



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA

CAMILA REIS DE GODOY

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS DE
PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA PARA O ENCAPSULAMENTO DE *Bacillus
megaterium***

SÃO CARLOS-SP
2024

CAMILA REIS DE GODOY

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FILMES BIODEGRADÁVEIS DE
PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA PARA O ENCAPSULAMENTO DE *Bacillus
megaterium***

Trabalho de conclusão de curso apresentada
ao Centro de Ciências Biológicas e Saúde da
Universidade Federal de São Carlos, para
obtenção do título de bacharel em Ciências
Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza
Coorientadora: Dra. Cristiane Sanchez Farinas

SÃO CARLOS-SP
2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

Folha de aprovação

Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Trabalho de Conclusão de curso do candidato Camila Reis de Godoy, realizada em 06/02/2024:

Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza
Laboratório de Microbiologia e Parasitologia, LMP/UFSCar

Prof. Dra. Cristiane Sanchez Farinas
Embrapa Instrumentação, São Carlos - SP

Mestre Camila Cristina Vieira Velloso
Engenharia Química/UFSCar

AGRADECIMENTOS

À Cristiane Sanchez Farinas, por me aceitar no laboratório e acreditar no meu trabalho.

À Camila Velloso por toda a sua paciência, disponibilidade e confiança. Mesmo de longe esteve presente durante essa jornada.

Ao Clóvis Wesley Oliveira de Souza pelo apoio acadêmico ao longo do processo.

A todos os membros do Laboratório Nacional de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio (LNNA/EMBRAPA), principalmente a Bia, Lud, Aline, Vanessa Molina, Vanessa Graciano e Roger. Obrigada por todas as risadas e conselhos sobre a vida acadêmica e vida pessoal. Vocês me acolheram de braços abertos e foram fundamentais para a escrita desse trabalho.

Aos meus familiares, em especial minha mãe Francisca e minha irmã Laura. Eu amo muito vocês. Obrigada por toda a força e incentivo durante todos esses anos.

À Isabelly, por todas as risadas, choros, abraços, aconchegos, brincadeiras e todo o tempo que passamos juntas. Você é incrivelmente especial para mim e eu sou muito grata por te você na minha vida.

Aos meus amigos e companheiros de casa, principalmente ao Renan e Leo. Obrigada por todas as risadas, cafés e surtos compartilhados. A vida durante a graduação não é fácil, mas vocês com certeza deixaram tudo mais tranquilo.

À Dominique, por ser minha melhor amiga e estar presente em todos os momentos.

Aos meus amigos do ensino médio e também os amigos da graduação, em especial a Priscila, Maria, Débora e Well, pela amizade e companhia.

À Embrapa Instrumentação pela infraestrutura e oportunidade de realizar esse trabalho. Agradeço também a todos os funcionários e técnicos por todo cuidado com o espaço de trabalho e apoio nas análises que possibilitam a realização da pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação e trajetória.

E a mim mesma, que sempre batalhei para conquistar os objetivos e não desisti.

I learned a lot, by the end of everything. The past is past, now, but that's...you know, that's okay! It's never really gone completely. The future is always built on the past, even if we won't get to see it. Still, it's um, time for something new, now.

- Outer Wilds

RESUMO

A utilização de microrganismos promotores do crescimento de plantas vem sendo bastante citada como uma alternativa sustentável e promissora aos fertilizantes químicos. O encapsulamento de microrganismos oferece vantagens notáveis, pois, as células ficam protegidas contra estresses e se estabelece um ambiente propício para um aumento de sua viabilidade e conseqüentemente para a sua melhor atuação na planta e no solo. A Proteína de Soja Isolada (SPI) é um produto de baixo custo, de origem biodegradável e está disponível globalmente. Dessa forma, formulações de inoculantes microbianos que utilizam a Proteína Isolada de Soja na matriz têm grande potencial comercial. Este projeto visa desenvolver e caracterizar filmes biodegradáveis usando Proteína Isolada de Soja como matriz para encapsulação da bactéria *B. megaterium B119*, a fim de criar uma plataforma de liberação controlada de biofertilizantes. Além disso avaliar a viabilidade celular e o tempo de armazenamento e também mudanças nas caracterizações físico-químicas, ocasionadas por pH diferentes. A abordagem se baseia na necessidade de alternativas sustentáveis aos fertilizantes convencionais, buscando mitigar impactos ambientais. Os filmes foram produzidos através da técnica de *casting* e caracterizados por FTIR, MEV, ângulo de contato, permeabilidade, intumescimento e solubilidade. O objetivo do trabalho foi avaliar a eficácia do encapsulamento, perfil de liberação e viabilidade pós-armazenamento. Os resultados demonstraram que o filme com pH 7,0 possui uma coloração mais escura e uma taxa de intumescimento maior, o que favorece a sua liberação. Porém, na análise da viabilidade acelerada os melhores valores foram para o filme com pH 5,0. Em resumo, os resultados apontam que o pH exerce uma influência significativa em várias propriedades dos filmes feitos com Proteína Isolada de Soja (PIS), destacando-se o filme com pH 5,0 por sua capacidade de liberação controlada, viabilidade e o filme com pH 6,0 e pH 7,0 por sua resistência a condições ambientais adversas, como radiação U.V. Esses achados sugerem um potencial promissor de aplicação nos campos dos biofertilizantes e liberação controlada de microrganismos.

Palavras-chave: biofertilizantes; soja; microrganismos; encapsulamento.

ABSTRACT

The use of plant growth-promoting microorganisms has been widely cited as a sustainable and promising alternative to chemical fertilizers. Microorganism encapsulation offers notable advantages, as the cells are protected against stresses and a conducive environment for increased viability is established, leading to enhanced performance in both plants and soil. Isolated Soy Protein (ISP) is a low-cost, biodegradable product available globally. Thus, microbial inoculant formulations utilizing Isolated Soy Protein as a matrix hold significant commercial potential. This project aims to develop and characterize biodegradable films using Isolated Soy Protein as a matrix for encapsulating the bacterium *B. megaterium* B119, to create a platform for controlled release of biofertilizers. Additionally, it evaluates cell viability, storage time, and changes in physicochemical characteristics induced by different pH levels. The approach is based on the need for sustainable alternatives to conventional fertilizers, aiming to mitigate environmental impacts. Films were produced using the casting technique and characterized by FTIR, SEM, contact angle, permeability, swelling, and solubility. The objective was to assess encapsulation efficacy, release profile, and post-storage viability. Results showed that the pH 7.0 film had a darker coloration and higher swelling rate, favoring its release. However, in accelerated viability analysis, the best values were observed for the pH 5.0 film. In summary, the results indicate that pH significantly influences various properties of films made with Isolated Soy Protein (ISP), with the pH 5.0 film standing out for its controlled release capability and viability, and the pH 6.0 and 7.0 films for their resistance to adverse environmental conditions such as UV radiation. These findings suggest promising potential for application in the fields of biofertilizers and controlled release of microorganisms.

Keywords: biofertilizers; soy; microorganisms; encapsulation.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FLUXOGRAMA DA PRODUÇÃO DA PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA (PIS) E SEUS RESÍDUOS.....	12
FIGURA 2 - ASPECTO VISUAL DOS FILMES ANTES DA SECAGEM.....	19
FIGURA 3 - MEV DOS FILMES COM DIFERENTES PHs. EM A1, B1 E C1 SÃO IMAGENS DOS FILMES COM VISTA SUPERIOR COM AUMENTO DE 250X. EM A2, B2 E C2 SÃO IMAGENS DOS FILMES COM VISTA SUPERIOR COM AUMENTO DE 5000X.	20
FIGURA 4 - TERMOGRAMA DE DSC DOS TRÊS FILMES COM PIS COM PH 5,0 (A), PH 6,0 (B) E PH 7,0 (C). NA ÚLTIMA IMAGEM ESTÁ REPRESENTADO OS TRÊS TERMOGRAMAS JUNTOS (D).....	23
FIGURA 5 - CURVA DE DECOMPOSIÇÃO TÉRMICA. TERMOGRAMAS (A) DERIVADA DA PERDA DE PESO (DTG), (B) PERDA DE PESO (TGA).	24
FIGURA 6 - ESPECTROS DE FTIR DOS TRÊS FILMES.	26
FIGURA 7 - AS IMAGENS APRESENTAM OS VALORES DE INTUMESCIMENTO (A) E SOLUBILIDADE (B) PARA OS TRÊS FILMES.	27
FIGURA 8 - PERFIL DE LIBERAÇÃO DOS TRÊS FILMES. (A) CÉLULAS VIÁVEIS EM UFC G-1. (B) LIBERAÇÃO RELATIVA AOS VALORES DE VIABILIDADE NO ENCAPSULAMENTO.	29
FIGURA 9 - SOBREVIVÊNCIA EM PORCENTAGEM DAS CÉLULAS FRENTE A EXPOSIÇÃO A LUZ UV.	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	9
1.1. BIOFERTILIZANTES	9
1.2. INOCULANTES MICROBIANOS	10
1.3. CASTING	11
1.4. PROTEÍNA DE SOJA ISOLADA	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
2. OBJETIVOS	13
2.1. GERAL	13
2.2. ESPECÍFICOS	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. MATERIAIS	14
3.2. MÉTODOS	14
3.2.1. Preparo do filme com o microrganismo	15
3.2.2. Caracterizações	15
3.2.2.1. Aspecto visual	15
3.2.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	15
3.2.2.3. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	16
3.2.2.4. Termogravimetria (TG)	16
3.2.2.5. Espectroscopia na região de infravermelho (FTIR)	16
3.2.2.6. Grau de Intumescimento e Grau de Solubilidade	16
3.2.2.7. Permeabilidade do vapor de água	17
3.2.3. Perfil de liberação do microrganismo	17
3.2.4. Viabilidade acelerada	18
3.2.5. Viabilidade frente a estresse U.V.	18
3.2.6. Análise estatística	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1. ASPECTO VISUAL	19
4.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	19
4.3. CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)	20
4.4. TERMOGRAVIMETRIA (TG)	23
4.5. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DE INFRAVERMELHO (FTIR)	25
4.6. GRAU DE INTUMESCIMENTO E GRAU DE SOLUBILIDADE	26
4.7. PERMEABILIDADE DO VAPOR DE ÁGUA	28
4.8. PERFIL DE LIBERAÇÃO DO MICRORGANISMO	28
4.9. VIABILIDADE ACELERADA	29
4.10. VIABILIDADE FRENTE A ESTRESSE U.V.	31
5. CONCLUSÕES	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1. BIOFERTILIZANTES

Diversos estudos demonstram que as pesquisas na área alimentícia estão depositando esforços para aumentar cada vez mais a produção de alimentos no mundo (Lapicciarella, 2021). Algo essencial para um maior aumento de produção é a saúde da planta. Nesse ponto os fertilizantes podem ser grandes aliados, auxiliando no seu crescimento e desenvolvimento, entregando os nutrientes necessários (Correa, 2020).

Apesar de atribuir vantagens para as plantações, a utilização de fertilizantes químicos convencionais em excesso pode contribuir para a degradação dos solos, poluição das águas e do ar. Esses impactos negativos não se limitam apenas ao meio ambiente, pois também apresentam desvantagens significativas para a saúde humana (Batista, 2021; Singh, 2022). Devido a esses problemas que são causados pelo uso excessivo de fertilizantes convencionais, a comunidade científica busca desenvolver soluções que possam contribuir para o aumento da produtividade agrícola e que sejam sustentáveis (Batista; Singh; Lapicciarella, 2021).

Uma abordagem notável para enfrentar esse desafio é a aplicação de biofertilizantes. Essa estratégia se destaca por sua capacidade de impulsionar o crescimento e desenvolvimento das plantas por meio de diversos mecanismos, enquanto simultaneamente aprimora a fertilidade do solo (Kour et al., 2020).

O termo "biofertilizante" pode ser interpretado de várias maneiras, frequentemente levando a definições que abrangem desde extratos de algas marinhas, compostos de resíduos urbanos, misturas microbianas com componentes não identificados, até produtos de fertilizantes minerais enriquecidos com compostos orgânicos. É interessante notar que artigos científicos frequentemente adotam uma interpretação abrangente desse termo, abarcando desde fertilizantes derivados de origem animal até extratos de plantas (Maçik, 2020). De acordo com Silva et al. (2012), a utilização de biofertilizantes na agricultura é aconselhada com o propósito de mitigar a poluição ambiental, além de aprimorar as características físico-químicas do solo. Isso resulta em uma diminuição na demanda por fertilizantes sintéticos.

Os biofertilizantes com misturas microbianas atuam formando relação de simbiose com a planta, onde um fornece benefícios ao outro (El-Hawary et al., 2002). Microrganismos do gênero *Bacillus* se configuram como o principal gênero capaz de solucionar elementos como potássio e fósforo (Santos; Nogueira; Hungria, 2019). Eles também são capazes de realizar atividades relacionadas ao biocontrole, como por exemplo a antibiose, em que os microrganismos secretam metabólitos como antibióticos, compostos orgânicos voláteis,

toxinas e enzimas degradadoras de parede celular para combater os patógenos. Desse modo, os biofertilizantes com formulações que incluam espécies de *Bacillus*, possuem destaque por sua capacidade de solubilização do fosfato e fósforo e também pela sua ação no biocontrole (Fasusi; Cruz; Babalola, 2021).

1.2. INOCULANTES MICROBIANOS

Os inoculantes microbianos podem ser definidos como produtos que contêm microrganismos e acarretam benefícios para as plantas. Eles podem ser aplicados nas sementes, no solo ou nas folhas das culturas, promovendo o aprimoramento do crescimento e desenvolvimento da vegetação. Um inoculante microbiano para ser eficaz deve assegurar a proteção tanto física quanto química do microrganismo, desse modo evitando uma redução rápida da viabilidade das células durante o armazenamento e aplicação em campo (Soumare et al., 2020).

Para desenvolver um inoculante que seja eficiente várias etapas precisam ser concluídas, tais como isolar e selecionar o microrganismo; fazer uma triagem de seu potencial em promover o crescimento de plantas ou atuar no biocontrole; buscar a otimização dos parâmetros de cultivo microbiano; desenvolver uma formulação capaz de garantir a persistência microbiana no solo, entre outras etapas. Ademais, as formulações devem atender à necessidade dos agricultores, possuir baixo custo, ser de fácil manipulação e aplicação, e também ter prazo de validade maior que uma safra (Bashan et al., 2014; Mahanty et al., 2017; Oliveira et al., 2021).

Em relação à comercialização no Brasil, o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) estipula que o inoculante deve obter uma concentração mínima de 10⁹ células viáveis por cada g ou mL de produto até a data de validade, que deve ser de no mínimo 6 meses (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2021).

Os inoculantes microbianos podem ser obtidos de diversas formas, sendo uma delas por meio do encapsulamento, que envolve a imobilização do microrganismo no interior de uma estrutura, e apresenta uma vantagem de proporcionar um microambiente favorável para o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência do microrganismo. Essas características permitem uma maior viabilidade nas etapas de aplicação, adaptação e permanência no ambiente, fazendo com que a ação dos biofertilizantes aumente como um todo (John et el., 2011; Sahu; Brahma Prakash, 2016).

Dentre os métodos de encapsulamento, a técnica de casting é utilizada para a fabricação de filmes. O próximo tópico descreve os procedimentos que são utilizados nessa

técnica.

1.3. CASTING

A técnica de casting é utilizada para produzir filmes. Geralmente se inicia com a preparação de uma solução polimérica aquecida em excesso de água, em seguida a solução é resfriada e é feita a adição da suspensão com microrganismos. Depois o filme é espalhado sobre uma superfície lisa e espera-se evaporar o solvente (geralmente água), em condições ambiente ou em umidade relativa controlada (Dangaran, Tomasula e Qi, 2009; Krochta, 2009).

Durante a evaporação espera-se que o filme seja formado através do rearranjo de suas macromoléculas (Otoni et al., 2017). Filmes com umidade final de 5-8% facilitam a sua retirada do suporte (THARANATHAN, 2003).

Além de escolher com qual inoculante e com qual técnica de encapsulamento se irá trabalhar, outra decisão importante que deve ser tomada é em relação a qual carreador que será utilizado na formação dos filmes.

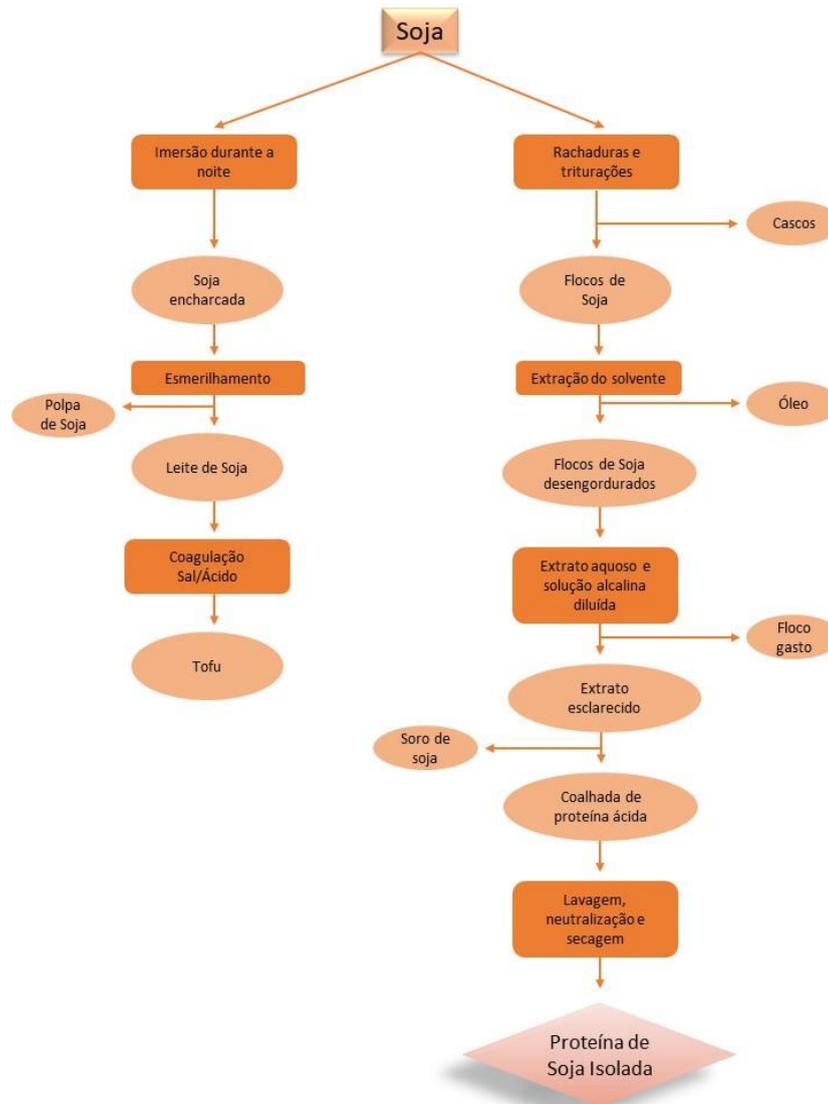
Lodi (2023) utiliza dessa técnica para produzir uma plataforma de encapsulamento de microrganismos em matriz pva, também sendo aplicada na agricultura. Outro estudo realizado com matrizes de amido, utilizou da técnica de casting para a formação de filmes (Lopes, 2022).

1.4. PROTEÍNA ISOLADA DE SOJA

A Proteína Isolada de Soja (PIS) representa a forma mais refinada dentre os principais derivados proteicos obtidos da soja, que incluem a farinha de soja, a proteína texturizada e a proteína concentrada. Com uma concentração superior a 90% de proteína, a Proteína Isolada de Soja se apresenta como um pó de tonalidade creme. Esse pó é produzido a partir da fração proteica dos grãos de soja, que é separada das demais substâncias não-proteicas por meio de um processo de purificação realizado em etapas. Esse processo é fundamentado na reatividade química e solubilidade das diferentes substâncias, visando isolar de maneira eficiente a proteína (Kumar *et al.*, 2002; Lodha; Netravali, 2005).

A Figura 1 ilustra o processo empregado para a obtenção da PIS utilizada no presente estudo.

Figura 1 - Fluxograma da produção da Proteína de Soja Isolada (PIS) e seus resíduos.



Fonte: Adaptado de Chua; Liu (2019).

A Proteína Isolada de Soja (PIS) é composta pelas proteínas de reserva da soja, que formam uma variedade de macromoléculas com tamanhos variados, e estruturas distintas derivadas de 18 diferentes resíduos de aminoácidos. Quando soluções aquosas de PIS são submetidas à ultra-centrifugação, geralmente revelam cerca de 15 frações distintas. No entanto, quatro frações dominantes são identificadas como 2S (20-22%), 7S (37%), 11S (31-40%) e 15S (10-11%), que são responsáveis pelas características da PIS.

Alguns atributos funcionais das proteínas podem ser aprimorados por meio da modificação de sua estrutura tridimensional, conhecida como desnaturação, que pode ser alcançada por agentes físicos, químicos ou enzimáticos. Por exemplo, o aquecimento da proteína nativa leva à quebra das ligações não-covalentes. Da mesma forma, valores de pH

muito baixos ou muito altos influenciam na ionização de grupos na proteína, resultando em uma carga elevada positiva ou negativa na molécula, o que causa repulsão intramolecular e expõe regiões hidrofóbicas internas.

O interesse pela PIS tem crescido significativamente devido à sua aplicação abrangente em várias indústrias. Isso se deve à sua capacidade de gerar produtos e bioprodutos que promovem a sustentabilidade e se alinham a uma visão econômica baseada em ciclos (Arfat *et al.*, 2014; Muller *et al.*, 2011; Ortega-Toro *et al.*, 2014; Menezes Filho *et al.*, 2021). Diversos estudos relatam que a PIS pode ter influência na floração, aumento de peso, maturação, podendo ser até mesmo comparada com alguns hormônios. Ela vem sendo utilizada como bioestimulante de várias espécies com fator relevante na agricultura, como o tomate e o brócolis (Colla *et al.*, 2017; Barrada *et al.*, 2022).

A PIS é usada como matriz de filmes biodegradáveis devido às suas propriedades estruturais e funcionais que permitem a formação de estruturas com características adequadas para sua utilização. As propriedades inerentes das proteínas as tornam excelentes materiais para formação de filmes e revestimentos biodegradáveis (CHO *et al.*, 2007; DENAVI *et al.*, 2009; HOPKINS *et al.*, 2015). Além disso, a grande diversidade de grupos funcionais derivados dos aminoácidos resulta em forças interativas capazes de melhorar a estabilidade dos filmes (HAMMANN e SCHMID 2014; DANGARAN, TOMASULA e QI, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

O objetivo deste trabalho é desenvolver um filme à base de Proteína Isolada de Soja (PIS) que sirva para produção de inoculantes microbianos encapsulados com bactéria (*Bacillus megaterium*). Além disso, avaliar a viabilidade celular e o tempo de armazenamento e também mudanças nas caracterizações físico-químicas, ocasionadas por pH diferentes.

2.2. ESPECÍFICOS

- Preparar filmes com a Proteína Isolada de Soja (PIS) e descrever suas características;
- Avaliar a eficiência do filme no encapsulamento de microrganismos;
- Caracterizar o filme através da espectroscopia de infravermelho (FTIR), da microscopia eletrônica de varredura (MEV), ângulo de contato, permeabilidade do vapor de água e a sua viscosidade;

- Determinar o grau de solubilidade e o grau de intumescimento do filme;
- Avaliar o perfil de liberação do microrganismo encapsulado;
- Avaliar a viabilidade do *B. megaterium* B119 encapsulado após o armazenamento por alguns meses;
- Avaliar o efeito da matriz na proteção a exposição à radiação UV.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

Para a produção dos filmes foi utilizada uma Proteína Isolada de Soja 90% em pó (90% de proteína, Bremil, Brasil), como plastificante utilizado foi o glicerol líquido (LS Chemicals). O microrganismo utilizado foi uma cultura de *B. megaterium* (CNPMS B119) obtida na Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo (SOUZA *et al.*, 2020) e água destilada. Para as avaliações microbiológicas utilizou-se o Ágar (CHEM-GOLD), caldo TSB (Caldo Triptona Soja - Biolog) e água destilada.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Obtenção do concentrado com microrganismos

A bactéria utilizada foi obtida a partir da Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo (CNPMS) (Minas Gerais, Brasil).

Para reativar o microrganismo, um criotubo contendo 5,0 ml de suspensão de células (~4,2 UFC/mL) armazenados a -80°C foi descongelado à temperatura ambiente e transferido para 50 mL de meio de cultura líquido TSB (Caldo Triptona Soja - Biolog) em erlenmeyers de 500 mL. Os erlenmeyers foram então incubados em um shaker por 16 horas a 250 rpm a 30°C para permitir o crescimento das células.

Seguindo uma metodologia adaptada de Velloso (2023) para obter esporos, 10% deste inóculo foi adicionado a 50 mL de meio TSB (Caldo Triptona Soja - Biolog) fresco em erlenmeyers de 500 mL e incubado por 72 horas a 250 rpm a 30°C.

Após 72 horas, o meio de cultivo foi centrifugado a 8000 rpm a 4°C por 20 minutos para precipitar completamente as células, e o sobrenadante foi descartado. As células foram então ressuspendidas em volume igual de solução estéril de NaCl 0,85%, e novamente centrifugadas

a 8000 rpm a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e por fim as células foram ressuspendidas em volume igual de solução estéril de NaCl 0,85%.

3.2.2. Preparo do filme com o microrganismo

A produção dos filmes foi feita pela técnica de casting conforme Carpiné *et al.*, (2015), com modificações. Foram produzidas quatro formulações com variações no pH, sendo eles 5,0; 6,0 e 7,0. A formulação dos filmes consistiu em 5,0 g de PIS e 1,5 g de glicerol, para cada 100 g de formulação. Para a produção dos filmes a PIS mais o glicerol foi pesado para posteriormente se completar o volume com 97,5 ml de água destilada. Após a pesagem a formulação foi homogeneizada por 20 minutos em agitador magnético e em seguida aquecida até 40 °C. Através de um pHmetro, o pH foi ajustado para 10,5 com solução de NaOH 1 M e após esse procedimento aqueceu-se a solução a 70 °C por 20 minutos. Passados os 20 minutos a solução foi resfriada até 35°C para que em seguida ela possa ser separada em 4 béqueres diferentes e terem o pH ajustados em 5,0; 5,5; 6,0 e 7,0 utilizando HCl 1 M. Logo em seguida as diferentes soluções foram homogeneizadas novamente por mais 15 minutos em agitação mecânica.

Nesse momento em que as quatro formulações finais estavam prontas, elas receberam 2,5 ml do microrganismo concentrado. Por fim foram vertidas aproximadamente 20 g da solução filmogênica em placas de acrílico e a secagem foi realizada em estufas a 30°C por 24h.

3.2.3. Caracterizações

3.2.3.1. Aspecto visual

O registro do aspecto visual dos filmes produzidos foi realizado por meio da captura de imagens em câmera de celular Samsung M30, com nível de aumento 1x. Os filmes foram avaliados levando em consideração parâmetros como homogeneidade (ausência de partículas insolúveis e coloração uniforme), continuidade (ausência de rupturas ou fraturas após a secagem), flexibilidade, facilidade de desprendimento do suporte e facilidade de manuseio (TURBIANI, 2007).

3.2.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia da superfície e fratura dos filmes foi avaliada por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (JSM-6510, JEOL). Os materiais foram colocados em stubs de alumínio com fita de carbono dupla face e revestidos com ouro. As micrografias foram tiradas

em diferentes magnificações.

3.2.3.3. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi feita em equipamento Q200 (TA Instruments, New Castle, DE, USA). As amostras de aproximadamente 6,0 mg foram submetidas às rampas de aquecimento/resfriamento/aquecimento entre 25 °C e 200 °C, a uma taxa de 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio. Foi determinada temperatura de transição vítrea (T_g).

3.2.3.4. Termogravimetria (TG)

A Análise Termogravimétrica foi realizada utilizando um equipamento - TGA - TA Instruments, modelo TGA Q500 - para avaliar o comportamento térmico e a estabilidade dos filmes. As amostras foram aquecidas em uma atmosfera de nitrogênio a uma taxa de aquecimento de 10°C por minuto, no intervalo de 25 a 600°C.

3.2.3.5. Espectroscopia na região de infravermelho (FTIR)

Para estudar a estrutura molecular do filme, uma amostra foi analisada por meio da espectroscopia na região de infravermelho (FTIR) usando um Bruker Vertex 70. O FTIR foi equipado com acessório de reflectância atenuada total (ATR). O espectro obtido foi de 4000 a 400 cm⁻¹, com 32 varreduras por amostra e resolução de 4 cm⁻¹.

3.2.3.6. Grau de Intumescimento e Grau de Solubilidade

A análise do grau de intumescimento e solubilidade foi conduzida em um único experimento, seguindo a metodologia estabelecida por Bigi *et al.* (2004) e Gontard *et al.* (1992). Os filmes foram cortados em dimensões de 2 x 2 cm e submetidos a um período de secagem em um forno a 100°C durante 24 horas. O peso inicial dos filmes foi registrado como (*m*₀). Amostras em triplicata foram inseridas em tubos Falcon contendo 50 mL de água destilada estéril e colocadas dentro de um incubador orbital a 25°C, com agitação suave. Durante 1, 2, 4 e 24 horas, as amostras foram monitoradas para ambas as análises.

Após cada período de imersão, os filmes foram retirados da água utilizando pinças, e a superfície foi delicadamente seca com papel absorvente para eliminar o excesso de água. Em seguida, os filmes foram pesados novamente, registrando-se o peso após imersão como (*m*₁). O grau de intumescimento dos materiais foi calculado por meio da relação entre o peso úmido e o peso inicial, levando em consideração o tempo de imersão (Equação 1).

$$\text{Grau de Intumescimento (\%)} = \frac{m_1 - m_0}{m_0} * 100 \quad \text{Equação 1}$$

Posteriormente, as amostras foram submetidas a uma nova etapa de secagem em um forno a 100°C por 24 horas, a fim de obter o peso seco (m_2). A solubilidade dos materiais foi determinada calculando-se a diferença entre os pesos inicial e final (Equação 2).

$$\text{Grau de Solubilidade (\%)} = \frac{m_0 - m_2}{m_0} * 100 \quad \text{Equação 2}$$

3.2.3.7. Permeabilidade do vapor de água

Uma amostra circular do filme (diâmetro de 10 cm) foi colocada em uma garrafa de vidro da cor âmbar contendo uma solução de NaCl concentrada ($75 \pm 3\%$ umidade relativa) a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. O sistema foi pesado e monitorado por 24h durante 7 dias, analisando o peso ganho de por meio da transferência de vapor de água no filme. Os resultados foram expressos por meio de duas fórmulas. A Taxa de Permeabilidade do vapor de água, foi determinada pela relação entre o coeficiente do ângulo da reta traçada ($\Delta m/\Delta t$) e a área de contato (A) (Equação 3).

$$\text{WVPR - Water Vapor Permeability Rate (g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}) = \frac{\Delta m}{\Delta t * A} \quad \text{Equação 3}$$

A Permeabilidade do vapor de água foi calculada pela equação 4, onde x é a espessura do filme, S é a pressão de saturação de solução salina a 25°C (3.16 kPa), HR_1 é a umidade relativa dentro do dessecador, e HR_2 é a umidade relativa dentro da garrafa de vidro.

$$\text{WVP - Water Vapor Permeability (g} \cdot \text{mm} \cdot \text{kPa}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}) = \frac{\text{WVPR} * x}{S(\text{HR}_1 - \text{HR}_2)} \quad \text{Equação 4}$$

3.2.4. Perfil de liberação do microrganismo

O perfil de liberação do material foi adquirido ao colocar uma quantidade conhecida de cada material em uma solução salina a 0,85% e agitá-los a 150 rpm, a 25°C . Foram coletadas amostras nos intervalos de tempo de 2, 6 e 24 horas. Após a coleta foi realizada a diluição seriada e essas amostras foram então inoculadas em placas de Petri, e a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de material foi determinada para cada intervalo de tempo. Esse valor refletirá a quantidade de microrganismos presentes em relação à massa do material ao longo desses períodos de tempo específicos.

3.2.5. Viabilidade acelerada

Os filmes encapsulados com *B. megaterium* B119 foram armazenados em três temperaturas diferentes, 15°C, 30°C e 45°C durante um mês, com a umidade controlada. Durante as 4 semanas, uma amostra de cada filme com as bactérias encapsuladas, foram liberados por 2 horas a 30°C. Para as análises foi feito uma diluição seriada, inoculando o material em meio TSB (Caldo Triptona Soja - Biolog) e ágar bacteriológico por 24 horas a 25°C, a fim de contar as colônias formadas. Essa etapa permitirá avaliar a viabilidade acelerada das bactérias após a liberação e fornecerá informações sobre a capacidade de crescimento e proliferação.

Os cálculos para a determinação do valor de UFC g⁻¹ pelo método da contagem em placa foram realizados pela equação abaixo:

$$\text{UFC g}^{-1} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de colônias} * \text{FD} * \text{Diluição Seriada} * \text{Lí extração}}{\text{Massa seca da extração}} \quad \text{Equação 5}$$

A viabilidade buscar determinar um tempo de degradação para os filmes, que se relaciona com o tempo que o microrganismo pode ficar armazenado e ainda estar viável. Após a obtenção de todos os valores de UFC g⁻¹ dos três filmes, durante 28 dias, é possível se obter o tempo de viabilidade através da seguinte equação:

$$t \text{ (dias)} = \frac{\ln[A_0] - \ln [A]}{k} \quad \text{Equação 6}$$

Onde, A₀ é o UFC g⁻¹ inicial, A é o UFC g⁻¹ final e k é a constante da velocidade de reação (kJ / mol. K), obtido por meio da reação de Arrhenius (Choosuk *et al.*, 2022 & Ferron *et al.*, 2021).

3.2.6. Viabilidade frente a estresse U.V.

Para o ensaio de resistência à luz UV, 0,01 g das bactérias livres e 0,1 g das formulações foram colocadas em câmara com 6 luzes UV-C e deixadas por 20, 60 e 180 minutos. As lâmpadas utilizadas foram da marca PhilPIS 15W G15T8 que são conhecidas por sua ação germicida, com emissão de comprimentos de onda entre 200 e 280 nm, com pico em 253.7 nm. Este pico em torno de 254 nm, é relatado como o mais eficiente para matar esporos de Bacillus (SETLOW, 2006).

Os filmes foram retirados da câmara de radiação e deixados sob agitação 150 rpm, 25 °C por 2 h, com solução NaCl 0,85%. Alíquotas foram retiradas e plaqueadas para obtenção dos valores de UFC g⁻¹ (Equação 5).

3.2.7. Análise estatística

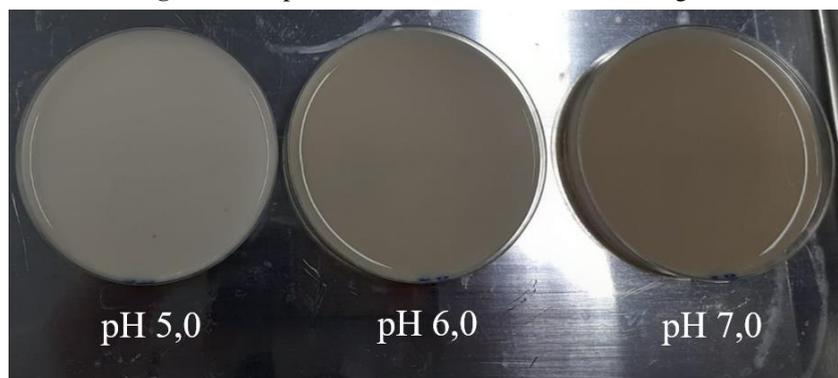
Os experimentos que necessitarem de dados quantitativos, foram realizados em triplicata e os valores obtidos foram expressos em termos de média \pm desvio padrão. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparação das médias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ASPECTO VISUAL

A produção de filmes à base de PSI, glicerol e com o microrganismo *B. megaterium* B119, foi realizada com sucesso, os filmes obtidos a partir de diferentes composições estão apresentados na Figura 2. Analisando visualmente os filmes foi possível perceber que a mudança do pH durante o preparo da solução precursora promoveu alteração de cor nos filmes, conforme o pH aumenta mais escura era a solução final. Os filmes estavam homogêneos, sem a presença de partículas insolúveis. O filme com pH 7,0 apresentou algumas rupturas e foi o filme que mais apresentou dificuldade na hora de ser retirado da placa de petri de acrílico.

Figura 2 - Aspecto visual dos filmes antes da secagem.



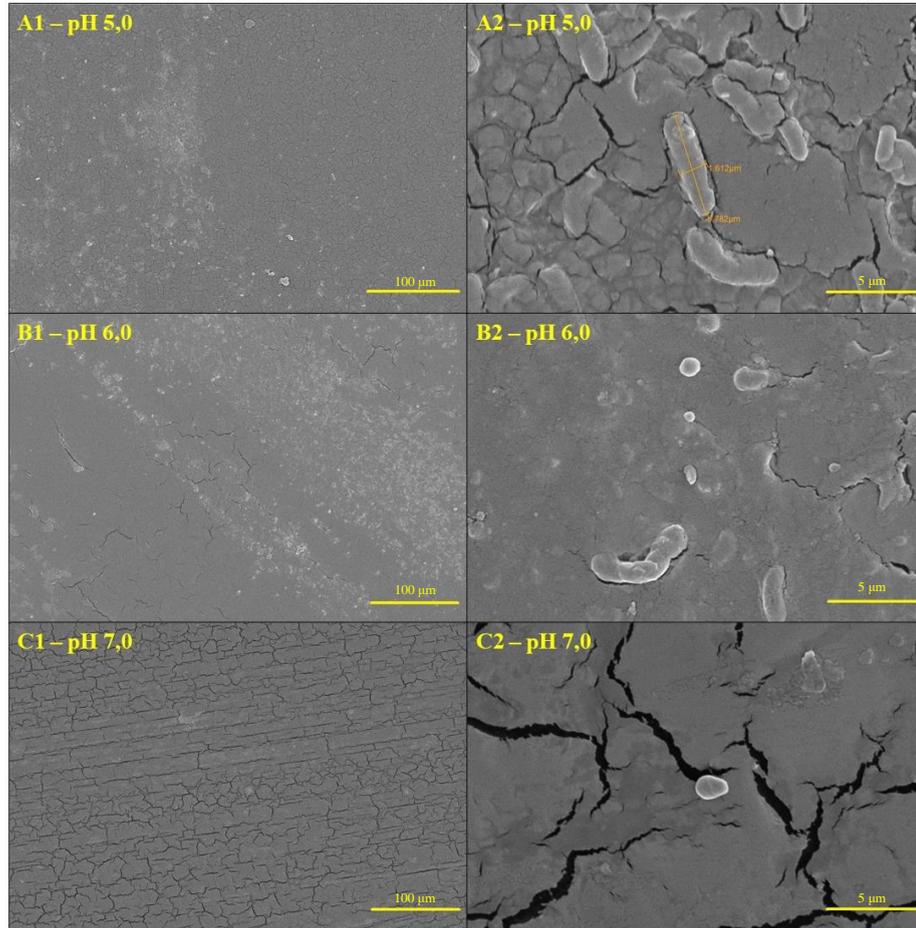
Fonte: Autoria própria.

4.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A Figura 3 exibe a estrutura superficial dos filmes, conforme revelado por MEV (microscopia eletrônica de varredura) dos filmes de PIS elaborados no pH 5,0 (A e B), pH 6,0 (C e D) e pH 7,0 (E e F) em aumentos de 250 e 5000 \times , respectivamente.

Nota-se mudança na superfície dos filmes à medida que se altera o pH. Nas imagens de $250\times$ é evidente que o filme com pH 7,0 possui uma estrutura com mais rachaduras, menos compacta e lisa quando comparadas àquelas observadas em filmes com pH 5,0 e 6,0.

Figura 3 - MEV dos filmes com diferentes pHs. Em A1, B1 e C1 são imagens dos filmes com vista superior com aumento de $250\times$. Em A2, B2 e C2 são imagens dos filmes com vista superior com aumento de $5000\times$.



Fonte: Autoria própria.

Outra mudança que pode ser observada é em relação aos microrganismos, que podem ser observados nas imagens de $5000\times$. Nos filmes com pH 5,0 e 6,0 foi encontrado uma grande quantidade de *B. megaterium* B119 na forma vegetativa, fato esse que é possível afirmar por conta do formato de bastonete encontrado em várias regiões dos filmes. Porém na análise do filme com pH 7,0 foi encontrado muito mais *B. megaterium* B119 na sua forma de esporo (Figura 3 – C1).

4.3. CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARREDURA (DSC)

Pressupondo que as características das soluções que formam filmes, incluindo sua estrutura e a interação entre os componentes, devem se manifestar no comportamento dos filmes sólidos, foi realizada uma análise da temperatura de transição vítrea (T_g). No que diz

respeito aos estudos dedicados à proteína de soja, a calorimetria diferencial de varredura tem sido largamente empregada, pois ela responde sobre as possíveis mudanças estruturais que o produto apresenta em função, por exemplo, quando ocorre uma alteração no pH do meio. Essa temperatura pode ser interpretada como a faixa na qual o movimento das macromoléculas se torna termicamente ativado (Schmidt; Giacomelli; Soldi, 2005).

Além da temperatura de transição vítrea (T_g) é possível extrair dados sobre a entalpia de desnaturação (ΔH_d) ao longo da análise térmica. A entalpia de desnaturação (ΔH_d) descreve a energia requerida para desnaturar a estrutura da proteína (Oliveira, 2019). Esse dado pode ser obtido através da integral da área sob o pico de desnaturação, que no caso do estudo reflete a quantidade de estrutura secundária que está sendo degradada na proteína (Studentnumber, 2009).

Tabela 1- Comportamento térmico dos filmes com diferentes pH's

Formulação	T_{g1} (°C)	T_{g2} (°C)	ΔH_d (J·g ⁻¹)
pH 5,0	-	113,9	75,25
pH 6,0	-	104,6	68,12
pH 7,0	66,8	152,8	28,30

* T_g – temperatura de transição vítrea; ΔH_d – entalpia de desnaturação. **Fonte:** Autoria própria.

No caso da PIS, a temperatura de transição vítrea (T_g) é comumente mencionada como a temperatura de desnaturação das duas principais frações componentes da proteína de soja, a glicinina (11S) e a β -conglucina (7S) (Mauri; Añón, 2006; Keerati-U-Rai; Corredig, 2009). Em solução, a T_g dessas frações geralmente varia entre 60-80 °C para a 7S e 80-95 °C para a 11S. A T_g de uma proteína normalmente não é afetada pela concentração quando em solução, onde essa temperatura geralmente é inferior a 100 °C. No entanto, em baixos teores de água, a T_g aumenta, e os picos endotérmicos são deslocados para temperaturas maiores (Kitabatake; Tahara; Doi, 1989). Como no presente estudo os filmes foram secos a uma temperatura de 30°C por 24h, quase toda a água presente foi evaporada, desse modo elevando os valores da T_g , ficando entre 113-152°C como mostra a Tabela 1 e também a Figura 4 (A, B, C e D).

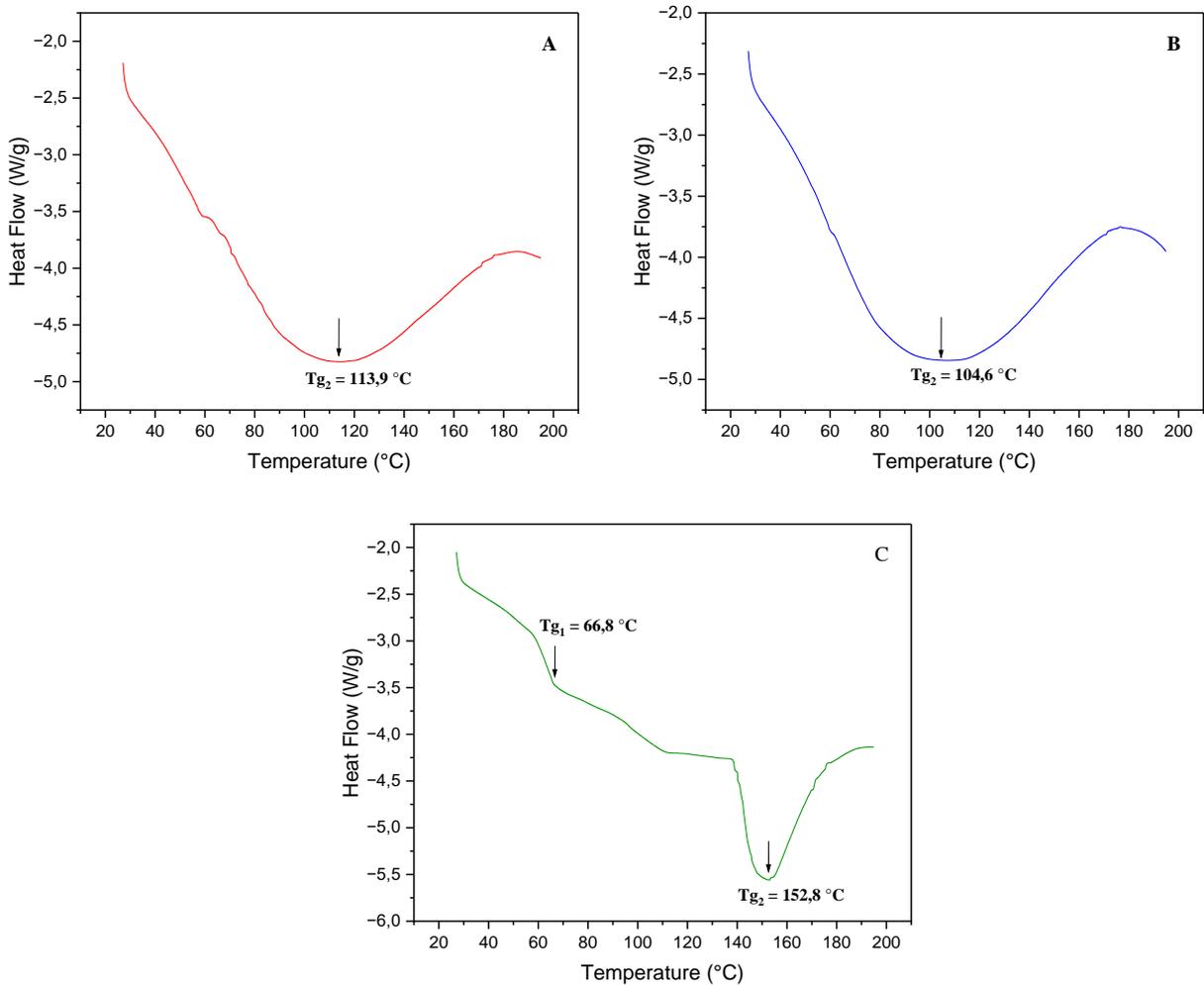
A influência do pH na temperatura de transição vítrea pode ser observada na Figura 4. O filme com o pH 7 apresenta um valor de T_{g2} maior que os outros dois filmes. Em um estudo com géis formados por PIS, onde os autores separaram as formulações em dois pHs 3,8 e 7,6, o gel com maior pH também apresentou uma T_g maior, corroborando com o resultado dessa pesquisa. Isso se deve devido ao fato de que em pHs mais baixos a distribuição de carga difere

daquela com pH 7,0 e aparentemente leva a diferenças na estrutura quaternária e estabilidade da proteína (Renkema, 2000).

Outra diferença que pode ser observada na Tabela 1 e na Figura 4 é que somente o pH 7,0 foi notado um valor de Tg_1 . Esse pico está relacionado com a desnaturação da β -conglucina (7S). É possível que os outros filmes não tenham apresentado esse pico pelo fato que eles estão mais próximos do ponto isoelétrico da proteína (pH 4,8) e essa desnaturação possa não ter ocorrido na temperatura prevista, uma vez que as proteínas são mais estáveis à desnaturação em seus pontos isoelétricos do que em qualquer outro pH (Fennema, Parkin, & Damodaran, 2010).

O valor da entalpia de desnaturação (ΔH_d) também foi afetado com a diferença de pH entre os filmes, diminuindo conforme o pH aumenta. Guo (2020), em um estudo sobre a estabilidade de agregados de proteína isolada de soja formados em diferentes valores de pH, também obteve valores mais baixos de ΔH nas amostras com pH 5,0 e 6,0 quando em comparação com as amostras de pH 7,0 e 8,0. A perda de ΔH geralmente está relacionada com uma alteração na conformação da proteína (por exemplo, desdobramento) e uma redução na estabilidade, o que vai de encontro com o resultado desse estudo, uma vez que os filmes com pH 7,0 se mostravam menos resistentes e estáveis.

Figura 4 - Termograma de DSC dos três filmes com PIS com pH 5,0 (A), pH 6,0 (B) e pH 7,0 (C). Na última imagem está representado os três termogramas juntos (D).



Fonte: Autoria própria.

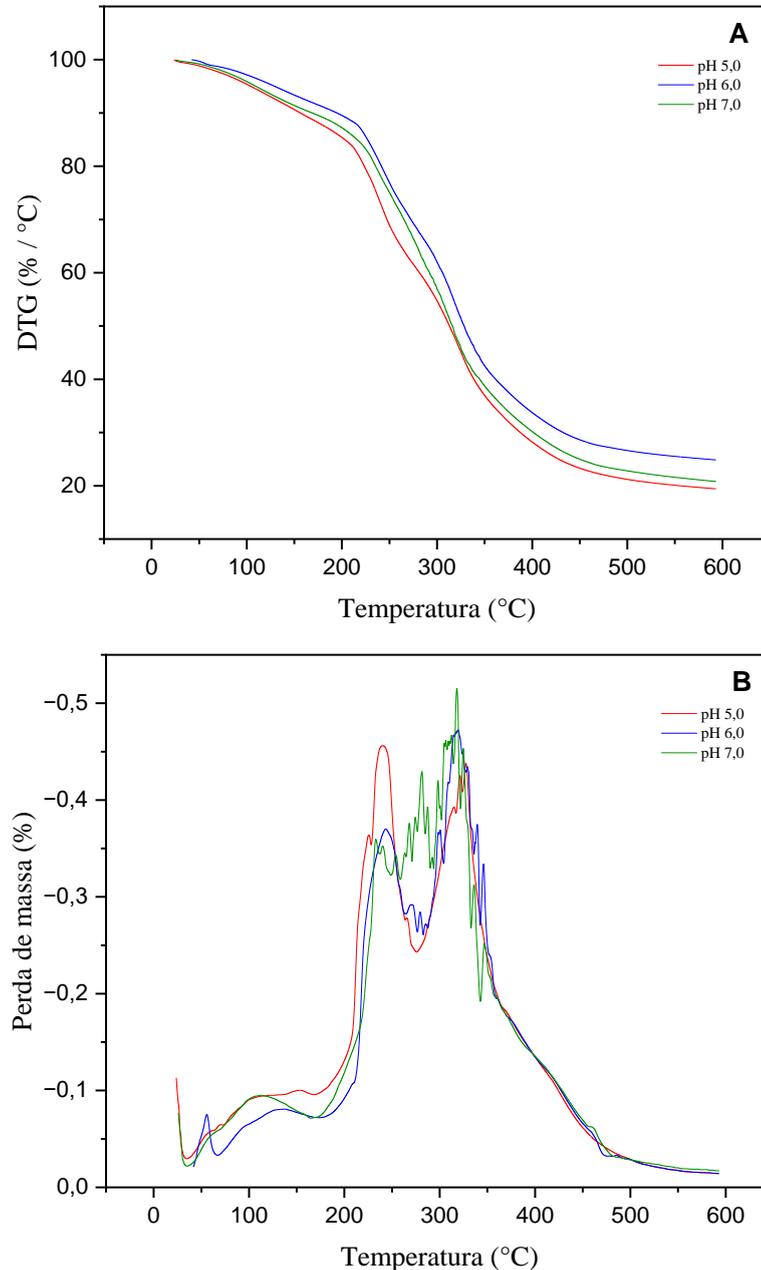
4.4. TERMOGRAVIMETRIA (TG)

A compreensão da degradação térmica de filmes poliméricos é essencial para determinar suas aplicabilidades. Isso se deve ao fato de que os biopolímeros frequentemente são expostos a temperaturas elevadas durante seu processamento.

Na análise termogravimétrica, o parâmetro mensurado é a variação de massa, representando o ganho ou perda de massa que ocorre na amostra em relação à temperatura ou ao tempo (Schmidt; Giacomelli; Soldi, 2005). O resultado da análise é comumente apresentado por meio de um gráfico de Termogravimetria (TG), em que o eixo X exibe os registros de temperatura, enquanto a ordenada representa o percentual de perda de massa. Calculando a derivada dessa curva TG, obtém-se a curva de Derivada Termogravimétrica (DTG). Essa curva

é usada para identificar a temperatura na qual a taxa de degradação é máxima, evidenciada pelos picos na curva de DTG (Schmidt; Giacomelli; Soldi, 2005).

Figura 5 - Curva de decomposição térmica. Termogramas (A) derivada da perda de peso (DTG), (B) perda de peso (TGA).



Fonte: Autoria própria.

A análise gráfica de Termogravimetria (TG) e curvas de Derivada Termogravimétrica (DTG) dos filmes à base de isolado proteico de soja estão ilustradas na Figura 5. Na imagem (A) podemos notar que a primeira degradação térmica, ocorrida na faixa de 25 a 218 °C. Guerrero *et al.*, (2011) e Su *et al.*, (2010) observaram que a perda de peso na primeira etapa está relacionada à perda de água dos filmes, por meio de quebras de ligações de hidrogênio

entre os grupamentos presentes. Neste estágio os filmes obtiveram uma perda de massa de aproximadamente 15% em todas as amostras.

A segunda degradação térmica, observada na faixa de 220 a 480 °C, está relacionada à degradação e alteração das cadeias poliméricas. De maneira geral, a segunda etapa, é atribuída à decomposição térmica dos componentes nos filmes analisados. Conforme estudos anteriores, a decomposição da proteína tem início por volta da temperatura de 225 °C (Muñoz *et al.*, 2012). Nesse estágio todas as amostras apresentaram uma perda significativa de massa sendo 78%, 76% e 72% para os filmes com pH 5,0, 6,0 e 7,0 respectivamente. Kumar *et al.*, (2010) também atribuíram a decomposição da proteína de soja e a perda de glicerol na faixa de 300 a 400 °C.

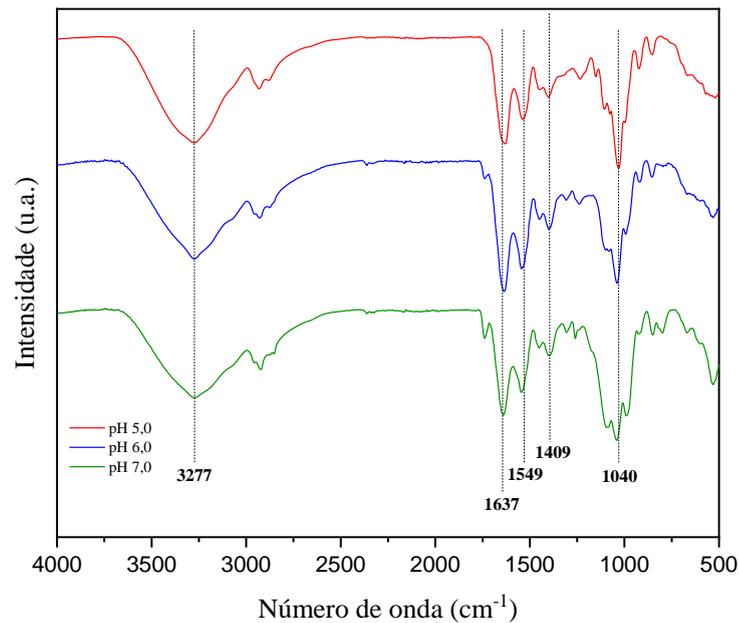
A temperatura máxima de 318° C foi encontrada no filme com o pH 7,0, no segundo estágio de degradação. Esse dado sugere que a estabilidade térmica desse filme é maior do que as outras, resultando em um eficaz atraso na perda de massa durante a decomposição térmica (Liu *et al.*, 2017).

4.5. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DE INFRAVERMELHO (FTIR)

A espectroscopia por FTIR fornece informação estrutural sobre a natureza e a conformação dos grupos funcionais presentes nos materiais lignocelulósicos. Isso é obtido por meio da correlação entre as bandas espectrais obtidas e as absorções específicas de cada grupo funcional presente no material (hidroxilas, cetonas, anéis aromáticos, alcenos, ésteres e álcoois (Rodríguez-Zúñiga *et al.*, 2014).

A figura 6 apresenta espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier dos três filmes com PIS. Na imagem é possível notar que os três filmes apresentaram curvas praticamente iguais, porém com intensidades diferentes. Uma banda ampla de estiramento N-H e estiramento O-H foi observada entre 3277 cm^{-1} nos três filmes. Essa banda foi atribuída à amida A dos filmes de proteína de soja (Xu *et al.*, 2015). O espectro de FTIR para a PIS também indica a presença de bandas vibracionais em 1637 cm^{-1} que correspondem ao alongamento da ligação C = O indicando a presença da amida I. Em 1549 cm^{-1} está relacionada a flexão N - H referente a amida II. Essas bandas são conhecidas por serem afetadas pela hidratação e pelas interações proteína-solvente (Wellner, Belton & Tatham, 1996). Outras bandas encontradas próximas a 1040 cm^{-1} e 1409 cm^{-1} estão relacionadas ao estiramento C – O e vibração de flexão do CH₂, respectivamente (Chen *et al.*, 2013).

Figura 6 - Espectros de FTIR dos três filmes.



Fonte: Autoria própria.

4.6. GRAU DE INTUMESCIMENTO E GRAU DE SOLUBILIDADE

A análise do grau de intumescimento e solubilidade em água são fatores cruciais a serem explorados ao lidar com filmes. Elas são usadas como indicadores determinantes para a escolha ideal de sua aplicação. Em pHs mais baixos, como 3 e 4, as globulinas (11S e 7S) são praticamente insolúveis, sendo o ponto máximo de solubilidade quando o pH se encontra próximo de 6,5 (Pearson, 1983).

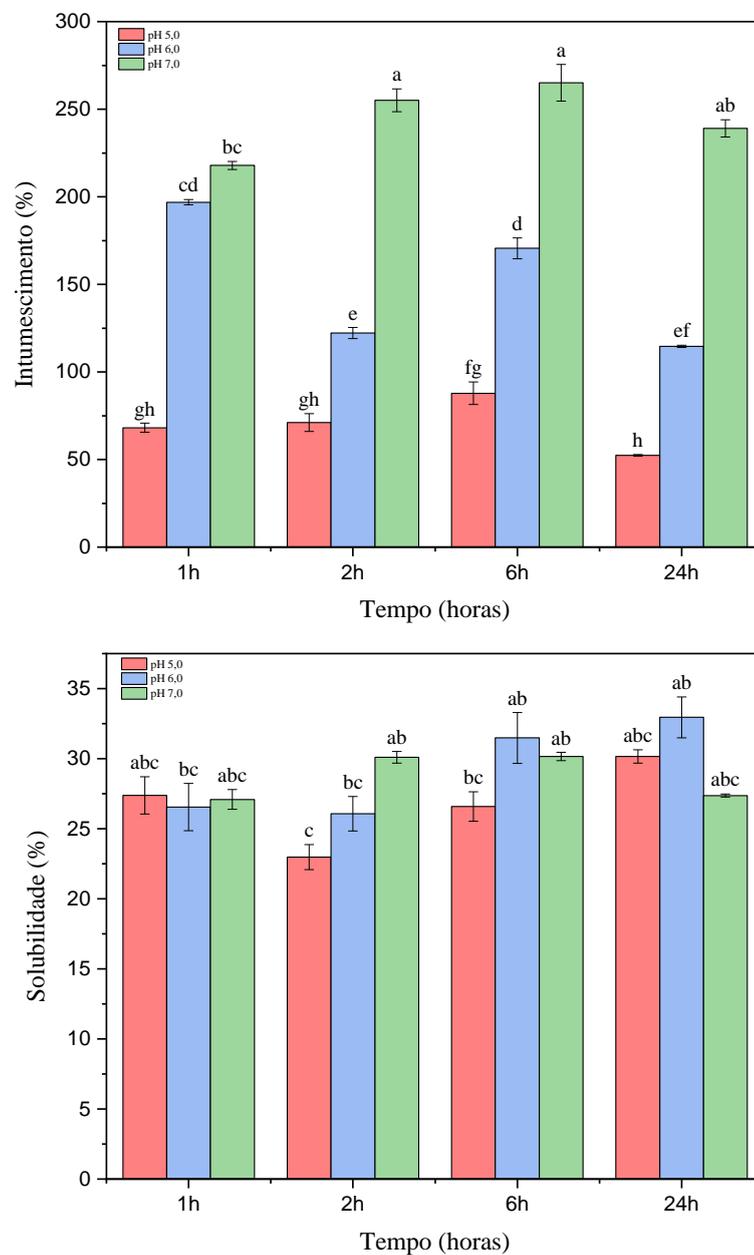
A solubilidade da PIS em meio aquoso depende do resultado do equilíbrio entre as interações proteína-proteína e proteína-solvente, e também por fatores como temperatura, pH e força iônica. Conforme proposto por Mohamed e Xu (2003) que estudaram a influência do pH nas propriedades térmicas e reológicas de blendas à base de PIS e amilopectina, a solubilidade da proteína em pHs alcalinos é significativamente maior do que em pH ácido. Porém, nesse estudo a diferença de solubilidade entre os filmes não possui diferença significativa, como é possível observar na Figura 7.

Já em relação ao grau de intumescimento os valores possuem diferença significativa entre si ($p < 0,05$) e foram maiores para o filme com pH 7,0, como pode ser observado na Figura 7. O grau de intumescimento é a medida da capacidade de absorver água de um polímero, podendo ser definido como a razão entre massa do filme intumescido e a massa do filme seco (Bortolin *et al.*, 2013). O intumescimento ocorre a partir do relaxamento das cadeias poliméricas que formam o polímero propiciando o acúmulo do meio no espaço não preenchido (Aouada,

2009). Os maiores valores de intumescimento foram encontrados para os três filmes após um período de 6 horas sendo $84,7 \pm 0,5$; $170,5 \pm 0,2$ e $239,0 \pm 2,0$ para os filmes com pH 5,0; 6,0 e 7,0 respectivamente. Esses valores podem estar relacionados com a porosidades dos filmes e ao fato da PIS ter o ponto isoelétrico próximo de pH 5,0.

No ponto isoelétrico a soma total das cargas elétricas é igual a zero e não há migração do composto quando colocado em campo elétrico. Nesse ponto, a solubilidade em água, a viscosidade e a capacidade de intumescimento das proteínas atingem o mínimo. Como o ponto isoelétrico da PIS é igual a 4,8 é possível que esse seja o motivo para o filme com pH 5,0 apresentar os menores resultados.

Figura 7 - As imagens apresentam os valores de intumescimento (A) e solubilidade (B) para os três filmes.



*Tratamentos seguidos pela mesma letra, não diferem significativamente a 5 % pelo teste de Tukey. **Fonte:** Autoria própria.

4.7. PERMEABILIDADE DO VAPOR DE ÁGUA

A permeabilidade do vapor de água dos filmes depende de fatores como solubilidade e difusão das moléculas na matriz do filme, os quais, por sua vez, dependem das condições de umidade relativa do ambiente em que os filmes interagem.

Tabela 2 - Valores médios da análise de permeabilidade ao vapor de água dos três filmes.

Formulação	PVA (g.mm/h.m ² . KPa)
pH 5,0	0,6585 ± 0,05 ^a
pH 6,0	0,5144 ± 0,09 ^a
pH 7,0	0,4635 ± 0,02 ^a

*Tratamentos seguidos pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente a 5 % pelo teste de Tukey. **Fonte:** Autoria própria.

A tabela 3 expõem os resultados da PVA para os três filmes, e foi possível analisar que conforme o pH aumenta, a PVA diminui.

A interação entre o pH e os filmes de PIS mostrou que o pH 7,0 favoreceu a redução da PVA, possivelmente devido ao distanciamento do ponto isoelétrico da proteína e, sendo assim, reduzindo a taxa de difusão de água dentro do filme (Swain, 2004).

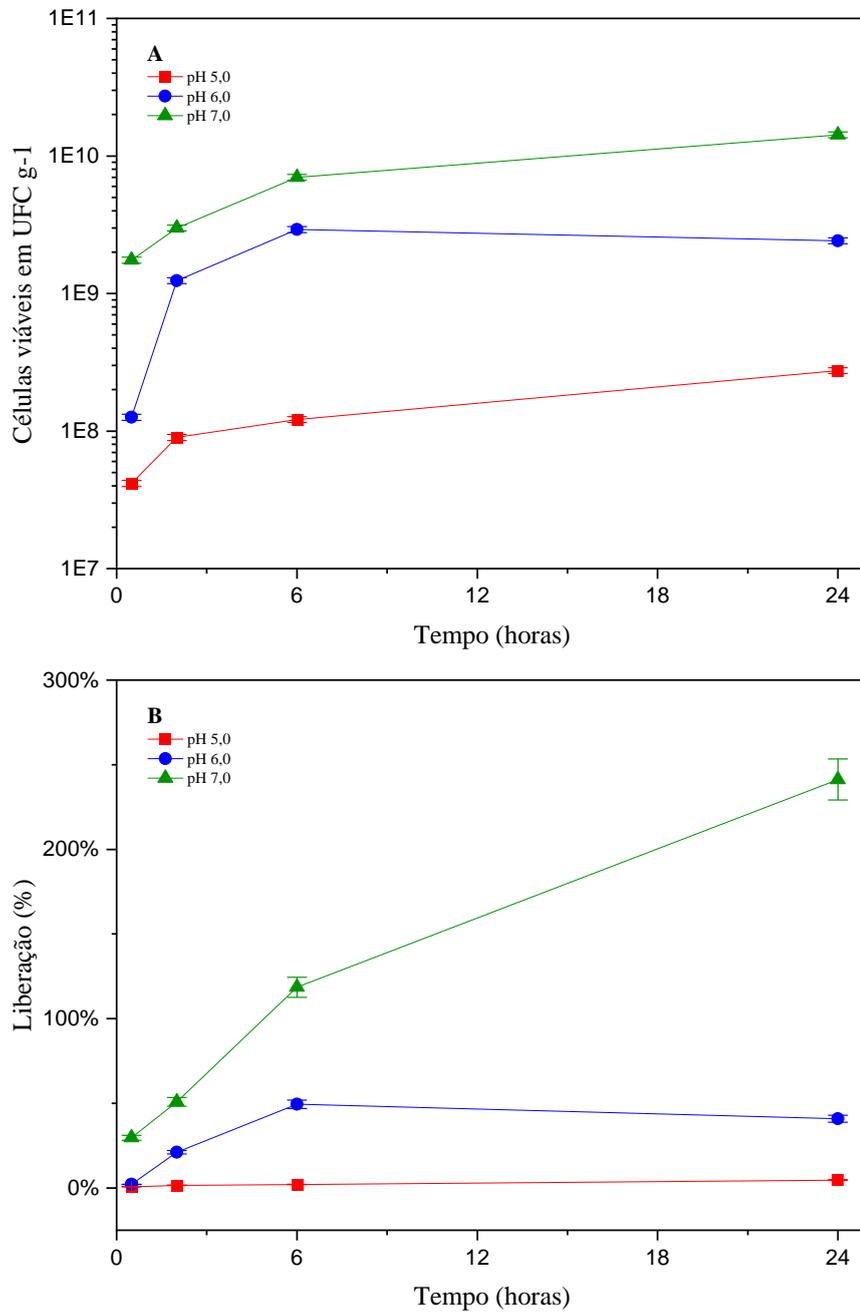
4.8. PERFIL DE LIBERAÇÃO DO MICRORGANISMO

O perfil de liberação de todos os materiais foi obtido colocando uma massa conhecida dos mesmos em 5 ml de solução salina 0.85%, e agitados 150 rpm, 25 °C. Logo após, foi realizada a diluição seriada e o plaqueamento para a contagem de UFC/g conforme a equação 5. A Figura 8 (A e B) demonstra que o filme com pH 7,0 apresentou uma liberação mais rápido do que os outros filmes, principalmente de 6h a 24h.

Essa formulação passou de 119% para 241%, em 6 horas. Essa porcentagem aumentou significativamente em comparação as outras formulações, que apresentaram um comportamento diferente. Os filmes com o pH 7,0 apresentaram maior porosidade no MEV e também um maior grau de intumescimento.

Ademais, o filme com pH 7,0, após 6h de liberação apresentou uma taxa maior que 100%, o que significa provavelmente, que a bactéria estaria se replicando e aumentando o número de células viáveis. Essa reprodução demonstra que o substrato do filme é capaz de suprir as necessidades que os microrganismos encontram para se multiplicar.

Figura 8 - Perfil de liberação dos três filmes. (A) Células viáveis em UFC g⁻¹. (B) liberação relativa aos valores de viabilidade no encapsulamento.



Fonte: Autoria própria.

4.9. VIABILIDADE ACELERADA

Considerando que os filmes foram satisfatoriamente formados, com suas diferentes características, o próximo passo foi avaliar se o encapsulamento da bactéria foi eficiente durante o processo, e se a viabilidade pode ser mantida nas condições utilizadas. A Tabela 4 mostra os

resultados de viabilidade de *B. megaterium B119* no encapsulamento. Os dados foram obtidos seguindo a equação (5).

Tabela 3 - Resultados da primeira e última semana da viabilidade acelerada expressos em UFC g⁻¹

Temperatura	Formulação	0 dias (UFC g ⁻¹)	28 dias (UFC g ⁻¹)
15°C	pH 5,0	1,1 * 10 ⁸	3,1 * 10 ⁶
	pH 6,0	1,5 * 10 ⁹	1,1 * 10 ⁷
	pH 7,0	3,6 * 10 ⁹	2,3 * 10 ⁷
30°C	pH 5,0	1,1 * 10 ⁸	1,6 * 10 ⁷
	pH 6,0	1,5 * 10 ⁹	2,1 * 10 ⁷
	pH 7,0	3,6 * 10 ⁹	3,6 * 10 ⁷
45°C	pH 5,0	1,1 * 10 ⁸	2,2 * 10 ⁵
	pH 6,0	1,5 * 10 ⁹	2,2 * 10 ⁵
	pH 7,0	3,6 * 10 ⁹	6,0 * 10 ⁵

Fonte: Autoria própria.

Analisando a tabela 4 é possível notar que o filme com pH 5,0 foi o que obteve os melhores resultados em relação a manutenção de sua viabilidade durante o armazenamento, pois em algumas temperaturas ele reduziu somente 3 ordens de grandeza, sendo o maior o valor o de 1,6 * 10⁷ UFC g⁻¹ após 28 dias mantido a 30°C.

Porém é essencial executar um novo estudo de viabilidade para avaliar o número de microrganismos presentes no material após seis meses de armazenamento, especialmente considerando que o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) exige uma concentração mínima de 10⁹ células viáveis por grama ou mL do produto até a data de validade de seis meses (Hungria e Nogueira, 2020). Também foram analisados o tempo de viabilidade dos filmes, seguindo a equação (6). Esses dados podem ser visualizados na Tabela 5.

Tabela 4 - Tempo de viabilidade dos filmes

Temperatura	Formulação	<i>t</i> (dias) até acabar o inóculo	<i>t</i> (dias) até reduzir duas ordens de grandeza
15°C	pH 5,0	210,5	53,3
	pH 6,0	130,1	30,8
	pH 7,0	117,6	31,5
30°C	pH 5,0	152,2	38,5
	pH 6,0	96,7	22,9
	pH 7,0	89,9	24,1
45°C	pH 5,0	113,4	28,7
	pH 6,0	74,0	17,5
	pH 7,0	70,5	18,9

Fonte: Autoria própria.

Como pode ser observado na Tabela 5, o filme com o pH 5,0 possui um tempo de viabilidade maior, quando analisado a liberação até a morte do último inóculo. Isso provavelmente ocorre porque sua liberação acontece de forma mais lenta e os filmes com esse pH são mais homogêneos e com um menor intumescimento, como foi possível observar em testes anteriores.

O filme com o pH 5,0 também possui o melhor resultado quando analisado o tempo que se leva para reduzir duas ordens de grandeza, o que pode se estar relacionado com o fato desses filmes contarem com uma maior quantidade de microrganismos (observados nas imagens do MEV).

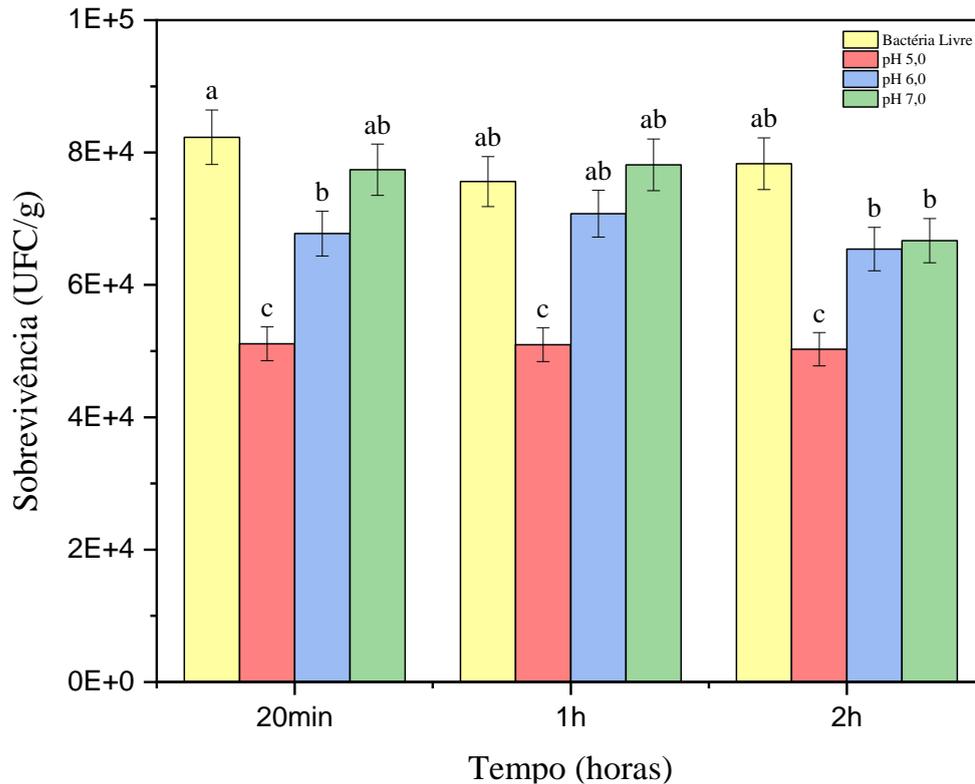
4.10. VIABILIDADE FRENTE A ESTRESSE U.V.

Além da análise da viabilidade celular pós-processo de encapsulamento e da investigação dos perfis de liberação, juntamente com sua relação com as taxas de inchamento, é crucial avaliar se as formulações podem conferir proteção à bactéria diante das condições de estresse pertinentes à fase de aplicação no campo. O encapsulamento deve ser capaz de separar as células do ambiente que as rodeiam, assim protegendo-as de fatores externos (Yao *et al.*, 2020) como exposição à radiação UV.

Com o intuito de proteger as células contra os raios UV, além do encapsulamento, é dada uma atenção especial às matrizes empregadas no processo. Relatos indicam que materiais capazes de absorver luz UV são mais eficazes na preservação da viabilidade dos microrganismos diante desse estresse. Porém é importante assegurar que tais materiais não causem danos ao crescimento microbiano, que sejam estáveis em condições de campo e que não sejam de alto custo (Griego; Spence, 1978; Zhou *et al.*, 2018; Zogo *et al.*, 2019).

A Figura 9 mostra os resultados de sobrevivência das células frente a radiação UV foram significativamente diferentes. Os valores foram inferiores para o filme com pH 5,0 e pH. Porém o valor da sobrevivência do filme com pH 6,0 e pH 7,0 foram maiores e próximos dos valores obtidos para o microrganismo livre. Fato esse que pode estar relacionado com a coloração mais escura desses filmes.

Figura 9 - Sobrevivência em UFC/g das células frente a exposição a luz UV durante três tempos diferentes.



Fonte: Autoria própria.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na pesquisa sobre filmes à base de Proteína Isolada de Soja (PIS) revelam que a variação de pH durante a produção influencia significativamente as propriedades dos filmes. Visualmente, a mudança de pH afeta a cor dos filmes, tornando-os mais escuros com o aumento do pH. A análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostra diferenças na estrutura superficial dos filmes, com filmes de pH mais ácidos apresentando maior homogeneidade.

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) revela que a temperatura de transição vítrea (T_g) e a entalpia de desnaturação (ΔH_d) dos filmes diminuem à medida que o pH aumenta, indicando alterações na estrutura das proteínas. A solubilidade dos filmes não é afetada pelo pH. O grau de intumescimento e a permeabilidade ao vapor de água também variam com o pH, com filmes de pH mais alto apresentando maior intumescimento e menor permeabilidade.

A liberação controlada de *B. megaterium* B119 a partir dos filmes mostra uma correlação com as características dos filmes, sendo o filme de pH 7,0 mais eficiente na liberação. A viabilidade acelerada demonstra que o filme de pH 5,0 mantém a viabilidade por

um período mais longo em diferentes temperaturas. Além disso, os filmes com pH 6,0 e pH 7,0 mostram capacidade de proteção contra a radiação UV, com o filme de pH 7,0 apresentando melhor sobrevivência das células frente a esse estresse.

Em conclusão, os resultados indicam que o pH influencia diversas propriedades dos filmes à base de PIS, e o filme com pH 5,0 se destaca em termos de liberação controlada, viabilidade e resistência a estresses ambientais, sugerindo seu potencial aplicativo em diversas áreas, como embalagens e liberação controlada de microrganismos.

Mesmo com as dificuldades encontradas durante a produção do filme, sendo necessário a realização de diversos testes até que se chegasse na formulação ideal, podemos concluir que, com base na experiência adquirida ao longo do trabalho, que os filmes a base de Proteína Isolada de Soja são eficientes para o encapsulamento de microrganismo.

Os próximos passos serão realizar o recobrimento de sementes com as formulações e estudar os possíveis efeitos na germinação.

6. REFERÊNCIAS

AGROECOLOGIA. **Agricultura Familiar, Agroecologia e Mercado**. Fortaleza - CE: n. 6,2010. Disponível em: <<http://www.agrisustentavel.com/doc/ebooks/pragas.pdf>>. Acesso em:10 ago. 2023.

AOUADA, F.A.; MUNIZ, E.C. VAZ, C.M.P & MATTOSO, L.H.C. Correlação Ente Parâmetros da Cinética de Intumescimento com Características Estruturais e Hidrofílicas de Hidrogéis de Poliacrilamida e Metilcelulose. **Química Nova** [ONLINE]. v.32, n.6, p.1482-1490, 04 ago. 2009.

ASTM International, 2001. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. D882-01, in: Annual Book of ASTM Standards. **American Society for Testing and Materials**, Filadélfia, pp. 162–170.

BASHAN, Y. et al. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). **Plant and Soil**, v. 378, n. 1–2, p. 1–33, 2014.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. AzoPISrillum -plant relationshPIS: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 521–577, 1 ago. 2004.

BARRADA, A. et al. Drench Application of Soy Protein Hydrolysates Increases Tomato Plant Fitness, Fruit Yield, and Resistance to a Hemibiotrophic Pathogen. **Agronomy**, v. 12, n. 8, p. 1761, 27 jul. 2022.

BATISTA, B. D.; SINGH, B. K. Realities and hopes in the application of microbial tools in agriculture. **Microbial Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 1258–1268, 1 jul. 2021.

BEMILLER, J. N. WHISTLER RL. Carbohydrates. **Food chemistry**. New York, NY, USA: Marcel Dekker, Inc, p. 157-225, 1996.

BIGI, A. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. **Biomaterials**, v. 25, n. 25, p. 5675–5680, nov. 2004.

BORTOLIN, A. et al. Nanocomposite PAAm/methyl cellulose/montmorillonite hydrogel: Evidence of synergistic effects for the slow release of fertilizers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 31, p. 7431–7439, 2013.

CARPINÉ, D. et al. Desenvolvimento E Caracterização De Biofilme Emulsionado Produzido A Partir De Proteína Isolada De Soja E Gordura De Coco. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**. Anais...2015. Disponível em: <<https://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/desenvolvimento-e-caracterizacao-de-biofilme-emulsionado-produzido-a-partir-de-protena-isolada-de-soja-e-gordura-de-coco-1709>>. Acesso em: 24 ago. 2023.

CHEN, J. et al. Determination of the domain structure of the 7S and 11S globulins from soy proteins by XRD and FTIR. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 7, p. 1687–1691, maio 2013.

CHOOSUK, N. et al. Kinetic Modeling of Quality Changes and Shelf Life Prediction of Dried Coconut ChPIS. **Processes**, v. 10, n. 7, p. 1392, 17 jul. 2022.

CHUA, J. Y.; LIU, S. Soy whey: More than just wastewater from tofu and soy protein isolate industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 91, p. 24-32, 2019.

COLLA, G. et al. Biostimulant Action of Protein Hydrolysates: Unraveling Their Effects on Plant Physiology and Microbiome. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 2202, 22 dez. 2017.

CORRÊA, Daiane. Biofertilizantes no desenvolvimento de plantas de pimenta malagueta. **Revista Agronomia Brasileira**, Mato Grosso, ed. 4, ano 2020, Anual. Disponível em: <https://www.fcav.unesp.br/Home/ensino/departamentos/cienciasdaproducaoagricola/laboratorioidematologia-labmato/revistaagronomiabrasileira/rab202027.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2023.

DANGARAN, K.; TOMASULA, P. M.; QI, P. Structure and function of protein-based edible films and coatings. EMUSCADO, I. M.; HUBER, K. C. **Edible film and coatings for food applications**. New York: Springer, 2009. p. 25-56.

EL-HAWARY, M. I. et al. Effect of Application of Biofertilizer on the Yield and NPK Uptake of Some Wheat Genotypes as Affected by the Biological Properties of Soil. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 11, p. 1181–1185, 15 out. 2002.

FASUSI, O. A.; CRUZ, C.; BABALOLA, O. O. Agricultural sustainability: Microbial biofertilizers in rhizosphere management. *Agriculture (Switzerland)*, v. 11, n. 2, p. 1–19, 2021.

FENNEMA, O. R., Parkin, K. L., & Damodaran, S. (2010). **Química de Alimentos de Fennema**. (4a ed.) Porto Alegre: Artmed.

FERRON, L. et al. Development of an Accelerated Stability Model to Estimate Purple Corn Cob Extract Powder (Moradyn) Shelf-Life. **Foods**, v. 10, n. 7, p. 1617, 13 jul. 2021.

GONTARD, N., GUILBERT, S., CUQ, J.-L., Edible Wheat Gluten Films: Influence of the Main Process Variables on Film Properties using Response Surface Methodology. **J Food Sci** 191–199, 1992.

GUO, F. et al. Storage stability of soy protein isolate powders containing soluble protein aggregates formed at varying pH. **Food Science & Nutrition**, v. 8, n. 10, p. 5275–5283, out. 2020.

GUERRERO, P.; GARRIDO, T.; LECETA, I.; De La CABA, K. Films based on proteins and polysaccharides: Preparation and physical–chemical characterization. **European Polymer Journal**, 2013.

GRIEGO, V. M.; SPENCE, K. D. Inactivation of *Bacillus thuringiensis* spores by ultraviolet and visible light. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 35, n. 5, p.906, 1978.

Hungria, M., Nogueira, M.A. **Fixação biológica de nitrogênio**, in: Seixas, C.D.S., Neumaier, N., Junior, A.A.B., Krzyzanowski, F.C., Leite, R.M.V.B.C. (Eds.), *Tecnologias de Produção de Soja*. Embrapa Soja, Londrina, PR, pp. 185–195, 2020.

JOHN, R. P. et al. Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 31, n. 3, p. 211–226, 2011.

JAWERTH, M. E. et al. Mechanical and Morphological Properties of Lignin-Based Thermosets. **ACS Applied Polymer Materials**, v. 2, n. 2, p. 668–676, 14 fev. 2020.

KEERATI-U-RAI, M.; CARREDIG, M.; Effect of dynamic high-pressure homogenization on the aggregation state of soy protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2009.

KITABATAKE, N.; TAHARA, M.; DOI, E. Denaturation temperature of soy protein under low moisture conditions. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, p. 1201-1202, 1989.

KROCHTA, J. M. Film, Edible. In: YAM, K. L. (Ed.). *The Wiley Encyclopedia of Packaging*, 3a ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2009.

KUMAR, R. et al. Adhesives and plastics based on soy protein products. **Industrial Crops and Products**, v. 16, n. 3, p. 155–172, nov. 2002.

KUMAR, V. et al. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 945–959, jun. 2010.

KOUR, D. et al. Microbial biofertilizers: Bioresources and eco-friendly technologies for agricultural and environmental sustainability. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, n. December 2019, 2020.

LAPICCIRELLA, J. Do N.; CARNEIRO JR, D. C. F.; ROCHA, C. H. ARAUJO, I. S. A. MATOSO, A de O. O uso de Biofertilizantes na Agricultura Orgânica. In: *Anais...*, 2º **Congresso Online Internacional de Sementes Crioulas e Agrobiodiversidade**, Dourados, de 01 a 04 de dezembro de 2021, 2022.

LIU, X. et al. Development of Eco-friendly Soy Protein Isolate Films with High Mechanical Properties through HNTs, PVA, and PTGE Synergism Effect. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 44289, 10 mar. 2017.

LODHA, P.; NETRAVALI, A. N. Thermal and mechanical properties of environment-friendly ‘green’ plastics from stearic acid modified-soy protein isolate. **Industrial Crops and Products**, v. 21, n. 1, p. 49–64, Jan. 2005.

MA, Q. et al. Characterization of antioxidant properties of soy bean protein-based films with Cortex Phellodendri extract in extending the shelf life of lipid. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 22, p. 100413, dez. 2019.

MACIK, M.; GRYTA, A.; FRĄC, M. Biofertilizers in agriculture: An overview on concepts, strategies and effects on soil microorganisms. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 162, p. 31-87, 2020.

MAURI, A. N.; AÑÓN, M. C. Effect of solution pH on solubility and some structural properties of soybean protein isolate films. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 7, p. 1064–1072, maio 2006.

MAHANTY, T. et al. Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 4, p. 3315– 3335, 2017.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Legislações — Português (Brasil). Acesso em: 10 ago. 2023.

MOHAMED, A.; XU, J. Effect of ionic strength and pH on the thermal and rheological properties of soy protein–amylopectin blend. **Food Chemistry**, v. 83, n. 2, p. 227–236, nov. 2003.

MOHANAN, A.; NICKERSON, M. T.; GHOSH, S. Oxidative stability of flaxseed oil: Effect of hydrophilic, hydrophobic and intermediate polarity antioxidants. **Food Chemistry**, v. 266, p. 524–533, nov. 2018.

MUÑOZ, L. A. et al. Characterization and microstructure of films made from mucilage of *Salvia hispanica* and whey protein concentrate. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 3, p. 511–518, ago. 2012.

OLIVEIRA, J. L. et al. **Encapsulation Strategies for *Bacillus thuringiensis*: From Now to the Future**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 69, n. 16, p. 4564– 4577, 2021.

OLIVEIRA, M. M. G. D. **Filmes de proteína de soja e carboximetilcelulose e aplicação como cobertura comestível em secagem intermitente de mamão**. 2019. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto., São José do Rio Preto, 2019.

OTONI, C. G. et al. **Recent Advances on Edible Films Based on Fruits and Vegetables—A Review**. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 16, n. 5, p. 1151–1169, 2017.

Pearson, A. M. Soy proteins. **In *Developments in Food Proteins***, ed. B. J. F. Hudson. Applied Science Publishers, London, p. 67-108, 1983.

QIN, Z. et al. Preparation and Characterization of Soy Protein Isolate-Based Nanocomposite Films with Cellulose Nanofibers and Nano-Silica via Silane Grafting. **Polymers**, v. 11, n. 11, p. 1835, 7 nov. 2019.

RODRÍGUEZ-ZÚÑIGA, U. F. et al. **Use of Spectroscopic and Imaging Techniques to Evaluate Pretreated Sugarcane Bagasse as a Substrate for Cellulase Production Under Solid-State Fermentation.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 172, n. 5, p. 2348–2362, 1 mar. 2014.

SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. **Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture.** *AMB Express*, v. 9, n. 1, 2019.

SAHU, P. K.; BRAHMAPRAKASH, G. P. **Formulations of biofertilizers - Approaches and advances.** In: *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity: Vol. 2: Functional Applications.* [s.l.] Springer India, p. 179–198, 2016.

SCHMIDT, V.; GIACOMELLI, C.; SOLDI, V. Thermal stability of films formed by soy protein isolate–sodium dodecyl sulfate. **Polymer Degradation and Stability**, v. 87, n. 1, p. 25–31, jan. 2005.

SILVA, J. B. G. et al. **Avaliação da condutividade elétrica e ph da solução do solo em uma área fertirrigada com água residuária de bovinocultura de leite.** *Irriga*, v. 1, n. 01, p. 250, 29 maio 2012.

SINGH, P. et al. **Unlocking the strength of plant growth promoting Pseudomonas in improving crop productivity in normal and challenging environments: a review.** *Journal of Plant Interactions*, v. 17, n. 1, p. 220–238, 31 dez. 2022.

SOUMARE, A. et al. From Isolation of Phosphate Solubilizing Microbes to Their Formulation and Use as Biofertilizers: Status and Needs. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 7, p. 425, 9 jan. 2020.

STUDENTNUMBER, Floris van Eerden. **Differential Scanning Calorimetry and Protein Stability.** Groningen. 2009.

SU, J. et al. High-internal-phase emulsions (HIPEs) for co-encapsulation of probiotics and curcumin: enhanced survivability and controlled release. **Food & Function**, v. 12, n. 1, p. 70–82, 2021.

SWAIN, S. N. et al. Biodegradable Soy-Based Plastics: Opportunities and Challenges. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 12, n. 1, p. 35–42, jan. 2004.

THARANATHAN, R. N. **Biodegradable films and composite coatings: past, present and future.** *Trends in Food Science & Technology*, v. 14, n. 3, p. 71–78, 2003.

TURBIANI, F. R. B. **Desenvolvimento e caracterização de filmes ativos de alginato de sodio reticulados com benzoato de calcio.** [s.l.] [s.n.], 2007. Disponível em: <<http://repositorio.unicamp.br/Acervo/Detail/428963>>. Acesso em: 24 ago. 2023.

WELLNER, N.; BELTON, P. S.; TATHAM, A. S. Fourier transform IR spectroscopic study of hydration-induced structure changes in the solid state of ω -gliadins. **Biochemical Journal**, v. 319, n. 3, p. 741–747, 1 nov. 1996.

XU, F. et al. Preparation of cross-linked soy protein isolate-based environmentally-friendly films enhanced by PTGE and PAM. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 373–380, maio 2015.

YAO, M. et al. Progress in microencapsulation of probiotics: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 2, p. 857–874, mar. 2020.

ZADEH, E. M.; O'KEEFE, S. F.; KIM, Y.-T. **Utilization of Lignin in Biopolymeric Packaging Films**. ACS Omega, v. 3, n. 7, p. 7388–7398, 31 jul. 2018.

ZHOU, X. Thermokinetics study of degradation process of soybean-based polyurethane foams. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 136, n. 16, 20 abr. 2019.

ZOGO, B. et al. Impact of sunlight exposure on the residual efficacy of biolarvicides *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus* against the main malária vector, *Anopheles gambiae*. **Malaria Journal**, v. 18, n. 1, p. 1–9, 26 fev. 2019.