Journal of Experimental Sciences**, v. 3, n. 4, p. 161–164, 2010.
- BRASIL. **Decreto 4.954, de 14 de janeiro de 2004**. Diário oficial da República, Brasília, DF, 2004. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil03/ato2004-2006/2004/decreto/d4954.htm>. Acesso em: 15 de setembro de 2022.
- BRASIL. **Regulamento (CE) n.º 2003/2003**. Parlamento Europeu e do Conselho de 13 de Outubro de 2003 relativo aos adubos. Brasília, 2003. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/publicacoes-fertilizantes/regulamento_ce_20032003.pdf/view. Acesso em: 15 de setembro de 2022.
- BRASIL. **Instrução Normativa 61/2020 de 08-07-2020**, acessado em 24/10/2022 <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-61-de-8-7-2020-organicos-e-biofertilizantes-dou-15-7-20.pdf>
- CALVO, P.; NELSON, L.; KLOEPPER, J. W. Agricultural uses of plant biostimulants. **Plant and Soil**, v. 383, p. 3–41, 2014.

CHOWDHURY, A. et al. Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 114–127, 2008.

CHUN, S. C.; CHANDRASEKARAN, M. Chitosan and chitosan nanoparticles induced expression of pathogenesis-related proteins genes enhances biotic stress tolerance in tomato. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 125, p. 948–954, 2019.

COLLA, G. et al. Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 1–6, 2014.

COLLA, G. et al. Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 28–38, 2015.

COLLA, G. et al. Foliar applications of protein hydrolysate, plant and seaweed extracts increase yield but differentially modulate fruit quality of greenhouse tomato. **HortScience**, v. 52, n. 9, p. 1214–1220, 2017.

COQUEIRO, D. S. O.; MARASCHIN, M.; PIERO, R. M. D. Chitosan reduces bacterial spot severity and acts in phenylpropanoid metabolism in tomato plants. **Journal of Phytopathology**, v. 159, n. 7–8, p. 488–494, 2011.

CRAIGIE, J. S. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 371–393, 2011.

DA COSTA, J. T. et al. Effects of different formulations of neem oil-based products on control *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) (Coleoptera: Bruchidae) on beans. **Journal of Stored Products Research**, v. 56, p. 49–53, 2014.

DE OLIVEIRA, J. L. et al. Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 8, p. 1550–1561, 2014.

DIEGO, N. de; SPÍCHAL, L. Biostimulants – A Practical Guide Use of Plant Metabolites to mitigate stress effects in crops. *In: The Chemical Biology of Plant Biostimulants*, p. 261–300, 2020.

DINESHKUMAR, R. et al. Microalgal liquid biofertilizer and biostimulant effect on green gram (*Vigna radiata* L) an experimental cultivation. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1–21, 2020.

DU JARDIN, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 3–14, 2015.

EBIC. **European Biostimulants Industry Council**. EBIC, 2021. Disponível em: <https://biostimulants.eu/>. Acesso em: 10. jan. 2021.

ERTANI, A. et al. Biostimulant activity of two protein hidrolysates in the growth and

nitrogen metabolism of maize seedlings. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 172, n. 2, p. 237–244, 2009.

FAO. Food and Agriculture Organization. **World fertilizer trends and outlook to 2018**. Rome: Food & Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2018.

FERAUGE, M. T.; SMAL, J. P. **Dix années de recherches sur le pommier**. France: Comité national pour l'étude de la culture fruitière, 1977.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; GARRIDO-HERRERA, F. J.; GONZÁLEZ-PRADAS, E. Alginate and lignin-based formulations to control pesticides leaching in a calcareous soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, n. 1–3, p. 794–801, 2011.

FICH, E. A. et al. Transpiration from tomato fruit occurs primarily via trichome-associated transcuticular polar pores. **Plant Physiology**, v. 184, n. 4, p. 1840–1852, 2020.

GODLEWSKA, K. et al. Potential applications of cyanobacteria: *Spirulina platensis* filtrates and homogenates in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 6, p. 1–18, 2019.

GOMEZ-ESTACA, J. et al. Formation of zein nanoparticles by electrohydrodynamic atomization: Effect of the main processing variables and suitability for encapsulating the food coloring and active ingredient curcumin. **Food Hydrocolloids**, v. 28, n. 1, p. 82–91, 2012.

GUTIÉRREZ-GAMBOA, G. et al. A review of the use of biostimulants in the vineyard for improved grape and wine quality: effects on prevention of grapevine diseases. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 3, p. 1001–1009, 2019.

HU, Q. Industrial Production of Microalgal Cell-mass and Secondary Products – Major Industrial Species *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. In: **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. New York: John Wiley & Sons, 2013.

Iavicoli, I. et al. Nanotechnology in agriculture: Opportunities, toxicological implications, and occupational risks. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 329, p. 96–111, 2017.

JARDIN, P.; XU, L.; GEELEN, D. Agricultural Functions and Action Mechanisms of Plant Biostimulants (PBs). In: **The Chemical Biology of Plant Biostimulants**. New York: John Wiley & Sons, 2020.

KEAWCHAOON, L.; YOKSAN, R. Preparation, characterization and *in vitro* release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 1, p. 163–171, 2011.

KHAN, W. et al. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 28, n. 4, p. 386–399, 2009.

KHOT, L. R. et al. Applications of nanomaterials in agricultural production and crop

protection: A review. **Crop Protection**, v. 35, p. 64–70, 2012.

KOLOMAZNI, K.; FRIEBROVA, V.; JANA, D. Diffusion of biostimulators into plant tissues. **Heat and Mass Transfer**, v. 48, n. 9, p. 1505–1512, 2012.

KUMAR, S. et al. Development and evaluation of alginate-chitosan nanocapsules for controlled release of acetamiprid. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 631–637, 2015.

KUNST, T.; WHITAKER, J. **Protein modification to optimize functionality protein hydrolysates**. Handbook of food enzymology. New York: Dekker, v. 15, p. 235–251, 2003.

LAO, S. B. et al. Novel amphiphilic chitosan derivatives: Synthesis, characterization and micellar solubilization of rotenone. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 4, p. 1136–1142, 2010.

LOPEZ-MOYA, F.; SUAREZ-FERNANDEZ, M.; LOPEZ-LLORCA, L. V. Molecular mechanisms of chitosan interactions with fungi and plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2, p. 1–15, 2019.

MALA, R. et al. Agronomic biofortification of *Amaranthus dubius* with macro nutrients and vitamin A. *In: IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. IOP Publishing, 2017.

MAINI, P. The experience of first biostimulant, based in amino acids and peptides: a short respective review on the laboratory researches and the practical results. **Centro Scientifico Italiano dei Fertilizzanti**, v. 1, n. 1, p. 29–43, 2006.

MÓGOR, Á. F. et al. Biostimulant properties of cyanobacterial hydrolysate related to polyamines. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 1, p. 453–460, 2018.

NABTI, E.; JHA, B.; HARTMANN, A. Impact of seaweeds on agricultural crop production as biofertilizer. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 14, n. 5, p. 1119–1134, 2017.

ÖRDÖG, V. et al. Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. **Journal of Applied Phycology**, v. 16, n. 4, p. 309–314, 2004.

OSMAN, M. E. H.; ABO-SHADY, A. M.; EL-NAGAR, M. M. F. Cyanobacterial *Arthrospira (Spirulina platensis)* as safener against harmful effects of fusilade herbicide on faba bean plant. **Rendiconti Lincei**, v. 27, n. 3, p. 455–462, 2016.

PASUPULETI, V. K.; DEMAIN, A. L. Protein hydrolysates in biotechnology. **Protein Hydrolysates in Biotechnology**, p. 1–229, 2010.

PAUL, K. et al. Understanding the biostimulant action of vegetal-derived protein hydrolysates by high-throughput plant phenotyping and metabolomics: A case study on tomato. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1–17, 2019.

- PETOSA, A. R. et al. Assessing the transport potential of polymeric nanocapsules developed for crop protection. **Water Research**, v. 111, p. 10–17, 2017.
- POVERO, G. Exploring Natural Resources for Biostimulants. 2020 *In: The Chemical Biology of Plant Biostimulants*. New York: John Wiley & Sons, 2020.
- PUROHIT, R. et al. Social, Environmental and Ethical Impacts of Nanotechnology. **Materials Today: Proceedings**, v. 4, n. 4, p. 5461–5467, 2017.
- RAMPINO, A. et al. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 455, p. 219–228, 2013.
- RICHMOND, A. Microalgae Culture of economic potential. *In: CRC Handbook of microalgal mass culture*. Florida: CRC press, 2017.
- ROUPHAEL, Y. et al. Synergistic action of a microbial-based biostimulant and a plant derived-protein hydrolysate enhances lettuce tolerance to alkalinity and salinity. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1–12, 2017.
- ROUPHAEL, Y.; COLLA, G. Editorial: Biostimulants in Agriculture. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1–7, 2020.
- SANGHA, J. S. et al. Seaweeds (Macroalgae) and their extracts as contributors of plant productivity and quality. the current status of our understanding. **Advances in Botanical Research**, v. 71, p. 189–219, 2014.
- SCHIAVON, M.; ERTANI, A.; NARDI, S. Effects of an alfalfa protein hydrolysate on the gene expression and activity of enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and nitrogen metabolism in *Zea mays* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 24, p. 11800–11808, 2008.
- SCHÖNHERR, J. Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 11, p. 2471–2491, 2006.
- SILVA, M. dos S. et al. Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and soil sorption studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, n. 1–3, p. 366–374, 2011.
- SINGH, B. N. et al. Antimicrobial nanotechnologies: What are the current possibilities? **Current Science**, v. 108, n. 7, p. 1210–1213, 2015.
- STADNIK, M. J.; DE FREITAS, M. B. Algal polysaccharides as source of plant resistance inducers. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 2, p. 111–118, 2014.
- STIRK, W. A. et al. Plant Biostimulants from Seaweed: An Overview. *In: The Chemical Biology of Plant Biostimulants*. New York: John Wiley & Sons, 2020.
- UYSAL, O.; UYSAL, F. O.; EKINCI, K. Evaluation of microalgae as microbial fertilizer. **European Journal of Sustainable Development**, v. 4, n. 2, p. 77–82, 2015.

WANG, B. et al. Tryptophan-independent auxin biosynthesis contributes to early embryogenesis in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 15, p. 4821–4826, 2015.

WUANG, S. C. et al. Use of Spirulina biomass produced from treatment of aquaculture wastewater as agricultural fertilizers. **Algal research**, v. 15, p. 59–64, 2016.

TUHY, Ł. et al. Biofortification of maize with micronutrients by Spirulina. **Open Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 1119–1126, 2015.

WEIL, J. H.; BONNET, J.; BONNET, J. **Biochimie générale**. Paris: Masson, 1987.

WESTGATE, P. J.; SCHULTZ, B. B.; HAZZARD, R. V. Effects of carriers, emulsifiers, and biopesticides for direct silk treatments on caterpillar feeding damage and ear development in sweet corn. **Journal of Economic Entomology**, v. 110, n. 2, p. 507–516, 2017.

WORANUCH, S.; YOKSAN, R. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, n. 2, p. 578–585, 2013.

YAKHIN, O. I. et al. Biostimulants in plant science: A global perspective. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 113–117, 2017.

YIN, H.; DU, Y.; DONG, Z. Chitin oligosaccharide and chitosan oligosaccharide: Two similar but different plant elicitors. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 2014–2017, 2016.

ZHANG, C. et al. The preparation and physiochemical characterization of rapeseed protein hydrolysate-chitosan composite films. **Food Chemistry**, v. 272, p. 694–701, 2019.

ZHANG, Y. et al. Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymolloaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate-chitosan hydrochloride double layers. **Food Chemistry**, v. 142, p. 269–275, 2014.

CAPÍTULO 1

Metabolites produced by macro- and microalgae as plant biostimulants



Chapter 4 - Metabolites produced by macro- and microalgae as plant biostimulants

Deise Munaro ¹, Aline Nunes ¹, Caroline Schmitz ¹, Cláudia Bauer ¹, Daniela Sousa Coelho ¹, Eva Regina Oliveira ¹, Rosendo Augusto Yunes ¹, Sidnei Moura ², Marcelo Maraschin ¹  

Show more 

+ Add to Mendeley  Share  Cite

<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91095-8.00011-8>

[Get rights and content](#)

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780323910958000118>

RESUMO

Nos últimos anos, muitos países têm buscado implementar ações para minimizar os riscos do uso de agrotóxico nas culturas agrícolas. Nesse contexto, surge o potencial dos bioestimulantes que são capazes de influenciar positivamente o crescimento e desenvolvimento vegetal, além de comprovadamente aumentarem a resistência a fatores de estresse bióticos e abióticos, atuando sobre a qualidade e rendimento dos cultivos. Os efeitos dos bioestimulantes advêm dos diversos compostos bioativos e da ação sinérgica destes, desencadeando efeitos fisiológicos promotores do desenvolvimento vegetal. Os bioestimulantes podem ter origens diversas, no entanto, tem-se destacado os organismos marinhos devido a sua riqueza em compostos bioativos. Neste contexto, algas e microalgas estão entre os organismos mais bioprospectados, já sendo utilizados nas áreas farmacêutica, alimentícia e agrícola. Fontes ricas de polissacarídeos, aminoácidos e fitormônios, são consideradas matérias-primas com potencial para a formulações de bioestimulantes de plantas. Bioestimulantes podem atuar em diferentes condições de estresse ambiental (estresse abiótico e biótico), constituindo uma eventual alternativa em substituição aos agroquímicos sintéticos utilizados atualmente. Dessa maneira, este capítulo apresenta e discute as perspectivas para o desenvolvimento de novos produtos com potencial bioestimulante, com foco biotecnológico nos polissacarídeos algais. Percebe-se um número crescente de estudos com a temática em questão, com ênfase principalmente nos polissacarídeos carragenas e alginatos como candidatos a bioestimulantes, devido a sua disponibilidade comercial. Entretanto, estudos também demonstram a ocorrência de outros biocompostos em extratos macro/microalgais e de cianobactérias com potencial para uso agrícola, como os fitormônios auxina, citocinina e giberelina, e os aminoácidos prolina, ácido glutâmico e alanina. Por fim, enfatiza-se que o desenvolvimento de produtos bioestimulantes requer padronização da composição química dos extratos, a determinação da estabilidade e de características toxicológicas dos compostos bioativos, garantindo a eficácia e segurança para uso agrícola.

Palavras-chave: Bioestimulantes, compostos bioativos, microalga.

CAPÍTULO 2

Desenvolvimento e caracterização da composição química de hidrolisado proteico de *A. platensis* e de produto nanoestruturado derivado

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de produtos bioestimulantes do desenvolvimento vegetal têm despertado interesse científico e tecnológico crescente na última década. Há pelo menos dois motivos para isso: um relaciona-se à busca de substâncias com efeitos indutores do desenvolvimento das plantas (YAKHIN et al., 2017) e o outro considera as exigências à regulamentação e comercialização de insumos agrícolas e a necessidade de esclarecer seus mecanismos bioquímicos e efeitos diferenciais, a fim de comportar uma classe de produtos inovadores e que se distinguem dos fertilizantes convencionais (JARDIN; XU; GEELEN, 2020).

Nesse sentido, surge a possibilidade de introduzir novos produtos formulados a partir de hidrolisados proteicos de biomassas vegetais, animais e microbianas ricas naquela classe de macromoléculas. Os avanços industriais observados na produção desses bioestimulantes demonstram a possibilidade de diversas aplicações biotecnológicas, que vão desde insumos para a produção de vacinas ao uso de hidrolisados como suplementos de meios de culturas de células de plantas, insetos e bactéria (PASUPULETI; DEMAIN, 2010). Em escala industrial, o processo de obtenção de hidrolisados proteicos tem se tornado uma prática de baixo impacto ambiental, por utilizar subprodutos da agroindústria e apresentar uma destinação correta de seus resíduos (COLLA et al., 2015). Segundo Chiaiese et al., (2018), 90% dos hidrolisados proteicos utilizados atualmente na horticultura são obtidos de proteínas de origem animal (colágeno de subprodutos do couro, vísceras e mucosas da indústria cárnea e pesqueira). A produção de hidrolisados a partir de biomassa vegetal é menor, tendo sido mais recentemente introduzida no mercado de bioestimulantes (CHIAIESE et al., 2018). Contudo, há um grande potencial de crescimento desses produtos no mercado, através da exploração de diversas outras fontes de biomassa, inclusive de origem marinha.

Bioestimulantes, incluindo hidrolisados proteicos, são definidos como misturas quimicamente complexas, cuja identidade nem sempre é bem definida (DU JARDIN, 2015). De fato, a composição e a concentração, dos princípios ativos na matéria-prima para a produção de bioestimulantes dependem de diversos fatores ambientais de manejo (POVERO, 2020). Além disto, a diversidade de processos industriais utilizados no processamento de matérias-primas anteriores à formulação dos produtos finais também atua como fator de variação (POVERO, 2020). Por exemplo, o hidrolisado proteico da farinha de carne apresenta maior teor de aminoácidos livres, comparativamente ao

hidrolisado proteico da alfafa, com menor grau de hidrólise e maior peso molecular (ERTANI et al., 2009). Isso demonstra que as fontes de hidrolisados proteicos e os métodos de hidrólise são fatores críticos na determinação da composição química do produto final bioestimulante (CHIAIESE et al., 2018; PAUL et al., 2019). De fato, uma revisão da análise química de hidrolisados proteicos revelou que a relação proteína/peptídeo e aminoácidos livres variou na faixa de 1-85% (m/m) e 2-18% (m/m), respectivamente, além da composição majoritária dos aminoácidos encontrados usualmente apresentar alanina, arginina, glicina, prolina, glutamato, glutamina, valina e leucina (ERTANI et al., 2009; PASUPULETI; DAMAIN, 2010). Adicionalmente, além de aminoácidos livres, outros compostos como reguladores de crescimento de plantas (triacontanol e ácido indol acético) e precursores de rotas biossintéticas associadas a eventos fisiológicos estimulantes do desenvolvimento vegetal foram encontrados em hidrolisados proteicos (ERTANI; SCHIAVON; NARDI, 2008; ERTANI et al., 2013; COLLA et al., 2015; MÓGOR et al., 2018).

A fim de detectar e identificar a diversidade de moléculas presentes em extratos quimicamente complexos, diversas técnicas analíticas sofisticadas, como a ressonância magnética nuclear (RMN), a espectrometria de massa (MS) e a espectroscopia vibracional no infravermelho próximo (NIR), têm sido utilizadas, permitindo aprimorar a caracterização química de produtos bioestimulantes (POVERO, 2020). Além disso, estas técnicas contribuem para a identificação dos compostos com o efeito bioestimulante pretendido em extratos e hidrolisados de biomassas, auxiliando na padronização composicional e no controle de qualidade de produtos dedicados a usos específicos, evitando variações entre lotes de produção (PASUPULETI; DEMAIN, 2010).

Embora a instrução normativa vigente no Brasil (IN 61 de 2020) exija garantias da fração orgânica (6% de C) e de nutrientes na composição de fertilizantes organominerais para aplicação foliar, hidrolisados proteicos apresentam uma gama ampla de compostos de interesse agrícola. Na prática, empresas e desenvolvedores deste tipo de tecnologia buscam através de diversas técnicas analíticas identificar os principais constituintes nas formulações comerciais, apesar de não existir uma legislação que fiscalize e oriente sobre este tipo de avaliação específica. Assim, destaca-se a necessidade urgente de estabelecimento de protocolos e critérios claros, objetivos e padronizados, a fim de determinar a composição dos produtos em seus constituintes bioativos, garantindo a qualidade e eficiência do biofertilizante.

Além de desenvolver e caracterizar um bioestimulante, aspectos afins à aplicação e entrega dos compostos bioativos aos seus alvos moleculares na planta são fundamentais para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação e dos efeitos desses produtos sobre o desenvolvimento vegetal. Segundo De Azevedo e Freire (2006), a eficiência relacionada à tecnologia de aplicação de um produto é demonstrada quando este alcança o alvo molecular desejado, resultando na resposta biológica esperada, seja no controle de pragas, doenças ou na fertilização, associada à economia e segurança de uso.

Dentre os fatores determinantes da eficiência de um produto em atingir seu alvo biológico/molecular, o tipo de formulação e suas características físico-químicas são considerados relevantes (DE AZEVEDO; FREIRE, 2006). No contexto do desenvolvimento de produtos nanotecnológicos, diversas abordagens têm sido estudadas a fim de otimizar a *performance* dos ativos de interesse, implicando em menores perdas e maior tempo de ação destes. Para tal, o uso de polímeros biodegradáveis ao desenvolvimento de sistemas de liberação modificados de compostos bioativos tem possibilitado ganhos de desempenho/eficiência aos produtos (PETOSA et al., 2017).

Diferentes métodos de preparo de nanopartículas permitem obter sistemas nanoestruturados com propriedades adequadas para garantir a liberação apropriada e localizada do(s) ativo(s). Graças aos progressos na química e na físico-química de polímeros coloidais, tem sido possível preparar sistemas nanoestruturados com uma vasta gama de propriedades, sob condições controladas (KAH; HOFMANN, 2014).

Dentre as diversas técnicas propostas ao desenvolvimento de sistemas nanoestruturados, a técnica de interação iônica tem recebido maior atenção nos últimos anos, por ser um processo simples e fácil de ser realizado (GAN; WANG, 2007; FAN et al., 2012; SPIELMAN-SUN et al., 2020; TRIPATHY et al., 2012). Nesta técnica, a força motriz à formação das nanopartículas envolve interações eletrostáticas entre polieletrólitos de cargas opostas, ou forças intermoleculares não-covalentes como ligações de hidrogênio, força de van der Waals, ou transferência de dipolo (HUNTER, 2013). Este processo assegura que o ativo encapsulado nas nanopartículas seja protegido da inativação devido à ausência de estresse físico e químico durante sua elaboração (CHUAH et al., 2009; FAN et al., 2012).

A busca por biomateriais aptos ao desenvolvimento de nanopartículas que apresentem segurança adequada do ponto de vista ambiental, quando utilizada em aplicações de caráter agrícola, é um fator importante relacionado à sustentabilidade dos

sistemas de produção. A quitosana, um polímero natural e biodegradável obtido a partir do processo de deacetilação da quitina, tem sido utilizada no desenvolvimento de formulações nanotecnológicas (AL-NAAMANI; DOBRETSOV; DUTTA, 2016). Formada por cadeias lineares de unidades de glicosamina e N-acetil-glicosamina unidas por ligações β (1 \rightarrow 4), a quitosana apresenta em sua estrutura grupos funcionais acetil e amina, com cargas negativa e positiva, respectivamente, que permitem a formação de novas estruturas (RAMPINO et al., 2013; CHUN; CHANDRASEKARAN, 2019). A porcentagem de grupos amina livre na quitosana confere o grau de desacetilação ao polímero, possibilitando sua solubilidade em soluções ácidas diluídas (TRIPATHY et al., 2012). A protonação do grupo amina da quitosana proporciona características catiônicas à molécula, de forma que sua aplicabilidade em nanomateriais seja potencializada (SONVICO et al., 2006). Além da natureza catiônica daquele polímero, a capacidade de formar ligações com hidrogênio entre suas cadeias imprime-lhe características filmogênicas, gelificantes e mucoadesivas para preparos de dispositivos farmacêuticos (RAMPINO et al., 2013), ou de outra natureza como em sistemas de liberação controlada de fertilizantes agrícolas (DUHAN et al., 2017).

Neste contexto, este trabalho busca desenvolver e caracterizar nanopartículas de quitosana contendo o hidrolisado proteico de *A. platensis*, com efeito bioestimulante otimizado em relação ao ativo livre, quando aplicado em tecidos foliares. Assim, o desenvolvimento do hidrolisado proteico daquela cianobactéria, de seu derivado nanoestruturado, sob a forma de complexos nanoparticulados de quitosana e lecitina, e a caracterização físico-química destes são descritos.

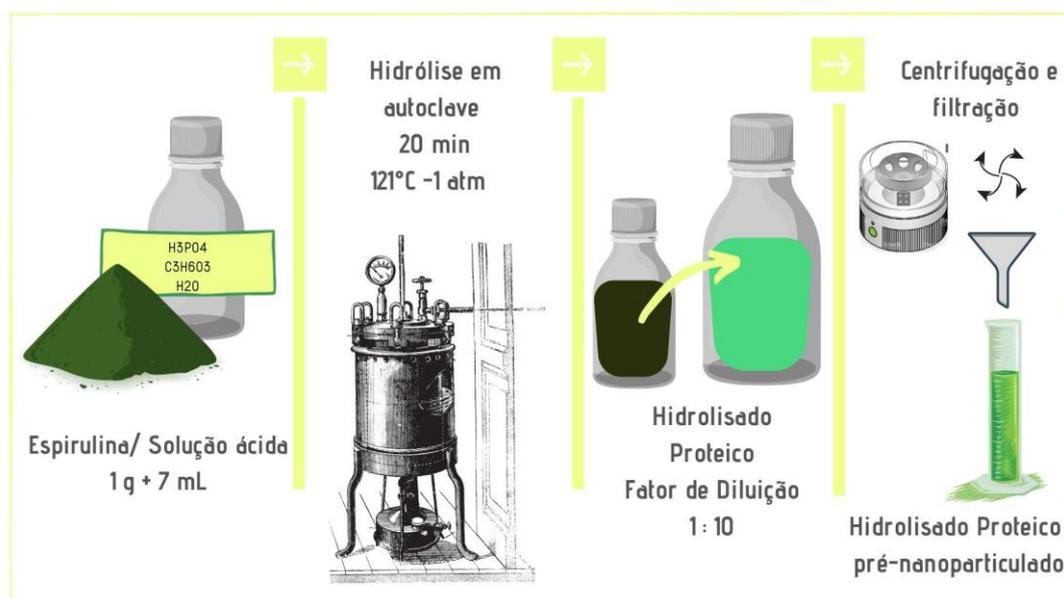
2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DO HIDROLISADO PROTEICO DE *Arthrospira platensis*

Para a obtenção do hidrolisado proteico, utilizou-se como matéria-prima a cianobactéria *Arthrospira platensis*. O ativo liofilizado e em pó foi importado e adquirido junto à empresa Galena Química e Farmacêutica, com certificações para uso alimentar, e gentilmente cedido pela empresa Nanoscopying Soluções em Nanotecnologia Ltda. As principais informações qualitativas e quantitativas do produto comercial garantem quantidades de proteínas (61,4%), cinzas (8,78%), umidade (8,46%) e metais pesados (<20 ppm).

O procedimento de hidrólise foi desenvolvido e padronizado nos últimos anos pelo grupo de colaboradores do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV) da Universidade Federal de Santa Catarina. Para tal, testes com ácidos orgânicos e inorgânicos em diversas concentrações foram realizados para determinação do material a ser aplicado posteriormente (Figura 1).

Figura 1 – Processo ilustrativo para a obtenção do hidrolisado proteico da cianobactéria *Arthrospira platensis*



Fonte: elaborada pela autora (2022).

A hidrólise ácida foi realizada a partir de uma solução v/v/v (4,5: 1,5: 1), contendo ácido láctico ($C_3H_6O_3$) p.a; ácido fosfórico (H_3PO_4) p.a e água destilada. A relação de biomassa da cianobactéria para a mistura com a solução ácida foi de 1g/7 mL. Em seguida, a solução contendo a biomassa microalgal foi autoclavada (20 min, $121^\circ C$, 1 atm). Ao final deste processo, obteve-se a solução de hidrólise mãe denominada *mHi*. O aspecto visual da solução *mHi* é apresentada na Figura 2.

Figure 2 – Aspectos visuais de *A. platensis* seca e dos produtos de hidrólise (*mHi* e *Hi*)



Fonte: elaborada pela autora (2022).

Com o intuito de obter-se uma solução capaz de ser nanoformulada, a solução mãe do hidrolisado foi diluída 10 vezes em água destilada e posteriormente centrifugada (10 min, 18°C, 4000 rpm). O sobrenadante foi coletado, reservado e o resíduo de biomassa sedimentado descartado. Após este procedimento, a solução de hidrolisado proteico da cianobactéria diluído (*Hi*) foi filtrada em suporte de papel de filtro qualitativo (80g/m²), coletada, armazenada em frasco âmbar, à 4 °C.

2.2 QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS TOTAIS EM HIDROLISADO PROTEICO (*HI*) DE *Arthrospira platensis* POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISÍVEL

A quantificação total de aminoácidos na solução de hidrolisado proteico baseou-se em técnica colorimétrica, utilizando reagente de ninidrina (C₉H₆O₄). Esta técnica considera a capacidade da ninidrina em reagir com o grupamento amino (NH₂⁺) de qualquer α-aminoácido, formando um derivado denominado de roxo de Ruhemann, o qual apresenta máxima de absorbância espectral a 570 nm (FRIEDMAN, 2004).

A quantificação dos aminoácidos totais presente no hidrolisado foi realizada seguindo a adaptação do método de Friedman, Pang e Smith (1984) e Silveira e Furlong (2007). Em tubos de vidro adicionou-se 1 mL de hidrolisado e 3 mL de solução de ninidrina (0,1%, m/v) em tampão fosfato de sódio 200 mM em pH 7,0. Posteriormente as amostras foram incubadas em banho-maria por 30 minutos, à 100°C. A concentração total de aminoácidos foi determinado a partir da leitura da absorbância em 570 nm da

solução em leitor de microplacas, utilizando-se uma curva padrão de cisteína (Sigma-Aldrich, MO - USA) (0 a 1000 ug.ml⁻¹; $y = 0.0024x + 0,0069$ $r^2 = 0,993$).

2.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS NO HIDROLISADO PROTEICO DE *A. platensis* ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A técnica para análise dos aminoácidos do hidrolisado proteico de *A. platensis* consiste na identificação e quantificação dos aminoácidos (aa's) de uma amostra, a partir da reação com o reagente de Edman – fenilisotiocianato (PITC) - sendo usada uma etapa de derivatização, seguida de separação cromatográfica dos derivados feniltiocarbamil (PTC) dos aminoácidos, com detecção por UV. A reação do PITC com o grupo amino (N-terminal) dos aminoácidos foi proposta por Pehr Edman para determinar o sequenciamento de aminoácidos de uma proteína em degradação, através de hidrólise. O protocolo para esta análise teve adaptações a partir do trabalho de White, Hart e Fry (1986), utilizado para detectar aminoácidos em alimentos, partindo de uma hidrólise ácida da biomassa.

Inicialmente, a amostra de hidrolisado proteico de *A. platensis* foi submetida à extração em fase sólida (SPE). Esta etapa consiste na remoção de moléculas de alto peso molecular, através do uso de cartuchos de SPE (Sep-pack C18), com o objetivo de isolamento do analito (*clean-up*) e remoção de lipídios e proteínas que podem interferir na detecção dos aminoácidos. Os cartuchos foram inicialmente ativados com as soluções A -ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (v/v) em água, B - ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (v/v) em água e metanol (80/20) e C - solução de ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (v/v) em água e metanol (70/30). Deve-se evitar que a fase sólida seque, impedindo que se criem caminhos preferenciais para a solução amostral. Posteriormente, é feita a adição de amostra (1 mL), adicionada de 2 mL da solução C, seguido de eluição na coluna de SPE ativada. O primeiro mL do eluente foi descartado e os próximos 2 mL coletados. Após concentração e remoção do componente ácido da amostra (1h 30min, speedvac, 45°C), o volume residual foi adicionado de solução de reidratação contendo etanol, água e trietilamina (2: 2: 2) v/v/v, etapa que antecede a derivatização. Esta, por sua vez, consistiu em coletar 10 uL da solução contendo a amostra reidratada e adicionar 20 uL da solução de derivatização composta por: etanol; água: trietilamina: fenilisotiocianato (7: 1: 1: 1) v/v/v/v. A amostra foi homogeneizada e permaneceu em repouso por 20 min, seguido de

secagem em *speedvac* (90min, 45°C) e liofilização (1h) para a completa retirada de umidade das amostras. Após esta etapa as amostras foram armazenadas à -80 °C até o momento das análises cromatográficas. A solubilização das amostras utilizou solução tampão fosfato de sódio (Na₂HPO₄) 5 mM (pH 7,4): acetonitrila (95: 5, v/v).

A separação dos compostos derivados de PTC ocorreu em equipamento UPLC Thermo-Fisher (Ultimate 3000), com gradiente das fases móveis A: 940 ml de acetato de sódio 0,14 M (pH 6,4) + 0,05% trietilamina em 60 ml de acetonitrila e B: 60% acetonitrila e 40% água (v/v), fluxo de 0,8 ml/min e tempo de análise de 25 minutos. O gradiente de eluição consistiu de 0 - 20' (100% A, 0% B) e de 20 - 25'(100% B, 0% A), utilizando-se coluna de fase reversa (Thermo BioBase®, C18 – 150mm x 4,6mm, 5µm Ø partícula), termostaticada à 30° C e os comprimentos de onda de 254, 230, 269, 280 nm à detecção dos analitos de interesse. A quantificação dos aminoácidos utilizou curvas-padrão dos 20 aminoácidos que compõem as proteínas e os aminoácidos não-proteico ácido amino gama butírico (GABA) e citrulina, nas concentrações de 2,5 a 20 µmol/ml.

2.3 OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO HIDROLISADO PROTEICO DE *A. platensis*

Para a obtenção das nanopartículas utilizou-se o método de interação iônica, seguindo a metodologia proposta por Sonvico et al. (2006), com adaptações. O sistema nanoparticulado foi constituído por lecitina de soja (Lipoid S100, Alemanha, 100% fosfatidilcolina) e quitosana de alto peso molecular (3,1.10² - 3,7.10² kDa, Sigma Aldrich, Alemanha). Brevemente, prepararam-se as soluções de lecitina em álcool etílico p.a (2,5% m/v) e de quitosana (1% m/v) em ácido acético (1% v/v). A formação das nanopartículas (Tabela 3) foi realizada espontaneamente por meio da adição subsequente de 4 mL da solução de lecitina (LC), sob agitação magnética, à solução contendo 45 mL (*Hi*) e 1 mL de quitosana (QS) para obter a proporção 10: 1 LC/QS (m/m), ou de 45,5 mL de (*Hi*) e 0,5 mL de (QS), com proporção final de 20: 1 LC/QS (m/m). Duas outras formulações controle contendo água destilada em substituição ao hidrolisado proteico foram elaboradas, a fim de testar o sistema de estruturação das nanopartículas. Após gotear a lecitina de soja na solução, as formulações foram mantidas por 20 min sob agitação magnética. A Tabela 3 apresenta as formulações testadas e seus respectivos constituintes.

Tabela 3 – Formulações de nanopartículas contendo o hidrolisado e o controle e proporções das soluções de lecitina e quitosana adicionadas

Formulação	Proporção lecitina/quitosana	Quitosana (mL)	Lecitina (mL)	Ativo/água destilada (mL)
Hidrolisado	10:1	1	4	45
Livre de ativo	10:1	1	4	45
Hidrolisado	20:1	0,5	4	45,5
Livre de ativo	20:1	0,5	4	45,5

2.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ENSAIO DE ESTABILIDADE DAS NANOFORMULAÇÕES

As nanopartículas geradas foram caracterizadas quanto ao tamanho médio, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ), em leituras em triplicata, por espectroscopia de correlação fotônica e anemometria laser Doppler, em equipamento Zetasizer Nano® (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). As medidas foram realizadas à 25 °C e as amostras preparadas na diluição de 1: 1 (v/v, nanoformulação: água destilada). Para determinação do tamanho médio de partículas, as leituras foram realizadas em ângulo de 90°, o potencial zeta destas foi determinado sob condição de ± 150 mV aplicado às células eletroforéticas do equipamento, sendo calculado com base na média dos valores de mobilidade das nanopartículas. O pH das formulações foi medido em potenciômetro de bancada (Kasvi).

Para o teste de estabilidade, as formulações em triplicata foram armazenadas em frascos de vidro âmbar, em temperatura ambiente (23 ± 1 °C), protegidos da luz e da umidade. As medidas de caracterização físico-química (tamanho de partículas, PDI, potencial Zeta e pH) foram realizadas às 24 horas e aos 7, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias após a obtenção das formulações.

2.5 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS NANOFORMULAÇÕES ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A fim de visualizar a morfologia estrutural das nanopartículas, as formulações foram diluídas 10 vezes em água ultra purificada e depositadas sobre grids de cobre com revestimento de carbono (CF-Cu, TED PELLA INC., EUA, 300 mesh). Após 15 min, o excesso da solução sobre o grid foi removido delicadamente com papel absorvente.

Posteriormente, a amostra foi corada com acetato de uranila 2% (m/v), por 24h, no escuro. As imagens foram adquiridas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM-1011-100kV (Tóquio, Japão), junto ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC).

2.6 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE) E DO TEOR DE AMINOÁCIDOS TOTAIS NAS NANOFORMULAÇÕES

A eficiência de encapsulação é definida através da porcentagem do ativo presente nas nanopartículas em relação ao total adicionado à formulação (MÜLLER-GOYMANN, 2004). A eficiência de encapsulação (EE%) e o teor de ativo foram determinados nas amostras através da quantificação total de aminoácidos por espectrofotometria UV-vis, conforme descrito em 2.2. A EE%, foi estimada (Equação 1) considerando-se a diferença percentual entre a quantidade total de aminoácidos totais da formulação após a completa dissolução em metanol (1: 10) em relação ao valor encontrado no ultrafiltrado, obtido pelo método de ultrafiltração/centrifugação, (Amicon - membranas filtrantes Ultracel-100, 100 KDa, Milipore, Corp. EUA). O teor de aminoácidos totais (%) recuperado foi estimado por comparação em relação ao total do ativo encontrado na suspensão coloidal com a quantidade inicial adicionada na formulação (Equação 1).

Cálculo da eficiência de encapsulação:

$$EE\% = Ct - \frac{Cf}{Ct} \times 100 \quad 1$$

Onde Ct = Concentração total obtida e Cf = Concentração do filtrado.

2.7 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE POLIAMINAS E DE TRIPTOFANO CONTIDAS EM HIDROLISADO PROTEICO E NANOPARTÍCULAS ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Através de cromatografia líquida de alta eficiência foram quantificadas as poliaminas espermina, espermidina, putrescina e cadaverina, além do aminoácido triptofano e seus derivados 5-hidroxitriptofano e triptamina. Amostras de hidrolisado proteico e das nanopartículas contendo o hidrolisado proteico foram diluídas em ácido

perclórico 5% (v/v) e ressuspendidas em acetonitrila, injetando-se alíquotas de 20 μL , ($n = 3$) em um cromatógrafo líquido, conforme metodologia descrita por Lima et al. (2008). A quantificação foi realizada por meio de uma curva de calibração dos respectivos padrões comerciais. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g/mL}$.

2.8 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) DO HIDROLISADO PROTEICO DE *Arthrospira platensis* E DAS NANOFORMULAÇÕES

Os espectros de FTIR das amostras foram coletados em equipamento Bruker IFS-55 (Modelo Opus. 5.0, Bruker Biospin, Alemanha), equipado com detector DGTS e sistema de reflexão única (ângulo de incidência de 45°), com acessório de atenuação de refletância ATR (golden gate). Espectros de 3 réplicas por amostra foram coletados em uma janela espectral de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$, com resolução de 4 cm^{-1} . O processamento dos espectros utilizou o *software* Essential FTIR (v.1.50.282) e considerou a definição da janela espectral de interesse ($3000\text{-}600\text{ cm}^{-1}$), correção de linha de base, normalização e otimização da relação sinal/ruído (*smoothing*). A identificação das bandas baseou-se em relatos da literatura em condições semelhantes (LEAL et al., 2008; PEREIRA et al., 2013).

2.9 ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DO HIDROLISADO PROTEICO DE *A. platensis*

Os espectros (^1H -RMN) das amostras do hidrolisado proteico foram obtidos junto ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Laboratório Nacional de Biociências (CNPEM, Campinas, SP). Previamente às análises, o hidrolisado proteico foi seco em centrífuga com vácuo *Speedvac*, (Vacufuge plus- Eppendorf), liofilizado (24h) e armazenado à -80°C . O hidrolisado foi ressolubilizado em 600 μL de CD_3OD , contendo ácido trimetilsilil propiônico (TSP 0,024%, m/v) como padrão interno de referência. Para a aquisição dos espectros de ^1H foram adquiridos 256 scans, seguido de processamento e análise com o *software* Bayesyl (RAVANBAKHS et al., 2015), considerando a transformação de Fourier, filtragem de solventes, referência de deslocamento químico, correção da linha de base e convolução da forma da linha de referência em modo automático.

2.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram coletados, sumarizados e submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, quando necessário, à 5% de probabilidade. As análises foram feitas utilizando-se *scripts* em linguagem R (versão 4.1.0), em ambiente de interface gráfica R Studio.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS TOTAIS EM HIDROLISADO PROTEICO DE *A. PLATENSIS* POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VISÍVEL

Através das técnicas de espectrofotometria UV-vis e UHPLC foi possível determinar a quantidade de aminoácidos totais na solução de hidrolisado proteico de *A. platensis* filtrada (1: 10, v/v). As análises foram feitas com quatro amostras, em triplicata, resultando em um valor médio de 68,9 mg/mL. Dentre os aminoácidos identificados por cromatografia líquida de ultra alta eficiência (UHPLC), 14 são proteicos e um não proteico, i.e. o ácido gama aminobutírico (GABA). Deste total, foram quantificados nove aminoácidos, a saber: fenilalanina, lisina, prolina, asparagina, metionina, arginina, glutamina, treonina e triptofano. Os demais aminoácidos foram apenas identificados, sendo: isoleucina, leucina, gaba, glicina, valina e tirosina. Além destes, as poliaminas triptamina, espermidina, espermina, cadaverina e putrescina também foram identificadas e quantificadas.

Em relação à quantidade total de proteínas da biomassa da cianobactéria inicial, o rendimento de aminoácidos foi de 78% (m/m). Tais valores, quando comparados aos bioestimulantes da classe dos hidrolisados proteicos e produtos similares, evidenciam uma grande variação, considerando as diversas fontes de biomassas utilizadas na formulação e concentrações de cada produto comercial. Para tanto, a Tabela 4 apresenta o conteúdo aminoacídico total de alguns produtos comerciais, a fim de permitir a comparação dos produtos em relação à quantidade de aminoácidos totais do hidrolisado proteico de *A. platensis* deste estudo.

Tabela 4 – Produtos comerciais oriundos de hidrólise proteica ou contendo aminoácidos em suas formulações, em relação ao observado ao hidrolisado proteico de *Arthrospira platensis*

Nome comercial	Tipo de produto	Aminoácidos (g/Kg)	Doses recomendadas/ testadas (µg/mL)	Referências
Hidrolisado <i>A. platensis</i>	Hidrolisado ácido de <i>A. platensis</i>	68,9	*	A autora
Auxym®	Extrato fermentado de planta	51,9	51,9	Colla et al. (2017)
Trainer®	Hidrolisado enzimático de sementes leguminosas	10	30	Colla et al. (2017)
Kelpak®	Extração de algas <i>Ecklonia maxima</i>	2,5	7,5	Colla et al. (2017)
Bioestimul®	Extrato concentrado de <i>Kappaphicus alvarezii</i>	247	250	**Dominisolo (2021)
Vorax®	Extrato fermentado de melação de cana	300	60	Silva (2019)
Algafert®	Hidrolisado enzimático de <i>A. platensis</i>	5,6	11,2	Santini et al. (2021)
Spiragro®	Hidrolisado enzimático de <i>A. platensis</i>	2,9	5,8	Santini et al. (2021)

*Doses em experimentação pela autora. ** Informação fornecida informalmente pelo fabricante.

A análise da Tabela 4 revela que diversos produtos comerciais apresentam concentrações superiores de aminoácidos em relação ao observado neste trabalho. Porém, estes advêm de processos de fermentação ou de extratos de biomassas concentrados. Maiores teores significam menores volumes na embalagem do produto final, possibilitando diminuir custos de transporte, tendo em vista que a concentração de uso será posteriormente ajustada por diluição pelo agricultor. Portanto, processos industriais que aumentem a concentração de ingredientes ativos são importantes para produtos bioestimulantes. Nota-se também que alguns dos hidrolisados enzimáticos descritos (Spiragro® e Algafert®) apresentam teores reduzidos de aminoácidos totais, comparativamente ao produto em desenvolvimento por hidrólise ácida desta tese. Além disso, é sabido que técnicas de hidrólise enzimática possuem um custo elevado em comparação àquelas desenvolvidas com solventes químicos. Por fim, é possível notar que as concentrações de uso recomendadas dos produtos mostram-se bastante variáveis e partem de diluições do produto original.

Outro fator que influencia fortemente a produção e a comercialização de produtos bioestimulantes está associado à legislação vigente em cada país e também em relação às normativas vigentes internacionalmente. Especificamente no Brasil, a legislação (BRASIL, 2020) que regula a produção e comercialização de biofertilizantes contendo aminoácidos em sua composição exige apenas que sejam determinadas as quantidades mínimas de aminoácidos presentes. A falta de uma legislação consolidada e de protocolos metodológicos para fiscalização de determinadas classes de bioestimulantes faz com que certos compostos estejam garantidos na composição do produto comercial, porém muitas vezes presente em quantidades mínimas, sem que estas possam garantir a eficiência fitotécnica alegada. Neste sentido, os aminoácidos livres e os peptídeos são um típico exemplo de ingredientes descritos na legislação nacional de biofertilizantes, em que pese estarem presentes em diversos produtos comerciais como protagonistas de determinados gêneros de insumos agrícolas.

3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO HIDROLISADO PROTEICO DE *A. PLATENSIS* E ENSAIO DE ESTABILIDADE DAS NANOFORMULAÇÕES

A análise por espalhamento de luz dinâmico (DLS) das nanopartículas contendo o hidrolisado proteico permitiu determinar o diâmetro hidrodinâmico médio, o índice de polidispersividade (PDI) e o potencial zeta médios das duas formulações testadas (Tabela 5). A avaliação destas variáveis após 24 h do preparo das formulações possibilita avaliar a estabilização do sistema nanoestruturado logo após seu preparo, no que tange as suas características físico-químicas, além de identificar a eventual ocorrência de formulações instáveis e que não se destinarão ao ensaio de estabilidade à longo prazo.

Tabela 5 – Diâmetro, polidispersividade (PDI) e potencial zeta médios das formulações nanoparticuladas contendo o hidrolisado proteico de *Arthrospira platensis* e controle 24 horas após do preparo

Formulação	Tamanho médio (nm)	PDI	Potencial zeta (mV, em módulo)
Hidrolisado LC/QS (10: 1)	120,66 ± 1,00 a	0,22 ± 0,01 a	20,10 ± 0,55 a
Controle LC/QS (10: 1)	123,73 ± 1,68 a	0,22 ± 0,01 a	22,73 ± 10,3 a
Hidrolisado LC/QS (20: 1)	122,66 ± 4,81 a	0,24 ± 0,02 a	29,23 ± 2,57 a
Controle LC/QS (20: 1)	116,76 ± 4,53 a	0,21 ± 0,02 a	16,96 ± 3,84 a

Resultados apresentados como média ± desvio padrão (n=3); para cada coluna letras distintas representam diferenças significativas entre as formulações ($p < 0,05$); ANOVA de uma via, seguida do teste *post hoc* de Tukey.

As nanopartículas formuladas com o hidrolisado proteico e sem o ativo (controle) nas duas variações de LC/QS (10:1 e 20:1) apresentaram tamanho médio variando de 116 nm a 126 nm, 24 h após o preparo da formulação (Tabela 5). Foi possível observar no início do preparo dos nanoestruturados que as soluções do hidrolisado e controle mostravam-se transparentes, indício da completa solubilização da quitosana. No entanto, logo após a polimerização, estas soluções apresentaram-se opalescentes (Figura 3), indicando a formação de sistemas nanoparticulados. Estatisticamente, as nanoformulações contendo os hidrolisados LC/QS 10: 1 e 20: 1 e as formulações controle não diferiram estatisticamente ($P < 0,05$) quanto às variáveis em estudo, após 24h do preparo. Em um primeiro momento, este fator indica que o sistema contendo o hidrolisado proteico consegue manter as interações com a quitosana e a lecitina, conferindo um tamanho médio de nanopartícula interessante do ponto de vista agrônomo, por possibilitar um intervalo de tamanho ótimo para absorção foliar das nanopartículas (TAIZ; ZEIGER; MOLLER, 2013; SPIELMAN-SUN et al., 2020).

Figura 3 – Aspecto das formulações LC/QS com e sem agitação magnética. A imagem da direita caracteriza o fenômeno de opalescência



Fonte: elaborada pela autora (2022).

O índice de polidispersão (PDI) de um sistema nanoestruturado está relacionado com a homogeneidade de distribuição dos tamanhos de nanopartículas formadas. Em geral, valores menores ou iguais a 0,3 indicam sistemas mais monodispersos. Após 24h de formação das nanopartículas, todas as formulações apresentaram PDI abaixo de 0,3 (Tabela 5), indicando homogeneidade de tamanho médio das nanopartículas na população.

Após 24h de preparo, as nanopartículas apresentaram valores positivos do potencial zeta em módulo, variando entre 16 mV e 29 mV (Tabela 5). Os valores de potencial zeta constatados podem ser atribuídos à neutralização dos grupos fosfatos da lecitina pelos grupos amino carregados positivamente da quitosana. Estes valores podem explicar a interação eletrostática entre os grupos amina protonados da quitosana com o poliânion da lecitina. Hunter (2013) atribui o maior valor em módulo do potencial zeta à maior estabilidade da suspensão. O ponto ideal de dispersão compreende valores de ± 30 mV capaz de gerar suspensões aquosas estáveis. Ao observarmos valores altos (em módulo) desta variável, pode-se perceber que grandes forças repulsivas atuam neste sistema, minimizando à agregação, provocada pelas interações de Van der Waals (HUNTER, 2013). Hafner et al. (2011) e Sonvico et al. (2006) apresentam valores em módulo de potencial zeta em nanopartículas de quitosana e lecitina próximos ao exposto

neste trabalho, como esperado pelo comportamento eletroestático das cargas presentes nos grupos da composição das nanopartículas.

O método de interação iônica utilizado na produção das nanopartículas de quitosana e lecitina considera os processos interativos de cargas elétricas presentes na estrutura química das moléculas constituintes da formulação. Neste estudo, o objetivo da interação iônica relaciona-se ao comportamento das cargas positivas do polissacarídeo quitosana e de suas interações com as cargas negativas provenientes dos fosfolípidios da lecitina. Através da elevada densidade de cargas positivas de grupamento amino presentes na estrutura química da quitosana em pH ácido, é possível estabelecer uma forte interação eletrostática com cargas negativas dos demais constituintes da formulação (BAO; LI; ZHANG, 2008). Com isso, a quitosana estabelece um papel fundamental no transporte de ativos através deste tipo de interação.

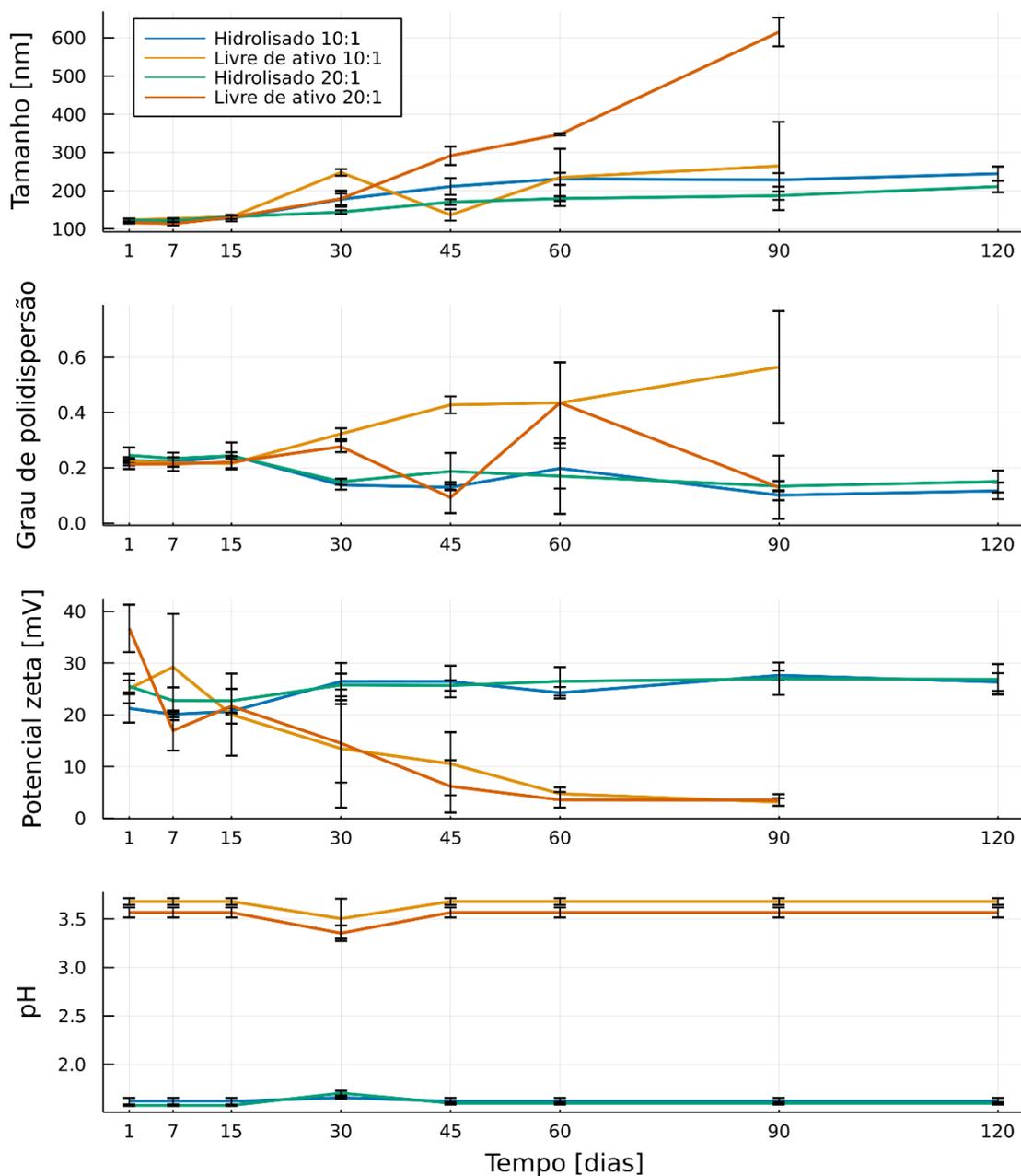
Fatores como adsorção de moléculas ativas às superfícies das nanopartículas, agregação das nanopartículas e instabilidade do princípio ativo podem influenciar na estabilidade de formulações coloidais (RAMPINO et al., 2013). Tendo em vista que as formulações de nanopartículas de quitosana contendo o hidrolisado proteico (10:1 e 20:1) apresentaram características físico-químicas ideais, um teste de estabilidade com duração de 120 dias para controle de qualidade das formulações foi realizado, considerando-se as variáveis tamanho das nanopartículas, índice de polidispersão, potencial zeta e pH nos momentos amostrais 7, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 dias.

As formulações apresentaram aspectos visuais semelhantes ao observado no início do ensaio, sem sedimentação ou variação de coloração. Em relação ao tamanho de partícula, as formulações contendo o hidrolisado LC/QS (10:1 e 20:1) não diferiram estatisticamente ($P < 0,05$), apresentando valores médios entre 210 a 244 nm (Figura 4). Entretanto, as formulações de nanopartículas livres do hidrolisado (controles) nas duas proporções de LC/QS (10:1 e 20:1) diferiram estatisticamente ($P < 0,05$) quando comparadas com os mesmos sistemas contendo o hidrolisado proteico. De interesse, ressalta-se que as medições das formulações livres do hidrolisado (controles) aos 120 dias não puderam ser avaliadas devido à instabilidade dos sistemas nanoestruturados.

Os resultados quanto ao índice de polidispersão (Figura 4) mostram que até os 60 dias não houve diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre as formulações estudadas, apresentando valores abaixo de 0,3 ideais para um sistema estável. Após 60 dias, as formulações controle mostraram-se instáveis, enquanto aquelas contendo o hidrolisado apresentaram valores de PDI ($< 0,2$), não diferindo estatisticamente ($P < 0,05$)

entre as formulações do hidrolisado LC/QS nas diluições (10:1 e 20:1). Por fim, os valores de potencial zeta das formulações não diferiram ($P < 0,05$) até os 30 dias de armazenamento. Posteriormente, as formulações livres de hidrolisado evidenciaram uma diminuição dos valores de carga superficial, indicando uma perda de estabilidade do sistema. Já nas formulações contendo o hidrolisado, os valores de carga mostraram-se estáveis, não diferindo estatisticamente ($P < 0,05$). Os valores encontrados para os sistemas LC/QS neste trabalho corroboram com estudo desenvolvido por Sonvico et al. (2006), onde apresentam valores similares, tanto em relação ao tamanho médio de nanopartículas, bem como para o potencial zeta. O pH das formulações livres do hidrolisado e contendo o hidrolisado foram estatisticamente diferentes, porém, mantiveram-se constantes ao longo do período avaliado (Figura 4).

Figura 4 – Tamanho médio, índice de polidispersão, potencial zeta e pH das formulações LC/QS (10:1, 20:1) contendo o hidrolisado proteico e controle durante o ensaio de estabilidade por 120 dias



Fonte: elaborada pela autora (2022).

Diante do exposto, os resultados mostram que as formulações contendo o hidrolisado LC/QS (10:1 e 20:1) são estáveis até 120 dias em temperatura ambiente (± 23 °C). Além disso, foi possível identificar diferenças importantes entre as formulações contendo o hidrolisado proteico e as livres deste ativo, sendo que as primeiras conseguem ser beneficiadas por um prazo maior de estabilidade, conforme demonstrado por seus

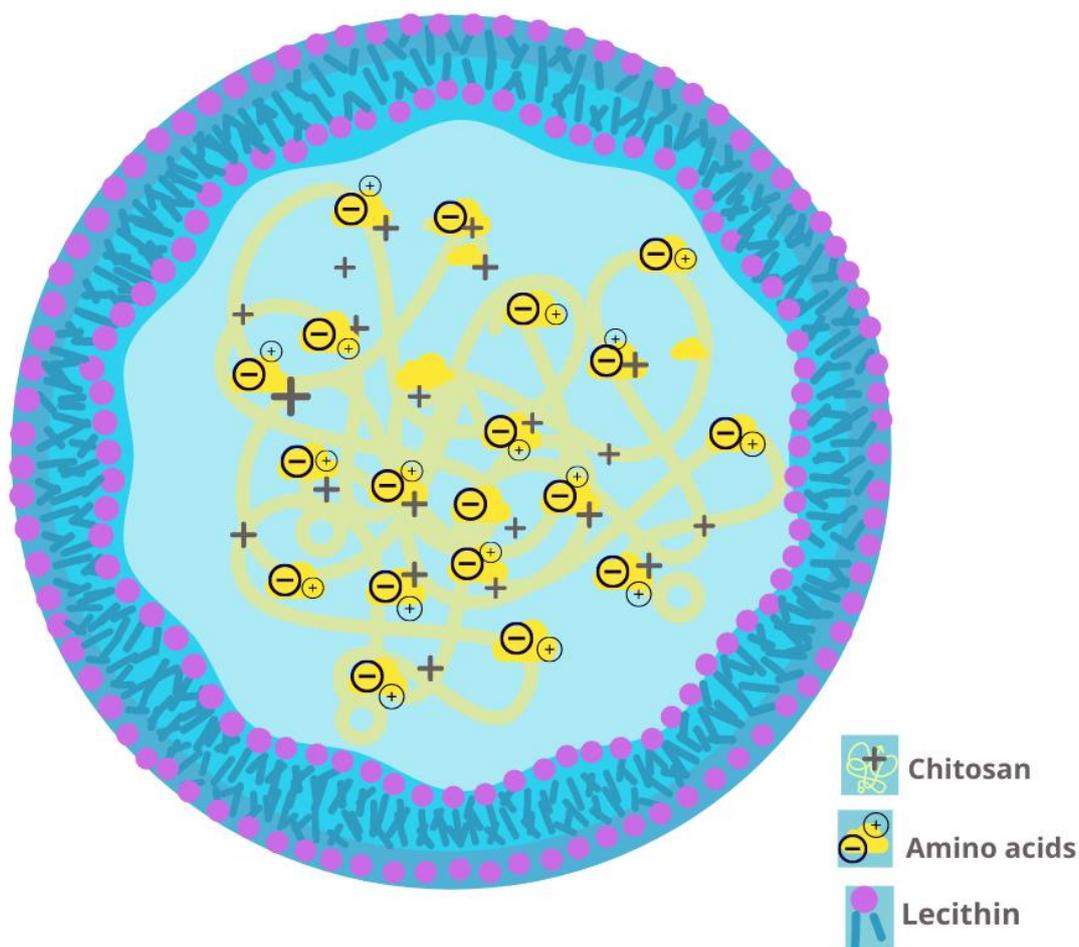
valores de tamanho de nanopartículas, PDI e potencial zeta. Este fato pode estar relacionado com as características físico-químicas dos componentes do hidrolisado proteico, capazes de proporcionar alguma interação ao sistema LC/QS, de modo a torná-lo estável. Na literatura não foram identificados estudos voltados à avaliação e desenvolvimento de nanopartículas com hidrolisados proteicos, porém é possível realizar comparações em relação aos principais componentes do hidrolisado com outros sistemas (SONVICO et al., 2006; DE MOURA; AOUADA; MATTOSO, 2008) e dessa maneira pode-se supor como este comportamento ocorre, como discutido abaixo.

Tendo em vista que o desenvolvimento dos sistemas nanoestruturados deste trabalho está embasado na interação eletrostáticas das moléculas componentes, é possível propor um modelo de interação entre o hidrolisado proteico contendo aminoácidos, com o sistema de LC/QS (Figura 5). A quitosana é um polímero com característica de polieletrólito positivo quando em solução (GAN; WANG, 2007). Tal característica faz com que o polissacarídeo apresente interação eletrostática através do fenômeno de reticulação iônica, i.e., uma interação não covalente típica, que pode ocorrer com íons carregados negativamente como a lecitina, e com grupos COO^- e de cadeias laterais de aminoácidos livres, contribuindo para a formação e estabilização das nanopartículas. Estas inferências baseiam-se em estudos da quitosana com grupos ácidos (DE MOURA; AOUADA; MATTOSO, 2008) e com colágeno desnaturado por hidrólise enzimática, apresentando diversos grupos carboxílicos aniônicos interagindo com grupos protonados da quitosana, conforme descrito previamente (TONHI e PLEPIS, 2002). De forma similar, este fenômeno de interação eletrostática é observado com a lecitina, conforme demonstrado em diversos trabalhos (GERELLI et al., 2008; SONVICO et al., 2006; HAFNER et al., 2011).

As lecitinas, por serem fosfolipídios anfifílicos, quando em meio aquoso podem apresentar um comportamento similar à formação de uma membrana biológica, organizando suas moléculas lipídicas (cauda hidrofóbica da lecitina) mantidas por interações não-covalentes com o outro grupo hidrofóbico da molécula de lecitina, formando uma camada dupla contínua, a qual servem de barreira ao fluido majoritariamente hidrofílico na solução (hidrolisado), promovendo assim a formação espontânea da bicamada em ambiente aquoso (FETTIPLACE; ANDREWS; HAYDON, 1971). A estrutura de bicamada é atribuída às propriedades especiais das moléculas lipídicas que promovem o agrupamento espontâneo em duplas camadas, mesmo sob condições artificiais simples (ALBERTS et al., 2010). Assim, neste estudo, sugere-se que

a parte hidrofílica (grupo polar) das lecitinas podem estar interagindo diretamente com a solução do hidrolisado proteico (Figura 5). Este tipo de interação formando nanopartículas com bicamadas pode ser encontrada em outras pesquisas (LIU et al., 2016; VARGAS; SHON, 2019; JIANG; LEE; LOO, 2020).

Figura 5 – Modelo elucidativo da estrutura de nanopartículas contendo o hidrolisado proteico de *A. platensis* e das interações entre cargas elétricas da lecitina, quitosana e dos aminoácidos presentes nas nanopartículas no sistema LC/QS



Fonte: elaborada pela autora (2022).

A forma e a natureza anfipática das moléculas de lipídios são responsáveis pela formação espontânea da bicamada lipídica num ambiente aquoso. Moléculas hidrofílicas se dissolvem imediatamente em água, pois elas contêm grupos carregados e/ou polares sem carga que podem formar interações eletrostáticas favoráveis, ou ligações de hidrogênio com moléculas de água, respectivamente. Ao contrário, as moléculas hidrofóbicas são insolúveis, pois praticamente todos seus átomos são não-carregados e

não-polares, portanto incapazes de formar interações energeticamente favoráveis com moléculas de água. Por estas razões, moléculas lipídicas agregam-se espontaneamente, direcionando suas caudas hidrofóbicas para o interior e as cabeças hidrofílicas ao exterior, interagindo com a água. Dependendo de sua forma, essas moléculas podem fazê-lo de duas maneiras; *i*) formando micelas, com caudas voltadas para o interior, ou *ii*) associar suas caudas hidrofóbicas com grupos hidrofóbicos presentes no meio de reação, onde ambos se protegem do meio aquoso, formando uma bicamada. É plausível que este tipo de comportamento seja gerado nas lecitinas quando em solução aquosa, a exemplo do hidrolisado proteico em estudo. A quitosana, por sua vez, forma enovelamentos e interações com os aminoácidos abundantemente livres na solução, por apresentar, em meio ácido, cargas positivas devido à protonação dos grupos amino (NH_3^+). Assim, um substrato com alta densidade de sítios negativos imersos em solução de quitosana se comportará como um suporte adequado à atração e subsequente formação de interações entre estes grupos e reticulação.

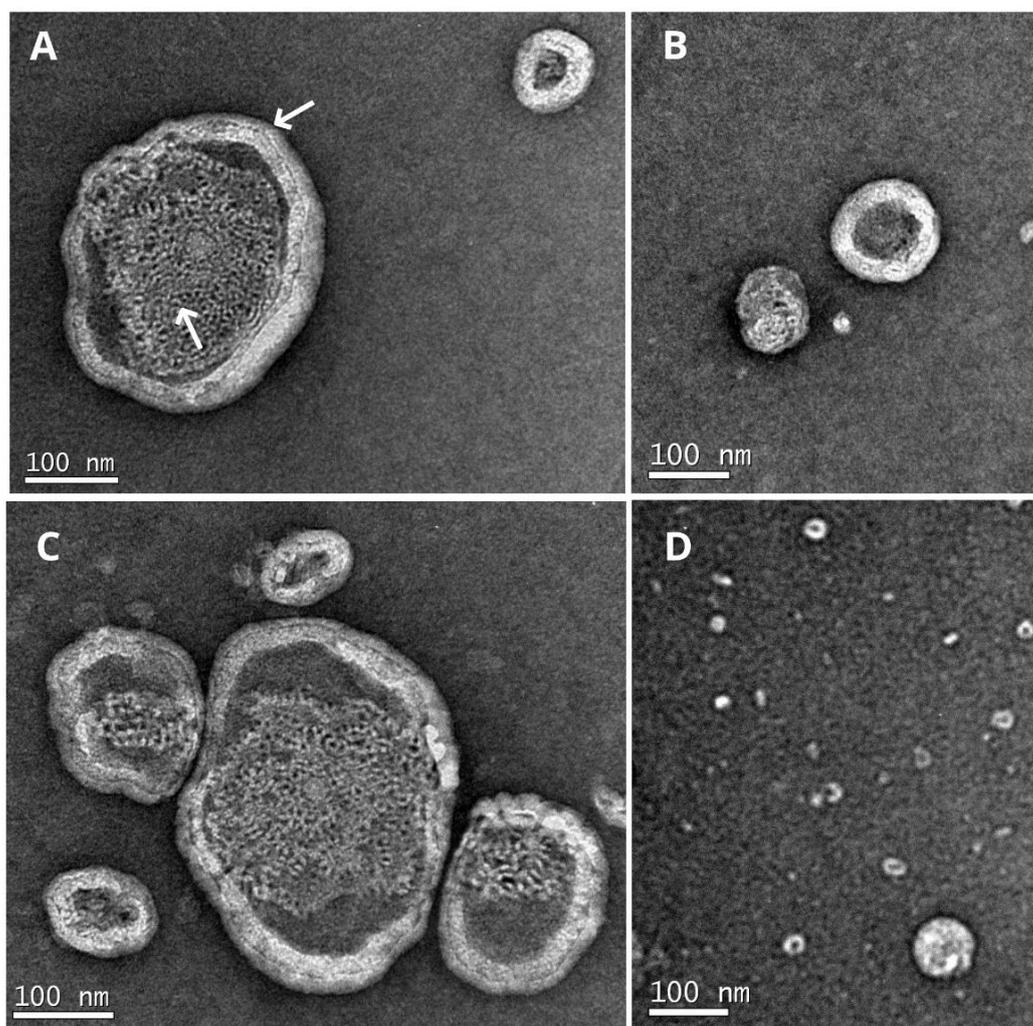
Quando em solução aquosa diluída, em pH próximo a 3, os grupos $-\text{NH}_2$ da quitosana ocorrem totalmente protonados (i.e., NH_3^+), formando um polícatión. Essa propriedade permite que a quitosana forme estruturas reticuladas com agentes iônicos (Figura 5). Em relação à aplicação em folhas, moléculas precisam primeiro penetrar a cutícula cerosa na superfície foliar. A cutícula é uma camada de plaquetas cerosas sobrepostas. Os componentes morfológicos das folhas são seletivos, ou seja, não absorvem todos os tipos de moléculas. As células-guarda dos estômatos, tricomas e as células sobre nervuras são os responsáveis primários pela absorção de compostos. Estando dentro das folhas, as moléculas absorvidas movem-se dentro da planta de célula a célula ou pelo floema (DUNCAN, 2018). Esta primeira barreira física conhecida como cutícula, se distingue em função da natureza química e física, e condiciona a entrada de formulações dependendo também do ambiente no qual a folha se desenvolveu e ao qual a absorção está ocorrendo (DEVINE et al., 1992). Diferenças em características de solubilidade desses diferentes componentes foliares apresentam obstáculos à absorção de moléculas. Alguns componentes são lipofílicos, enquanto outros são hidrofílicos (STERLING, 1994). Nanopartículas contendo lecitinas possuem a vantagem de aumentar superficialmente a área de contato em superfícies apolares, como cutículas foliares.

3.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS CONTENDO HIDROLISADO PROTEICO DE *ARTHROSPIRA PLATENSIS* ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Na microscopia eletrônica de transmissão (TEM), as nanopartículas apresentaram formato esférico, com diâmetro de partícula ($>100 \text{ nm} < 300 \text{ nm}$) similar ao observado pela técnica de DLS (Figura 6). Além disso, percebe-se que as nanopartículas apresentam uma camada (*shell*) e um contraste de densidades em relação ao seu interior (*core*). Esta estrutura, com divisão evidente do tipo *core-shell*, é típica de nanopartículas do tipo lipossomas, como descrito por Liu et al., (2016), em nanopartículas de lecitina e quitosana. Aqueles autores evidenciaram a formação de bicamadas nas estruturas e a formação de *core-shell* ao encapsular insulina (LIU et al., 2016). Este tipo de nanopartícula, conhecida como híbrida, também é descrita por Jiang et al. (2020), onde o sistema constitui-se de um polímero no núcleo que encapsula o ativo, com sua superfície revestida ou funcionalizada com composto lipídico, possuindo uma única ou múltiplas camadas lipídicas, podendo ser fosfolipídios, por exemplo (JIANG; LEE; LOO, 2020). Possuindo uma arquitetura *core-shell*, essas nanopartículas exibem atributos promissores como uma versátil e robusta integridade estrutural, boa biocompatibilidade e potencial de encapsulamento de agentes terapêuticos hidrofílicos (VARGAS; SHON, 2019).

Outra evidência desta formação *core-shell* relaciona-se ao tamanho constante apresentado pelas bicamadas, independentemente do tamanho da nanopartícula (Figura 6). Esta ordenação pode estar atribuída ao mesmo tamanho de molécula que a forma e ao mesmo tipo de interação entre estas camadas, o que indicaria a presença das lecitinas neste arranjo. Este fato não poderia ser explicado com a quitosana, pois a variação de tamanho e proporções dos monômeros presentes na solução não são iguais, implicando na variação de tamanho destas camadas (FAN et al., 2012).

Figura 6 – Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas LC/QS contendo o hidrolisado proteico de *Arthrospira platensis*. **A**, **B** e **C** apresentam detalhes da estrutura das nanopartículas de LC/QS, evidenciando pelas setas a bicamada formada e o *core* apresentando contrastes na densidade do material adjacente. Na imagem **D**, observa-se a homogeneidade de tamanhos apresentados pelas nanopartículas



Fonte: elaborada pela autora (2022).

Nas nanopartículas deste estudo, o *core* está formado por compostos hidrofílicos, i.e. hidrolisado proteico. O contraste evidente no interior das nanopartículas pode estar relacionado com o enovelamento das cadeias de quitosana com os aminoácidos do hidrolisado. Isto explicaria em parte o motivo de as nanopartículas livres do ativo não manterem estabilidade por longo período (120 dias), comparado aos sistemas contendo o hidrolisado proteico. A tendência das cadeias de quitosana manterem-se estendidas em pH baixo (GAN; WANG, 2007), pode ocasionar a instabilidade das formulações controle,

evidenciado na diminuição de cargas do potencial zeta após 30 dias de armazenamento. Ao contrário, as nanopartículas contendo o hidrolisado apresentaram valores de potencial zeta altos e estáveis ao longo do tempo de estudo da estabilidade, sendo que estes sistemas favorecem o envelhecimento da quitosana através das interações promovidos entre as cargas elétricas dos constituintes presentes. Foi observado contraste de densidade entre as partes interna e externa das nanopartículas (solução aquosa), demonstrando a presença de compostos distintos naqueles ambientes. Estas evidências indicam a formação do *core* de nanopartículas atribuídas a quitosana envelhecendo-se com aminoácidos, ou outras moléculas hidrofílicas com cargas negativas presentes no hidrolisado (Figuras 6A e 6C).

3.4 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE%) E TEOR DE AMINOÁCIDOS TOTAIS NAS NANOFORMULAÇÕES LC/QS CONTENDO HIDROLISADO PROTEICO DE *ARTHROSPIRA PLATENSIS*

Ambas as formulações, (LC/QS 10:1 e 20:1), foram estudadas em relação ao conteúdo de aminoácidos totais encapsulados. Através deste ensaio (Tabela 6), a eficiência de encapsulação das nanopartículas foi em média de 72,62% para a formulação LC/QS 10:1 e 72,06% para as nanopartículas LC/QS 20:1, não havendo diferenças estatísticas significativas entre ambas ($P < 0,05$). Ao longo das medições realizadas até 120 dias após a formulação das nanopartículas, observou-se que ambas as formulações aumentaram sua eficiência de encapsulação de aminoácidos totais, mantendo-se constantes e similares. Este comportamento também foi observado durante o ensaio de estabilidade (3.2), onde as formulações variaram ao longo do tempo em seus valores de tamanho, potencial de polidispersão e de superfície de cargas, porém não havendo diferenças estatísticas entre as formulações.

Os valores de conteúdo de aminoácidos totais encapsulados observados demonstram que o método da ninidrina utilizado para a quantificação e eficiência de encapsulação dos aminoácidos nas nanopartículas causa interferências nos grupos amino livres da quitosana em pH ácido, que reagem com a ninidrina, contribuindo positivamente para a formação do composto conhecido como púrpura de Rühmann, gerando valores superestimados, conforme descrito por Yuan et al. (2007). Sendo assim, esta reação é capaz de interferir na quantificação de aminoácidos totais por este método. Por este motivo, neste estudo quantificamos pelo mesmo método as reações de ninidrina com o grupamento amino da quitosana nas formulações controle (nanopartículas livres do

ativo), subtraindo os valores das formulações contendo o hidrolisado das formulações controle, com o intuito de termos o valor real proveniente apenas dos aminoácidos livres nas formulações que continham o hidrolisado proteico.

Tabela 6 – Eficiência de encapsulação de aminoácidos totais das formulações LC/QS 10:1 e 20:1 contendo o hidrolisado proteico de *Arthrospira platensis* ao longo de 120 dias de armazenamento das formulações

Eficiência de Encapsulação (%)*				
Formulação	7 dias	30 dias	60 dias	120 dias
NP (10:1)	72,62 ±0,44 aA	77,01±1,79 aA	81,86 ±1,52 aB	85,10 ±4,91 aB
NP (20:1)	72,06 ±0,23 aA	75,57±1,47 aA	81,52 ±1,65 aB	83,40 ±5,02 aB

Resultados apresentados como média ± desvio padrão (n=3); para cada coluna, letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre as formulações em cada tempo ($p < 0,05$); ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Tukey, letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre as formulações ao longo do tempo ($p < 0,05$); ANOVA de uma via seguida do teste *post hoc* de Tukey.

Os valores de (EE%) demonstraram mais uma vez que o sistema de nanopartículas LC/QS e o hidrolisado proteico estabilizam-se ao longo do tempo, favorecendo a interação superficial de aminoácidos ao sistema. Este comportamento pode estar envolvido com o equilíbrio químico e físico da solução através do fenômeno de adsorção. A adsorção é um processo de transferência de um ou mais constituintes (adsorbatos) em uma fase fluída para uma superfície adsorvente. Neste tipo de processo, as moléculas na fase fluída são atraídas para a zona interfacial devido à existência de forças atrativas não compensadas no adsorvente (RUTHVEN, 1984). A adsorção pode ocorrer em materiais macromoleculares e em nanopartículas que são utilizadas terapêuticamente como carreadores de fármacos, nos quais o princípio ativo (fármaco ou material biologicamente ativo) é dissolvido, aprisionado ou encapsulado, ou ao qual o princípio ativo é adsorvido ou ligado (KREUTER, 2007). No trabalho com nanopartículas realizado por Li, Paulson e Gill (2015), os pesquisadores encapsularam hidrolisado proteico de salmão em nanopartículas lipossômicas de quitosana, apontando a relação de maior eficiência de encapsulação em formulações contendo mais de 0,05% de quitosana e encontrando valores ótimos de tamanho de partícula e eficiência de encapsulação entre 70 a 75%, utilizando 0,2% do polímero na síntese dos lipossomos. Li et al. (2022) basearam-se no encapsulamento de imunoglobulina em nanopartículas lipossômicas com quitosana, demonstrando que devido à interação robusta entre quitosana e lipossomas, o

tamanho das nanopartículas, eficiência de encapsulamento e estabilidade dos lipossomas atingiram o estado ideal em uma concentração de quitosana de 0,8%, com a eficiência de encapsulamento atingindo 77,51%.

Weiner (1997) explica que o aprisionamento hidrofílico é proporcional à concentração de fosfolipídios e ao volume interno total dos lipossomas. Neste trabalho, notamos que ao longo do tempo (a partir do 30º dia da formulação – Figura 4) ocorre um aumento no tamanho do diâmetro das nanopartículas e aumento das cargas de superfície, o que pode explicar o aumento da eficiência de encapsulamento dos aminoácidos livres ao longo do tempo de armazenamento (Tabela 6).

Considerando que não houve diferenças estatísticas significativas ($P < 0,05$) entre as formulações em relação ao tamanho, PDI, potencial zeta e aos valores de EE%, optou-se por seguir aos demais ensaios com apenas uma das formulações, i.e., LC/QS 10:1. Embora não haja diferenças estatísticas ao longo dos 120 dias de armazenamento entre as duas formulações estudadas, optou-se pela escolha da formulação LC/QS 10:1, por disponibilizar uma quantidade maior de cargas positivas do grupo amino da quitosana às interações com cargas negativas na solução contendo o hidrolisado proteico.

3.5 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE POLIAMINAS E DE TRIPTOFANO CONTIDAS EM HIDROLISADO PROTEICO ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

No presente estudo, foi possível identificar a presença das poliaminas putrescina, espermidina, espermina e cadaverina, bem como o proto-alcaloide triptamina, triptofano e seu derivado 5-hidroxitriptofano (Tabela 7). Embora a hidrólise ácida usualmente acarrete a destruição do triptofano (DA SILVEIRA; FURLONG, 2007), as condições de hidrólise da biomassa de *A. platensis* proposta neste trabalho preservaram uma pequena fração deste importante aminoácido (6,63 ug/mL).

Tabela 7 – Quantificação de poliaminas no hidrolisado proteico de *Arthrospira platensis* através de cromatografia líquida de alta eficiência

Aminoácidos/Poliaminas	Hidrolisado (ug/mL)
Triptofano	6,63 ± 0,382
5-Hidroxitriptofano	5,52 ± 0,121
Triptamina	0,77 ± 0,021
Putrescina	0,11 ± 0,005
Cadaverina	0,09 ± 0,002
Espermina	0,53 ± 0,011
Espermidina	0,07 ± 0,010

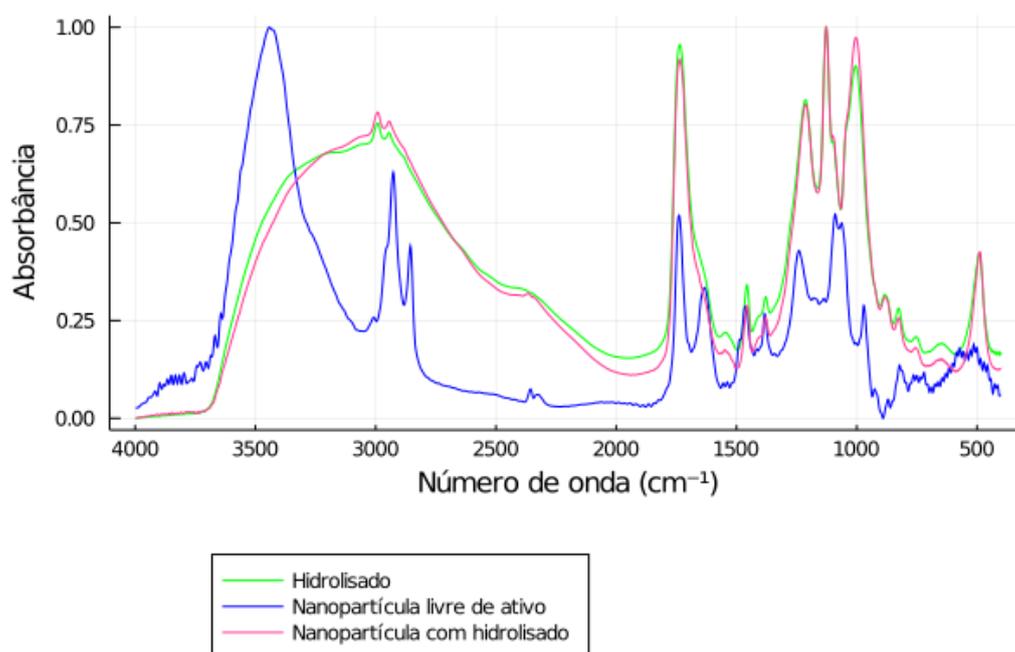
Resultados apresentados como média ± desvio padrão (n=3) para cada coluna.

Poliaminas são moléculas alifáticas nitrogenadas de baixo peso molecular, contendo grupos amino ao longo de suas estruturas (WALKER, 2011). As principais poliaminas encontradas nas células são a putrescina, espermidina e a espermina. Sua biossíntese ocorre a partir de precursores aminoácidos, i.e., L-ornitina e L-arginina, para a putrescina e L- metionina, para a espermidina e espermina (ALCÁZAR et al., 2010). O interesse na identificação e quantificação destas moléculas em um extrato bioestimulante está ligado à capacidade de ativação da síntese de hormônios endógenos nas plantas tratadas com formulações contendo tais compostos (WALLY et al., 2013; MÓGOR et al., 2018). São conhecidas por promoverem diversos processos fisiológicos nas plantas, atuando sobre o desenvolvimento e diferenciação celular, crescimento de raízes, floração e maturação de frutos, na capacidade de fluidez das membranas, senescência foliar e durante estresses abióticos (KUMARI et al., 2009; ALCÁZAR et al., 2010). Em estudo de Lin e Lin (2019) são relatadas em mais de cinquenta espécies de microalgas a composição de poliaminas, as quais ocorrem em baixas concentrações, i.e., na faixa de μM . Em macroalgas, estas aminas biogênicas estão relacionadas à regulação do desenvolvimento de tecidos, também ocorrendo em concentrações micromolares (TARAKHOVSKAYA; MASLOV; SHISHOVA, 2007). Já o triptofano, um aminoácido proteico comum em plantas, atua como precursor intermediário da biossíntese de várias substâncias indólicas, entre elas o ácido indolacético (AIA), principal auxina endógena em plantas (ZHAO, 2012). As duas rotas de biossíntese de AIA melhor elucidadas demonstram ser o ácido indol-3-acético um intermediário proveniente da descarboxilação e desaminação do triptofano (WANG et al., 2015).

3.6 ANÁLISE DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR) DO HIDROLISADO PROTEICO DE *ARTHROSPIRA PLATENSIS* NAS NANOFORMULAÇÕES

Para caracterizar e melhor compreender a formação de nanopartículas contendo o hidrolisado proteico, os espectros de infravermelho médio (FTIR) das formulações nanoparticuladas contendo o hidrolisado proteico e o controle foram analisadas. Nos espectros referentes às nanopartículas controle (Figura 7), foi possível verificar que as bandas dos grupos funcionais identificados estão de acordo com o descrito na literatura para espectros de quitosana e do fosfolípido lecitina (WHITTINGHILL; NORTON; PROCTOR, 2000; OSMAN; AROF, 2003; XU et al., 2005; LAWRIE et al., 2007; KULIGOWSKI et al., 2008).

Figura 7 – Perfis espectrais de FT-IR das nanoformulações LC/QS 10: 1 contendo o hidrolisado proteico e do controle contendo o hidrolisado proteico de *A. platensis*



Fonte: elaborada pela autora (2022).

Observa-se banda com estiramento largo e intenso na região do espectro entre 3441-3432 cm^{-1} , sendo essa relacionada ao estiramento de grupos hidroxila da quitosana, a qual apresenta-se sobreposta à banda de estiramento N-H. A banda na região de 2927-2885 cm^{-1} foi considerada de média intensidade e está relacionada ao estiramento da

ligação C-H, atribuída às moléculas de alcanos presentes em lecitinas/fosfatidilcolina/fosfolipídios. Na região da banda que compreende 2350-2320 cm^{-1} há um sinal fraco característico de ligações O-H, comumente atribuído aos ácidos carboxílicos. A região de 1739 – 1750 cm^{-1} é típica do estiramento de grupamentos carbonila e apresenta forte intensidade no espectro das nanopartículas livres de ativo. Na janela espectral entre 1514 - 1590 cm^{-1} constata-se uma banda pouco intensa e com sobreposição, relacionada com os grupos de amins primárias. A frequência entre 1633-1645 cm^{-1} é representada por amida I do grupo acetil da quitosana, enquanto a banda entre 1415-1425 cm^{-1} foi associada à deformação axial de CN da amida. A região *fingerprint* que compreende as janelas espectrais de 875- 890 cm^{-1} e 1245-1150 cm^{-1} é característica de estruturas de polissacarídeos, representada por ligações C-O-C de grupos glicosídicos. Os perfis espectrais de FT-IR do hidrolisado proteico e de suas nanopartículas derivadas apresentam bandas sobrepostas, ou seja, semelhantes (Figura 7). Para a análise destes espectros, comparações com espectros de FTIR contendo padrões dos possíveis compostos atribuídos foram realizados (BARTH, 2007; OHI, 2009; RAGAVENDRAN et al., 2011; KOSE; ONCEL, 2015; PANUSZKO et al., 2015; COLEGIO, 2016; ZHANG et al., 2019). Na região que corresponde às frequências 2993-2943 cm^{-1} observam-se bandas relacionadas ao ácido láctico presente no hidrolisado, sendo este sinal característico do estiramento de grupos C-H. De forma similar, as bandas observadas em 700-1750 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} foram associadas aos grupos C=O e CH-O, respectivamente, característicos daquele ácido orgânico. A região de 3000 cm^{-1} apresenta sinal típico do grupo P-OH, presente no ácido fosfórico. Adicionalmente, as bandas espectrais com frequências entre 1380-1370 cm^{-1} e 1154 cm^{-1} podem ser atribuídas ao grupo éster fosfato P=O do ácido fosfórico presente no hidrolisado proteico. Por sua vez, a banda em 2916 cm^{-1} é indicativa de ligações O-H da função COOH, característica de aminoácidos. Além desta banda, a região de 1600-1660 cm^{-1} também é atribuída à presença de aminoácidos, no que tange aos seus grupamentos amina. A região espectral com sinal em comprimento de onda de 3280 cm^{-1} é atribuída a proteínas, enquanto as bandas observadas em 2923 cm^{-1} , 1642 cm^{-1} e 1456 cm^{-1} às amidas primárias e ao grupo N-H das amidas secundárias, respectivamente. A banda no comprimento de onda 1398 cm^{-1} é atribuída ao grupo carboxílico de aminoácidos. A Tabela 8 registra as principais bandas (cm^{-1}) observadas nos espectros de FTIR e as funções orgânicas a elas atribuídas nas três formulações em estudo.

Tabela 8 – Possíveis atribuições a grupos funcionais e compostos de bandas identificadas nos espectros de FT-IR de formulações de nanopartículas e hidrolisado proteico de *Arthrospira platensis*

Bandas (comprimento de onda, cm ⁻¹)	Grupos funcionais	Nanopartículas controle	Nanopartículas contendo o ativo	Hidrolisado proteico
3441-3423	OH -NH	X		
3000	P-OH			Ácido fosfórico
3280	Proteínas		X	X
2993-2943	C-H		X	X
2927-2885	C-H	Lecitinas		
2923	Lipídios	X	X	X
2916	OH			Aminoácidos
2350-2320	OH	X	X	X
1739-1750	C=O	X	X	X
1700-1750	C=O	Carbonila lecitina		Ácido láctico
1642	C=O Amidas I			
1633-1645	Amida I	Acetil quitosana		
1600-1660	N-H	X		Aminoácidos
1514-1590	Amina primária	X	X	X
1456	N-H Amidas II	X	X	X
1415-1425	C-N Amida I C-C glucose	X	X	X
1398	Carboxila	X		Aminoácidos
1380-1370	P=O	X		Ácido Fosfórico
1245-1150	C-O-C anel glicosídico	Polissacarídeos		
1200	CH-O			Ácido láctico
1154	P=O			Ácido Fosfórico
875-890	Polissacarídeos	X		
830-750	Aminas I e II		X	X
650	C-H Alcenos		X	X

Presença da banda referente indicada com (x), células vazias indicam ausência das bandas.

3.6 ANÁLISE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DE HIDROGÊNIO (¹H-RMN) DO HIDROLISADO PROTEICO DE *ARTHROSPIRA PLATENSIS*

A análise dos espectros de ¹H-RMN do hidrolisado proteico de *A. platensis* através da plataforma Bayesil identificou 91 compostos, sendo que destes quarenta e um apresentaram similaridade de perfis espectrais com padrões analíticos superior a 80%. Destes, 13 aminoácidos foram identificados (Tabela 9), sendo que apenas a alanina não foi identificada por cromatografia líquida (item 3.1). A espectroscopia de ¹H-RMN possibilitou uma análise mais rápida e abrangente em relação às demais técnicas utilizadas neste trabalho para a identificação dos aminoácidos e também de outras moléculas de interesse na composição de um bioestimulante (Tabela 9).

Tabela 9 – Metabólitos identificados nos espectros de ^1H -RMN do hidrolisado proteico de *Arthrospira platensis*. Os compostos foram identificados através da plataforma Bayesyl, sendo que a pontuação atribuída (0 a 10) para cada metabólito corresponde a probabilidade de o espectro amostral ser equivalente ao observado para determinado analito padrão

Composto	HMDB Identificador	Pontuação de confiança (≥ 8 a 10)
Glicina	HMDB00123	10
L- alanina	HMDB00161	10
L-prolina	HMDB00162	10
L-valina	HMDB00883	10
L-leucina	HMDB00687	10
L-metionina	HMDB00696	10
L-tirosina	HMDB00158	10
L- fenilalanina	HMDB00159	10
L-glutamina	HMDB00641	10
Betaína	HMDB000043	10
Hipoxantina	HMDB00157	10
Creatinina	HMDB00562	10
Isopropanol	HMDB00863	10
Glucose	HMDB00122	10
Ácido 2-hidroxiisovalérico	HMDB00407	10
Ácido beta-hidroxibutírico	HMDB00357	10
EDTA	HMDB05109	10
Dimetil sulfona	HMDB04983	10
Acetona	HMDB01659	10
Ácido piroglutâmico	HMDB00267	10
Ácido acético	HMDB000042	10
Colina	HMDB00097	10
L- Ácido láctico	HMDB00190	10
Ácido cítrico	HMDB00094	10
Dimetilamina	HMDB000087	10
L- ácido glutamico	HMDB00148	9
L-ácido aspartico	HMDB00191	9
L-treonina	HMDB00167	9
L- Lisina	HMDB00182	9
Mioinisol	HMDB00211	9
Ácido alfa-hidroxibutírico	HMDB0000008	9
L-carnitina	HMDB00062	9
Glicerol	HMDB00131	9
3-hidroxi-isobutirato	HMDB0000023	9
Ácido fórmico	HMDB00142	9
1,5-anidrosorbitol	HMDB02712	9
Etanol	HMDB00108	9
Ácido pirúvico	HMDB00243	8
Ácido succínico	HMDB00254	8
Ureia	HMDB00294	8
Ácido acetoacético	HMDB00060	8

Considerando os resultados descritos na Tabela 9, alguns metabólitos identificados despertam especial atenção. Betaína, por exemplo, é relatada por Ashraf e

Foolad (2007) como uma molécula importante relacionada à proteção de organismos fotossintéticos à estresses abióticos, incluindo estresse salino, através do acúmulo destas moléculas osmoprotetoras (AHMAD et al., 2016). Aplicações exógenas de glicina-betaína também foram promissoras em relação às respostas de plantas expostas a estresses abióticos provocados por salinidade (ASHRAF et al., 2008). Seciu et al. (2016) avaliaram o efeito de um bioestimulante contendo glicina-betaína em sua composição e concluíram que o produto foi capaz de mitigar os efeitos do estresse hídrico em plantas de couve-flor e repolho tratadas com estes osmoprotetores.

Como respostas fisiológicas ao estresse osmótico, plantas acumulam um certo grupo de metabólitos, prolina, glutamato, glicina-betaína, L-carnitina, manitol, sorbitol, frutanos, poliois, trealose, sacarose e oligossacarídeos, juntamente com íons inorgânicos (ALI; BANO; FAZAL, 2017). L-carnitina, um composto de amônio quaternário, possui propriedades osmolíticas bem descritas no equilíbrio osmótico em células animais (RIPPA; PERRIN, 2018) e também em *Arabidopsis thaliana* (LELANDAIS-BRIÈRE et al., 2007). Ertani et al. (2017) estudaram a expressão de genes de tomateiros tratados com hidrolisado proteico de alfafa e identificaram genes envolvidos no transporte de membrana de cátions e L-carnitina. No presente trabalho, L-carnitina, creatinina e betaína foram identificadas como constituintes do hidrolisado de *A. platensis*, evidenciando seu potencial como bioestimulante vegetal.

Outro composto associado ao metabolismo de moléculas de interesse foi identificado na composição do hidrolisado, trata-se do ácido piroglutâmico. Em plantas, este ácido é precursor de ácido glutâmico e encontra-se associado ao controle do estado redox celular como intermediário na síntese de glutathione, e a eventos de regulação da homeostase celular sob condições de estresses ambientais (GANG et al., 2018). Jiménez-Arias et al. (2019) demonstraram que a aplicação de ácido piroglutâmico é capaz de promover um aumento na produtividade de alface, em condições de campo com irrigação 30% inferior à ótima. O ácido piroglutâmico parece ser um osmoprotetor em plantas estressadas por *déficit* hídrico, além de atuar no aumento da taxa fotossintética e de defesas antioxidantes, mantendo o equilíbrio osmótico e hídrico (JIMÉNEZ-ARIAS et al., 2019). Além disso, este ácido orgânico foi descrito como agente antibacteriano e antifúngico contra *Phytophthora infestans* (GANG et al., 2018).

Por fim, outros metabólitos identificados no hidrolisado de *A. platensis* possuem relevante interesse por estarem presentes em rotas intermediárias de síntese de aminoácidos, como, por exemplo, o 3-hidroxi-isobutirato na biossíntese de L-valina, L-

isoleucina e *L*-leucina (VIEGAS et al., 2018). Com isso, é possível notar que a composição de aminoácidos e de moléculas do hidrolisado proteico da cianobactéria *A. platensis* em estudo possui clara potencialidade para aplicação como um bioestimulante de plantas.

4 CONCLUSÃO

Com este estudo, é possível perceber que a hidrólise ácida da biomassa de *A. platensis* pode ser realizada gerando uma solução contendo aminoácidos livres e outros compostos de interesse para a aplicação em cultivos. Além disso, foi possível desenvolver um sistema de entrega nanoformulado a partir de lecitina e quitosana do hidrolisado de *A. platensis* diluído (1:10 v/v). A nanoformulação contendo o ativo apresentou tamanho médio de aproximadamente 200 nm, mostrando-se estável até 120 dias após seu preparo.

À vista disso, o hidrolisado proteico de *A. platensis* nanoformulado apresenta-se com características de um potencial bioestimulante de plantas. Futuros ensaios devem estar relacionados aos efeitos do hidrolisado proteico de *A. platensis* sobre o metabolismo de plantas de diferentes espécies e em diferentes estágios de desenvolvimento com o propósito de comprovar os efeitos bioestimulantes que a complexa matriz de moléculas presente no hidrolisado possa promover.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, P. et al. Nitric oxide mitigates salt stress by regulating levels of osmolytes and antioxidant enzymes in chickpea. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, p. 1–11, 2016.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2010.
- ALCÁZAR, R. et al. Polyamines: Molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Plant*, v. 231, n. 6, p. 1237–1249, 2010.
- ALI, F.; BANO, A.; FAZAL, A. Recent methods of drought stress tolerance in plants. *Plant Growth Regulation*, v. 82, n. 3, p. 363–375, 2017.
- AL-NAAMANI, L.; DOBRETSOV, S.; DUTTA, J. Chitosan-zinc oxide nanoparticle composite coating for active food packaging applications. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 38, p. 231–237, 2016.
- ASHRAF, M. et al. Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. *Advances in Agronomy*, v. 97, n. 7, p. 45–110, 2008.
- BAO, H.; LI, L.; ZHANG, H. Influence of cetyltrimethylammonium bromide on physicochemical properties and microstructures of chitosan-TPP nanoparticles in aqueous solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 328, n. 2, p. 270–277, 2008.
- BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, v. 1767, n. 9, p. 1073–1101, 2007.
- CHIAIESE, P. et al. Renewable sources of plant biostimulation: Microalgae as a sustainable means to improve crop performance. *Frontiers in Plant Science*, v. 871, p. 1–6, 2018.
- CHUAH, A. M. et al. Formation of biocompatible nanoparticles via the self-assembly of chitosan and modified lecithin. *Journal of Food Science*, v. 74, n. 1, p. 1–34, 2009.
- COLEGIO, R. C. Nanocápsulas de urea en quitosano y ácido polimetacrílico em cultivo hidropônico de lechugas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, v. 15, n. 2, p. 423–431, 2016.
- COLLA, G. et al. Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. *Frontiers in Plant Science*, v. 5, p. 1–6, 2014.
- COLLA, G. et al. Foliar applications of protein hydrolysate, plant and seaweed extracts increase yield but differentially modulate fruit quality of greenhouse tomato. *HortScience*, v. 52, n. 9, p. 1214–1220, 2017.
- COLLA, G. et al. Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, v. 196, p. 28–38, 2015.
- DA SILVEIRA, C. M.; FURLONG, E. B. Caracterização de compostos nitrogenados

- presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 805–811, 2007.
- DE AZEVEDO, F. R.; FREIRE, F. **Tecnologia de aplicação de defensivos agrícolas. Tecnologia de aplicação de defensivos agrícolas**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006.
- DE MOURA, M. R.; AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H. C. Preparation of chitosan nanoparticles using methacrylic acid. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 321, n. 2, p. 477–483, 2008.
- DU JARDIN, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 3–14, 2015.
- DUHAN, J. S. et al. Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. **Biotechnology Reports**, v. 15, p. 11–23, 2017.
- ERTANI, A. et al. Alfalfa plant-derived biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed *Zea mays* L. plants. **Plant and Soil**, v. 364, p. 145–158, 2013.
- ERTANI, A; SCHIAVON, M; NARDI, S. Transcriptome-wide identification of differentially expressed genes in *Solanum lycopersicon* L. in response to an alfalfa-protein hydrolysate using microarrays. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1–19, 2017.
- FAN, W. et al. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, n. 1, p. 21–27, 2012.
- FELIPINI, R. B. et al. Apple scab control and activation of plant defence responses using potassium phosphite and chitosan. **European Journal of Plant Pathology**, v. 145, n. 4, p. 929–939, 2016.
- FETTIPLACE, R.; ANDREWS, D. M.; HAYDON, D. A. The thickness, composition and structure of some lipid bilayers and natural membranes. **The Journal of Membrane Biology**, v. 5, n. 3, p. 277–296, 1971.
- FRIEDMAN, M. Applications of the ninhydrin reaction for analysis of amino acids, peptides, and proteins to agricultural and biomedical sciences. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 3, p. 385–406, 2004.
- GAN, Q.; WANG, T. Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier-Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 59, n. 1, p. 24–34, 2007.
- GANG, F. LI. et al. Synthesis and bioactivities evaluation of L-pyroglutamic acid analogues from natural product lead. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 4644–4649, 2018.
- GERELLI, Y. et al. Structure of self-organized multilayer nanoparticles for drug delivery. **Langmuir**, v. 24, n. 20, p. 11378–11384, 2008.

HAFNER, A. et al. Short- and long-term stability of lyophilised melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 59, n. 9, p. 1117–1123, 2011.

HUNTER, R. **Zeta potential in colloid science - Principles and applications**. London: Academic press, 2013.

JARDIN, P.; XU, L.; GEELEN, D. Agricultural Functions and Action Mechanisms of Plant Biostimulants (PBs). *In: The Chemical Biology of Plant Biostimulants*. New York: John Wiley & Sons, 2020.

JIANG, L.; LEE, H. W.; LOO, S. C. J. Therapeutic lipid-coated hybrid nanoparticles against bacterial infections. **RSC Advances**, v. 10, n. 14, p. 8497–8517, 2020.

JIMÉNEZ-ARIAS, D. et al. Lettuce plants treated with L-pyroglutamic acid increase yield under water deficit stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 158, n. 11 p. 215–222, 2019.

KAH, M.; HOFMANN, T. Nanopesticide research: Current trends and future priorities. **Environment International**, v. 63, p. 224–235, 2014.

KOSE, A.; ONCEL, S. S. Properties of microalgal enzymatic protein hydrolysates: Biochemical composition, protein distribution and FTIR characteristics. **Biotechnology Reports**, v. 6, p. 137–143, 2015.

KREUTER, J. Nanoparticles – a historical perspective. **International journal of pharmaceutics**, v. 331, n. 1, p. 1–10, 2007.

KULIGOWSKI, J. et al. On-line gel permeation chromatography-attenuated total reflectance-Fourier transform infrared determination of lecithin and soybean oil in dietary supplements. **Journal of Chromatography A**, v. 1185, n. 1, p. 71–77, 2008.

KUMARI, N. et al. Polyamines in plants: an overview. **International Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 5, n. 1, p. 93–107, 2009

LAWRIE, G. et al. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 8, p. 2533–2541, 2007.

LEAL, D. et al. FT-IR spectra of alginic acid block fractions in three species of brown seaweeds. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 2, p. 308–316, 2008

LELANDAIS-BRIÈRE, C. et al. Disruption of AtOCT1, an organic cation transporter gene, affects root development and carnitine-related responses in Arabidopsis. **Plant Journal**, v. 51, n. 2, p. 154–164, 2007.

LIMA, G. P. P. et al. Comparison of polyamine, phenol and flavonoid contents in plants grown under conventional and organic methods. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 43, n. 10, p. 1838–1843, 2008.

- LIN, H. LIN, H. Polyamines in microalgae: something borrowed, something new. **Marine Drugs**, v. 17, n. 1, p. 1–23, 2019.
- LIU, L. et al. Self-assembled lecithin/chitosan nanoparticles for oral insulin delivery: Preparation and functional evaluation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 761–769, 2016.
- LI, X. et al. Encapsulation efficiency and oral delivery stability of chitosan–liposome-encapsulated immunoglobulin Y. **Journal of Food Science**, v. 87, n. 4, p. 1708–1720, 2022.
- LI, Z.; PAULSON, A. T.; GILL, T. A. Encapsulation of bioactive salmon protein hydrolysates with chitosan-coated liposomes. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 733–743, 2015.
- MÓGOR, Á. F. et al. Biostimulant properties of cyanobacterial hydrolysate related to polyamines. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 1, p. 453–460, 2018.
- MÜLLER-GOYMANN, C. C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 343–356, 2004.
- NAIR, R. et al. Nanoparticulate material delivery to plants. **Plant Science**, v. 179, n. 3, p. 154–163, 2010.
- OHI, M. D. EM Analysis of Protein Structure. **Encyclopedia of Life Sciences**, n. 1958, p. 662–666, 2009.
- OSMAN, Z.; AROF, A. K. FTIR studies of chitosan acetate-based polymer electrolytes. **Electrochimica Acta**, v. 48, n. 8, p. 993–999, 2003.
- PANUSZKO, A. et al. Hydration of amino acids: FTIR spectra and molecular dynamics studies. **Amino Acids**, v. 47, n. 11, p. 2265–2278, 2015.
- PASUPULETI, V. K.; DEMAIN, A. L. Protein hydrolysates in biotechnology. **Protein Hydrolysates in Biotechnology**, p. 1–229, 2010.
- PAUL, K. et al. Understanding the biostimulant action of vegetal-derived protein hydrolysates by high-throughput plant phenotyping and metabolomics: A case study on tomato. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1–17, 2019.
- PETOSA, A. R. et al. Assessing the transport potential of polymeric nanocapsules developed for crop protection. **Water Research**, v. 111, p. 10–17, 2017.
- PEREIRA, L.; GHEDA, S. F.; RIBEIRO-CLARO, P. J. A. Analysis by vibrational spectroscopy of seaweed polysaccharides with potential use in food, pharmaceutical, and cosmetic industries. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 2013, p. 1–7, 2013.

- POVERO, G. Exploring Natural Resources for Biostimulants. **The Chemical Biology of Plant Biostimulants**, p. 261–300, 2020.
- RAGAVENDRAN, P. et al. Functional group analysis of various extracts of *Aerva lanata* by FTIR spectrum. **Pharmacology**, v. 1, p. 358–364, 2011.
- RAMPINO, A. et al. Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 455, p. 219–228, 2013.
- RIPPA, S.; PERRIN, Y. Physiology of L-carnitine in plants in light of the knowledge in animals and microorganisms. **Plant Science**, v. 274, n. 6, p. 432–440, 2018.
- ROUPHAEL, Y.; COLLA, G. Biostimulants in Agriculture. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1–7, 2020.
- RUTHVEN, D. M. **Principles of adsorption and adsorption processes**. New York: John Wiley & Sons, 1984.
- SANTINI, G. et al. Plant biostimulants from cyanobacteria: An emerging strategy to improve yields and sustainability in agriculture. **Plants**, v. 10, n. 4, p. 1–22, 2021.
- SCHIAVON, M.; ERTANI, A.; NARDI, S. Effects of an alfalfa protein hydrolysate on the gene expression and activity of enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle and nitrogen metabolism in *Zea mays* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 24, p. 11800–11808, 2008.
- SECIU, A. M. et al. Water use efficiency on cabbage and cauliflower treated with a new biostimulant composition. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 10, p. 475–484, 2016.
- SILVA, M. dos S. et al. Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and soil sorption studies. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, n. 1–3, p. 366–374, 2011.
- SONVICO, F. et al. Formation of self-organized nanoparticles by lecithin/chitosan ionic interaction. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 324, n. 1, p. 67–73, 2006.
- SPIELMAN-SUN, E. et al. Protein coating composition targets nanoparticles to leaf stomata and trichomes. **Nanoscale**, v. 12, n. 6, p. 3630–3636, 2020.
- TARAKHOVSKAYA, E. R.; MASLOV, Y. I.; SHISHOVA, M. F. Phytohormones in algae. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 54, n. 2, p. 163–170, 2007.
- TRIPATHY, S. et al. Synthesis, characterization of chitosan-tripolyphosphate conjugated chloroquine nanoparticle and it's in vivo anti-malarial efficacy against rodent parasite: A dose and duration dependent approach. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 434, p. 292–305, 2012.

- TONHI, E.; PLEPIS, A. M. G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. **Química Nova**, v. 25, p. 943–948, 2002.
- VARGAS, K. M.; SHON, Y. S. Hybrid lipid-nanoparticle complexes for biomedical applications. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, n. 5, p. 695–708, 2019.
- VIEGAS, C. M. et al. Evidence that 3-hydroxyisobutyric acid inhibits key enzymes of energy metabolism in cerebral cortex of young rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 26, p. 293–299, 2008.
- WALKER, J. M. **Polyamines: Methods and Protocols**. Springer Protocols: Life Sciences, 2011.
- WALLY, O. S. D. et al. Regulation of phytohormone biosynthesis and accumulation in *Arabidopsis* following treatment with commercial extract from the marine macroalga *Ascophyllum nodosum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, n. 2, p. 324–339, 2013.
- WANG, B. et al. Tryptophan-independent auxin biosynthesis contributes to early embryogenesis in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 15, p. 4821–4826, 2015.
- WEINER, N. **Phospholipid liposomes: Properties and potential use in flavor encapsulation**. Washington: American Chemical Society, 1997.
- WHITTINGHILL, J. M.; NORTON, J.; PROCTOR, A. Stability determination of soy lecithin-based emulsions by Fourier transform infrared spectroscopy. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 1, p. 37–42, 2000.
- XU, Y. X. et al. Chitosan-starch composite film: Preparation and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 21, n. 2, p. 185–192, 2005.
- YAKHIN, O. I. et al. Biostimulants in plant science: A global perspective. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 1–32, 2017.
- YIN, H.; DU, Y.; DONG, Z. Chitin oligosaccharide and chitosan oligosaccharide: Two similar but different plant elicitors. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 2014–2017, 2016.
- YUAN, Y. et al. The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 3, p. 561–567, 2007.
- ZHANG, Y. et al. Fabrication, characterization and antimicrobial activities of thymol-loaded zein nanoparticles stabilized by sodium caseinate-chitosan hydrochloride double layers. **Food Chemistry**, v. 142, p. 269–275, 2014.
- ZHAO, Y. Auxin biosynthesis: A simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-Acetic acid in plants. **Molecular Plant**, v. 5, n. 2, p. 334–338, 2012.

CAPÍTULO 3

A Novel Biostimulant from Chitosan Nanoparticles and Microalgae-based Hydrolysed Protein: improving crop performance in tomato

ABSTRACT

Plant biostimulants are known to be of natural origin and to promote effects on growth and metabolism, increasing tolerance to abiotic and biotic stresses in plants. As they come from natural and biological extracts, some biostimulant molecules are susceptible to losses and degradations due to the sensitivity of some natural compounds. Nanoparticles revolutionized the pharmaceutical industry, enabling preservation, solubility, and efficient delivery of compounds to specific cellular tissues. This technology can be applied to compounds of agricultural interest, allowing better performance of molecules in crops. In this context, we developed a nanoliposomal system containing protein hydrolyzate from *Artrospira platensis*, and tested its effects in foliar applications on tomato plants in two phases, vegetative and fruiting, evaluating growth and metabolism parameters. Plants treated with nanoparticles containing the protein hydrolysate showed a higher increase in height during the vegetative stage and greater activity of nitrate reductase and urease enzymes. In the fruiting stage, in addition to enzymatic activity, the content of chlorophyll, carotenoids, epigallocatechin and lycopene in fruits were higher in plants treated with nanoliposomes containing the protein hydrolysate of *A. platensis*. We conclude that protein hydrolyzate nanoliposomes promote efficient performance relative to their free form, providing the same effects in plants with lower doses of nanoparticulate protein hydrolyzate.

Keywords: Nanoliparticless, protein hydrolysates, amino acids, plant biostimulants.

1 INTRODUCTION

Climate change, the great challenge of the century, directly affects agricultural production. Global climate variation causes negative impacts on agriculture, increasing production costs and compromising humanity's food security (WHELEER et al., 2013). Before climate change, agriculture for specific crops in different regions of the planet was well established, with genetic varieties adapted to such environmental climates (ALTIERI et al., 2017). Today, climate insecurity is a much greater challenge than ever for farmers. Plant physiology is strongly influenced by climatic variations, where extreme fluctuations cause plants stress, reducing productivity (PRETTY, 2018). Mitigating these effects involves creating technologies, such as biostimulants and biofertilizers, minimizing the damage to biodiversity caused by pesticides, and increasing the resilience of crops in the face of temperature increases, floods, and droughts (BUONO, 2021).

European Biostimulant Industry Council defines plant biostimulants as products of biological origin, which may be from microorganisms. When applied to plants, it stimulates physiological processes promoting better plant performance, increasing growth and production, tolerance to stress, and product quality (RODRIGUES et al.,

2019). These definitions are strongly related to physiological functions in the face of environmental adversities suffered by crops. The effects reported in the literature still need to indicate a specific mode of action for them (DU JARDIN; LI; GEELEN, 2020), but rather stimuli related to growth and fruit quality. These results are varied and depend a lot on the type of biostimulant applied and doses. Plant responses are also reported and vary according to the phenological stage, species, and nutritional conditions of the plant (PARAĐIKOVIĆ et al., 2019).

One of the classes of biostimulants, protein hydrolysates, are products from the hydrolysis of plant or animal proteins, resulting in a matrix of polypeptides, oligopeptides, and amino acids in their composition (COLLA et al., 2015). Several protein hydrolysates and different effects are demonstrated, such as alfalfa applied to apples, promoting fruit quality, increasing pigments in fruits, and delaying post-harvest diseases (SOPPELSA et al., 2018). Effects promoted by the application of protein hydrolysates in plants are reported, such as increasing root development and improving nutrient acquisition activities (ERTANI et al., 2009), inducing tolerance to abiotic stress, increasing secondary metabolites and antioxidant compounds (VISCONTI et al., 2015; LUZIATELLI et al., 2019), increased activity of the enzyme nitrate reductase (KOCIRA et al., 2019), modulation of flowering time and induction of drought tolerance (AGLIASSA et al., 2021), modulation of the phytohormonal profile and accumulation of brassinosteroids (CECCARELI et al., 2021), reduction of chrysanthemum senescence and increased levels of N in leaves (CARILLO et al., 2022).

Microalgae are photosynthetic organisms capable of synthesizing a wide range of metabolites. These organisms are already widely explored in the fields of biofuels, human and animal nutrition, bioremediation, pharmaceuticals, and cosmeceuticals (CHANDA et al., 2019). Concerning their agricultural application, this is still not very expressive, but presents several advantages in respect to the macroalga species already widespread for their use in crop plants (BEHERA et al., 2021).

Unlike macroalgae that are mined or grown on marine farms, cyanobacterium can be grown in industrial reactors year-round. Industrial cultivation favors the standardization of important components of the biomass matrix, an important fact for the formulation of a product, unlike macroalgae which undergo variations in composition according to the seasonality (MICHALAK; CHOJNACKA, 2014). *Arthrospira platensis*, also known as spirulina, is described by a large number of proteins in its composition, in addition to other compounds of interest for the formulation of biostimulants, such as

polyamines, phytohormones, antioxidants, and amino acids, for example (STIRK et al. (2020). Its use as a plant biostimulant, although promising, has already shown important effects such as growth induction, tolerance to biotic and abiotic stresses, and an increase in fruit quality (COLLA; ROUPHAEL, 2020) as applied in liquid form and by foliar route (DIEGO; SPÍCHALO, 2020). Du Jardin (2020) argues that the guarantee of the constituents remains stable in these biostimulants. Nanoparticles are useful in many industrial and biological processes, because they have catalytic characteristics and can carry different functional groups, enabling cellular uptake of the active through efficient delivery (CHEN et al., 2021). Just as the pharmaceutical industry was revolutionized with nanotechnology applications in its formulations, prioritizing delivery targets and solubility of molecules in specific tissues, the optimization of delivery systems of bioactive molecules in plants can be improved with the use of nanostructured derivatives. The use of nanotechnology is already present for the delivery of some pesticides in crops, reducing herbicide leaching into the soil (KUMAR et al., 2019), and decreasing doses for pest control (WESTGATE; SCHULTZ; HAZZARD, 2017).

However, when it comes to biostimulants, formulations with biocomposites will be necessary to maintain the standard of a product of natural origin, unlike metallic nanoparticles, which are widely used for agrochemicals (UL HAQ; IJAZ, 2019).

In addition to being a natural polymer, chitosan is also described for its biostimulant effects on crops (SHAHRAJABIAN et al., 2021). Chitosan can be used as a nanocarrier for various molecules and elements because it is a non-toxic, biodegradable and biocompatible biopolymer (TRIPATHY et al., 2012). Chitosan nanoparticles are also easily adsorbed on the leaf surface to be used as a coating for the slow release of fertilizers and pesticides (SHAHRAJABIAN et al., 2021). Chitosan can act on the surface of particles, as do some ions carried by it, reducing the dissolution of fertilizers and promoting more efficient absorption of nutrients by plants (DUHAN et al., 2017). This way, chitosan nanocapsules can reduce fertilizer losses (DUHAN et al., 2017). In order to develop a plant biostimulant product and enable its delivery through polymeric nanoparticles, this study developed an innovative chitosan-based biostimulant nanostructured system containing an *A. platensis* hydrolysate for the delivery of bioactive compounds, in addition to evaluating its effects on tomato plants with foliar applications during two phenological stages.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 PROTEIN HYDROLYSATE AND CHARACTERIZATION

The hydrolysis solution was formulated with a certain amount of the lyophilized cyanobacteria *Arthrospira platensis*, containing ~ 60% of its biomass in proteins, water, H₃PO₄ and C₃H₆O₃. The information regarding the process and quantities are protected by the patent application registered upon the code BR 10 2022 021 167 1 at the INPI (National Institute of Industrial Property - Brazil).

2.2 COMPOSITION OF PROTEIN HYDROLYSATE

Ca, P, K, S, B, Cu, Mn, Ni, and Na were quantified in addition to N in the protein hydrolysate solution. Quantifications were performed using the methods of Tedesco et al. (1995).

2.3 IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF AMINO ACIDS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY AND BY THE NINHYDRIN METHOD

Amino acid analysis included the determination of total amino acids and their identification and quantification in the hydrolysate. Total quantifications were performed by the ninhydrin method (FRIEDMAN; PANG; SMITH, 1984) in a UV-vis micro plate spectrophotometer (SpectraMax Paradigm Molecular Device-Sunnyvale, CA, USA). For that, 1 ml hydrolysate and 3 ml ninhydrin solution (0.1%, w/v) in 200 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0 were added to glass tubes. The total amino acid contents were determined by recording the absorbance of the solution at 570 nm and the calculations used a cysteine (Sigma-Aldrich, MO – USA) standard curve (0 to 1000 ug.ml⁻¹·y= 0.0024x r²=0.993).

The analyzes performed by ultra-high performance liquid chromatography followed the protocol described by White, Hart, and Fry (1986). The technique consists of identifying and quantifying the amino acids of a sample from the reaction with Edman's reagent - phenylisothiocyanate, being used in a derivatization step so that the chromatographic technique can separate the phenylthiocarbonyl (PTC) derivatives, following their detection by UV absorption. For that, 20 ul of the protein hydrolysate were

used for derivatization with phenyl isothiocyanate. After that, aliquots (10 μ l) of the samples in 0.14 M sodium acetate mobile phase (pH 6.4) + 0.05% trimethylamine (1:1 v/v) were injected into the UHPLC system equipped with a C₁₈ reverse phase column (150mm x 4.6 mm, 5 μ m particle \emptyset - Thermo Biobase), thermostated at 30°C. The analytes were eluted at 0.8 ml/min flow of a mobile phase A (940 ml sodium acetate 0.14 M, pH 6.4 + 0.05% triethylamine in 60 ml acetonitrile) and B (60% acetonitrile, 40% H₂O, v/v) in a gradient system as follow: 0 - 20' (100% A, 0% B) and 20 – 25' (100% B, 0% A). Analytes UV-vis detection was recorded at 254 nm wavelength and for the calculation of their contents, *L*-amino acid standards (Sigma-Aldrich – MO, USA) were used to obtain calibration curves for each amino acid.

2.4 IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF POLYAMINES IN PROTEIN HIDROLYSATE

Protein hydrolyzate samples were analyzed in their polyamine profiles according to the method proposed by Lima et al. (2008) with modifications, as follows: 200 μ l hydrolysate were diluted in 5% (v/v) perchloric acid (Merck, NJ, USA) and added of 600 μ l acetonitrile, following injection of the samples (20 μ l) into a Thermo-Fischer UHPLC (Ultimate 3000) chromatographic system.

2.5 SYNTHESIS OF CHITOSAN NANOPARTICLES

To obtain the nanoparticles, the ionic interaction method was used, which is also part of the submitted patent application (code number BR 10 2022 021 167 1 – INPI, Brazil). The nanoparticulate system consisted of soy lecithin (Lipoid S100, Germany, 100% phosphatidylcholine) and high molecular weight chitosan (3, 1, 102 – 3, 7, 102 kDa, Sigma Aldrich, Germany). Briefly, solutions of lecithin in ethyl alcohol, chitosan, and acetic acid were prepared. The formation of the nanoparticles was carried out spontaneously by adding the lecithin solution under magnetic stirring. For this study, two nanoparticle formulations were made, containing variations in the lecithin/chitosan ratio (LC/QS, w/w), which were further named Formulation 1 and Formulation 2. In order to understand the dynamics of the nanoparticulate system, control formulations of the two LC/QS variations were formulated containing water instead of the bioactive compounds, i.e., protein hydrolysate.

2.6 PARTICLE SIZE, POLIDISPERSITY INDEX, ZETA POTENTIAL AND STABILITY

The nanoparticles were characterized in terms of their average size, polydispersity index (PDI), and zeta potential (PZ), in triplicate readings, by phoronic correlation spectroscopy and laser Difusion Light Scattering (DLS), in a Zetasizer Nano® equipment (Malvern, Worcestershire, United Kingdom). Measurements were performed at 25°C and samples were prepared at a 1: 1 dilution (v/v, nanoformulation: distilled water). To determine the particle's size, the readings were performed at an angle of 90° and the zeta potential of these was determined under a condition of $\pm 150\text{Mv}$ applied to the electrophoretic cells of the equipment, being calculated based on the average of the mobility values of the nanoparticles. The pH of the formulations was measured in a bench potentiometer (K39-2014B, Kasvi). For the stability test, the triplicate formulations were stored in amber glass vials, at room temperature ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), protected from light and moisture. The physicochemical characterization measurements (particle size, PDI, zeta potential, and pH) were performed at 24 h and at 7, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 days after obtaining the formulations. For loading efficiency, measurements were made at 7, 30, and 60 days after nanoparticle formulation.

2.7 LOADING EFFICIENCY

The encapsulation efficiency was defined by the percentage of the active presence in the nanoparticles concerning the total added to the formulation. The encapsulation efficiency (EE%) and the active content were determined in the samples through the total quantification of amino acids determined by UV-vis spectrophotometry using the ninhydrin method. The EE% was estimated (Equation 1) considering the difference of percentual values between the total amount of total amino acids of the formulation after complete dissolution in methanol (1: 10) and those found in the ultrafiltrate obtained by the ultrafiltration/centrifugation method, (Amicon- Ultracel-100 filter membranes, 100 KDa, Millipore, Corp. USA). The total amino acid content (%) recovered was estimated by comparing the total value found in the colloidal suspension in respect to the initial amount added in the formulation.

$$EE = Ct - \frac{Cf}{Ct} \times 100 \quad 2$$

Ct = Total concentration of total amino acids Cf = Concentration of the filtrate of total amino acids.

2.8 HIGH RESOLUTION TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPE (HR-TEM) AND SCANNING ELECTRON MICROSCOPE/ FIELD EMISSION GUN (SEM/FEG) OF *A. platensis* BIOMASS AND NANOPARTICLES

In order to visualize the nanoparticle's structural morphology, the formulation containing the hidrolysate was diluted 10x in ultra-purified water and deposited on carbon coated copper grids (CF-Cu, TED PELLA INC., USA, 300 mesh). After 15 min, excess solution on the grid was gently removed with absorbent paper. Subsequently, the sample was stained with 2% uranyl acetate (w/v) for 24 h, in the dark. The images were acquired using a JEOL JEM-1011-100kV transmission electron microscope (Tokyo, Japan), at the Central Laboratory of Electron Microscopy (LCME/UFSC) of the Federal University of Santa Catarina. To visualize the structural morphology of the nanoparticles and the raw material (i.e., powdered cyanobacteria), the lyophilized samples were analyzed in a field emission scanning electron microscope (SEM/FEG-Mira3-Tescan, EDS detector SDD, Xmax- 50, Oxford Instruments). The analyzes were performed at the Central Laboratory of Microscopy of the University of Caxias do Sul.

2.9 PLANTS EXPERIMENT DESIGN, GROWTH CONDITIONS AND TREATMENTS

The experiment was carried out in the 2019-2020 summer growing season in the Parque Ecológico Cidade das Abelhas (Federal University of Santa Catarina, Florianópolis/SC, 27°32'15.8"S and 48°30'11.7"W). The tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv. Itaipava,) seedlings were transplanted in November (four true leaf stage) into plastic pots containing 10 L substrate with NPK fertilization and soil pH corrected for tomato cultivation. To evaluate the effects of treatments, tomato plants were divided in the experiment into two phenological stages: vegetative (VEG) and fruiting (ripening - RIP) stages. The experiment was arranged in a completely randomized design, consisting of

12 pots containing one plant per pot (experimental unit) totalizing 96 pots for each phenological stage. The pots containing the plants in the VEG stage were distributed on a bench next to the area where the RIP stage plants were cultivated, using a spatial distribution as follows: 0.7 m distance between plants and 1.5 m between rows.

To evaluate the behavior of tomato plants in the face of foliar application of *A. platensis* protein hydrolysate (PH) and the formulation containing the nanoparticle derivative (NP), eight treatments were established, applied weekly to plants in both VEG and RIP stages, as described in Table 10. The pH of the treatment solutions was adjusted to 5.5 and these were applied through a manual sprayer by aspersion, weekly, in the morning, covering the whole plant. At the end of the experiment, the VEG plants received a total of 4 applications and those collected at RIP stage received 10 applications of the treatments. The sprayed volume varied along the growth of the plants and in this way it was decided to carry out applications up to the point of leaf run-off

Table 10 - Treatments and concentrations of amino acids in tomato plants foliar applications

Treatment abbreviation	Treatment	Amino acid (g.L⁻¹)
Control	Water	0
NP1	NP <i>A. platensis</i>	0.3
NP2	NP <i>A. platensis</i>	0.8
NP3	NP <i>A. platensis</i>	1.2
NP4	NP <i>A. platensis</i>	1.6
NP5	NP <i>A. platensis</i>	2.0
PH	Protein Hydrolysate de <i>A. platensis</i>	2.0
NP Control	Control Nanoparticle	0*

NP: nanoparticles containing hidrolysate; PH: Protein Hydrolysate of *A. platensis*; * NP control containing the same concentration of nanoparticles as the NP5 treatment, but without the active.

The aerial part of the plants in the VEG and RIP stages were collected and weighed for determining the fresh weight, following by the transferring to an oven (65°C - constant weight) for dry weight measurement. The height of the aerial part of the plants was measured for the two phenological stages. Two leaves were collected just above the fourth rachis of each plant in the RIP stage to determine the leaf area, from which photos were captured with a background containing a dimensional scale. The images were later processed using the free Image J software (RASBAND et al., 1997), to calculate the leaf area of each sample. The Soil Plant Analysis Development Index (SPAD) was evaluated using a Minolta Chlorophyll Meter (model SPAD-502, Minolta Camera Co. Ltd., Osaka,

Japan). Readings were collected weekly by taking 10 measurements per plant and over the sampling times the average of each evaluated plant was calculated.

2.10 TOTAL CHLOROPHYLL AND CAROTENOIDS

For the quantification of chlorophylls and carotenoids leaflet samples (100 mg, fresh weight, $n = 4$) were collected at VEG and RIP phenological stages and stored in liquid N_2 and ultrafreezer ($-80^\circ C$). Chlorophylls and carotenoids were extracted using the method proposed by Hiscox and Israelstam (1979) with dimethylsulfoxide and solution's absorbances (470, 645 and 663 nm) recorded in a microplate reader spectrophotometer (Spectramax Paradigm Molecular Device-Sunnyvale, CA, USA). The calculation of chlorophyll contents used the formulas proposed by Arnon (1949), with data expressed in $\mu g/g$ of fresh weight.

2.11 DETERMINATION OF TOTAL PHENOLICS COMPOUNDS AND FLAVONOIDS

Samples (0.5g of fresh mass) were ground in liquid N_2 , macerated in 5 ml 80% methanol solution, incubated (1h) in a dark room ($23^\circ \pm 1^\circ C$) and then filtered on a cellulose filter under vacuum. Analysis of the phenolic compounds was performed using the Folin–Ciocalteu spectrophotometric method based on Schiavon et al. (2012), with modifications. For that, aliquots (300 μl) of the extracts were added to 225 μl of the Folin–Ciocalteu (Vetec, SP - Brazil) reagent and 2.5 mL 2% sodium carbonate (Na_2CO_3 , w/v) solution and incubated for 1h at room temperature. Thereafter, the absorbance of the solution was measured (750nm) on a microplate reader. The quantification of the total phenolic compounds was calculated using a gallic acid standard curve ($y=00076x$, $r^2=0,9974$) and the results expressed in mg gallic acid per g of fresh weight ($n = 4$). For the determination of total flavonoids, a 0.5 ml aliquot of each 80% methanol extract was used in the presence of 0.5 ml aluminum chloride solution (2% in methanol) and 2.5 ml ethanol, according to Zacarias et al. (2007). After standing for 1h, the absorbance reading was performed at 420nm on a UV–vis spectrophotometer (Hiatachi U-1800). Flavonoids were quantified using the standard quercetin curve ($0 \text{ a } 250 \mu g.mL^{-1} - r^2 = 0.995; y = 0.0066x+0.0516$).

2.12 NITRATE REDUCTASE AND UREASE ACTIVITY

For the analysis of nitrate reductase activity (EC 1.6.6.1) the protocols of Jaworski (1971), Meguro (1982) and Oliveira et al. (2005) were adopted, with adaptations. Initially, 200 mg (n = 4) of leaf tissue were weighed, immediately frozen with liquid N₂ and stored at -80 °C. The concentration of the ion (NO₂⁻) produced is determined in a spectrophotometer (Spectramax Paradigm Molecular Device-Sunnyvale, CA, USA) by reading the absorbance at 540 nm. Nitrate reductase activity was expressed in μmol nitrite/g fresh weight (μmol NO₂⁻ g⁻¹ FW), from standard curve of NO₂⁻ - 1000 μmol to 0 (y=0.0132x+ 0.0493, r² = 0.9978). To determine the activity of the urease enzyme (EC 3.5.1.5), the extraction method proposed by Hogan, Swift and Done (1983) was used as the determination of NH₄ was performed as described by McCullough (1967), with adaptations. After the extraction and reaction steps, absorbance readings were taken in a spectrophotometer (Spectramax Paradigm Molecular Device-Sunnyvale, CA, USA) at 625 nm. The enzyme activity was determined by the amount of the ammonium (NH₄⁺) ion produced, and the values found were compared with a standard curve using NH₄Cl in concentrations ranging from 1000 μmol to 0 (y=0.0006x+0.006, r² = 0.9968). The results obtained were expressed in μmol NH₄⁺ g⁻¹ of fresh weight.

2.13 PHENOLICS COMPOUNDS - EXTRACTION AND UHPLC ANALYSIS IN LEAF SAMPLES

For the extraction of polyphenols of tomato leaves followed the protocol of Regueiro et al. (2014) and Uarrota et al. (2022). In summary, 100 mg lyophilized and crushed leaves were mixed with 4 ml acetone/water (60: 40, v/v) and stirred in a thermostatic water bath (60°C, 15 min). After this step, 3 ml of the extract were collected and defatted with 2 ml petroleum ether, following centrifuging at 12,000 g for 10 min, at 4°C. The aqueous acetone phase was collected and concentrated under N₂ flow. The aqueous extract was collected and 1 ml 0.1% formic acid in water was added and the sample filtered through a 0.22 μm filter. LC system (UHPLC Thermo – Ultimate 3000) composed by a quaternary pump, autosampler, 248-column thermostat (30°C), four-channel diode array detector (UV-vis operating at 280, 236, 315, and 370 nm), and a C₁₈ reverse-phase column (Thermo BioBasic, 150 mm x 4.6 mm, 5 μm particle Ø) was used for determining the polyphenolic profile of the leaf extracts. As mobile phase three

solutions were used: A (0.1% formic acid), B (water: acetic acid: *n*-butanol, 350: 1: 10, v/v/v), and C (acetonitrile acidified with 0.1% formic acid), for eluting the injected samples (10 μ L, $n = 3$) over a gradient phase as follows: 0-2.6 min (95% A, 5% C), 2.6-12.13 min (gradient linearly adjusted to 66.5% A, 1% B, 32.5 % C), 12.13 -13.30 min (gradient linearly adjusted to 9% A, 1% B, 90% C, remaining isocratic until 18.00 min), 18.00-19.00 min (gradient linearly adjusted to 66.5 % A, 1% B, 32.5% C), 19-30 min (gradient adjusted linearly to the initial condition - 95 % A, 5 % C). Before each injection, an equilibration stage was set with a constant flow (0.8 mL min⁻¹) of the mobile phase A.

2.14 LYCOPENE EXTRACTION AND QUANTIFICATION IN FRUITS SAMPLES

After harvesting the fruits, their biomass was freeze-dried and stored at 80°C for lycopene extraction, according to the protocol proposed by (SADLER; DAVIS; DEZMAN, 1990), using 2 g of ground and dried biomass in a solvent volume of ethanol: hexane: acetone (10: 10: 10). The biomass together with the solvent was subjected to magnetic stirring protected from light for 30 min, the solution was filtered (0.22 μ m) and 5 ml water were added. After standing for 15 min, the nonpolar fraction containing lycopene was collected and concentrated under N₂ flow. The identification and quantification of lycopene in the extracts were performed according to Fagundes et al. (2015). The analytical standard (SigmaAldrich – MO, USA) and the samples were dissolved in hexane: chloroform (1: 1, v/v) and injected into a Thermo Scientific, Ultimate 3000 Model chromatograph, equipped with a C₁₈ reversed-phase column (Vydac, 250 x 4.6 mm, 5 mm inner diameter, 30°C) and a DAD detector operating at 470 nm. Methanol: acetonitrile solution (90: 10, v/v) was the mobile phase used, with a flow rate at 0.8 ml/min. The lycopene was identified in the sample chromatograms according to the retention time of the analytical standard and its amounts estimated using an external standard curve (0 to 1 mg mL⁻¹ – $r^2 = 0.995$; $y = 43.461 + 0.2838x$) of lycopene (SigmaAldrich – MO, USA). The results were expressed in mg lycopene per g dry mass ($n = 3$) of three consecutive injections (mean \pm SD).

2.15 STATISTICAL ANALYSES

For determining the effect of the *A. platensis* hydrolyzate and its nanoderivative in the different biological assays, the data set was collected and summarized, following

ANOVA and Tukey HSD post hoc analyzes. Differences were considered significant when $P \leq 0.05$. The normality and homoscedasticity of the residues were verified. All statistical tests were performed using the R statistical software.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 PROTEIN HYDROLYSATE COMPOSITION OF NUTRIENTS, AMINO ACIDS AND POLYAMINES

The composition of the protein hydrolysate from the *A. platensis* presents macro- and micronutrients in contents (mg.L^{-1}) as follows: 170 N, 1490 P, 1450 K, 132 Ca, 3.5 Mg, 10 S, 8.6 B, 0.8 Ni, 1.91 Mn, 3.8 Zn, and 0.33 Co. In a second approach, through the quantification performed by the phenylisothiocyanate derivatization method, a total of 68.98 g/l total amino acids (AA) in the hydrolyzed product was detected (i.e., 6.89% dry weight). This value represents an efficiency by 78% of protein conversion into free amino acids through the hydrolysis process of the *A. platensis* dry biomass. Among the identified AA, 14 are proteinaceous and one is non-protein, i.e., gamma-aminobutyric acid (GABA), being that nine AA were quantified (Table 11). The only identified AAs were isoleucine, leucine, GABA, glycine, valine, and tyrosine. In addition to these, the polyamines tryptamine, spermidine, spermine, cadaverine, and putrescine were also identified in the protein hydrolysate (Table 11).

Table 11 – Identification and quantification of Amino acids and Polyamines by HPLC

Amino acid	mg.mL^{-1}	Polyamine	ug.mL^{-1}
Phe	24.03 ± 3.74	Triptamine	0.77 ± 0.02
Lys	16.66 ± 4.18	Putrescine	0.11 ± 0.05
Pro	13.02 ± 0.823	Cadaverine	0.09 ± 0.02
Asp	4.08 ± 0.21	Spermidine	0.53 ± 0.01
Met	3.98 ± 0.27	Spermine	0.07 ± 0.01
Arg	3.73 ± 2.60		
Glu	2.15 ± 0.23		
Thr	1.31 ± 0.87		
Trp	0.06 ± 0.03		

Results presented as mean \pm standard deviation ($n = 3$) for each column.

The aim of the various hydrolysis methods is the quantitative release of all amino acids from the substrate and the quantitative recovery of them in the hydrolysate.

However, in any hydrolysis method attention should be paid as to the destruction of the released residues, biasing the calculation of the amounts of each AA, as several factors affect the completeness of the hydrolysis process, such as temperature, time, hydrolysis agent and additives (FOUNTOULAKIS; LAHM, 1998). This fact explains smaller amounts of some AAs such as tryptophan, which is largely destroyed during chemical hydrolysis, particularly in the presence of carbohydrates in a chemically complex matrix such as the hydrolysate of cyanobacteria biomass. On the other hand, for the complete digestion of proteins by enzymatic hydrolysis, incubation with several enzymes is necessary and the reactions usually last a long time, so the method, in addition to raising production costs, might not be enough attractive when used on a large scale (NAVARRETE DEL TORO; GARCÍA-CARREÑO, 2003).

According to Calvo et al. (2014), the protein contents in protein hydrolysates range from 1 to 85% (w/w) and 2-18% (w/w) in free amino acid values. It is noted that the process for obtaining the *A. platensis* protein hydrolysate herein described was effective in the percentage of protein conversion found in the biomass initially used, allowing a high conversion into free amino acids (78%) and final content of those metabolites of 6.86%. This result indicates that most of the amino acids were preserved, reaching the final objective of the process of this product.

The compositional variation of the amino acids present in the hydrolysates also intrinsically depends on the composition of proteins derived from the biomass (COLLA et al., 2015; MORENO-HERNANDEZ et al., 2020). The amino acid content of *A. platensis* protein isolates described by Clément et al. (1967) and Bashir et al. (2016) indicate a profile of major amino acids similar to what we found in the studied matrix. However, it is important to note that both the extraction and quantification methods adopted by those authors are different from those performed in this study, making our comparisons difficult. Ljubic et al. (2018) use the same quantification method through derivatization with phenylisothiocyanate to detect the AA profile of *A. platensis* in different cultivation processes, describing different findings from those mentioned above and from what is herein described. With this in mind, it might be realized that there is great variation between the analyzes and mainly in the composition of the matrix of each sample tested in different works. In this way, the importance of product control analyzes and the standardization of methodologies for biostimulant products is noted.

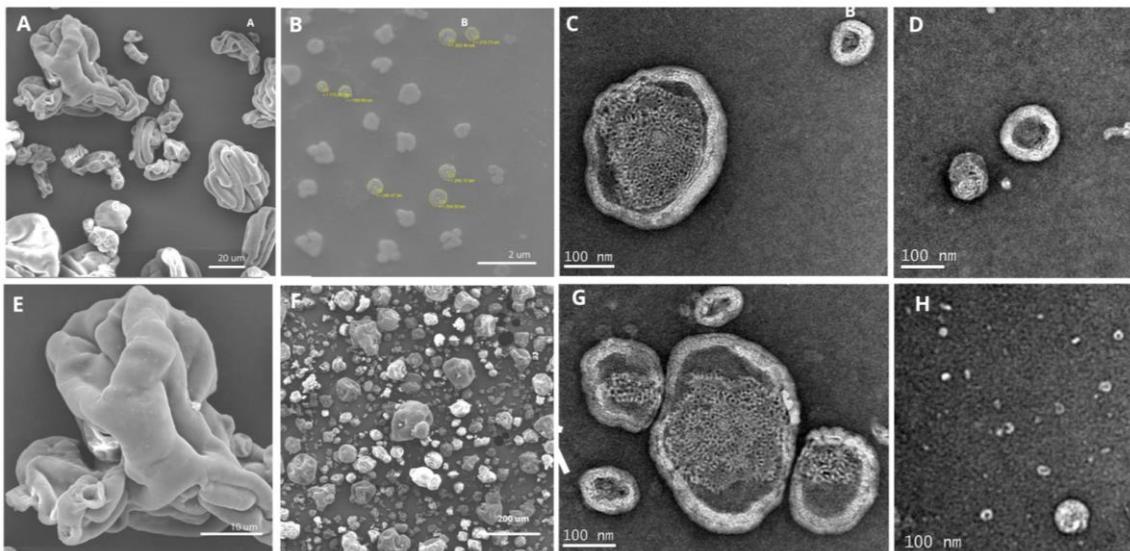
Regarding the matrix described in this work, we noticed higher amounts of the amino acids phenylalanine, lysine and proline. The high proportion of proline is

interesting, precisely because of its effects already related to plant physiology, e.g., a precursor of phytohormone, pollen fertility and water balance regulator (COLLA et al., 2015; HAUSTER et al., 2014). The polyamines identified in the protein hydrolysate of *A. platensis* have an important role as biostimulants (STIRK et al., 2020) and have already been identified in some microalgae (JANTARO et al., 2017; LIN; LIN, 2019). Mógor et al. (2018) identified polyamines in *A. platensis* protein hydrolysate and proved the positive effect on the growth of lettuce plants. The polyamine composition found in this study was considered low, around 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, but significant for promoting physiological effects in plants, given that these molecules have effects at very low concentrations (STIRK et al., 2002; STIRK et al., 2020).

3.2 CHARACTERIZATION OF CHITOSAN NANOPARTICLES AND TOTAL AMINO ACID LOADED EFFICIENCY

The morphology and size distribution of the hydrolyzate-containing nanoparticles were examined under TEM and SEM-FEG (Figure 8). In the images (Figure 8A and 8E), the structure of the freeze-dried cyanobacteria is observed before hydrolysis, as well as the formation of nanoparticles. The shape of the later was found to be uniformly spherical, with dimension varying from 50 to 200 nm. It might be also noticed a distinction between the layers that delimit the nanoparticles, known as the shell-core structure. The outer layer demonstrates particularities of bilayer formation, typical of the description of liposome-like nanoparticles (KARNY et al., 2018).

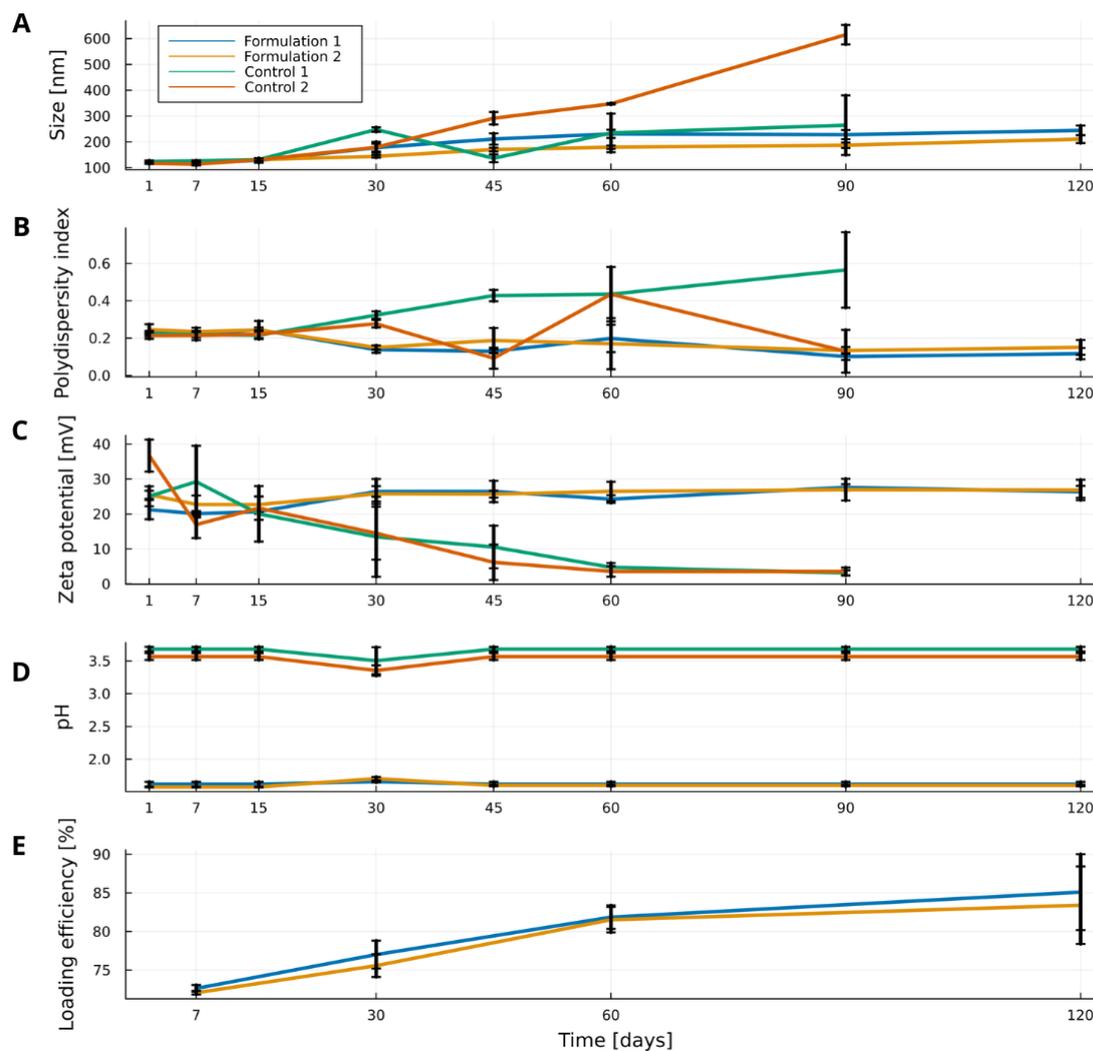
Figure 8 – FEG micrographs of LC/QS nanoparticles containing *Astrosira platensis* protein hydrolysate. A and E, show details of the cyanobacteria biomass. B, C and G, show details of the structure of LC/QS nanoparticles, showing by the arrows the bilayer formed and the core showing contrasts in the density of the adjacent material. In image F and H, the homogeneity of sizes presented by the nanoparticles can be observed



Fonte: elaborada pela autora (2022).

Regarding their average size, zeta potential (PZ) and polydispersity index (PDI) measured through DLS, it was noticed that the nanoparticles containing the hydrolysate (Formulation 1 and 2) as well as the controls (Control 1 and 2) showed average sizes ranging from 113 nm to 126 nm, 1 day after formulation preparation (Figure 9). Statistically, the nanoformulations containing the PH and the control formulations did not differ ($P < 0.05$) in terms of size (Figure 9A) until the 60th day of the trial. After this period, F1 and F2 started to present an average particle size smaller than their respective control formulations. The PDI and PZ (Figure 9B and 9C) presented up to the 45 days measurement did not indicate significant differences between formulations and control formulations. After this period, the control formulations started to present higher PDI values than the formulations and a decrease in PZ, statistically different from the formulations containing the protein hydrolysate

Figure 9 – Physicochemical evaluations of nanoparticles, formulations 1 and 2 containing *Arthrospira platensis. platensis* protein hydrolysate and their respective controls without the active Control 1 and 2. (A) Mean particle size measured in nm over 120 days of the formulation. (B) Average polydispersity index of the formulations over 120 days. (C) Mean zeta potential of the formulations over 120 days. (D) average pH of formulations over 120 days (E) Percentage of total amino acid encapsulation efficiency over 120 days



Fonte: elaborada pela autora (2022).

The pH measurements (Figure 9D) were statistically different between formulations and control formulations. The encapsulation efficiency measured up to 120 days for formulations 1 and 2 containing the active did not show statistical differences in each temporal measurement. About EE%, the formulations showed a tendency to increase encapsulated amino acids after the first 30 days of formulation, going from $76.29\% \pm 1.63$ to $81.69\% \pm 1.58$ at 60 days, and remaining the same until 120 days.

As the measurement time elapsed, the formulations containing the active showed greater stability, maintaining their average particle size, decreasing their PDI, and increasing the value of surface charges, differing from the values found in the control nanoparticles. This result evidence as positive the interactions that the PH establishes with the components of the formulas to the formation and stability of the nanoparticles, providing more homogeneous sizes, lower PDI values, and increasing surface charges (ZP) to the nanostructured system. High values (i.e., larger or smaller than neutral loads) in the load surface measurements indicate large repulsive forces acting on this system, minimizing the aggregation caused by the Van der Waals force (REIMERS et al., 2017). When analyzing the loading of the active nanoparticles (total AA content), the formulations did not present statistical distinctions between them.

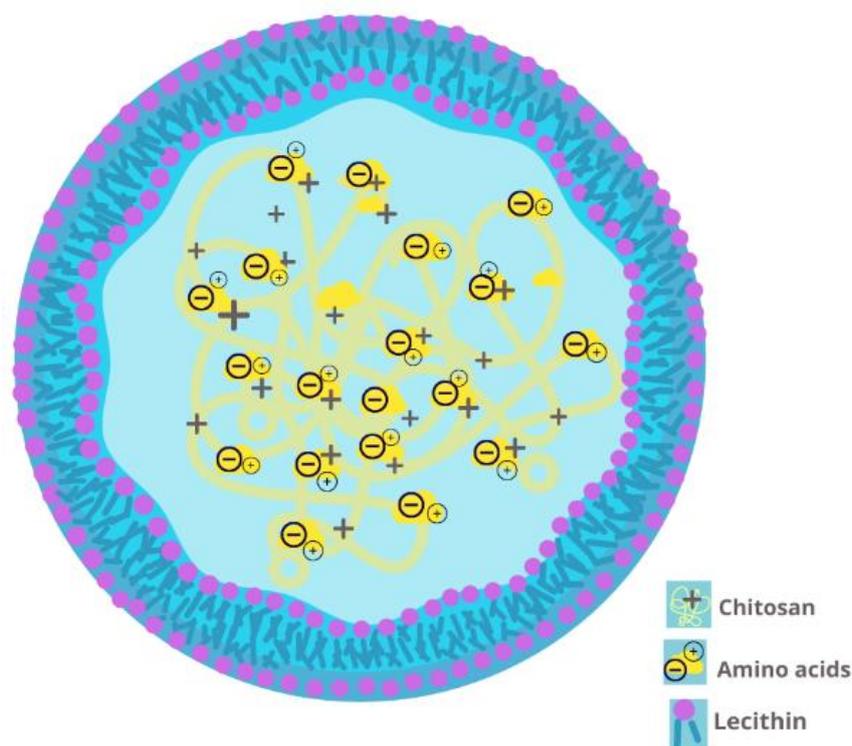
The fact that the formulations increase the loading efficiency is directly related to the change in zeta potential loads, which also increased after 60 days. This evidence leads us to hypothesize that the NP/PH system adjusts itself over time, providing greater stability between the electrostatic interactions of the system, so that AA charges start interacting with the NP core. With that in mind, it was proposing a shell-core model elucidation of the AA charges together with the chitosan and lecithin charges, considering the findings by TEM, in addition to the observations made to the size, PZ, and PDI of the formulations (Figure 10), suggesting that the nanoparticles are of the liposomal type. The observed values of total encapsulated amino acids (EE%) once again demonstrate that the LC/QS nanoparticle system and the protein hydrolysate stabilize over time, favoring the surface interaction of AAs to the system. This behavior may be related with the chemical and physical equilibrium of the solution through the phenomenon of adsorption.

Adsorption is a process of transferring one or more constituents (adsorbates) in a fluid phase to an adsorbing surface. In this type of process, molecules in the fluid phase are attracted to the interfacial zone due to the existence of uncompensated attractive forces in the adsorbent (RUTHVEN, 1984). The investigations of Li, Paulson, and Gill (2015) and Li et al. (2022) demonstrated interactions of polymers in the formation of liposomal nanoparticles in matrices like the type of fillers present in the protein hydrolysate (salmon hydrolyzates and immunoglobulins), presenting efficiencies encapsulation of assets close to those found in this work. Weiner et al. (1997) explain that the hydrophilic entrapment is proportional to the concentration of phospholipids and the total internal volume of the liposomes. In this work, it was noticed that over time (Figure 9), an increase in the diameter size of the nanoparticles and an increase in surface charges were detected, which

may explain the increase in the encapsulation efficiency of free amino acids over the storage time. This type of liposomal system created for the encapsulation and delivery of amino acids and other compounds present in the *A. platensis* PH is cited in the literature, for example in the work by Karny et al. (2018), which specifies the interaction of liposomes with the leaf surface layers, penetrating via the lipid pathway through the waxy surface, which is different from the common pathway for aqueous solutions. These interactions are important to understand how encapsulated AAs are delivered to the crop plants of interest.

The use of nanoliposomes is already known and validated in biological systems for antimicrobial treatments, nutraceuticals, and drugs that are difficult to absorb in some body tissues (DVIR et al., 2020). They are defined as vesicles containing an aqueous interior and surrounded by lipids that form a bilayer capable of carrying proteins and AAs. The interaction of liposomes is strongly influenced by charges, such as divalent cations, as well as the interaction of these systems with AAs that have zwitterionic characteristics. Thus, AAs and other molecules that are present in the hydrolysate can be more efficiently absorbed by the leaf surface (JIANG et al., 2021), as they can penetrate the leaf surface through the lipid pathway through the waxy surface, which is different from the common route for aqueous solutions (KARNY et al. 2018).

Figure 10 – Proposed model of the structure of nanoparticles containing the protein hydrolysate of *Arthrospira platensis* and the interactions between electrical charges of lecithin, chitosan and amino acids present in the nanoparticles, typical of nanoliposomes



Fonte: elaborada pela autora (2022).

3.3 BIOASSAY – TOMATO VEGETATIVE PHENOLOGICAL STAGE

The results obtained from the application of the biostimulant at doses NP3, NP4, NP5, PH, and NP Control during the vegetative period of the tomato plants indicated an increase in plant height in relation to the control (Table 12). A very similar pattern of results was also observed for the fresh weight and dry weight of plants in that phenological stage. On the other hand, in the ripening stage, the plants did not show differences in height and dry weight in relation to the control. In fresh weight and SPAD index, the NP5 treatment afforded lower values than the control treatment. Regarding leaf area, no statistical differences were found between treatments and control (Table 12).

Biostimulants can act on the primary and secondary metabolism of plants and studies have already shown that biostimulants formulated from microalgae can influence especially in the vegetative stage, as observed in this study. Oancea et al. (2013) found root development with greater branching and biomass and an increase in the number of leaves and leaf area of tomato plants treated with the biostimulant *Nannochloris* sp compared to the control. Likewise, Mutale-Joan et al. (2021), by combining microalgae and cyanobacteria (*Dunaliellasalina*, *Chlorella ellipsoidea*, *Aphanothece* sp., and *Arthrospira maxima*) extracts in tomato plants under saline stress, found that the 5% concentrations of the formulated product improved the vegetative growth, characterized by greater shoot and root weight, and leaf area. Thus, as in this study, it was observed that not all concentrations were effective in improving vegetative development in relation to the control.

It should be noted that in the vegetative period of plants, the action of protein hydrolysates has been effective in stimulating the growth of different agricultural crops, especially due to the hormonal activity that occurs in plants at this stage (CARUSO et al., 2019a; PAUL et al., 2019; AGLIASSA et al., 2021; CARILLO et al., 2022). Thus, it is clear that in addition to the rich biochemical composition of cyanobacteria, protein hydrolysates play a fundamental role in the vegetative development of tomato plants. Thus, the concentrations of these will determine their greatest effectiveness, as seen in this study, in the treatments NP3, NP4, NP5, PH, and NP Control.

The NP Control treatment that only contains chitosan was effective in promoting tomato vegetative growth, differing from the control (distilled water), a finding that may be correlated with the growth promoter action in plants of those polysaccharide, by increasing stomatal conductance and reducing transpiration. Besides, chitosan increases photosynthetic activity, acts on tolerance to abiotic stressors (e.g., drought, salinity, and extreme temperatures), as well as increases the activity of antioxidant enzymes and the expression of defensive genes (SHAHRAJABIAN et al., 2021).

Table 12 - Plant height, fresh weight, dry weight, leaf blade area and SPAD index in the vegetative and ripening phenological stages (n = 12) of tomato plants treated with *Arthrospira platensis* protein hydrolyzate and with the nanoparticulate derivative

Treatment	Plant height (cm)		Fresh Weight (g)		Dry Weight (g)		Leaf area (cm ²)	SPAD		
	Stage	Vegetative	Ripening	Vegetative	Ripening	Vegetative		Ripening	Vegetative	Ripening
p-value		1.1.10 ⁻¹⁴	0.159	1.47.10 ⁻⁴	0,0105	1.47.10 ⁻⁴	0.1223	0,109	0,0179	1,21.10 ⁻⁹
Control		23.6 ± 3.82 d	97.0 ± 11.8 a	20.1 ± 9.49 c	442.2 ± 30.1 a	1.70 ± 0.84 c	70.4 ± 3.40 a	191.4 ± 53.5 a	47.2 ± 4.32 a	68.1 ± 11.8 ab
NP1		26.5 ± 3.06 cd	98.0 ± 11.9 a	24.7 ± 9.70 bc	320.0 ± 91.1 ab	2.00 ± 0.88 bc	53.6 ± 20.3 a	148.9 ± 20.9 a	46.0 ± 4.21 a	73.7 ± 19.2 a
NP2		27.5 ± 4.43 cd	103.1 ± 14.1 a	27.9 ± 10.8 abc	443.1 ± 72.5 a	2.28 ± 1.35 abc	63.3 ± 14.2 a	200.2 ± 58.4 a	46.6 ± 3.02 a	74.2 ± 14.7 a
NP3		32.2 ± 3.64 ab	91.2 ± 14.2 a	32.6 ± 7.77 ab	338.6 ± 8.23 ab	2.75 ± 0.86 abc	60.6 ± 8.29 a	160.1 ± 20.2 a	45.1 ± 2.33 a	56.4 ± 6.77 bc
NP4		33.0 ± 3.34 ab	93.7 ± 6.72 a	33.6 ± 9.17 ab	311.9 ± 43.5 ab	2.93 ± 0.98 ab	46.6 ± 8.93 a	138.6 ± 42.9 a	44.0 ± 3.57 a	59.5 ± 8.71 bc
NP5		34.7 ± 2.87 ab	89.5 ± 15.9 a	31.1 ± 9.81 ab	276.2 ± 64.8 b	2.78 ± 1.11 abc	45.1 ± 5.80 a	173.7 ± 55.7 a	43.2 ± 3.83 a	47.1 ± 5.74 c
PH		35.3 ± 2.85 a	98.7 ± 13.8 a	36.4 ± 3.81 a	415.6 ± 30.6 ab	3.34 ± 0.45 a	63.9 ± 4.35 a	210.2 ± 48.5 a	42.7 ± 3.78 a	52.6 ± 4.34 c
NP Control		30.2 ± 6.63 bc	91.3 ± 13.3 a	30.0 ± 12.0 abc	372.4 ± 50.8 ab	2.73 ± 1.28 abc	58.6 ± 2.59 a	194.2 ± 57.7 a	46.6 ± 2.91 a	55.3 ± 3.22 bc

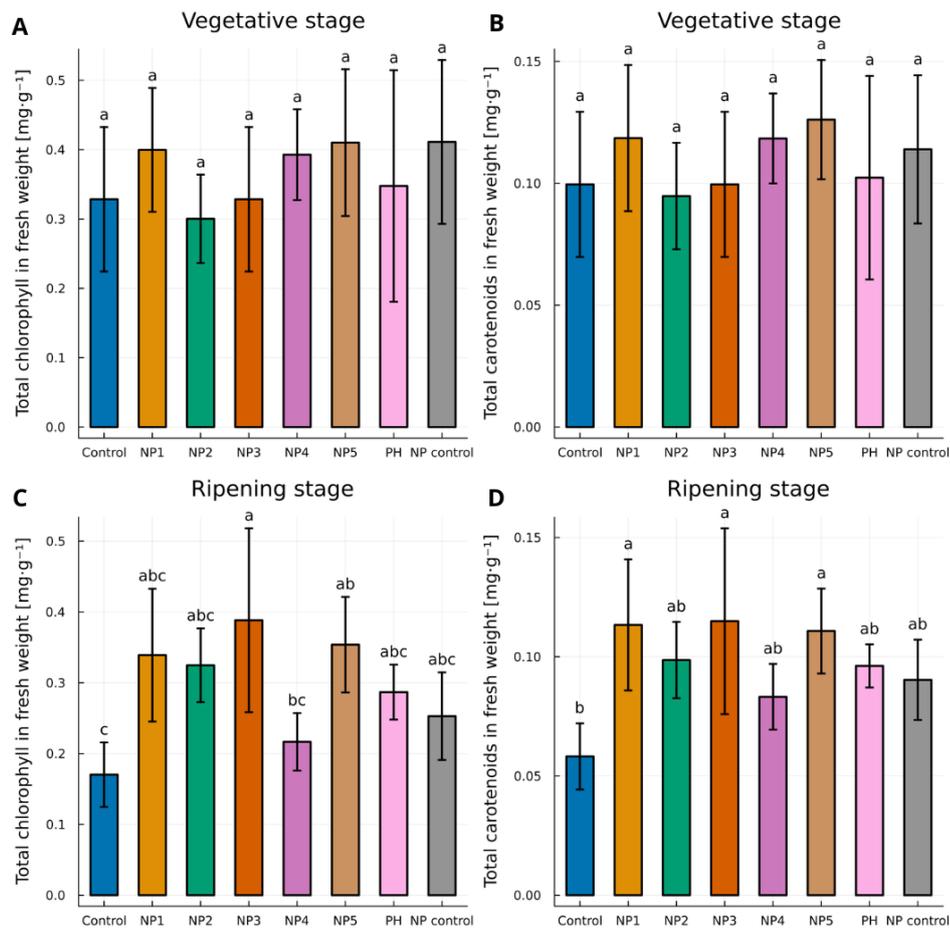
Means followed by the same letter in the column for each variable do not differ according to Tukey's HSD at a 0.05 level of probability. Control: 0 mg. mL⁻¹ of amino acids; NP1: Nanoparticles 0.3 mg. mL⁻¹ of amino acids; NP2: Nanoparticles 0.8 mg. mL⁻¹ of amino acids; NP3: Nanoparticles 1.2 mg. mL⁻¹ of amino acids; NP4: Nanoparticles 1.6 mg. mL⁻¹ of amino acids; NP5: Nanoparticles 2.0 mg. mL⁻¹ of amino acids; Hi: Protein hidrolysate 2.0 mg. mL⁻¹ of amino acids; NP control: Nanoparticles 0 mg. mL⁻¹ of amino acids. *NP control containing the same concentration of nanoparticles as the NP5 treatment, but without the active.

3.4 BIOCHEMICAL PARAMETERS

3.4.1 Chlorophyll and Carotenoids total

During the vegetative period, the treatments investigated did not show significant differences regarding the total amounts of chlorophylls and carotenoids (Figure 11). In the frutification stage, the NP3 and NP5 treated plants showed higher averages of those metabolites than the control, increasing the total chlorophyll content ($P < 0.038$). A similar pattern was observed in total carotenoids, with an increase in means for the NP1, NP3, and NP5 treatments ($P < 0.0156$), differing from the control (Figure 11).

Figure 11 – Chlorophyll and carotenoids contents (means \pm S.E) of tomato leaves treated with the protein hydrolyzate and its nanoderivative. (A) Vegetative stage - total chlorophyll content, (B) Vegetative stage - total carotenoid content, (C) Ripening stage - total chlorophyll content, (D) Ripening stage - total carotenoid content



Letters in the figure indicated that the means \pm S.E of treatments with the same letter/s were not significantly different according to Tukey's HSD at a 0.05 level of probability.

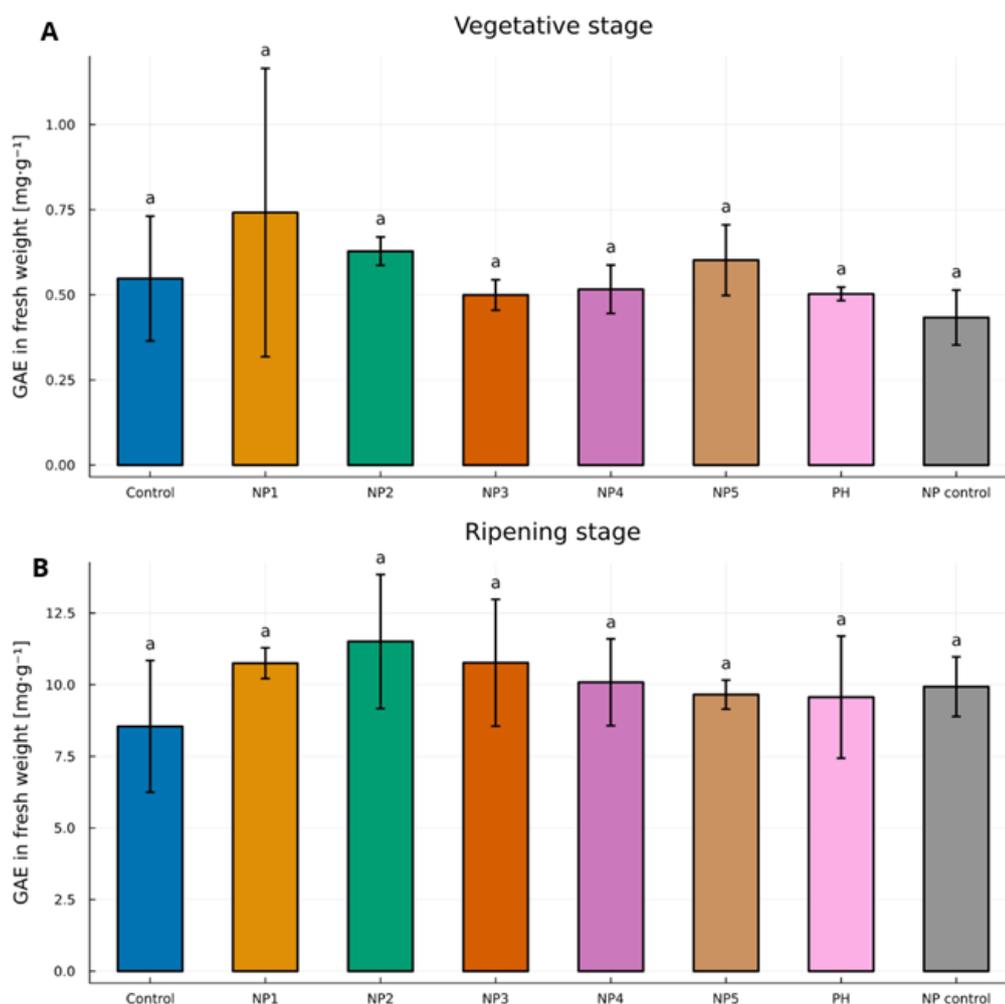
From the data, it is verified that the NP3 and NP5 treatments maintained the light capture more effectively through chlorophyll during the ripening stage, maintaining the vital processes of photosynthesis after passing through the vegetative phase, which occurred more intensively in the control treatment. Similar results were found by Deng et al. (2019) in grapes treated with different dilutions (600, 800, and 1000x) of a biostimulant based on a natural extract. It was found that the highest dilution presented more expressive values in the maturity stage of the plants, which resulted in better-quality fruits compared to the control.

Regarding carotenoids, important antioxidant pigments present in plants, and with a key role in photosynthesis and in the defense of plants against pathogens, it was found that the NP1, NP3, and NP5 treatments differed from the control, preserving their most prominent antioxidant capacity in the ripening stage. A study carried out by Refaay et al. (2021) demonstrated that when using *Chlorella vulgaris*, *Arthrospira platensis*, and *Tetradesmus dimorphus* as biostimulants, statistical differences from the control were found for the chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoids amounts following the foliar spray treatment of *A. platensis*, which points to the effectiveness of this specie rich in protein, carbohydrate, lipid, and phytohormones.

3.4.2 Phenolics and Flavonoids totals

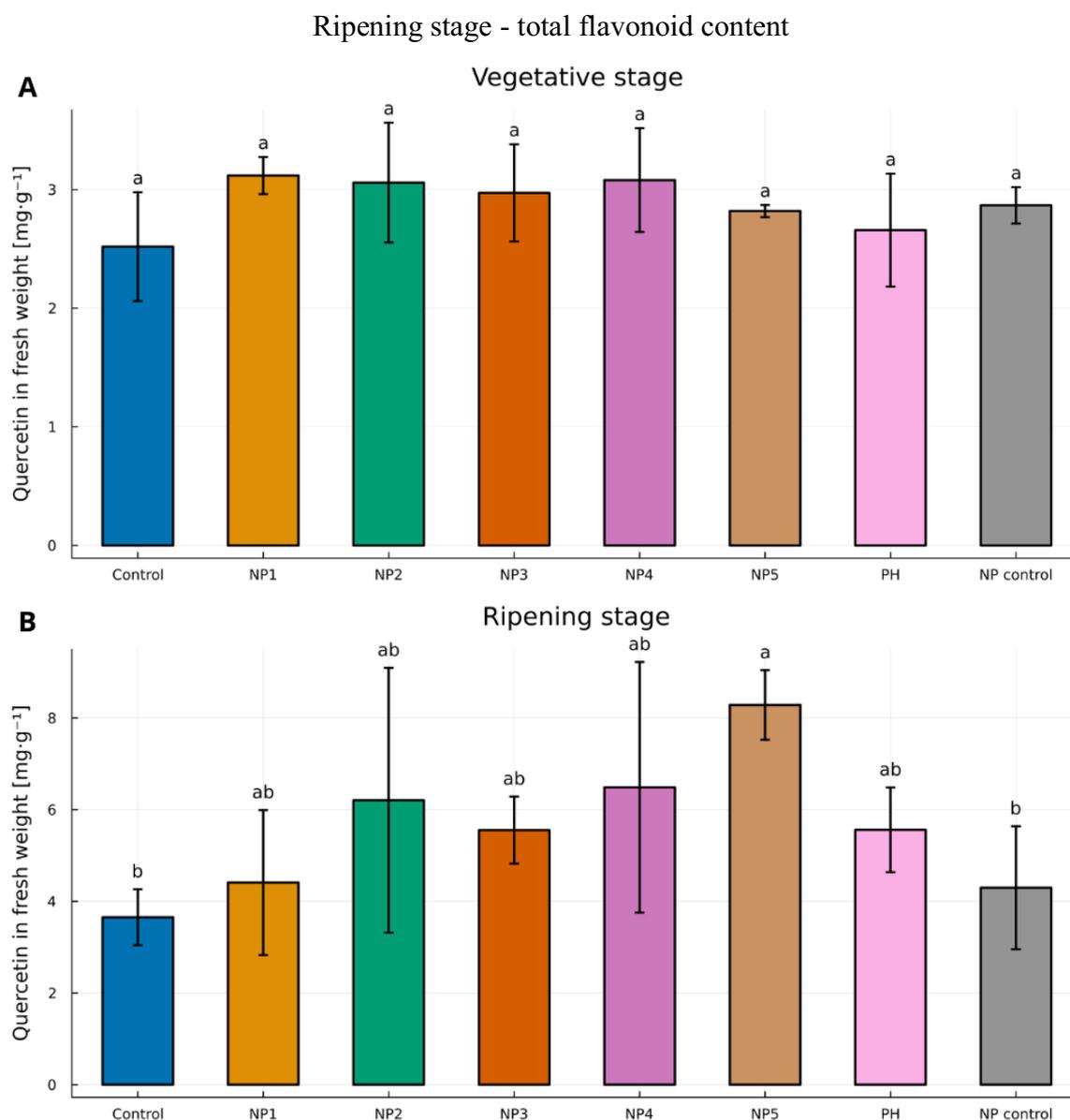
The total phenolic compounds and the flavonoid profile as a function of the treatments are described in Figures 12 and 13. The content of total phenolics and flavonoids did not show significant differences between treatments in the growing stage. In the ripening period, the flavonoid content increased in the treatment of the highest dose of NP5 nanoparticles ($p < 0.017$), in relation to the control, and the content of total phenolic compounds did not differ between treatments in this period.

Figure 12 – Total phenolic contents (means \pm S.E) of tomato leaves treated with the protein hydrolyzate and its nanoderivative. (A) Vegetative stage - total phenolic content (B) Ripening stage - total phenolic content.



Letters in the figure indicated that the means \pm S.E of treatments with the same letter/s were not significantly different according to Tukey's HSD at a 0.05 level of probability.

Figure 13 – Flavonoid contents (means \pm S.E) of tomato leaves treated with the protein hydrolyzate and its nanoderivative. (A) Vegetative stage - total flavonoid content (B)



Letters in the figure indicated that the means \pm S.E of treatments with the same letter/s were not significantly different according to Tukey's HSD at a 0.05 level of probability.

Among the parameters analyzed, plant stages and concentrations of the biostimulant, it was observed that the NP5 formulation differed from the control treatment in terms of total chlorophyll, carotenoid, and flavonoids contents in the ripening stage. Other studies demonstrated the ability of algae to increase the amounts of antioxidant substances. Lola-Luz, Hennequart, and Gaffney (2014), carrying out a field trial with potato, cv. Belladonna, verified an increase in the flavonoid content of approximately 300% compared to the control when applying a biostimulant based on the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* at the highest

concentration tested (10 L/ha). In another study, Kusvuran et al. (2021), when testing the effectiveness of foliar applications of the algae *Chlorella vulgaris* at different concentrations (1%, 3%, and 5%) in mitigating water stress in broccoli plants described a considerable increase in the content of total phenolic compounds (122%) and total flavonoids (20%) by applying 5% of the biostimulant compared to applications of 1% and 3%.

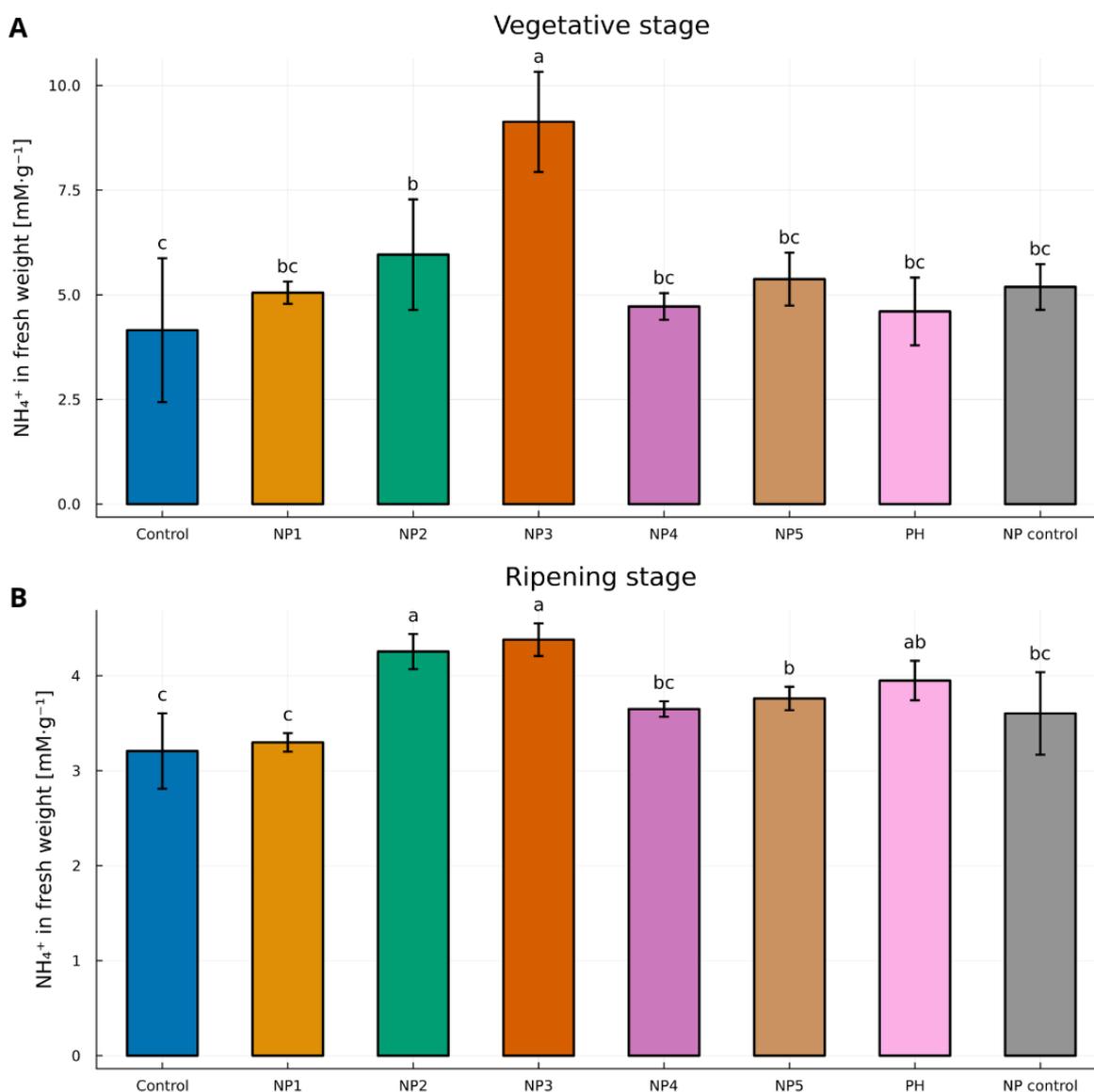
The increase in total flavonoids content may be related to plant response mechanisms, either by stress conditions, accumulation of reactive oxygen species (ROS), or even by the use of biostimulants itself, due to their composition, molecular conformation, and weight (BULGARI et al., 2015), which can be verified in this study.

3.4.3 Enzymatic activity - urease and nitrate reductase

Data for urease activity of tomato leaves treated with nanoparticles and protein hydrolyzate in the vegetative stage and ripening are shown in Figure 14. In the vegetative stage, the urease enzyme activity was higher in the NP3 treatments ($P < 1.69E-09$), while in the RIP stage, NP2 and NP3 showed higher enzymatic activity in relation to the control plants ($P < 2.74E-10$). There is a trend of the increase related to the concentrations of nanoparticles, with the NP3 treatment being the most effective in the vegetative period. In the RIP period, the enzyme concentration was more homogeneous between treatments with a significant difference found in the NP2, NP3, and free hydrolysate treatments.

Higher doses were observed in the growing season when plants were more responsive. This stage refers to the plant growth and demands a high rate of enzymatic activity during the plant's vegetative stage and flowering period. Urease activity is an important factor as it is responsible for hydrolyzing urea to release ammonium, playing an important role in nitrogen circulation. Although nitrogen assimilation related to nitrate reductase activity did not change between the two periods, keeping the best dose of AAs constant. The arginine present in the hydrolysate is the substrate for the urea cycle, which is catalyzed by the enzyme arginase, releasing substrate for urease activity facilitating nitrogen assimilation. The results herein described followed the same trend of other studies, where throughout the plant growth period urease exhibited firstly an initial increase in activity followed by a decrease in later periods (DEBOUBA, 2007; LI et al., 2016).

Figure 14 – Urease activity (means \pm S.E) of tomato leaves treated with the protein hydrolysate and its nanoderivative. (A) Vegetative stage - urease activity (B) Ripening stage - urease activity



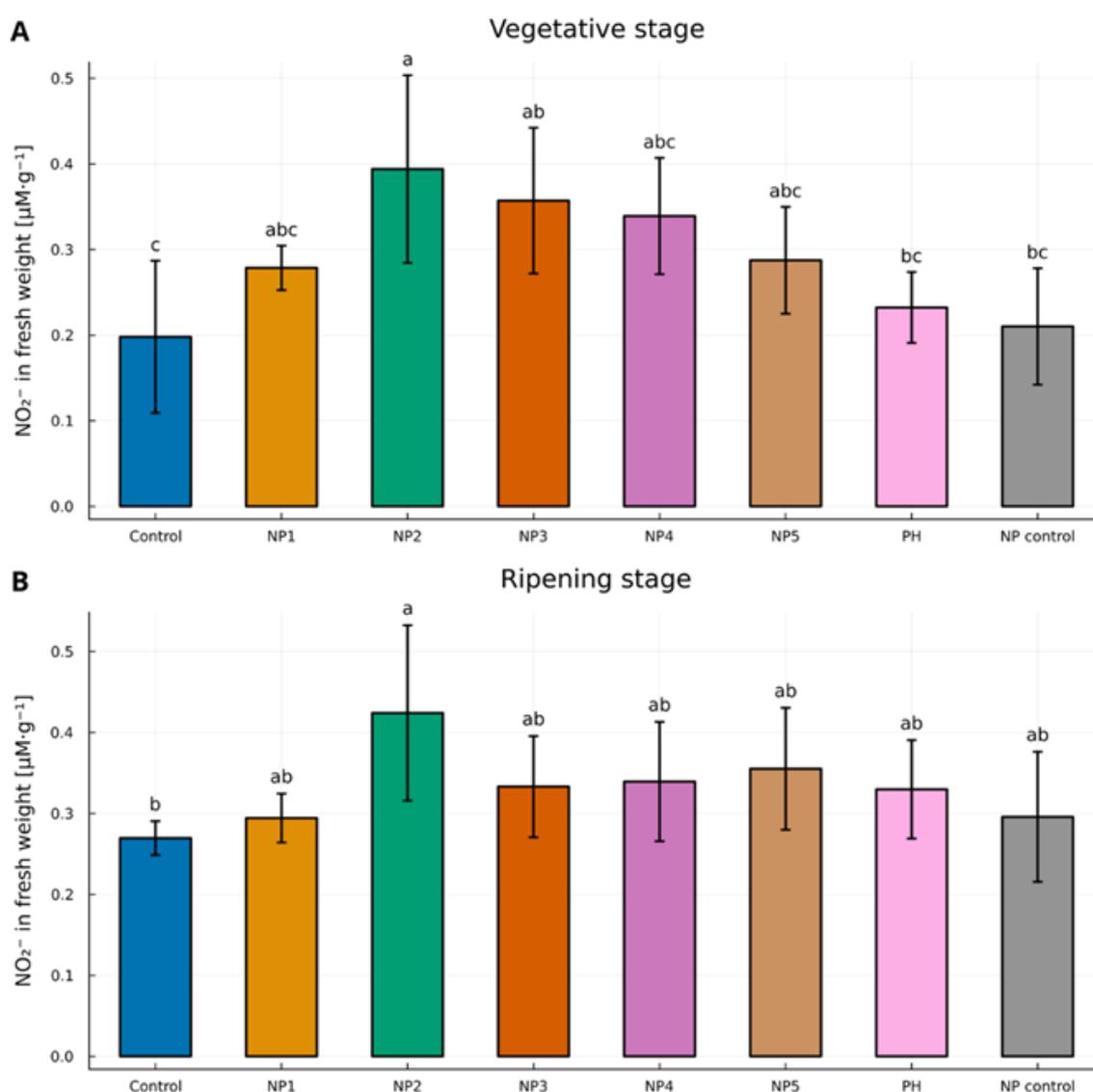
Letters in the figure indicated that the means \pm S.E of treatments with the same letter/s were not significantly different according to Tukey's HSD at a 0.05 level of probability.

Figure 15 shows the nitrate reductase values in the vegetative and ripening phenological stages. The NP2 treatment was significantly higher in both periods, i.e., vegetative (p-value = 0.000867) and ripening (p-value = 0.0475) stages. Nitrate reductase activity reduces nitrate to nitrite, a biochemical step critical to produce protein in most crop plants, as nitrate is the predominant source of nitrogen in fertilized soils.

In fact, research has already indicated a reduction in nitrate reductase activity upon reduced nitrogen sources availability, such as ammonium from the increase in urea reductase

activity. This trend may characterize that when the tomato plant already has the arginine substrate available, there is a preference for increasing urease activity to assimilate nitrogen for growth and, stabilizing the assimilation through nitrate reductase activity (HOGAN; SWIFT; DONE, 1983; DEBOUBA, 2007; SINGH; KUMAR, 2008).

Figure 15 – Nitrate reductase activity (means \pm S.E) of tomato leaves treated with the protein hydrolysate and its nanoderivative. (A) Vegetative stage - nitrate reductase activity (B) Ripening stage - nitrate reductase activity



Letters in the figure indicated that the means \pm S.E of treatments with the same letter/s were not significantly different according to Tukey's HSD at a 0.05 level of probability.

The increase in nitrate reductase in tomato plants is directly related to their tolerance to salts (NaCl, e.g.). Salt tolerance is an important agronomic attribute as soil salinity is

becoming a problem in crops due to high irrigation demand worldwide. The accumulation of salt in plants can inactivate enzymes, altering their physiology (DEBOUBA, 2007). This increase in nitrate reductase activity may infer that the nanoencapsulated hydrolysate NP2 may be a good candidate for further testing regarding salt stress tolerance.

3.4.4 Epigallocatechin contentes in ripinig stage

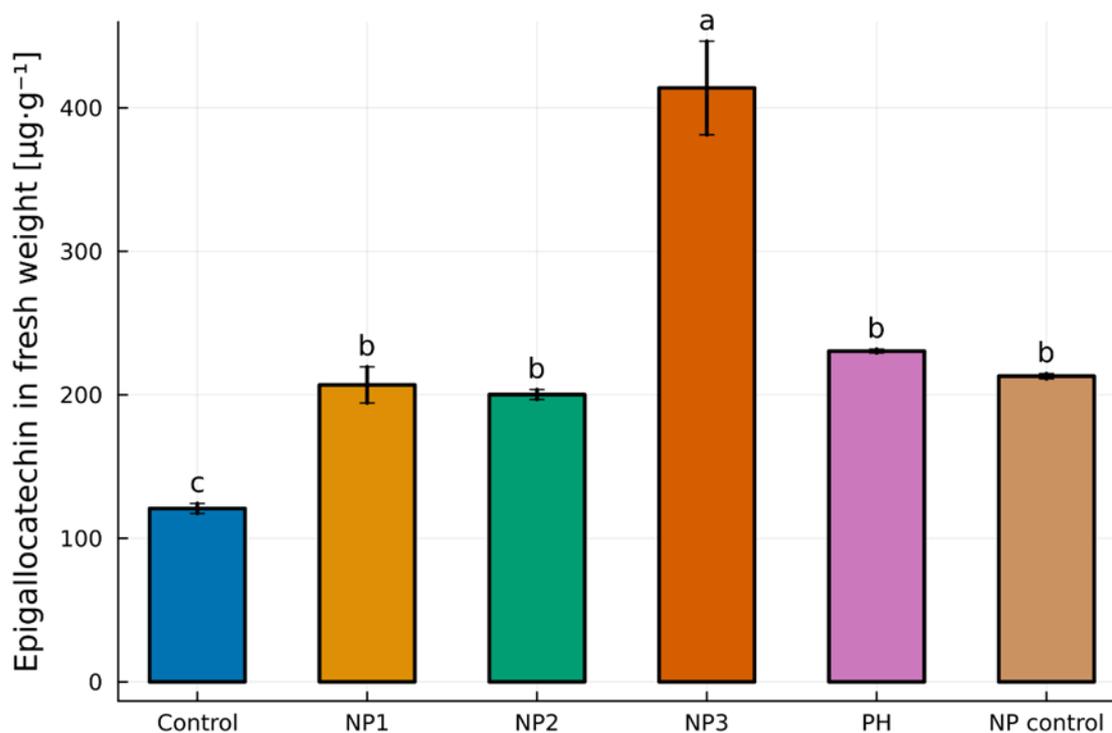
Epigallocatechin content in leaves of tomatoes treated with nanoparticles and protein hydrolysate rated at the ripening stage is shown in Figure 16. The NP1, NP2, NP3, PH, and NP Control treatments with nanoparticles and hydrolysates showed to be statistically superior to the control. Importantly, the NP3 treatment ($P < 1.43 \times 10^{-5}$) showed higher epigallocatechin content.

Epigallocatechin is a flavonoid with antioxidant power very well characterized as a ROS scavenger and in the relationships of plant defense induction responses associated with the jasmonic acid pathway, recognized as an important signaler of responses to abiotic stresses (HONG et al., 2015). Previous research has shown that abiotic factors or the application of plant hormones can alter the transcriptional levels of genes involved in catechin biosynthetic pathways, inducing changes in the concentrations of these molecules (LI et al., 2017). Jasmonic acids are fatty acid-derived signaling molecules and participate in the regulation of many physiological and developmental processes in plants. In this sense, it is recognized that the jasmonic acid pathway plays a key role in induced defensive responses and has been reported in several plants (HOWE; JANDER, 2008; LOU ET AL., 2015; SCHUMAN; BALDWIN, 2016).

Protein hydrolysates play an important role as natural biostimulants acting in the induction of defensive compounds in plants such as small peptides, amino acids, and hormones. As it is a complex matrix, it is difficult to understand how these compounds act synergistically as signaling molecules in plant metabolism; while its action of inducing growth, protein synthesis, and accumulation of phenolic compounds are already extensively reported (BATTACHARYYA et al., 2015; ERTANI et al., 2016; ERTANI et al., 2017; PUGLISI et al., 2020; SCHIAVON et al., 2010). The use of epigallocatechin-3-gallate in tomato plants protected the plant from salt stress with a beneficial effect on seed germination (AHAMMED et al., 2018). The study associated plant tolerance to salt stress due to the mitigation of oxidative stress through an efficient mechanism of ROS scavenging by the action of an increased

antioxidant enzymatic activity. This effect is of elevated value for the development of new products.

Figure 16 – Epigallocatechin content (means \pm S.E) in leaves of tomato treated with treatments containing nanoparticles and protein hydrolysate, rated at ripening stage

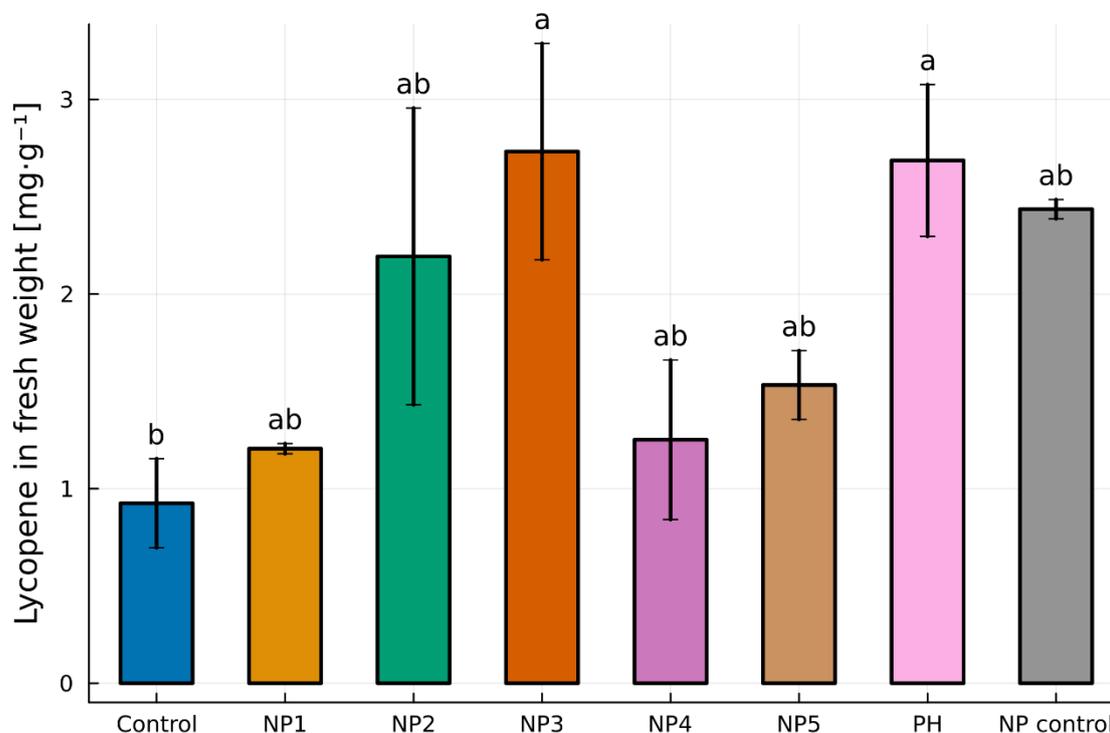


Letters in the figure indicated that the means \pm S.E of treatments with the same letter/s were not significantly different according to Tukey's HSD at a 0.05 level of probability.

3.4.5 Lycopene

The lycopene concentration in the tomato fruit samples is described in Figure 17. A linear increase in concentrations was observed until the NP3 treatment, as the concentrations of NP4 and NP5 ones were reduced. The NP3 and PH treatments promoted a significant increase in lycopene concentrations in fruits ($P < 0.0087$). A lower dose of AAs in NP3 showed similar effect in respect to the PH treatment, a fact that evidence an improved nanoparticle absorption by leaves, promoting the synthesis of lycopene in the tomato fruits. The NP4 and NP5 treatments significantly reduced the lycopene values, inferring that when the hydrolysate is encapsulated, concentrations above 1.6 of AAs can be harmful to the plant and jeopardize its antioxidant components. Besides, the PH treatment did not negatively affect the synthesis of lycopene, that is, when the hydrolysate is in the free form, a tolerance of the plant towards the concentration of amino acids seems to occur.

Figure 17 – Lycopene content (means \pm S.E) in tomato fruits treated with the protein hydrolysate and its nanoderivative, rated at ripening stage



Letters in the figure indicated that the means \pm S.E of treatments with the same letter/s were not significantly different according to Tukey's HSD at a 0.05 level of probability.

Studies with nanoformulation of biostimulants are an emerging science in the field, especially in foliar application, capable of increasing foliar absorption and, consequently, decreasing the demand for the necessary concentration of the bioactive to be used in the preparation of products. The reduced size of these nanoparticles increases the specific surface area and reactivity of nanofertilizers, which may affect nutrient solubility, diffusion, and, consequently, availability to plants (SINGH et al., 2013). Therefore, it is believed that the variation of effectiveness in the concentrations of the best treatments for lycopene synthesis, i.e., from 1.2 AAs of NP3 to 2.0 of PH, is related to hydrolysate encapsulation and increased foliar absorption.

Lycopene synthesis is induced by the increase in ethylene that is produced by the ripening of the fruit (LIU et al., 2012). In the observational data, accelerated growth has been found in relation to plant height for the NP3 and PH treatments. This could suggest a synergism in a cascading effect of the biostimulant product.

The lycopene data in tomato fruits with the use of biostimulant investigated in this work agree with previously reported by Sidhu et al. (2017), evaluating the lycopene content in four tomato cultivars after the use of a commercial fertilizer based on *Ascophyllum nodosum*. Increases in the contents of that carotenoid were found by the authors in all the treated tomato cultivars compared to the control.

The ripening of tomato fruits is correlated with the increase of lycopene in confluence with the degradation of chlorophylls, giving characteristic color changes. The consumer's preference for fully red fruits intensifies the search for biostimulants that promote this conversion to improve fruit quality (CARUSO et al., 2019b). In addition to the visual aspect of color, the application of alga biostimulants has been reported to reduce the ripening time, increasing the antioxidant properties, and thus increasing the commercial value of tomato fruits (RODRIGUES et al., 2020).

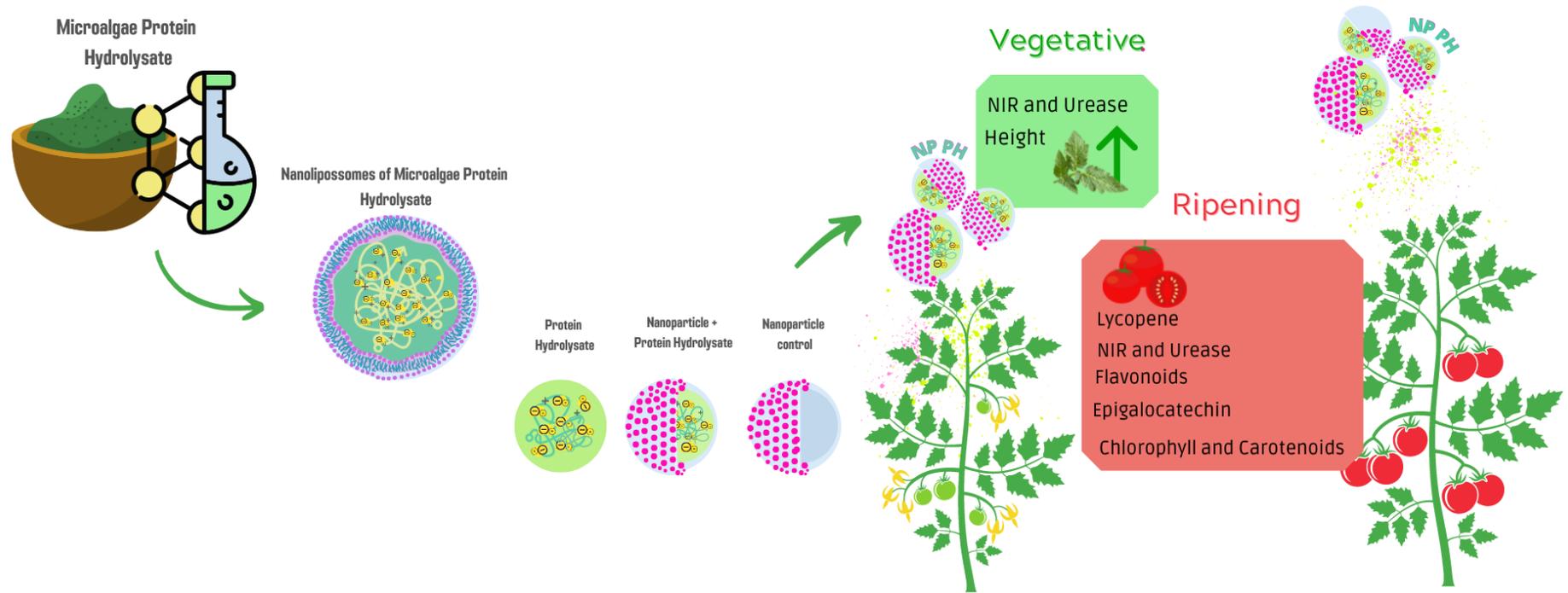
The *A. platensis* protein hydrolysate developed showed the expected compositional characteristics for a product of this class, indicating amounts of amino acids and polyamines reported to promote stimuli in plants. The formulation of chitosan nanoparticles with the purpose of encapsulating the protein hydrolysate of the *A. platensis* was obtained, reaching nanoparticle sizes smaller than 200 nm, important for the delivery of amino acids in leaf tissues. In addition, the developed system evidence nanoliposome structures, capable of delivering lipophilic and hydrophilic molecules present in the protein hydrolysate. Tests carried out in tomato cultures showed the ability of nanoparticles containing the protein hydrolysate to promote greater plant height in the vegetative stage, in addition to increasing the metabolism of carotenoids and flavonoids in the fruiting stage. The lowest doses tested NP2 and NP3 showed an increase in the enzymatic activity (i.e., urease and nitrate reductase), ensuring a better biochemical performance regarding the nitrogen metabolization in the two phenological states analyzed. Furthermore, the biosynthesis of epigallocatechin and lycopene was higher in NP3-treated plants in leaves and fruits, respectively. Regarding the lycopene content, we can evidence that the action of the nanoparticulate hydrolysate is more effective at lower doses than its free form.

4 CONCLUSIONS

It is concluded from the results obtained in this study that the biostimulant (Figure 18) based on hydrolyzed cyanobacteria proteins and its form delivered with nanoliposomes has a positive effect on the height of tomato plants in the vegetative stage, in addition to increasing

the activity of nitrogen assimilation by the plants. There was also an increase in the synthesis of chlorophylls and carotenoids, epigallocatechin and lycopene in fruits. Additional research is needed to better understand the mechanisms of action of nanoliposome-based biostimulants containing cyanobacteria protein hydrolysate to provide more precise dose guidelines and understand their uptake in plants for horticultural application.

Figure 18 – Schematic view of nanoliposomes of microalgae Protein hydrolysate effects on tomato plants under in vegetative and ripening stage



REFERENCES

- AGLIASSA, C. et al. A new protein hydrolysate-based biostimulant applied by fertigation promotes relief from drought stress in *Capsicum annuum* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 166, p. 1076–1086, 2021.
- AHAMMED, G. J. et al. Epigallocatechin-3-gallate alleviates salinity-retarded seed germination and oxidative stress in tomato. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 37, n. 4, p. 1349–1356, 2018.
- ALTIERI, M. A.; NICHOLLS, C. I. The adaptation and mitigation potential of traditional agriculture in a changing climate. **Climatic Change**, v. 140, n. 1, p. 33–45, 2017.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, n. 1, p. 1–15, 1949.
- BASHIR, S. et al. Functional properties and amino acid profile of *Spirulina platensis* protein isolates. **Biological Sciences**, v. 59, n. 1, p. 12–19, 2016.
- BATTACHARYYA, D. et al. Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 39–48, 2015.
- BEHERA, B.; SUPRAJA, K. V.; PARAMASIVAN, B. Integrated microalgal biorefinery for the production and application of biostimulants in circular bioeconomy. **Bioresource Technology**, v. 339, p. 1–14, 2021.
- BULGARI, R. et al. Biostimulants and crop responses: a review. **Biological Agriculture and Horticulture**, v. 31, n. 1, p. 1–17, 2015.
- BUONO, D. Can biostimulants be used to mitigate the effect of anthropogenic climate change on agriculture? It is time to respond. **Science of the Total Environment**, v. 751, p. 1–12, 2021.
- CARILLO, P. et al. Protein hydrolysates from animal or vegetal sources affect Morphophysiological traits, ornamental quality, mineral composition, and shelf-life of chrysanthemum in a distinctive manner. **Plants**, v. 11, n. 17, p. 1–17, 2022.
- CARUSO, G. et al. Protein hydrolysate or plant extract-based biostimulants enhanced yield and quality performances of greenhouse perennial wall rocket grown in different seasons. **Plants**, v. 8, n. 7, p. 1–18, 2019.
- CARUSO, G. et al. Yield and nutritional quality of Vesuvian Piennolo tomato PDO as affected by farming system and biostimulant application. **Agronomy**, v. 5, n. 9, 505–519, 2019b.
- CECCARELLI, A. V. et al. Foliar application of different vegetal-derived protein hydrolysates distinctively modulates tomato root development and metabolism. **Plants**, v. 10, n. 2, p. 1–14, 2021.

- CHANDA, M.-J.; MERGHOUB, N.; EL ARROUSSI, H. Microalgae polysaccharides: the new sustainable bioactive products for the development of plant bio-stimulants? **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 11, p. 1–10, 2019.
- CHEN, L. et al. Recent progress in targeted delivery vectors based on biomimetic nanoparticles. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 1–25, 2021.
- CLÉMENT, G.; GIDDEY, C.; MENZI, R. Amino acid composition and nutritive value of the alga *Spirulina maxima*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 18, n. 11, p. 497–501, 1967.
- COLLA, G.; ROUPHAEL, Y. Microalgae: new source of plant biostimulants. **Agronomy**, v. 10, n. 9, p. 1–4, 2020.
- DEBOUBA, M. et al. Changes in growth and activity of enzymes involved in nitrate reduction and ammonium assimilation in tomato seedlings in response to NaCl stress. **Annals of Botany**, v. 99, n. 6, p. 1143–1151, 2007.
- DENG, Q. et al. SUNRED, a natural extract-based biostimulant, application stimulates anthocyanin production in the skins of grapes. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2019.
- DU JARDIN, P.; XU, L.; GEELLEN, D. Agricultural Functions and Action Mechanisms of Plant Biostimulants (PBs) an Introduction. **The Chemical Biology of Plant Biostimulants**, p. 1–30, 2020.
- DVIR, T. et al. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. **Nano-Enabled Medical Applications**, v. 1, p. 351–382, 2020.
- ERTANI, A. et al. Biological activity of vegetal extracts containing phenols on plant metabolism. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 1–14, 2016.
- ERTANI, A. et al. Mini review: fruit residues as plant biostimulants for bio-based product recovery. **AIMS Agriculture and Food**, v. 2, n. 3, p. 251–257, 2017.
- FAGUNDES, Cristiane et al. Effect of active modified atmosphere and cold storage on the postharvest quality of cherry tomatoes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 109, p. 73–81, 2015.
- FOUNTOULAKIS, M.; LAHM, H. W. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. **Journal of Chromatography A**, v. 826, n. 2, p. 109–134, 1998.
- FRIEDMAN, M.; PANG, J.; SMITH, G. A. Ninhydrin-reactive lysine in food proteins. **Journal of Food Science**, v. 49, n. 1, p. 10–13, 1984.
- HÄUSLER, R. E.; LUDEWIG, F.; KRUEGER, S. Amino acids—a life between metabolism and signaling. **Plant Science**, v. 229, p. 225–237, 2014.
- HOGAN, M. E.; SWIFT, I. E.; DONE, J. Urease assay and ammonia release from leaf tissues. **Phytochemistry**, v. 22, n. 3, p. 663–667, 1983.

- HONG, G. et al. Epigallocatechin-3-gallate functions as a physiological regulator by modulating the jasmonic acid pathway. **Physiologia Plantarum**, v. 153, n. 3, p. 432–439, 2015.
- HOWE, G. A.; JANDER, G. Plant immunity to insect herbivores. **Annual review of Plant Biology**, v. 59, n. 1, p.41–66, 2008.
- JANTARO, S.; KANWAL, S. Low-Molecular-Weight Nitrogenous Compounds (GABA and Polyamines) in Blue-Green Algae. *In: Algal Green Chemistry*. Amsterdam: Elsevier, 2017.
- JAWORSKI, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 43, n. 6, p. 1274–1279, 1971.
- JIANG, M. et al. Phytonanotechnology applications in modern agriculture. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 19, n. 1, p. 1–20, 2021.
- KARNY, A. et al. Therapeutic nanoparticles penetrate leaves and deliver nutrients to agricultural crops. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.
- KOCIRA, S. Effect of amino acid biostimulant on the yield and nutraceutical potential of soybean. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 79, n. 1, p. 17–25, 2019.
- KUMAR, S. et al. Nano-based smart pesticide formulations: Emerging opportunities for agriculture. **Journal of Controlled Release**, v. 294, p. 131–153, 2019.
- KUSVURAN, S. Microalgae (*Chlorella vulgaris* Beijerinck) alleviates drought stress of broccoli plants by improving nutrient uptake, secondary metabolites, and antioxidative defense system. **Horticultural Plant Journal**, v. 7, n. 3, p. 221–231, 2021.
- LI, Y. et al. Effects of artificial soil aeration volume and frequency on soil enzyme activity and microbial abundance when cultivating greenhouse tomato. **Soil Science Society of America Journal**, v. 80, n. 5, p. 1208–1221, 2016.
- LI, X. et al. Nitric oxide mediates brassinosteroid-induced flavonoid biosynthesis in *Camellia sinensis* L. **Journal of Plant Physiology**, v. 214, p. 145–151, 2017.
- LI, X. et al. Encapsulation efficiency and oral delivery stability of chitosan–liposome-encapsulated immunoglobulin Y. **Journal of Food Science**, v. 87, n. 4, p. 1708–1720, 2022.
- LI, Z.; PAULSON, A. T.; GILL, T. A. Encapsulation of bioactive salmon protein hydrolysates with chitosan-coated liposomes. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 733–743, 2015.
- LIMA, G. P. P. et al. Comparison of polyamine, phenol and flavonoid contents in plants grown under conventional and organic methods. **International journal of food science & technology**, v. 43, n. 10, p. 1838–1843, 2008.
- LIN, H. LIN, H. Polyamines in microalgae: something borrowed, something new. **Marine Drugs**, v. 17, n. 1, p. 1–23, 2019.

LIU, L. et al. Ethylene independent induction of lycopene biosynthesis in tomato fruits by jasmonates. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 5751–5761, 2012.

LJUBIC, A. et al. Biomass composition of *Arthrospira platensis* during cultivation on industrial process water and harvesting. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 2, p. 943–954, 2018.

LOLA-LUZ, T.; HENNEQUART, F.; GAFFNEY, M. Effect on health promoting phytochemicals following seaweed application, in potato and onion crops grown under a low input agricultural system. **Scientia Horticulturae**, v. 170, p. 224–227, 2014.

LOU, Y.; HU, L.; LI, J. Herbivore-induced defenses in rice and their potential application in rice planthopper management. *In: Rice Planthoppers*. Dordrecht: Springer Netherlands, 91–115, 2015.

LUCINI, L. et al. The effect of a plant-derived biostimulant on metabolic profiling and crop performance of lettuce grown under saline conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 182, p. 124–133, 2015.

LUZIATELLI, F. et al. Foliar application of vegetal-derived bioactive compounds stimulates the growth of beneficial bacteria and enhances microbiome biodiversity in lettuce. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1–16, 2019.

MEGURO, N. E.; MAGALHAES, A. C. Nitrate reductase activity in coffee cultivars *Coffea arabica*. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 17, n. 12, p. 1725–1731, 1982.

MCCULLOUGH, H. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. **Clínica Chimica Acta**, v. 17, n. 2, p. 297–304, 1967.

MICHALAK, I.; CHOJNACKA, K. Algal extracts: Technology and advances. **Engineering in Life Sciences**, v. 14, n. 6, p. 581–591, 2014.

MORENO-HERNÁNDEZ, J. M. et al. Strategies for production, characterization and application of protein-based biostimulants in agriculture: A review. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 80, n. 2, p. 274–289, 2020.

MUTALE-JOAN, C. et al. Microalgae-cyanobacteria-based biostimulant effect on salinity tolerance mechanisms, nutrient uptake, and tomato plant growth under salt stress. **Journal of Applied Phycology**, v. 33, n. 6, p. 3779–3795, 2021.

NAVARRETE DEL TORO, M. A.; GARCÍA-CARREÑO, F. L. Evaluation of the progress of protein hydrolysis. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 10, p. 1–14, 2003.

OANCEA, F. et al. Micro-algae based plant biostimulant and its effect on water stressed tomato plants. **Romanian Journal of Plant Protection**, v. 6, p. 104–117, 2013.

PARADIKOVIĆ, N. et al. Biostimulants research in some horticultural plant species-A review. **Food and Energy Security**, v. 8, n. 2, p. 1–17, 2019.

PAUL, K. et al. Understanding the biostimulant action of vegetal-derived protein hydrolysates by high-throughput plant phenotyping and metabolomics: A case study on tomato. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1–17, 2019.

PRETTY, J. Intensification for redesigned and sustainable agricultural systems. **Science**, v. 362, n. 6417, p. 1–13, 2018.

PUGLISI, I. et al. Biostimulant effect and biochemical response in lettuce seedlings treated with a *Scenedesmus quadricauda* extract. **Plants**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2020.

RASBAND, W. S. et al. **ImageJ**. Version 1.52v. Maryland: U.S. National Institutes of Health, 1997.

REFAAY, D. A. et al. Effect of foliar application with *Chlorella vulgaris*, *Tetradesmus dimorphus*, and *Arthrospira platensis* as biostimulants for common bean. **Journal of Applied Phycology**, v. 33, n. 6, p. 3807–3815, 2021.

REGUEIRO, J. et al. Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap–Orbitrap mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 152, p. 340–348, 2014.

REIMERS, J. R. et al. Competition of van der Waals and chemical forces on gold-sulfur surfaces and nanoparticles. **Nature Reviews Chemistry**, v. 1, n. 2, p. 1–13, 2017.

RODRIGUES, M. et al. Organic plant biostimulants and fruit quality – A review. **Agronomy**, v. 10, n. 7, p. 988–1004, 2020.

SADLER, G.; DAVIS, J.; DEZMAN, D. Rapid extraction of lycopene and β -carotene from reconstituted tomato paste and pink grapefruit homogenates. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 5, p. 1460–1461, 1990.

SCHIAVON, M. et al. High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, n. 6, p. 662–669, 2010.

SCHIAVON, M. et al. Accumulation of selenium in *Ulva* sp. and effects on morphology, ultrastructure and antioxidant enzymes and metabolites. **Aquatic Toxicology**, v. 122, p. 222–231, 2012.

SCHONHERR, J. Characterization of aqueous pores in plant cuticles and permeation of ionic solutes. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, n. 11, p. 2471–2491, 2006.

SCHUMAN, M. C.; BALDWIN, I. T. The layers of plant responses to insect herbivores. **Annual Review of Entomology**, v. 61, n. 1, 373–394, 2016.

SHAHRAJABIAN, M. H. et al. Sustainable agriculture systems in vegetable production using chitin and chitosan as plant biostimulants. **Biomolecules**, v. 11, n. 6, p. 1–18, 2021.

SIDHU, V. et al. A study on organic tomatoes: Effect of a biostimulator on phytochemical and antioxidant activities. **Journal of Food Quality**, v. 2017, p. 1–8, 2017.

SINGH, D. K.; KUMAR, S. Nitrate reductase, arginine deaminase, urease and dehydrogenase activities in natural soil (ridges with forest) and in cotton soil after acetamiprid treatments. **Chemosphere**, v. 71, n. 3, p. 412–418, 2008.

SINGH, N. B. et al. Zinc oxide nanoparticles as fertilizer for the germination, growth and metabolism of vegetable crops. **Journal of Nanoengineering and Nanomanufacturing**, v. 3, n. 4, p. 353–364, 2013.

STIRK, W. A. et al. Cytokinin- and auxin-like activity in cyanophyta and microalga. **Journal of Applied Phycology**, v. 14, p. 215–221, 2002.

STIRK, W. A. et al. Plant Biostimulants from Seaweed: An Overview. *In: The Chemical Biology of Plant Biostimulants*, New York: John Wiley & Sons, 2020a.

STIRK, W. A.; VAN STADEN, J. Potential of phytohormones as a strategy to improve microalgae productivity for biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 44, p. 1–21, 2020b.

SOPPELSA, S. et al. Use of biostimulants for organic apple production: Effects on tree growth, yield, and fruit quality at harvest and during storage. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1–17, 2018.

TEDESCO, M. J. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: UFRGS, 1995.

UARROTA, V. G. et al. Metabolic profiling and biochemical analysis of stored Hass avocado fruit by GC-MS and UHPLC-UV-VIS revealed oxidative stress as the main driver of “Blackspot” physiological disorder. **International Journal of Food Science & Technology**. (*in press*).

UL HAQ, I.; IJAZ, S. Use of metallic nanoparticles and nanoformulations as nanofungicides for sustainable disease management in plants. *In: Nanobiotechnology in Bioformulations*. Springer, Cham, 2019.

VISCONTI, F. et al. Effects of a commercial calcium protein hydrolysate on the salt tolerance of *Diospyros kaki* L. cv. “Rojo Brillante” grafted on *Diospyros lotus* L. **Scientia Horticulturae**, v. 185, p. 129–138, 2015.

WHEELER, T.; VON BRAUN, J. Climate change impacts on global food security. **Science**, v. 341, n. 6145, p. 508–513, 2013.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. **The Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 170–177, 1986.

ZAPATA, D. et al. Phytohormone production and morphology of *Spirulina platensis* grown in dairy wastewaters. **Algal Research**, v. 59, p. 1–9, 2021.

CONCLUSÃO GERAL

Tendo em vista o exposto neste trabalho, considera-se que a cianobactéria *A. platensis* apresenta potencial para uso e aplicação na formulação de bioestimulante de plantas, ganhando destaque na quantidade e diversidade de aminoácidos presentes na composição após a hidrólise e etapas de processo realizadas. Vale ressaltar que além dos aminoácidos presentes a composição do hidrolisado proteico apresentou poliaminas e outras moléculas descritas como precursores de fitormônios no metabolismo de plantas, merecendo estudos futuros.

Considera-se que o hidrolisado proteico pode ser nanoformulado com quitosana e lecitina, e que esta formulação nanoparticulada é estável e proporciona a proteção de no mínimo 70% dos aminoácidos em sistemas nanolipossômicos. O sistema de entrega através de lipossomas desenvolvido nesta tese, demonstra a possibilidade de entrega de compostos lipofílicos e hidrossolúveis, pela versatilidade proporcionada por vesículas lipossômicas, imprescindível no carregamento de matrizes complexas e diversas, assim como o hidrolisado proteico de cianobactérias aqui estudado. Além de ser eficiente na interação de moléculas polares e apolares, os nanolipossomas aqui desenvolvidos apresentam características propícias para sua interação com a superfície foliar e tamanhos máximos de 200 nm, capazes de permitir a entrada através de estômatos e lenticelas.

Em vista dos efeitos apresentados pela aplicação do hidrolisado proteico e sua formulação nanoparticulada, evidencia-se efeitos distintos entre um estágio fenológico que outro, mostrando que as plantas apresentaram incremento em altura no estágio vegetativo, indicando que a composição do hidrolisado proteico pode melhorar a performance de crescimento, possivelmente acelerando a ativação de vias relacionadas ao crescimento e na regulação de fitormônios da planta neste período. No período de frutificação das plantas, percebe-se melhor desempenho na produção de metabólitos que interferem na qualidade de frutos, na síntese e assimilação de nitrogênio e no acúmulo de moléculas relacionadas à indução de resistência a adversidades abióticas e bióticas. Nota-se também a atuação de nanopartículas frente a formulação não nanoparticulada, evidenciando que doses menores do hidrolisado proteico quando entregues em nanolipossomas proporcionaram os mesmos efeitos que doses maiores do hidrolisado proteico na sua forma livre. Esta inferência demonstra de maneira indireta que a entrega do hidrolisado proteico é mais eficiente na sua forma nanolipossômica, reduzindo custos e a quantidade de ativo a ser utilizada nas aplicações foliares.

Sugere-se estudos futuros voltados ao melhor entendimento da absorção do sistema nanolipossômico contendo o hidrolisado proteico de *A. platensis* e a compreensão da dinâmica

nos tecidos foliares. Outros ensaios podem ser direcionados em relação específica a outros estádios fenológicos para a cultura do tomateiro indicando as melhores doses para recomendação de uso em cada período deste cultivo.