

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA - PPGEQ

ALINE MEDEIRO FERREIRA

**FILMES POLIMÉRICOS A BASE DE CARBOXIMETIL CELULOSE  
REFORÇADOS COM NANOCELULOSE COM POTENCIAL PARA  
ENCAPSULAR O AGENTE DE BIOCONTROLE *Trichoderma harzianum***

São Carlos

2024

ALINE MEDEIRO FERREIRA

**FILMES POLIMÉRICOS A BASE DE CARBOXIMETIL CELULOSE  
REFORÇADOS COM NANOCELULOSE COM POTENCIAL PARA  
ENCAPSULAR O AGENTE DE BIOCONTROLE *Trichoderma harzianum***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, Campus São Carlos – SP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química.

**Orientadora:** Dra. Cristiane Sanchez Farinas (Embrapa Instrumentação / PPGEQ-UFSCar)

São Carlos

2024



## UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

---

### Folha de Aprovação

---

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Aline Medeiro Ferreira, realizada em 28/02/2024.

#### Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas (EMBRAPA)

Prof. Dr. Cauê Ribeiro de Oliveira (EMBRAPA)

Profa. Dra. Audirene Amorim Santana Paixão (UFMA)

*Dedico este trabalho a Deus e toda a  
minha família, em especial a minha  
eterna tia Maria Raimunda Medeiros  
Aguiar, que sempre acreditou no poder  
transformador da educação.*

*“Deleita-te também no Senhor e Ele te concederá o que deseja o teu coração. Entrega teu caminho ao Senhor; confia nele e Ele tudo fará.” Salmos 37. 4-5.*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pelo dom da vida, pelo Seu infinito amor e por ser minha fortaleza e consolo em todos os momentos.

Aos meus tios e segundos pais, Abmael Aguiar e a eterna Maria Raimunda, minha gratidão por acreditarem em mim e me proporcionarem o apoio necessário para alcançar meus objetivos. Serei eternamente grata por tudo.

À toda a minha família, especialmente a minha mãezinha, Maria do Socorro, pelo apoio incondicional, amor e sacrifícios para me proporcionar tudo o que precisei. Você é a razão que me faz acordar todos os dias e ir atrás dos meus sonhos. Te amo!

Aos meus amigos Paulo e Nilton que me trouxeram para viver esse desafio que é fazer mestrado em outra cidade. Obrigada por serem minha família longe de casa, pelo apoio, amizade e por todos os momentos divertidos que compartilhamos.

À Sirlan, minha amiga de longa data, por estar sempre presente em minha vida mesmo com a distância. Obrigada pelas conversas, risadas, conselhos e por sempre me incentivar/motivar e dizer que eu iria conseguir. Sou grata pela nossa amizade.

Ao meu namorado, Simon Kanematsu pelo amor, cuidado, carinho e companheirismo em todos os momentos. Você me faz tão bem. Te amo!

À Ludimila Lodi, pela disponibilidade em me ajudar sempre que precisava, você nunca mediu esforços. Sou muito grata, Luds!

À minha orientadora, Prof. Dra. Cristiane Sanchez Farinas, pelo apoio, orientação e por me receber tão bem em seu grupo de pesquisa. Sua compreensão e incentivo foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

À Mariana Brondi, pela paciência e disponibilidade em esclarecer minhas dúvidas e por ser uma verdadeira inspiração para mim no âmbito acadêmico.

Ao grupo de pesquisa Agronergia da Embrapa, em especial a Camila, Bianca, Vanessa Graciano, Vanessa Molina e o Roger. Obrigada pela ajuda, pelas risadas e por terem me recebido tão bem no grupo.

À Embrapa Instrumentação pela infraestrutura e toda sua equipe de técnicos, pelo suporte nos laboratórios e experimentos.

Ao PPGEQ/UFSCar, CNPq e a CAPES pela oportunidade e suporte financeiro disponibilizado para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A utilização de microrganismos para o biocontrole de pragas e doenças em plantas representa uma alternativa ambientalmente mais favorável aos agroquímicos, podendo contribuir para o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável. Dentre os microrganismos comercializados como biodefensivos, destaca-se o fungo *Trichoderma harzianum* (*T. harzianum*) devido aos diversos mecanismos de ação que emprega contra patógenos. Entretanto, a viabilidade dos inoculantes microbianos ainda precisa ser melhorada para garantir melhor eficiência em campo e um maior tempo de prateleira. Nesse sentido, formulações para encapsulamento microbiano tem se mostrado como uma estratégia promissora para melhorar as propriedades destes bioprodutos. Entre os polímeros com potencial para encapsulamento microbiano, a carboximetil celulose (CMC) se destaca devido à sua origem derivada da celulose, o polímero natural mais abundante na natureza. Porém, considerando suas limitações mecânicas, tem-se estudado a incorporação de nanocristais de celulose (NCC) como agentes de reforço. Assim, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de matrizes poliméricas a base de CMC de baixa e média viscosidade reforçadas com NCC para o encapsulamento do *T. harzianum* visando a aplicação como revestimento de grânulos fertilizantes. Os filmes foram produzidos pelo método de casting, caracterizados em relação às propriedades físico-química e morfológicas, antes e após a adição do microrganismo. Além disso, foram realizados ensaios com o microrganismo encapsulado de crescimento em placa, liberação dos esporos em solução salina e viabilidade no armazenamento no período de 3 meses. Os resultados obtidos indicam que as matrizes à base de 1,5% de carboximetil celulose (média viscosidade) (CMC<sub>média</sub>) e do nanocompósito com 1,5% CMC<sub>média</sub> e 0,25% NCC, apresentaram melhores resultados quanto à uniformidade superficial, resistência mecânica, perfis de solubilidade mais lento em água, menor grau de intumescimento liberação mais lenta do microrganismo da matriz e viabilidade ao longo do tempo. O uso das matrizes no revestimento de grânulos de fertilizante MAP não interferiu no crescimento do *T. harzianum*. Esses resultados ressaltam a eficiência das formulações propostas como uma estratégia potencial para o revestimento de grânulos de fertilizantes e veiculação de microrganismos.

**Palavras-chave:** Inoculante microbiano, encapsulamento, biocontrole, *Trichoderma harzianum*, nanocelulose, carboximetil celulose.

## ABSTRACT

The use of microorganisms for pest and disease biocontrol in plants represents an environmentally friendlier alternative to agrochemicals, potentially contributing to the development of more sustainable agriculture. Among the microorganisms marketed as biopesticides, the fungus *Trichoderma harzianum* (*T. harzianum*) stands out due to its various mechanisms of action against pathogens. However, the viability of microbial inoculants still needs to be improved to ensure better field efficiency and longer shelf life. In this regard, formulations for microbial encapsulation have emerged as a promising strategy to enhance the properties of these bioproducts. Among the polymers with potential for microbial encapsulation, carboxymethyl cellulose (CMC) stands out due to its origin derived from cellulose, the most abundant natural polymer in nature. However, considering its mechanical limitations, the incorporation of cellulose nanocrystals (CNC) as reinforcing agents has been studied. Thus, the present study aimed to develop polymeric matrices based on low and medium viscosity CMC reinforced with CNC for the encapsulation of *T. harzianum* aiming at application as a coating for fertilizer granules. The films were produced by the casting method, characterized regarding their physicochemical and morphological properties, before and after the addition of the microorganism. In addition, assays were performed with the encapsulated microorganism for plate growth, spore release in saline solution, and viability during a 3-month storage period. The results obtained indicate that matrices based on 1.5% carboxymethyl cellulose (medium viscosity) (CMC<sub>medium</sub>) and the nanocomposite with 1.5% CMC<sub>medium</sub> and 0.25% CNC showed better results in terms of surface uniformity, mechanical resistance, slower solubility profiles in water, lower degree of swelling, slower release of the microorganism from the matrix, and viability over time. The use of these matrices in coating MAP fertilizer granules did not interfere with the growth of *T. harzianum*. These results highlight the efficiency of the proposed formulations as a potential strategy for coating fertilizer granules and delivering microorganisms.

**Keywords:** Microbial inoculant, encapsulation, biocontrol, *Trichoderma harzianum*, nanocellulose, carboxymethyl cellulose.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estrutura molecular da carboximetil celulose sal sódico. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 2** – Estrutura molecular dos nanocristais de celulose via hidrólise ácida. .... 24
- Figura 3** – Processo de dispersão da NCC e CMC em agitador mecânico a 850rpm, durante 5h de agitação. .... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4** – Procedimento realizado para incorporação do microrganismo nas matrizes poliméricas, a) agitação da dispersão polimérica + *T. harzianum* no agitador mecânico; b) dispersão espalhada em placa de Petri. .... 32
- Figura 5** – Processo de revestimento de grânulos MAP..... 35
- Figura 6** - Transparência dos filmes poliméricos das matrizes de CMC e CMC:NCC. .... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 7** - Aparência dos filmes poliméricos das matrizes de CMC e CMC:NCC..... 37
- Figura 8** – Micrografias por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das superfícies dos filmes a) CMC<sub>média</sub>, b) CMC<sub>média</sub>:NCC, c) CMC<sub>baixa</sub> e d) CMC<sub>baixa</sub>:NCC. .... 38
- Figura 9** – a) Curva TG dos filmes de CMC<sub>média</sub>, CMC<sub>média</sub>:NCC, CMC<sub>baixa</sub> e CMC<sub>baixa</sub>:NCC, b) Curva TG dos filmes de CMC<sub>média</sub>+MO, CMC<sub>média</sub>:NCC+MO, CMC<sub>baixa</sub>+MO e CMC<sub>baixa</sub>:NCC+MO. .... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 10** – c) Curva DTG dos filmes de CMC<sub>média</sub>, CMC<sub>média</sub>:NCC, CMC<sub>baixa</sub> e CMC<sub>baixa</sub>:NCC, d) Curva DTG dos filmes de CMC<sub>média</sub>+MO, CMC<sub>média</sub>:NCC+MO, CMC<sub>baixa</sub>+MO e CMC<sub>baixa</sub>:NCC+MO. .... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 11** – a) Curvas de DSC dos filmes de CMC<sub>média</sub>, CMC<sub>média</sub> NCC, CMC<sub>baixa</sub> e CMC<sub>baixa</sub>:NCC e b) dos filmes de CMC<sub>média</sub>+MO, CMC<sub>média</sub>:NCC+MO, CMC<sub>baixa</sub>+MO e CMC<sub>baixa</sub>:NCC+MO..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 12** – a) Espetros FTIR dos filmes de CMC<sub>média</sub>, CMC<sub>média</sub> NCC, CMC<sub>baixa</sub> e CMC<sub>baixa</sub>:NCC e b) dos filmes de CMC<sub>média</sub>+MO, CMC<sub>média</sub>:NCC+MO, CMC<sub>baixa</sub>+MO e CMC<sub>baixa</sub>:NCC+MO..... 45
- Figura 13** – a) Perfis de intumescimento dos filmes de CMC<sub>média</sub> e CMC<sub>média</sub>:NCC; b) Perfis de solubilidade dos filmes de CMC<sub>média</sub> e CMC<sub>média</sub>:NCC. .... 48
- Figura 14** - Encapsulamento do *T. harzianum* nas matrizes de CMC puras e nos nanocompósitos CMC:NCC..... 49

**Figura 15** - Imagens MEV do *T. harzianum* encapsulado nas matrizes de CMC<sub>média</sub>, CMC<sub>média</sub>:NCC, CMC<sub>baixa</sub> e CMC<sub>baixa</sub>:NCC. ....**Erro! Indicador não definido.**

**Figura 16** - Crescimento do *T. harzianum* em placa, 6 dias, esporo livre e filmes de CMC<sub>média</sub>, CMC<sub>média</sub>:NCC, CMC<sub>baixa</sub> e CMC<sub>baixa</sub>:NCC.**Erro! Indicador não definido.**

**Figura 17** – Perfil de liberação do microrganismo encapsulado nas matrizes de CMC<sub>média</sub> e CMC<sub>média</sub>:NCC, durante o período de 30 dias..... 53

**Figura 18** – Viabilidade do *T. harzianum* encapsulados matrizes CMC<sub>média</sub> e CMC<sub>média</sub>:NCC, armazenado por um período de 3 meses a) armazenado em temperatura ambiente b) armazenado na geladeira .....**Erro! Indicador não definido.**

**Figura 19** - Aparência dos grânulos de MAP sem revestimento e revestidos com as matrizes de CMC<sub>média</sub> e o nanocompósito CMC<sub>média</sub>:NCC.**Erro! Indicador não definido.**

**Figura 20** – Imagens MEV das superfícies dos grânulos de MAP a) MAP sem revestimento; b) MAP revestido com a matriz de CMC<sub>média</sub>; c) MAP sem revestimento; d) MAP revestido com a matriz de CMC<sub>média</sub>:NCC. .... 57

**Figura 21** – Imagens MEV das fraturas dos grânulos de MAP a) MAP sem revestimento; b) MAP revestido com a matriz de CMC<sub>média</sub>; c) MAP sem revestimento; d) MAP revestido com a matriz de CMC<sub>média</sub>:NCC. .... 58

**Figura 22** - Crescimento do *T. harzianum* em placa com meio nutritivo de aveia, 6 dias, grânulos de MAP revestidos em diferentes tratamentos, ensaio realizado após 24h do revestimento dos grânulos. .... 59

**Figura 23** - Crescimento do *T. harzianum* em placa com meio nutritivo de aveia, 6 dias, grânulos de MAP revestidos em diferentes tratamentos, ensaio realizado após 30 dias de armazenamento dos grânulos revestidos. .... 60

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1.</b>	<b>INOCULANTES MICROBIANOS</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1.1.</b>	<b>Biocontrole</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1.2.</b>	<i>Trichoderma</i> .....	<b>17</b>
<b>2.2.</b>	<b>FORMULAÇÕES DE INOCULANTES MICROBIANOS</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2.1.</b>	<b>Tipos de Formulações</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2.2.</b>	<b>Filmes Poliméricos</b> .....	<b>20</b>
<b>2.3.</b>	<b>CARBOXIMETIL CELULOSE</b> .....	<b>21</b>
<b>2.4.</b>	<b>NANOCELULOSE</b> .....	<b>23</b>
<b>2.5.</b>	<b>FERTILIZANTES QUÍMICOS</b> .....	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1.</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2.</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1.</b>	<b>MATERIAIS</b> .....	<b>27</b>
<b>4.2.</b>	<b>PRODUÇÃO DOS FILMES</b> .....	<b>27</b>
<b>4.3.</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES</b> .....	<b>29</b>
<b>4.3.1.</b>	<b>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</b> .....	<b>29</b>
<b>4.3.2.</b>	<b>Análise de Termogravimetria (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</b> .....	<b>30</b>
<b>4.3.3.</b>	<b>Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)</b> .....	<b>30</b>

4.3.4. Análise mecânica .....	30
4.3.4. Grau de intumescimento e solubilidade .....	30
4.4. ENCAPSUMENTO DO MICRORGANISMO.....	31
4.4.1. Cultivo do microrganismo .....	31
4.4.2. Encapsulamento do microrganismo .....	32
4.4.3. Ensaio de crescimento em placa com meio nutriente de PDA.....	32
4.4.4. Ensaio de liberação do microrganismo.....	33
4.4.5. Viabilidade do microrganismo durante o armazenamento .....	33
4.5. REVESTIMENTO DOS GRÂNULOS DE FERTILIZANTE FOSFATO MONOAMÔNICO (MAP) .....	34
4.5.1. Preparo e revestimento de MAP com as matrizes poliméricas e microrganismo.....	34
4.5.2 Ensaio de crescimento em placa .....	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
5.1. CARACTERIZAÇÕES .....	38
5.1.1 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....	38
5.1.2 <i>Análise de Termogravimetria (TGA)</i> .....	39
5.1.3 <i>Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)</i> .....	42
5.1.4 <i>Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)</i> .....	43
5.1.5 <i>Análise Mecânica</i> .....	45
5.1.6 <i>Grau de intumescimento e solubilidade</i> .....	47
5.2. ENCAPSULAMENTO DO MICRORGANISMO .....	49
5.2.1 Caracterização do Microrganismo encapsulado .....	49
5.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	50
5.2.3 Crescimento em placa .....	50
5.2.4 Liberação do Microrganismo .....	51
5.2.5 Viabilidade do microrganismo durante o armazenamento .....	53

<b>5.3 REVESTIMENTO DOS GRÂNULOS DE FERTILIZANTE FOSFATO MONOAMÔNICO (MAP) .....</b>	<b>55</b>
<b>5.3.1 Preparo e revestimento de MAP com as matrizes de CMC, NCC e microrganismo. ....</b>	<b>55</b>
<b>5.3.2 Caracterização morfológica por MEV dos grânulos de MAP.....</b>	<b>56</b>
<b>5.3.3 Ensaio de crescimento em placa com meio nutritivo de aveia.....</b>	<b>58</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>61</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>62</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O aumento da produtividade agrícola para atender à crescente demanda global por alimentos, fibras e energia é um dos grandes desafios da atualidade (ONU, 2019). Assim, o uso de fertilizantes químicos e defensivos agrícolas é fundamental no aumento da produtividade e no controle de pragas e patógenos. Entretanto, a intensificação do uso de agroquímicos na agricultura resulta em impactos ambientais negativos e compromete a qualidade dos alimentos (Abbey et al., 2001). Dessa forma, torna-se necessária a implementação de métodos alternativos, especialmente aqueles baseados em recursos naturais, biodegradáveis e sustentáveis. Uma alternativa promissora é o uso de bioinsumos contendo microrganismos benéficos (Abbey et al., 2018).

A utilização de inoculantes microbianos na agricultura representa uma estratégia promissora para inserir uma diversidade de microrganismos benéficos nos sistemas agrícolas, com diferentes funções. Essa prática tem demonstrado bons resultados em comparação às técnicas agrícolas convencionais, uma vez que tem sido associada a melhorias significativas na produtividade agrícola e na redução dos impactos ambientais ocasionados pelo uso excessivo de agroquímicos, como herbicidas, pesticidas e fertilizantes sintéticos (Etesami e Maheshwari, 2018). Entretanto, deve-se notar que os inoculantes microbianos, quando usados como biofertilizantes e/ou agentes de biocontrole, enfrentam desafios, principalmente devido às baixas taxas de sobrevivência celular desses produtos (Machado et al., 2012). Por isso, a melhoria das formulações é fundamental para garantir a qualidade e a preservação das cepas durante as fases de produção, armazenamento e aplicação no campo. Pesquisas indicam que uma maneira eficaz de contornar esse problema é a encapsulação dos microrganismos em matrizes poliméricas biodegradáveis. Entre os polímeros mais utilizados para esse propósito estão os polissacarídeos, devido à sua biodegradabilidade, atoxicidade e excelente capacidade de formação de filmes (Albuquerque et al., 2009; Oliveira et al., 2017). A celulose, em particular, destaca-se como uma matéria-prima abundante, de baixo custo, renovável e biodegradável, cujos derivados são adequados para a formação de filmes e géis (Liebner et al., 2019). Como alguns desses materiais possuem propriedades mecânicas limitadas para várias aplicações, tem-se estudado a incorporação de agentes de reforço, visando melhorar essas propriedades (Ehrenstein, 1992; Wollerdorfer & Bader, 1998). Nesse contexto, os nanocristais de celulose (NCC) tem ganhado atenção, sendo uma alternativa promissora aos agentes de reforço inorgânicos, no desenvolvimento de filmes poliméricos

com melhores propriedades, tais como as mecânicas (Siqueira et al., 2010; Oliveira et al., 2017).

Diante desse cenário, o presente estudo tem como objetivo o desenvolvimento de matrizes de encapsulamento microbiano a base de CMC reforçados com NCC para encapsular o bioagente de controle *T. harzianum* visando a sua aplicação como revestimento para o fertilizante fosfatomonamônico (MAP) para possibilitar a compatibilidade de fertilizantes químicos com produtos biológicos e reduzir as perdas após a aplicação no campo por meio do revestimento.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. INOCULANTES MICROBIANOS**

A inoculação microbiana consiste em inserir microrganismos benéficos na agricultura para desempenhar diversas funções que favorecem o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Essa prática tem se mostrado eficaz, podendo ser aplicada em sementes, no solo ou diretamente nas folhas das culturas (Godoy, 2017; Soumare et al., 2020). Nas últimas décadas, as pesquisas sobre inoculantes microbianos têm se concentrado no isolamento e na caracterização dos microrganismos utilizados (Trabelsi & Mhamdi, 2013; Abhilash et al., 2016; Loján et al., 2017; Stamenković et al., 2018; Sammauria et al., 2020).

Esses inoculantes desempenham papéis fundamentais na agricultura, contribuindo para o crescimento saudável das plantas e a proteção das culturas. Dentre suas funções pode-se destacar a liberação de compostos bioativos que promovem o crescimento e aumentam a resistência das plantas a condições adversas (Egamberdieva et al., 2017; Florencio et al., 2022), atuando como agentes de biocontrole, diminuindo a incidência de doenças causadas por fitopatógenos (Babalola, 2018; Ramírez-Cariño et al., 2020; Alori; Florencio et al., 2022), e como biofertilizantes que aumentam a disponibilidade de nutrientes essenciais como nitrogênio, fósforo, potássio e enxofre para as plantas (Kour et al., 2020; Seenivasagan & Babalola, 2021; Florencio et al., 2022). Uma característica notável desses microrganismos é sua versatilidade, já que muitos apresentam vários mecanismos de ação, como a promoção do crescimento e desenvolvimento das plantas, por meio de certas bactérias e fungos (Meena et al., 2017; Antoine et al., 2021; Florencio et al., 2022).

A eficácia dos inoculantes microbianos depende de sua capacidade de criar um microambiente favorável à sobrevivência dos microrganismos, oferecendo proteção física e/ou química para evitar a rápida perda de viabilidade celular durante o armazenamento e minimizar perdas durante a aplicação em campo. É crucial que o inoculante contenha uma quantidade adequada de células vivas que possam interagir tanto com as plantas quanto com o microbioma do solo (Bashan et al., 2014; Herrmann & Lesueur, 2013; Vassilev et al., 2020).

Apesar dos benefícios significativos da inoculação microbiana, a comercialização desses produtos como biofertilizantes e/ou agentes de biocontrole enfrenta desafios, especialmente devido às baixas taxas de sobrevivência no campo (Ma et al., 2011). Portanto, a formulação dos inoculantes é um passo fundamental no desenvolvimento de produtos eficazes, uma vez que a qualidade e estabilidade dos inoculantes são questões críticas para sua aplicação comercial (Stamenković et al., 2018). É essencial entender o processo de produção dos inoculantes, incluindo a fisiologia dos microrganismos e das plantas, bem como a formulação desejada e seu impacto (Stamenković et al., 2018). Além disso, os agricultores procuram produtos que sejam fáceis de manusear e aplicar, e que ofereçam proteção contra estresses bióticos (como fitopatógenos) e abióticos (como seca e salinidade).

### **2.1.1. Biocontrole**

Inoculantes microbianos desempenham um papel crucial no controle biológico de fitopatógenos, representando uma abordagem fundamental no contexto da agricultura sustentável. O biocontrole agrícola consiste no controle de pragas e doenças em cultivos, minimizando o impacto ambiental e diminuindo os riscos à saúde humana e animal, ao mesmo tempo em que oferece uma alternativa economicamente viável aos métodos químicos convencionais (Moraes, 1992; Elnahal, et al, 2022). Um agente de biocontrole ideal é aquele que coloniza e compete de forma eficiente no microambiente (Melo, 1998), resultando em uma estratégia eficiente de manejo integrado. Entre os promissores agentes de biocontrole, microrganismos como *T. harzianum*, *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus subtilis*. Esses microrganismos são notáveis por suas atividades antagônicas, exibindo efeitos inibitórios contra patógenos como *Fusarium spp.*, *Pythium spp.* e *Rhizoctonia spp.* (Alori et al., 2017).

Esses inoculantes desempenham um papel crucial na redução dos efeitos causados pelos fitopatógenos por meio de uma série de mecanismos multifuncionais, tais como:

(1) Micoparasitismo: Os microrganismos podem se comportar como micoparasitas, atacando diretamente os fitopatógenos presentes no ambiente (Stummer et al., 2020).

(2) Aumento da resistência sistêmica das plantas: Os inoculantes têm a capacidade de induzir a resistência sistêmica nas plantas hospedeiras, ativando vias de sinalização que levam à produção de fitoalexinas, proteínas de defesa e outros compostos bioativos. Essa resposta fortalece a capacidade das plantas em se defender contra invasores patogênicos (Ab Rahman et al., 2018).

(3) Produção e liberação de compostos antimicrobianos: Microrganismos benéficos podem sintetizar e liberar compostos antimicrobianos, limitando o crescimento de patógenos (Stummer et al., 2020)

(4) Produção e liberação de enzimas de degradação da parede celular: Enzimas como quitinases, proteases e glucanases são secretadas pelos inoculantes, desencadeando a degradação da parede celular dos fitopatógenos, enfraquecendo-os de maneira eficaz (Ab Rahman et al., 2018).

### **2.1.2. *Trichoderma***

Em 1930 foi descoberto o potencial das espécies do gênero *Trichoderma* como agentes de controle biológico em plantas e a partir de então, essa abordagem tem sido explorada para combater diversos fitopatógenos, contribuindo para a busca contínua de soluções de manejo mais sustentáveis (Howell, 2003). *Trichoderma* é um gênero de fungo que é comumente encontrado no solo e em substratos vegetais em decomposição, se destacando entre os fungos do solo que são comercialmente disponíveis na forma de biopesticidas, biofertilizantes e inoculantes de solo (Harman, 2000; Harman et al. 2004).

Uma das principais razões para o destaque dos fungos de solo, especialmente do gênero *Trichoderma*, como agentes de biocontrole reside em sua grande acessibilidade, disponibilidade ambiental e a facilidade de cultivo de suas cepas. Além disso, sua não patogenicidade às plantas, juntamente com suas propriedades antagônicas, que se baseiam na ativação de diversos mecanismos, contribuem para sua eficácia como bioagentes de controle (Papavizas et al., 1982).

Entre as diversas espécies do gênero *Trichoderma*, o *T. harzianum* é amplamente estudado, sendo que muitos trabalhos destacam a eficiência do seu uso no biocontrole em plantações de milho e soja (Saravanakumar et al., 2017; Zhang et al., 2016; Lohmann et al., 2007). Como exemplo, a inoculação do *T. harzianum* em culturas de soja demonstrou uma significativa inibição de 56% sobre os efeitos causados pelo patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, responsável pelo desenvolvimento do mofo branco (Zhang et al., 2016).

Além do efeito no biocontrole, o *T. harzianum* também possui outras contribuições benéficas para as plantas hospedeiras como por exemplo, a liberação de fitohormônios e reforço da resistência das plantas em face de condições de estresse, fornecendo um suporte adicional à sua adaptação ambiental (Li et al., 2018; Mona et al., 2017).

Vale ressaltar que a influência positiva do *T. harzianum* se estende além das interações biocontroladoras e de estresse, atuando também na promoção do crescimento de plantas. A capacidade do *T. harzianum* em solubilizar fósforo no solo confere um notável benefício para o suprimento nutricional das plantas, facilitando a absorção deste nutriente vital (Bader, et al., 2020). A presença do *T. harzianum* no sistema radicular das plantas tem sido associada a uma maior captura de nutrientes essenciais, incluindo além do fósforo, nitrogênio, potássio, magnésio e zinco (Li et al., 2018; Mona et al., 2017).

## **2.2. FORMULAÇÕES DE INOCULANTES MICROBIANOS**

Conforme exposto anteriormente, os inoculantes microbianos demonstram uma notável capacidade de potencializar o crescimento e desenvolvimento de plantas. No entanto, para que os agricultores possam se beneficiar plenamente desses efeitos positivos, é importante formular os inoculantes corretamente. A formulação é uma etapa essencial na determinação do sucesso do produto, e é uma das áreas de pesquisa mais proeminentes no campo dos inoculantes microbianos (Vassileva et al., 2021, Florencio et al., 2022).

O estabelecimento de um meio de veiculação adequado para as células microbianas emerge como um fator de suma importância. A otimização dessa etapa de formulação assegura que, ao serem aplicados ao solo ou folhas das plantas, os microrganismos possam expressar seu potencial de maneira ideal (Qiu et al., 2019). Uma formulação eficaz deve apresentar diversas características essenciais. Em primeiro lugar, deve ser biodegradável, garantindo que seu uso não exerça um impacto negativo sobre o meio ambiente. Além disso, é crucial que a formulação seja economicamente viável e de fácil processamento, sem comprometer a viabilidade das células microbianas. A capacidade de manter esses microrganismos viáveis e protegidos por extensos períodos, inclusive em face de condições adversas durante o transporte e o armazenamento, é um atributo fundamental. Adicionalmente, a aplicação da formulação deve ser de fácil execução por parte do agricultor. No contexto do solo, a formulação deve fornecer nutrientes que favoreçam o desenvolvimento dos microrganismos, protegendo-os contra competição com outros microrganismos mais

adaptados ao solo, e oferecendo proteção contra condições de estresse (Kaminsky et al., 2019; Qiu et al., 2019; Vassilev et al., 2020).

No âmbito das formulações, estas podem assumir diferentes formas, incluindo líquidas, sólidas (como turfas, resíduos orgânicos e argilo-minerais) ou encapsuladas, frequentemente utilizando matrizes poliméricas. Sendo que hoje em dia, uma parcela considerável das pesquisas concentra-se nas formulações líquidas e encapsuladas, uma vez que essas abordagens têm demonstrado resultados promissores ao atenderem aos requisitos previamente mencionados (Bashan et al., 2014; Stamenković et al., 2018; Zayed, 2016).

### **2.2.1. Tipos de Formulações**

Nas formulações líquidas, os microrganismos são frequentemente incorporados em um meio transportador, geralmente composto por meio de cultura, água ou óleo, podendo conter aditivos. Nas formulações sólidas, os microrganismos são integrados a transportadores em pó, tais como turfa, argilas, solo inorgânico ou substratos inertes, como perlita e vermiculita. Por sua vez, o encapsulamento envolve a imobilização dos microrganismos em matrizes poliméricas (Bashan et al., 2014).

A utilização de inoculantes líquidos prevalece atualmente devido à sua compatibilidade com os sistemas de pulverização empregados no campo, assim como pela facilidade de manipulação e aplicação por parte do agricultor. No entanto, é importante observar que essa classe de produtos pode enfrentar desafios relacionados à sobrevivência pós-aplicação dos microrganismos, o que pode requerer aplicações repetidas para assegurar uma viabilidade celular adequada, crucial para garantir o desenvolvimento das culturas agrícolas. Este aspecto pode contribuir para um incremento nos custos globais devido à necessidade de múltiplas aplicações, quando comparado às formulações sólidas mais convencionais (Bashan et al., 2014; Gopalakrishnan et al., 2016). Já as formulações sólidas, possuem algumas desvantagens como a reduzida sobrevivência microbiana durante a fase de armazenamento, falta de homogeneidade na aplicação e uma maior tendência à contaminação em relação às formulações líquidas e encapsuladas (Bashan et al., 2014; John et al., 2011; Mahanty et al., 2017).

Em contrapartida, os inoculantes encapsulados apresentam diversas vantagens sobre outras formulações. Essas vantagens incluem uma liberação dos microrganismos de forma controlada, além de uma menor competição natural na rizosfera das plantas e maior resistência frente a condições adversas do ambiente. A estrutura encapsulada atua como

barreira protetora e, em alguns casos, pode servir como fonte de nutrientes de longo prazo para os microrganismos (Schoebitz & Belchi, 2016). Além disso, o armazenamento requer espaços reduzidos e os materiais encapsulados apresentam uma vida útil prolongada em comparação com outras formulações, possibilitando uma maior viabilidade durante a aplicação. Vale ressaltar, no entanto, que esse tipo de formulação implica em custos de produção mais elevados, em comparação às outras opções existentes (Bashan et al., 2014; John et al., 2011). Sendo assim, a escolha dos materiais utilizados para o encapsulamento microbiano se torna uma parte crucial do processo de formulação. É necessário que esses materiais tenham certas propriedades ou características, como a capacidade de (i) proteger os microrganismos contra as condições ambientais, (ii) se dispersar com o material a ser encapsulado e (iii) liberar seu conteúdo em condições específicas (Chaudhary et al., 2020; Rathore et al., 2013; Bashan, et al., 2002). Esses materiais de revestimento incluem óleos hidrogenados, ceras, maltodextrinas, celuloses, amidos, gomas e vários polímeros (Rojas-Sánchez, et al., 2022; Rathore et al., 2013; Schoebitz et al., 2013).

### **2.2.2. Filmes Poliméricos**

O uso de biopolímeros no desenvolvimento de novos materiais tem despertado o interesse dos pesquisadores científicos, emergindo como uma alternativa promissora aos polímeros sintéticos não biodegradáveis (Andrighetto et al., 2020). As vantagens de desenvolver novos materiais a partir de polímeros naturais incluem disponibilidade abundante, não toxicidade e biodegradabilidade (Carretero, 2013). Nesse contexto, os polissacarídeos se destacam como uma classe de biomateriais devido à sua capacidade de formação de filmes. Uma das áreas crescentes de aplicação de polímeros naturais é na agricultura, principalmente relacionada a pesquisas voltadas ao controle da liberação controlada de pesticidas, que compreendem os herbicidas (Albuquerque et al., 2009; Gonçalves, 2021; Oliveira et al., 2012), os fungicidas (Moura, 2008; Tanaka, 2019; Oliveira et al., 2012) e os inseticidas (Aouadra et al., 2009; Oliveira et al., 2012), nutrientes (Oliveira 2012), além da aplicação destes polímeros em processos de recobrimento de sementes e frutas (Garcia et al., 1998; Fakhouri et al., 2003; Tanada-Palmu et al., 2005; Oliveira et al., 2012).

Um polímero particularmente proeminente nesse contexto é o amido, cuja acessibilidade e baixo custo o transformam em um dos principais componentes de embalagens biodegradáveis. Extraído de fontes amiláceas, como cereais (arroz, trigo, aveia, milho), raízes (mandioca) e tubérculos (batata, batata doce, cará, inhame), o amido tem sido utilizado com

sucesso na produção de filmes mediante a técnica de casting, resultando em filmes homogêneos, resistentes, flexíveis e de fácil manuseio (Pereira et al., 2018; Pereira, 2017; Cao et al., 2017).

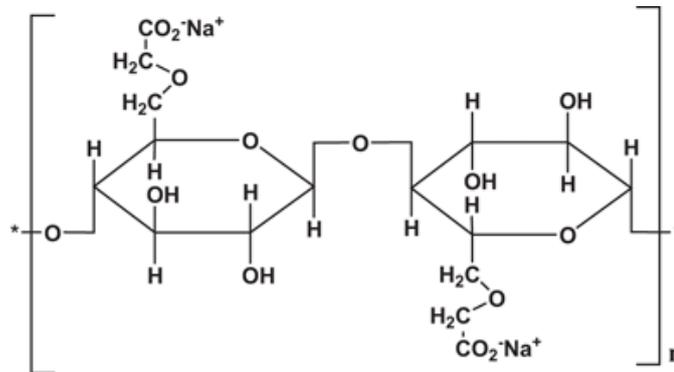
A celulose é outro polímero que se destaca pela abundância global da matéria-prima, seu baixo custo, natureza renovável e biodegradável (Machado et al., 2012). Estudos recentes envolvendo a adição de fibras de celulose em filmes demonstraram o reforço da matriz, indicando um caminho promissor para a melhoria das propriedades dos biopolímeros. Por exemplo, estudos têm evidenciado que filmes à base de acetato de celulose, um derivado da celulose, exibem elevado módulo de elasticidade sendo atribuído à natureza cristalina e ordenada da estrutura do acetato de celulose (Jesus et al., 2019; Shruthy, 2019; Brazeiro, 2021).

Li e colaboradores (2019) estudaram o encapsulamento do probiótico *Lactobacillus plantarum* em microgel à base de celulose e os resultados desse estudo demonstraram uma proteção eficaz do probiótico durante a liofilização e uma liberação controlada das células no ambiente do fluido intestinal simulado, mesmo após um período prolongado de armazenamento. Posteriormente Chain e colaboradores (2020) conduziram um estudo no qual um compósito superabsorvente acrílico-celulósico contendo bactérias de controle vegetal da espécie *Pseudomonas* foi avaliado quanto à retenção de água e proteção contra estresse hídrico em *Eucalyptus grandis*. O material superabsorvente desempenhou o papel de carreador para a introdução das bactérias benéficas no solo circundante das mudas de eucalipto em casa de vegetação. A matriz polimérica demonstrou a capacidade de manter a viabilidade da bactéria no solo ao longo de um período prolongado de 3 meses. O efeito aditivo entre o material superabsorvente e as bactérias benéficas configura um sistema ecologicamente favorável para promover a resistência das plantas a estresses abióticos.

### 2.3. CARBOXIMETIL CELULOSE

A carboximetil celulose (CMC), um derivado do polissacarídeo celulose, tem se destacado como um material proeminente na produção de filmes biodegradáveis e comestíveis, sendo reconhecida por suas propriedades não tóxicas, biocompatibilidade, solubilidade em água, origem renovável e baixo custo (Morais, 2020). Na Figura 1 está apresentada a estrutura molecular da CMC.

**Figura 1** – Estrutura molecular da carboximetil ceulose sal sódico.



Fonte: Site da ResearchGate

Estruturalmente, a CMC é um éter de celulose, sua estrutura está fundamentada no polímero de  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) -D-glucopiranosose da celulose. As propriedades da CMC, incluindo a formação de filmes, géis e hidrogéis (por reticulação com cátions bi e trivalentes), conferem-lhe relevância em várias aplicações, incluindo a liberação controlada de pesticidas e nutrientes na agricultura, além de sua utilização na indústria alimentícia para filmes comestíveis protetores (Santos et al., 2021; Oliveira et al., 2012).

Estudos recentes também têm investigado a eficácia da CMC como veículo em inoculantes. Cavalcante e colaboradores (2021) conduziram um estudo para avaliar a eficácia de biopolímeros como inoculantes de *Lactobacillus* na ensilagem de mandioca. O estudo envolveu duas cepas de *Lactobacillus* e formulações de inoculantes contendo carboximetilcelulose (CMC) combinada com amido de milho (CMC/amido) e fécula de mandioca (CMC/fécula) em proporções variadas. As combinações poliméricas demonstraram a capacidade de manter a viabilidade das células bacterianas isoladas ao longo do tempo, indicando seu potencial como bioinoculantes para a ensilagem.

Fernandes Júnior e colaboradores (2009) avaliaram a eficácia de misturas poliméricas de carboximetilcelulose (CMC) e amido como veículos de inoculante para rizóbios em feijão-caupi. Os autores observaram que as células rizobianas sobreviveram melhor em misturas com 50-60% de CMC. Além disso, as misturas de CMC/amido, especialmente quando compatibilizadas com 1% de MgO, demonstraram ser veículos eficientes para inoculantes rizobianos, mantendo sua viabilidade por até 165 dias de armazenamento. Isso destaca a CMC como um componente promissor para garantir a viabilidade de células rizobianas em inoculantes, contribuindo para a eficácia da nodulação em culturas agrícolas como o feijão-caupi.

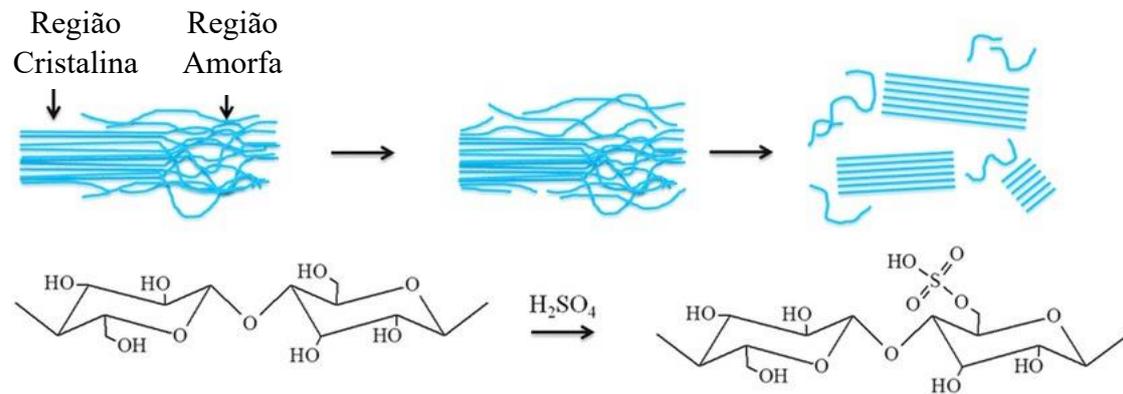
No entanto, a viabilidade da aplicação diversificada de polímeros biodegradáveis está intrinsecamente vinculada à necessidade de exibirem propriedades e resistência comparáveis a outros materiais convencionais. Tendo em vista a limitação mecânica que alguns polímeros biodegradáveis possuem, tem-se estudado a incorporação de agentes de reforço, como a nanocelulose (Siqueira et al., 2010; Oliveira et al., 2017).

#### **2.4. NANOCELULOSE**

Quando submetidas a tratamentos mecânicos e/ou hidrólise ácida ou enzimática controlada, as fibras de celulose passam pelo processo de diminuição ou remoção das regiões amorfas do material, resultando na formação de um material altamente cristalino com dimensões variando de alguns poucos nanômetros a micrômetros (Thomas et al., 2018). A nanocelulose é um nanomaterial derivado da celulose, apresentando características biodegradáveis, biocompatíveis, baixa densidade e não tóxicas. Esse material pode ser subdividido em dois tipos principais: nanocristais de celulose (NCCs) e nanofibrilas de celulose (NFCs). Os NCCs possuem alta rigidez em comparação às nanofibrilas de celulose (NFC), resultado da remoção ou redução de regiões amorfas (Thomas et al., 2018; John & Thomas, 2008). Embora processos envolvendo hidrólise enzimática existam para a produção de NCCs (Filson, et al., 2009), a hidrólise ácida, particularmente a hidrólise com ácido sulfúrico, é a técnica de preparação mais comum.

A estrutura molecular da nanocelulose obtida por rota ácida está apresentada na Figura 2. A hidrólise ácida quebra as ligações glicosídicas entre as unidades de glicose, removendo as regiões amorfas das fibras de celulose (Dufresne, 2013; Thomas et al., 2018). O processo típico de obtenção de NCCs envolve pré-tratamento alcalino, branqueamento, hidrólise ácida, lavagem, centrifugação, diálise e ultrassonificação para formar uma suspensão, que pode ser submetida a liofilização conforme necessário (Habibi et al., 2010).

**Figura 2** – Estrutura molecular dos nanocristais de celulose via hidrólise ácida.



Fonte: Site da ResearchGate

Os NCCs possuem uma faixa de diâmetro de 3 a 50 nm e comprimento de 50 a 500 nm, combinando alta rigidez (105-168 GPa) (Camarero-espinoza et al., 2015), alto módulo de Young (20-50 GPa) (Usov, et al., 2015), alta resistência à tração (aproximadamente 9 GPa) (Zhang et al., 2016), alta estabilidade térmica (aproximadamente 260 °C) (Pettersson & Oksman 2007; Ye et al., 2015), baixa densidade (1,5-1,6 g/cm<sup>3</sup>) (Liu et al., 2010) e grau de cristalinidade que varia de 54 a 88% (Filson, et al., 2009).

A aplicação dos NCCs como agentes de reforço em materiais compósitos tem sido amplamente estudada. Neto e colaboradores (2012) reforçaram a matriz de CMC com NCCs, e obtiveram bons resultados nas propriedades mecânicas e estabilidade térmica dos filmes nanocompósitos. Posteriormente, Lee e colaboradores (2014) obtiveram que a adição de nanocelulose bacteriana resultou em um aumento de até 400% o módulo elástico do material e a sua resistência a tração. Em sequência, Oun e colaboradores (2015) isolaram nanofibrilas de celulose (NFCs) de polpa de algodão, evidenciando o aumento de 23% na resistência à tração e 27% no módulo de elasticidade dos filmes de CMC. Vale destacar que o uso da nanocelulose nas áreas médica e farmacêutica também tem apresentado resultados interessantes para o encapsulamento e liberação controlada de fármacos e células devido a sua não-toxicidade (Lin & Dufresne, 2014).

Uma área onde a nanocelulose tem mostrado um potencial considerável é no campo do encapsulamento microbiano. Huq e colaboradores (2017) analisaram o efeito do nanocristal de celulose (NCC) e da lecitina numa matriz à base de alginato para microencapsulação de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* e concluíram que a adição de NCC e lecitina nas micropartículas de alginato melhorou a viabilidade do probiótico e o armazenamento, além de aumentar a resistência e a eficiência das microcápsulas. A liberação controlada do probiótico foi observada, mostrando potencial para proteção e liberação. Brondi e colaboradores (2022)

estudaram o encapsulamento do fungo *Trichoderma harzianum* em uma matriz polimérica a base de NCC e CMC e observaram que o nanocompósito favoreceu o crescimento do fungo após 10 dias de armazenamento em temperatura ambiente.

## 2.5. FERTILIZANTES QUÍMICOS

Os fertilizantes são insumos essenciais na agricultura, visando melhorar o desempenho das culturas ao fornecer nutrientes cruciais para o crescimento das plantas. No entanto, seu uso excessivo acarreta problemas ambientais, econômicos e energéticos (Costa, 2021; Seerano et al., 2014; Valderrama; Buzetti, 2017). A baixa eficiência na aplicação dos fertilizantes comerciais está relacionada à recuperação da composição nutricional das plantas, já que apenas uma pequena parcela da formulação adicionada é absorvida (Chalk et al., 2015). Desta forma, torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologias agrícolas alternativas que otimizem a produção e o uso criterioso de fertilizantes.

Cerca de 40 a 70% dos fertilizantes solúveis são perdidos para o ambiente, sem serem aproveitados pelas plantas, por problemas relacionados ao manejo inadequado que acarretam em perdas como lixiviação, volatilização e fixação, resultando em prejuízos financeiros, menor produtividade e poluição ambiental (Pang et al., 2019; Valderrama; Buzetti, 2017). Uma técnica promissora para melhorar a eficácia dos insumos é a utilização de fertilizantes encapsulados ou revestidos por matrizes poliméricas, que são conhecidos como fertilizantes de eficiência aprimorada e ecologicamente corretos. A fabricação desses produtos possibilita prolongar e retardar a liberação de nutrientes, reduzindo a quantidade de produtos aplicados, melhorando a eficácia e minimizando a poluição de efeitos nocivos ao ambiente (Trenkel, 2010; Borelli, 2020).

Diversos materiais, incluindo polímeros sintéticos e naturais, como enxofre, quitosana, amido, lignina e celulose, são usados para fabricar fertilizantes (Abbas et al., 2022; Alam & Christopher, 2018; Channab et al., 2023a). No entanto, a celulose e os polímeros nanocelulósicos surgiram como alternativas promissoras para enfrentar as preocupações ambientais, como a não biodegradabilidade associada aos polímeros sintéticos (Elhassani et al., 2019).

A nanocelulose e seus derivados são amplamente pesquisados devido ao seu potencial para aprimorar o desempenho de fertilizantes de liberação controlada e lenta (Kassem et al., 2021; El Assimi et al., 2021; El Idrissi et al., 2022). Esses materiais apresentam características únicas, como biocompatibilidade, alta área superficial e biodegradabilidade. Ao serem

incorporados nas formulações de fertilizantes, eles permitem controlar a liberação de nutrientes por períodos prolongados. A adição de revestimentos ou aditivos à base de nanocelulose tem demonstrado resultados promissores na melhoria da liberação controlada de nutrientes. Por exemplo, revestimentos como nanofibras de celulose oxidadas, montmorilonita e biocarvão modificado, aplicados em superfosfato triplo (TSP) resultaram em uma liberação mais lenta de nutrientes em comparação com o TSP não revestido (Kassem et al., 2022a).

Outros estudos, como os de Kassem e colaboradores (2021) investigaram a eficácia do revestimento de fertilizante NPK com nanocristais de celulose (NCC) e poli(álcool vinílico) (PVA) para melhorar a gestão de nutrientes em práticas agrícolas sustentáveis e obtiveram que os revestimentos prolongaram a liberação de nutrientes NPK de 3 para 10-30 dias.

Em suma, a nanocelulose e seus derivados representam uma fonte promissora na busca por fertilizantes mais eficientes, sustentáveis e ambientalmente amigáveis. As pesquisas nesse campo continuam a evoluir, abrindo caminho para um futuro mais verde e produtivo na agricultura.

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de matrizes de encapsulamento microbiano a base de CMC reforçados com NCC para encapsular o agente de biocontrole *T. harzianum* visando à aplicação como revestimento para grânulos fertilizantes.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

##### **Quanto à formulação**

- ✓ Desenvolver formulações a base de CMC (baixa e média viscosidade) e CMC:NCC;
- ✓ Realizar a produção de filmes pelo método de casting;
- ✓ Caracterizar as morfologias, propriedades físico-químicas, térmicas e mecânicas dos materiais poliméricos.

##### **Quanto ao encapsulamento microbiano**

- ✓ Avaliar o perfil de liberação do fungo *T. harzianum*;
- ✓ Avaliar a viabilidade durante 3 meses;

- ✓ Avaliar o efeito do encapsulamento na proteção do microrganismo frente ao revestimento do fertilizante MAP.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

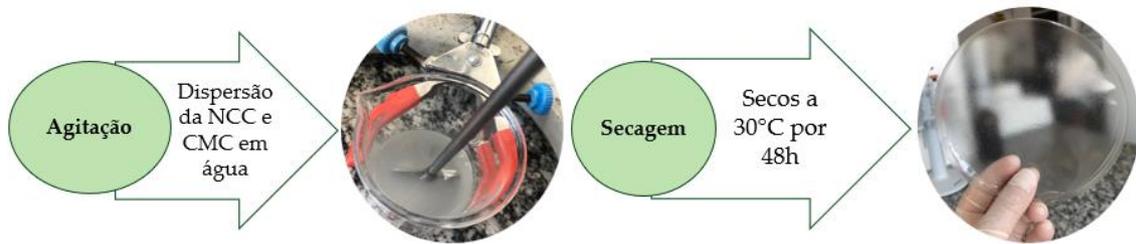
### 4.1. MATERIAIS

As matrizes de encapsulamento foram formuladas a base de carboximetil celulose sal sódico (CMC<sub>média</sub> - média viscosidade de 2040 cps, 0,7 grau de substituição e massa molecular 265.000 g/mol) (Synth, Brasil) e carboximetil celulose sal sódico (CMC<sub>baixa</sub> - baixa viscosidade 50-200 cps e massa molecular de 90.000 g/mol) (Sigma, USA) e na ausência e presença de nanocristais de celulose (NCCs) como agente de reforço. Os NCCs foram obtidos comercialmente da empresa Celluforce (Canadá). A produção desses materiais se dá por meio da hidrólise com ácido sulfúrico (64% m/v), resultando na adição de grupos sulfato meio-éster na superfície da NCC (Reid et al., 2017). De acordo com o fabricante, os NCCs possuem um diâmetro nominal médio de 7,5 nm e um comprimento de 150 nm, com uma relação de aspecto (L/D) de 20. O fungo agente de biocontrole *Trichoderma harzianum* (*T. harzianum*) LQC99, da coleção da Embrapa Meio Ambiente, foi utilizado com microrganismo modelo.

### 4.2. PRODUÇÃO DOS FILMES

A preparação dos filmes foi realizada empregando o método casting que consiste no preparo da dispersão polimérica seguida de secagem em estufa. No caso dos filmes com somente CMC, foram preparadas dispersões contendo 1,5% de CMC<sub>média</sub> ou 3% de CMC<sub>baixa</sub> (m/v), em 100mL de água destilada em béquer. Tais dispersões foram submetidas a agitação (850 rpm) por um período de 5 horas, de acordo com a Figura 3, para assegurar a dispersão da CMC. Posteriormente, a dispersão (aproximadamente 100mL) foi uniformemente espalhada em uma placa de Petri (raio 10,5cm) e submetida a um processo de secagem a 30 °C, o solvente foi então evaporado lentamente, em estufa sem circulação de ar para evitar a formação de bolhas, por um período de 48 horas.

**Figura 3** – Processo de dispersão da NCC e CMC em agitador mecânico a 850rpm, durante 5h de agitação e secagem em estufa a 30°C por 48 horas.



Fonte: arquivo pessoal (2023)

O mesmo protocolo foi empregado para a produção dos filmes de CMC reforçados com NCC, com uma ressalva: os NCC (0,25% (m/v)) foram inicialmente dispersados em água sob agitação de 850 rpm no agitador mecânico, e posteriormente adicionou-se a CMC. Ressalta-se que diferentes concentrações de CMC e NCC foram pré-avaliadas com o objetivo de se estabelecer a maior concentração viável para  $CMC_{m\u00e9dia}$  e  $CMC_{baixa}$  e a mínima concentração de NCC, conforme pode ser visualizado na Tabela 1.

**Tabela 1** – Formulações detalhadas dos filmes produzidos.

Variável	CMC (m/v) (%)	NCC (m/v) (%)	CMC:NCC	Característica
$CMC_{m\u00e9dia}$ concentração	0,5	0	0,5:0	Filmes muito finos e quebradiços
	1,0		1:0	Filmes um pouco finos e quebradiços
	1,5		1,5:0	Filmes de boa aparência e manuseabilidade
	2,0		2:0	Filmes bons, porém, dificuldade em manusear a CMC devido à viscosidade
	2,5		2,5:0	Filmes bons, porém, dificuldade em manusear a CMC devido à alta viscosidade
$CMC_{m\u00e9dia}$ :NCC concentração	1,5	0,1	1,5:0,1	Filmes bons, porém, sem diferenças aparentes

		0,25	1,5:0,25	Filmes bons e com aparência diferente devido a presença dos NCCs
		0,5	1,5:0,5	Filmes bons, porém, dificuldade em dispersar a NCC em CMC
		1	1,5:1	Filmes bons, porém, dificuldade em dispersar a NCC em CMC
<b>CMC<sub>baixa</sub> concentração</b>	2		2:0	Filmes de boa aparência
	3		3:0	Filmes de boa aparência e manuseabilidade
	4	0	4:0	Filmes grossos e dificuldade em manusear devido a rigidez
	5		5:0	Filmes grossos e dificuldade em manusear devido a rigidez
	6		6:0	Filmes grossos e dificuldade em manusear devido a rigidez
			0,1	3:0,1
<b>CMC<sub>baixa</sub>:NCC concentração</b>	3	0,25	3:0,25	Filmes bons e com aparência diferente devido a presença dos NCCs
		0,5	3:0,5	Filmes bons, porém, dificuldade em dispersar a NCC em CMC
		1	3:1	Filmes bons, porém, dificuldade em dispersar a NCC em CMC

### 4.3. CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

#### 4.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia da superfície dos filmes foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (JEOL JSM-6510). Os materiais foram colocados em stubs de alumínio, fixados em fitas de carbono e revestidos com uma fina camada de ouro em uma câmara de ionização (BALTEC Med. 020). O equipamento utilizado operou a uma tensão de aceleração de 5 kV e um detector de elétrons secundário.

#### **4.3.2. Análise de Termogravimetria (TGA) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

O comportamento térmico dos filmes foi avaliado por TGA e DSC (SDT – TA Instruments, Modelo SDT650). Uma massa de aproximadamente 5 mg da amostra foi transferida para um cadinho de platina e aquecido da temperatura ambiente até 800 °C, a uma taxa de 10 °C.min<sup>-1</sup>, sob atmosfera inerte de nitrogênio fornecido a uma vazão de 100 mL.min<sup>-1</sup>.

#### **4.3.3. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)**

A caracterização química dos filmes sem e com a adição de microrganismo foi obtida por FTIR, usando o aparelho Bruker, modelo Vertex 70 equipado com acessório de reflectância atenuada total (ATR), na faixa de 4000–400 cm<sup>-1</sup> com 32 varreduras por amostra, resolução de 4 cm<sup>-1</sup> e normalizadas em aproximadamente 1020 cm<sup>-1</sup>.

#### **4.3.4. Análise mecânica**

O teste de tração dos filmes foi realizado em máquina universal para ensaios mecânicos (EMIC, modelo DL-3000, com capacidade de carga de 30 kN) baseado na metodologia ASTM D882-01 (ASTM, 2001) com 5 repetições para cada amostra. A distância inicial entre as garras foi de 12 cm, carga de 50 kgf e velocidade de tração de 25 mm/min. A força máxima e deformação na ruptura foram calculados pelo software do equipamento. Já o módulo de elasticidade foi determinado a partir da inclinação da região linear da curva de tensão *vs.* Deformação.

#### **4.3.4. Grau de intumescimento e solubilidade**

As análises de Grau de Intumescimento (GI) e de Solubilidade (GS) foram realizadas no mesmo experimento. Inicialmente os filmes foram cortados (2x2 cm) e secos em estufas por 24 horas a 100°C e sua massa anotada (*m*<sub>0</sub>). Em seguida as amostras, foram imersas em tubos falcons com 50 mL de água destilada estéril e colocados em incubadora orbital a 25°C

sob agitação branda (75 rpm). As amostras foram observadas nos tempos de 0,5, 2, 4 e 24 horas. O experimento foi realizado em triplicata.

Para calcular o GI as amostras foram removidas da água, com auxílio de uma pinça, nos tempos determinados anteriormente, levemente secas com papel absorvente para retirar o excesso de água, e então novamente pesadas ( $m_1$ ). Dessa forma, o GI pode ser calculado a partir da relação entre a massa úmida ( $m_1$ ) e a massa seca inicial ( $m_0$ ) de acordo com a Equação (1):

$$GI (\%) = \frac{m_1 - m_0}{m_0} * 100 \quad (1)$$

Para determinar o GS, após a pesagem dos filmes úmidos, as amostras foram novamente secas em estufa por 24 horas a 100°C e sua massa seca foi anotada ( $m_2$ ). Assim, para determinar o GS, após a pesagem dos filmes úmidos, as amostras foram novamente secas em estufa por 24 horas a 100°C e seu peso seco foi anotado ( $m_2$ ). Assim, o GS pode ser calculado a partir da diferença entre a massa seca inicial do experimento ( $m_0$ ) e final ( $m_2$ ) de acordo com a Equação (2):

$$GS (\%) = \frac{m_0 - m_2}{m_0} * 100 \quad (2)$$

#### **4.4. ENCAPSUMENTO DO MICRORGANISMO**

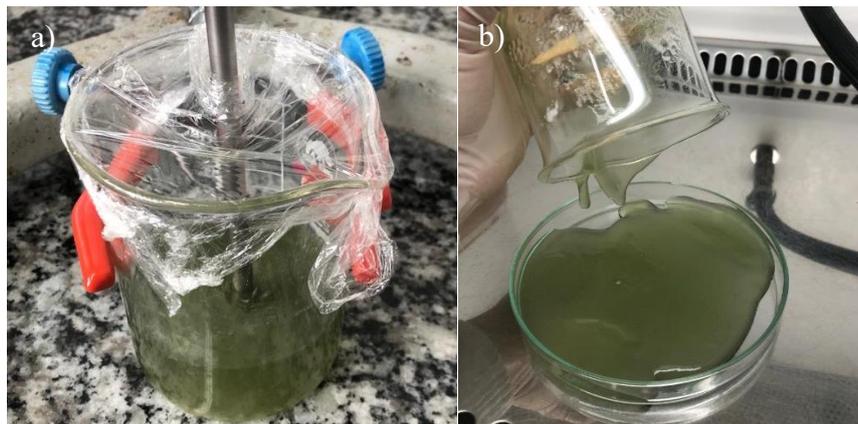
##### **4.4.1. Cultivo do microrganismo**

Os esporos do fungo *T. harzianum* armazenados em -80 °C foram reativados por meio do cultivo em placas de petri em meio PDA (agar de batata dextrose), em incubadoras do tipo BOD, por 6 -7 dias a 28 °C. Foi utilizado solução salina (NaCl) a 0,85% (m/v) para coletar os esporos, que foram então concentrados por centrifugação por 10 min a 8000 rpm. Determinou-se a concentração de esporos por meio de contagem em uma câmara de Neubauer.

#### 4.4.2. Encapsulamento do microrganismo

Para a incorporação do microrganismo na matriz, os materiais (béqueres, espátulas, placas de Petri, ponteiros e haste de agitação) foram previamente autoclavados a 121°C por 15 min, com exceção dos polímeros. Realizou-se o procedimento em condições estéreis em fluxo laminar de ar de modo a evitar contaminações. Adicionou-se uma concentração de  $1,5 \times 10^9$  esporos/g de polímero às matrizes de CMC<sub>média</sub> (1,5%), CMC<sub>média</sub>:NCC (1,5% e 0,25%, respectivamente), CMC<sub>baixa</sub> (3%) e CMC<sub>baixa</sub>:NCC (3% e 0,25%, respectivamente), com agitação por 30 minutos, em seguida a dispersão foi uniformemente espalhada em placas de Petri como pode ser visto na Figura 4 (a e b) e submetida a um processo de secagem em estufa a 30°C, ao longo de 48 horas.

**Figura 4** – Procedimento realizado para incorporação do microrganismo nas matrizes poliméricas, a) agitação da dispersão polimérica + *T. harzianum* no agitador mecânico; b) dispersão espalhada em placa de Petri.



Fonte: arquivo pessoal (2023)

#### 4.4.3. Ensaio de crescimento em placa com meio nutriente de PDA

Para avaliar o crescimento do microrganismo encapsulado, foram adicionados pequenos pedaços de filmes (5 mm de diâmetro) ao centro de uma placa de Petri (meio PDA) e seu crescimento foi acompanhado por 6 dias. Foram avaliados os esporos encapsulados versus o esporo livre com intuito de investigar se o desenvolvimento do fungo seria afetado pelo encapsulamento. Os filmes foram adicionados as placas dentro do fluxo laminar para evitar a contaminação. O experimento foi realizado em triplicata.

#### 4.4.4. Ensaio de liberação do microrganismo

Foi realizado a liberação do *T. harzianum* a partir da matriz polimérica. Nesse procedimento, uma quantidade 0,01 g do material encapsulado (equivalente a  $1,5 \times 10^9$  esporos/g de polímero) foi adicionada a frascos Erlenmeyer 125mL, contendo 10 mL de uma solução salina de NaCl a 0,85%. Os frascos foram acondicionados em incubadora orbital, mantida a 30°C e 250 rpm. Em intervalos de tempo de 2, 24 e 48 h, foram retiradas alíquotas de 100 µL para subsequente contagem dos esporos por meio de contagem em câmara de Neubauer. Cabe ressaltar que este ensaio foi executado em duplicatas biológicas, ou seja, utilizando dois frascos Erlenmeyer por cada filme estudado, e triplicatas analíticas para cada amostra biológica, visando reforçar a robustez e confiabilidade dos resultados obtidos.

#### 4.4.5. Viabilidade do microrganismo durante o armazenamento

Os filmes com o microrganismo encapsulado foram armazenados em sacos zip lock e mantidos em duas condições de temperatura distintas: 4 °C em um refrigerador e em temperatura ambiente, ao longo de um período de 3 meses. Amostras desses filmes foram retiradas nos tempos de 0, 1, 2 e 3 meses para análise. Para a determinação do número de células nos filmes, 0,1 g de material foi cortado em pequenos pedaços e transferido para Erlenmeyers contendo 50 mL de solução salina NaCl 0,85%. A liberação dos microrganismos foi realizada durante um período de 2 horas a 30 °C. As amostras foram então submetidas a diluições seriadas e inoculadas em meio PDA, onde as colônias formadas foram contadas após 24 horas de incubação a 28 °C. O número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama foi calculado utilizando o método de contagem em placa (através da equação 3). Os ensaios foram realizados em triplicata para garantir a precisão dos resultados.

A fórmula para o cálculo do número de UFC por grama utilizando o método de contagem em placa é expressa pela seguinte equação:

$$\frac{UFC}{g} = \frac{n^{\circ} \text{ colônias} \times FD \times \text{Diluição seriada} \times \text{Volume de extração}}{\text{Massa seca de extração}} \quad (3)$$

Essa equação baseia-se na relação entre o volume adicionado (volume de extração) a uma massa conhecida da formulação produzida (massa seca de extração). Uma alíquota dessa

solução é plaqueada em diferentes diluições seriadas, e a diluição (Diluição seriada) na qual a contagem adequada das colônias é determinada ( $n^{\circ}$  colônias) (entre 6 e 60 unidades formadoras de colônias para 20  $\mu$ l pipetados), a equação é aplicada.

O Fator de Diluição (FD) é utilizado como um fator de correção devido aos 100  $\mu$ l normalmente plaqueados por esta técnica. Neste estudo, para otimização dos recursos e tempo experimental, as placas de Petri foram divididas em 4 e foram pipetados 20  $\mu$ l, resultando em um FD constante e adimensional para este trabalho, obtido pela Equação 4.

$$FD = \frac{\text{volume total}}{\text{volume pipetado}} = \frac{100\mu\text{l}}{20\mu\text{l}} = 50 \quad (4)$$

#### 4.5. REVESTIMENTO DOS GRÂNULOS DE FERTILIZANTE FOSFATO MONOAMÔNICO (MAP)

##### 4.5.1. Preparo e revestimento de MAP com as matrizes poliméricas e microrganismo.

Os grânulos de fosfato monoamônico (MAP), com diâmetro variando entre 2,8 e 3,3 mm, foram fornecidos pela Adubos Vera Cruz Ltda. Para a preparação do revestimento, contendo CMC, NCC e *T. harzianum*, todos os materiais (béqueres, espátulas, placas de Petri, ponteiros e haste de agitação) foram previamente autoclavados a 121°C por 15 min, com exceção dos polímeros. Realizou-se o procedimento em condições estéreis em fluxo laminar de ar de modo a evitar contaminações.

Uma concentração de  $1,5 \times 10^9$  esporos/g de polímero foi adicionada às matrizes de CMC<sub>média</sub> (1,5%) e ao nanocompósito CMC<sub>média</sub>:NCC (1,5% e 0,25%, respectivamente), com agitação por 30 minutos. Dois tipos de revestimento foram realizados: o primeiro consistindo em uma única camada das matrizes de CMC<sub>média</sub> + microrganismo e o nanocompósito CMC<sub>média</sub>:NCC + microrganismo (MAP1CMC<sub>média</sub> + MO e MAP1CMC<sub>média</sub>:NCC+MO); o segundo, com duas camadas, onde a primeira camada consistia apenas nas matrizes poliméricas de CMC<sub>média</sub> e CMC<sub>média</sub>:NCC, enquanto a segunda camada incluía CMC<sub>média</sub> + microrganismo e CMC<sub>média</sub>:NCC + microrganismo, respectivamente (MAP2CMC<sub>média</sub> + MO e MAP2CMC<sub>média</sub>:NCC+ MO).

Foram adicionados 10% em massa da dispersão polimérica (m polímero/m fertilizante) em 150 g de grânulos de MAP. O processo de revestimento de grânulos fertilizantes foi realizado conforme ilustrado na Figura 5. Seguindo a metodologia de Bortoletto-Santos e colaboradores (2016), inicialmente, 150 g de grânulos de MAP foram colocados dentro de uma drageadeira, girando a 30 rpm sob fluxo de ar aquecido entre 30 e 35°C. As dispersões (CMC, NCC e microrganismo) preparadas previamente foram adicionadas sobre os grânulos de MAP com auxílio de uma espátula. A morfologia da camada formada nos grânulos foi analisada MEV.

Além disso, realizou-se o revestimento de grânulos MAP com calda de açúcar e microrganismo. Para tal, adicionou-se 10 g de sacarose em 100 mL de água a 100°C, quando a temperatura atingiu 30°C adicionou-se 6,6 mL de *T. harzianum* (concentração de  $1,5 \times 10^9$  esporos/g de sacarose) na formulação. Em seguida realizou-se o mesmo procedimento de revestimento detalhado anteriormente.

**Figura 5** – Processo de revestimento de grânulos MAP com as formulações poliméricas + microrganismo, grânulos dentro da drageadeira sob ar aquecido a 30-35°C.



Fonte: arquivo pessoal (2023)

#### 4.5.2 Ensaio de crescimento em placa

Para avaliar o crescimento do microrganismo no revestimento, foram adicionados grânulos de MAP com diâmetro 3,3 mm ao centro de uma placa de Petri contendo meio de cultura de aveia. Optou-se pelo uso do meio de cultura de aveia devido a uma substituição do fornecedor do meio de cultura de PDA (Ágar de Batata-Dextrose) que se mostrou ineficaz no

suporte ao crescimento de *T. harzianum*, portanto, o meio de cultura de aveia comercial foi empregado, uma vez que este demonstrou ser eficaz para o crescimento do fungo. O crescimento do microrganismo foi observado ao longo de 6 dias. Os grânulos revestidos com uma e duas camadas das matrizes CMC e CMC:NCC, bem como a camada de calda de açúcar, foram avaliados com intuito de investigar se o desenvolvimento do fungo seria afetado pelo revestimento. Os grânulos foram adicionados às placas dentro do fluxo laminar para evitar a contaminação. O experimento foi realizado em triplicata.

Posteriormente, o mesmo procedimento foi repetido após 1 mês do revestimento dos grânulos MAP, com o objetivo de avaliar o crescimento do microrganismo nos diferentes tipos de revestimento durante o armazenamento.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Preparação dos filmes poliméricos

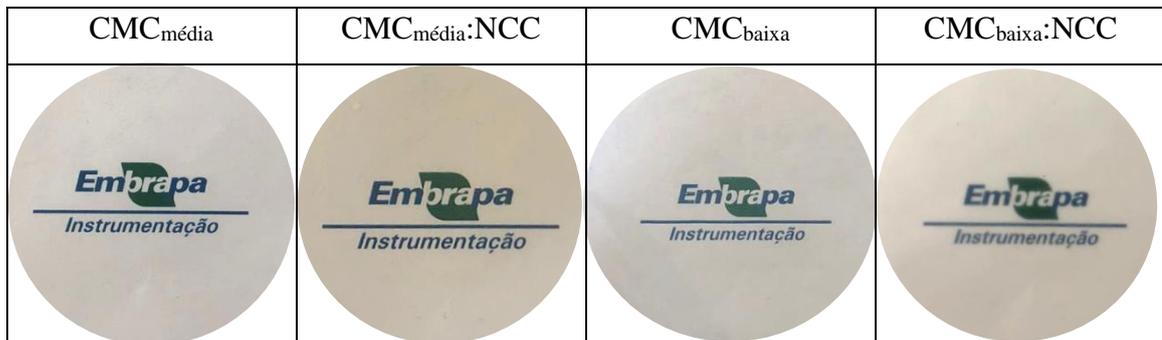
A Tabela 1 exibe as formulações iniciais desenvolvidas com base no estudo de Brondi e colaboradores (2022), visando selecionar as matrizes mais adequadas para o encapsulamento do agente de biocontrole *T. harzianum*. Esta análise foi realizada visualmente, inicialmente foram consideradas várias concentrações tanto de CMC (baixa e média viscosidade) quanto dos NCCs. As matrizes que produziram filmes com boa aparência e manuseabilidade, do ponto de vista visual, foram selecionadas, para determinar a maior concentração viável de se manipular da CMC de média viscosidade e a menor concentração viável de se trabalhar da CMC de baixa viscosidade e então adicionar a menor concentração de NCC nessas matrizes. É importante ressaltar que a dificuldade em homogeneizar a CMC e os NCCs foi um fator relevante na escolha dessas matrizes. Portanto, as concentrações de 1,5% de CMC de média viscosidade (CMC<sub>média</sub>), 3% de CMC de baixa viscosidade (CMC<sub>baixa</sub>) e 0,25% de nanocristais de celulose (NCC) foram escolhidas para dar continuidade à pesquisa.

As matrizes de CMC<sub>média</sub> (1,5%), CMC<sub>média</sub>:NCC (1,5% e 0,25%, respectivamente), CMC<sub>baixa</sub> (3%) e CMC<sub>baixa</sub>:NCC (3% e 0,25%, respectivamente) produziram filmes de boa aparência (Figuras 6 e 7). Foi possível observar que os filmes com somente CMC são transparentes enquanto os filmes nanocompósitos CMC<sub>média</sub>:NCC e CMC<sub>baixa</sub>:NCC foram translúcidos. A diferença na transparência dos filmes de somente CMC em comparação com

os filmes do compósito está relacionada às propriedades ópticas e à estrutura microscópica dos materiais (Gomes, et al., 2022)

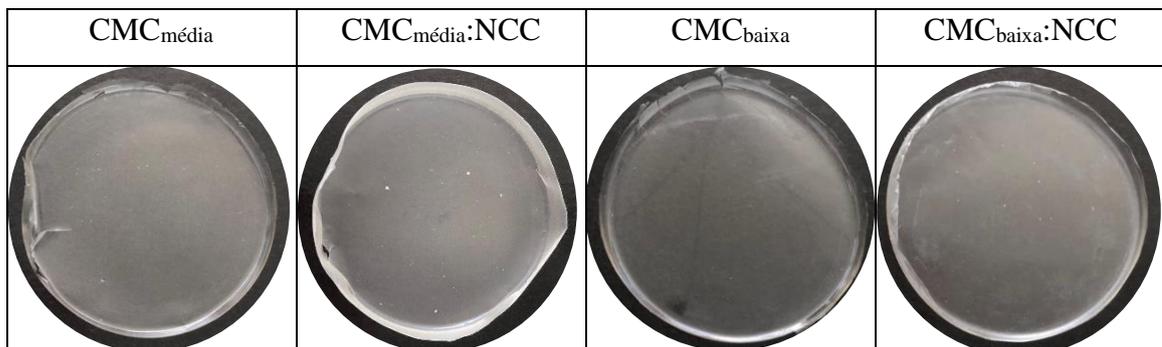
Filmes de CMC puro são transparentes, pois durante a formação do filme, as cadeias de CMC têm a tendência de se organizar em uma estrutura amorfa. Isso reduz a dispersão da luz no filme e ajuda a manter a transparência (Gomes, et al., 2022). Por outro lado, a adição de NCC nos filmes de CMC pode alterar levemente a transparência dos filmes, pois os NCC têm uma estrutura cristalina, com uma alta razão de aspecto. Quando incorporados em filmes de CMC, esses nanocristais podem se agrupar ou não se dispersar uniformemente na matriz polimérica. Aglomerados, agregados e até mesmo fibras de NCC podem dispersar a luz de maneira mais eficaz, resultando em um filme menos transparente (Gomes, et al., 2022).

**Figura 6** - Transparência dos filmes poliméricos das matrizes de CMC e CMC:NCC



Fonte: arquivo pessoal (2023)

**Figura 7** - Aparência dos filmes poliméricos das matrizes de CMC e CMC:NCC.



Fonte: arquivo pessoal (2023)

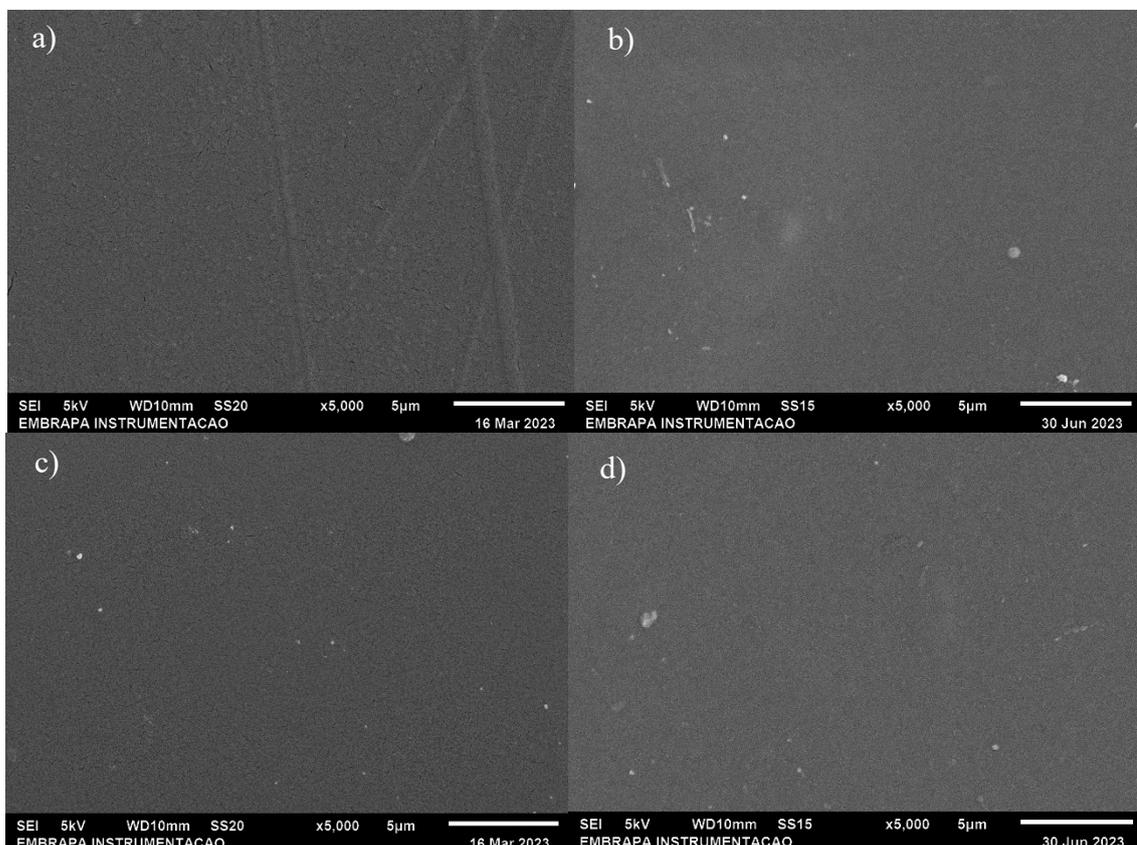
## 5.1. CARACTERIZAÇÕES

Os materiais produzidos ( $CMC_{\text{média}}$ ,  $CMC_{\text{média}}:NCC$ ,  $CMC_{\text{baixa}}$  e  $CMC_{\text{baixa}}:NCC$ ) foram caracterizados quanto a sua morfologia e características físico-químicas, térmicas e mecânicas.

### 5.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia dos filmes observados na Figura 8 mostraram que os filmes com somente  $CMC_{\text{média}}$  e  $CMC_{\text{baixa}}$ , apresentaram superfície lisa, compacta, regular e sem defeitos aparentes dentro dos limites de detecção do equipamento. Os filmes dos nanocompósitos  $CMC_{\text{média}}:NCC$  e  $CMC_{\text{baixa}}:NCC$  apresentaram na superfície a presença de alguns particulados. Isto pode estar relacionado ao método de preparação, considerando a dificuldade em homogeneizar a CMC e a NCC juntas.

**Figura 8** – Micrografias por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das superfícies dos filmes a)  $CMC_{\text{média}}$ , b)  $CMC_{\text{média}}:NCC$ , c)  $CMC_{\text{baixa}}$  e d)  $CMC_{\text{baixa}}:NCC$ .



### 5.1.2 Análise de Termogravimetria (TGA)

A análise de TGA é uma técnica que mede a variação da massa de uma amostra em função da temperatura (Redfern et al., 1994). No contexto dos filmes poliméricos sem e com microrganismo, a TGA pode fornecer informações sobre a estabilidade térmica do material, indicando a temperatura na qual ocorrem processos de degradação.

As Tabelas 2 e 3 apresentam os principais eventos térmicos dos filmes de CMC puros (baixa e média viscosidade) e dos nanocompósitos ( $\text{CMC}_{\text{média}}:\text{NCC}$  e  $\text{CMC}_{\text{baixa}}:\text{NCC}$ ) sem e com microrganismo (MO). As curvas de TGA e DTG dos filmes sem e com MO, podem ser visualizados nas Figura 9 e 10 (a e b). Os gráficos com índice a) são referentes os materiais sem microrganismo e os gráficos com índice b) referentes aos materiais com microrganismo.

Com base nos dados contidos nas Tabelas 2 e 3, foi possível observar que todos os filmes apresentaram pelo menos três estágios de degradação térmica. E, em todos os filmes, tanto os filmes sem MO (Figuras 9a e 10a) quanto os filmes com MO (Figuras 9b e 10b), foi observada uma fase de evaporação de água entre 40°C e 160°C. A perda de massa durante essa etapa se deve principalmente à evaporação da umidade livre ou ligada, influenciada pela natureza hidrofílica dos materiais (Oun; Rhim, 2017).

Todos os materiais apresentaram um primeiro evento de degradação térmica ocorrendo acima de 220°C, com perdas de massa entre ~12 e ~15%. Essas perdas podem ser atribuídas à degradação das cadeias laterais do polissacarídeo e à liberação de CO<sub>2</sub> (El-sayed et al., 2011).

No segundo evento de degradação térmica, também ocorreu uma perda de massa para todos os filmes entre ~ 24 a ~26%, essas perdas de massa ocorreram devido à decomposição das cadeias principais do polímero (Mallakpour et al., 2015). É notável que a temperatura inicial do primeiro e segundo evento de degradação térmica para os filmes nanocompósitos  $\text{CMC}_{\text{média}}:\text{NCC}$  sem e com MO (~235°C e ~264°C/ 274°C, respectivamente) foram menores em comparação aos filmes de  $\text{CMC}_{\text{média}}$  sem e com MO (~245°C e 268°C/ 278°C). Essa diferença pode ser atribuída à presença de grupos sulfato na superfície do NCC hidrolisado com ácido sulfúrico, que reduziram a estabilidade térmica da celulose devido a reações de desidratação (Kargarzadeh et al., 2012; Mariano et al., 2016; Morais et al., 2013).

**Tabela 2** - Temperatura inicial de degradação, temperatura máxima de degradação e resíduo para amostras obtidas sem microrganismo.

<b>Amostra</b>	<b>Temperatura inicial de degradação (°C)</b>	<b>Temperatura Máxima de degradação (°C)</b>	<b>Resíduo (%)</b>
CMC <sub>média</sub>	245	268	13
	268	316	26
CMC <sub>média</sub> :NCC	235	264	12
	264	320	27
CMC <sub>baixa</sub>	225	253	13
	253	310	24
CMC <sub>baixa</sub> :NCC	225	253	13
	253	310	24

**Tabela 3** - Temperatura inicial de degradação, temperatura máxima de degradação e resíduo para amostras obtidas com microrganismo.

<b>Amostra</b>	<b>Temperatura inicial de degradação (°C)</b>	<b>Temperatura Máxima de degradação (°C)</b>	<b>Resíduo (%)</b>
CMC <sub>média</sub> +MO	245	278	16
	278	328	24
CMC <sub>média</sub> :NCC+MO	235	274	13
	274	335	26
CMC <sub>baixa</sub> +MO	225	265	14
	265	335	26
CMC <sub>baixa</sub> :NCC+MO	225	265	16
	265	335	25

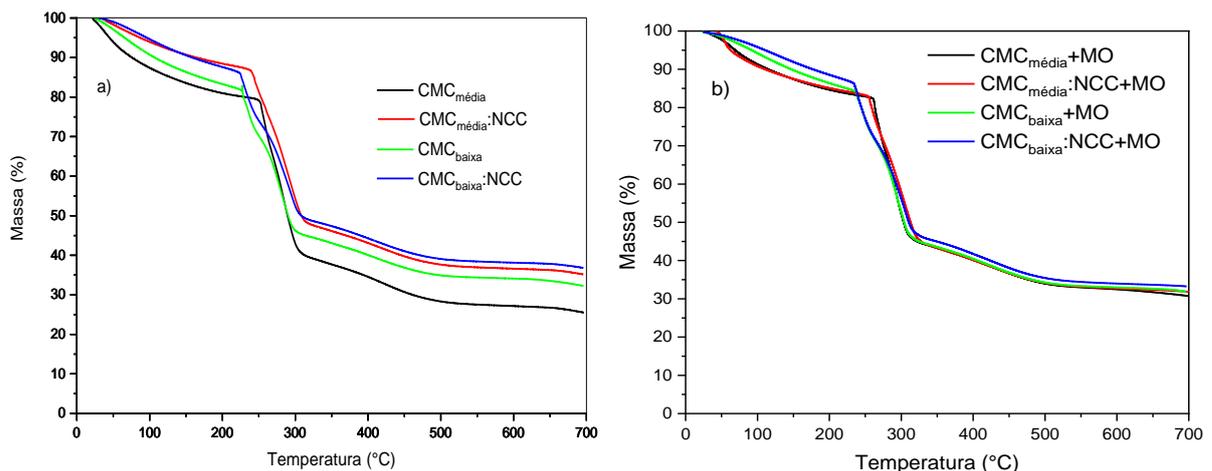
Analisando os filmes de CMC<sub>média</sub> sem e com MO e os filmes CMC<sub>baixa</sub>, sem e com MO, observa-se que os filmes CMC<sub>baixa</sub> sem e com MO tiveram uma temperatura inicial de degradação menor, explicada pela diferença entre as viscosidades dos polímeros. Polímeros com viscosidade mais alta se degradam a temperaturas mais elevadas, como no caso do CMC<sub>média</sub>, cuja viscosidade é 2040 cps. Isso ocorre porque materiais com viscosidade mais alta possuem uma estrutura mais compacta, o que torna mais difícil para o calor penetrar no material e causar decomposição (Obele, et al., 2021; Hashmi et al., 2020; McMullen et al., 2020, Morais, 2016). Dessa forma, os filmes de CMC de baixa viscosidade (CMC<sub>baixa</sub>) são menos estáveis termicamente do que os filmes de CMC de média viscosidade (Obele, et al., 2021; Hashmi et al., 2020; McMullen. et al., 2020, Morais, 2016).

Com base nos dados referentes a degradação térmica dos materiais sem MO é possível afirmar que houve melhora na estabilidade térmica dos nanocompósitos, devido às interações

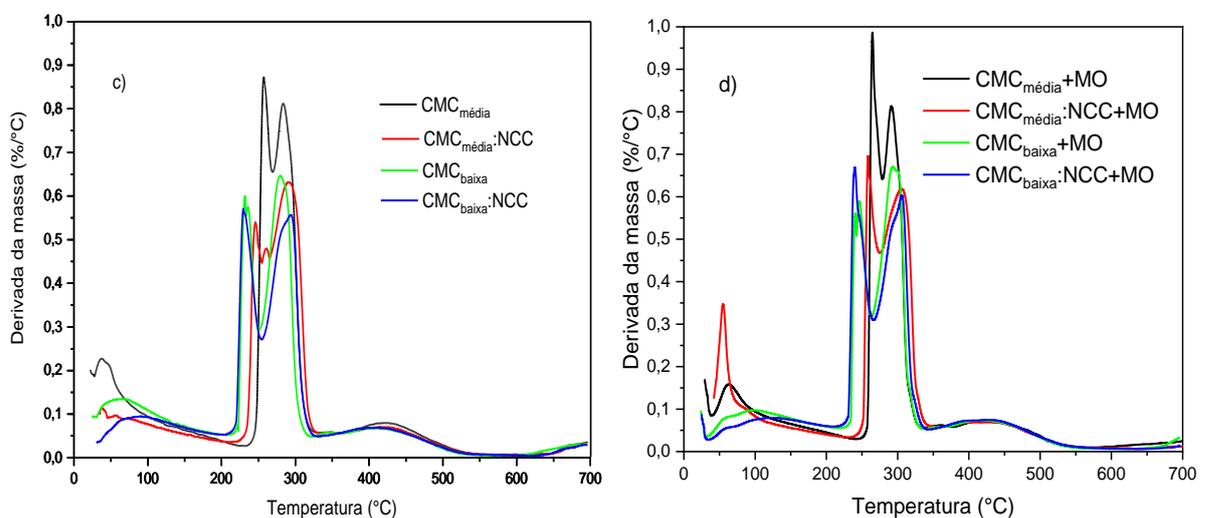
entre o NCC e a matriz de CMC (Bonardd et al., 2018; Yadav et al., 2020). Além disso, houve uma redução de 10% na perda total de massa para o filme  $\text{CMC}_{\text{média}}:\text{NCC}$  e 5% para o filme  $\text{CMC}_{\text{baixa}}:\text{NCC}$ . Isso pode ser atribuído à formação de ligações de hidrogênio entre a CMC e o NCC, conforme indicado por Mandal & Chakrabarty (2019).

A Adição do microrganismo na matriz polimérica resultou em um comportamento semelhante entre os filmes sem e com MO. Com uma ressalva nas curvas de perda de massa, que houve uma semelhança no perfil das matrizes. As curvas ficaram praticamente sobrepostas como pode ser visto na Figura 9b, demonstrando que houve uma interação entre o microrganismo e as matrizes poliméricas. Para uma análise mais detalhada, faz-se necessário a realização do mesmo experimento para a fungo isolado.

**Figura 9** – a) Curva TG dos filmes de  $\text{CMC}_{\text{média}}$ ,  $\text{CMC}_{\text{média}}:\text{NCC}$ ,  $\text{CMC}_{\text{baixa}}$  e  $\text{CMC}_{\text{baixa}}:\text{NCC}$ , b) Curva TG dos filmes de  $\text{CMC}_{\text{média}}+\text{MO}$ ,  $\text{CMC}_{\text{média}}:\text{NCC}+\text{MO}$ ,  $\text{CMC}_{\text{baixa}}+\text{MO}$  e  $\text{CMC}_{\text{baixa}}:\text{NCC}+\text{MO}$ .



**Figura 10** – c) Curva DTG dos filmes de  $\text{CMC}_{\text{média}}$ ,  $\text{CMC}_{\text{média}}:\text{NCC}$ ,  $\text{CMC}_{\text{baixa}}$  e  $\text{CMC}_{\text{baixa}}:\text{NCC}$ , d) Curva DTG dos filmes de  $\text{CMC}_{\text{média}}+\text{MO}$ ,  $\text{CMC}_{\text{média}}:\text{NCC}+\text{MO}$ ,  $\text{CMC}_{\text{baixa}}+\text{MO}$  e  $\text{CMC}_{\text{baixa}}:\text{NCC}+\text{MO}$ .



### 5.1.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A DSC é uma técnica que mede a diferença de calor absorvido ou liberado por uma amostra em relação a uma referência, conforme a temperatura é alterada (Redfern et al., 1994). No caso dos filmes poliméricos sem e com microrganismo, a DSC pode ser usada para analisar a estabilidade térmica dos materiais e as interações do microrganismo com a matriz polimérica.

Na tabela 6 pode ser visualizado os principais eventos térmicos dos filmes de CMC puros (média e baixa viscosidade) e dos nanocompósitos ( $\text{CMC}_{\text{média}}:\text{NCC}$  e  $\text{CMC}_{\text{baixa}}:\text{NCC}$ ) sem e com microrganismo (MO). As curvas de DSC dos filmes sem e com MO, são apresentados na Figura 11 (a e b), respectivamente.

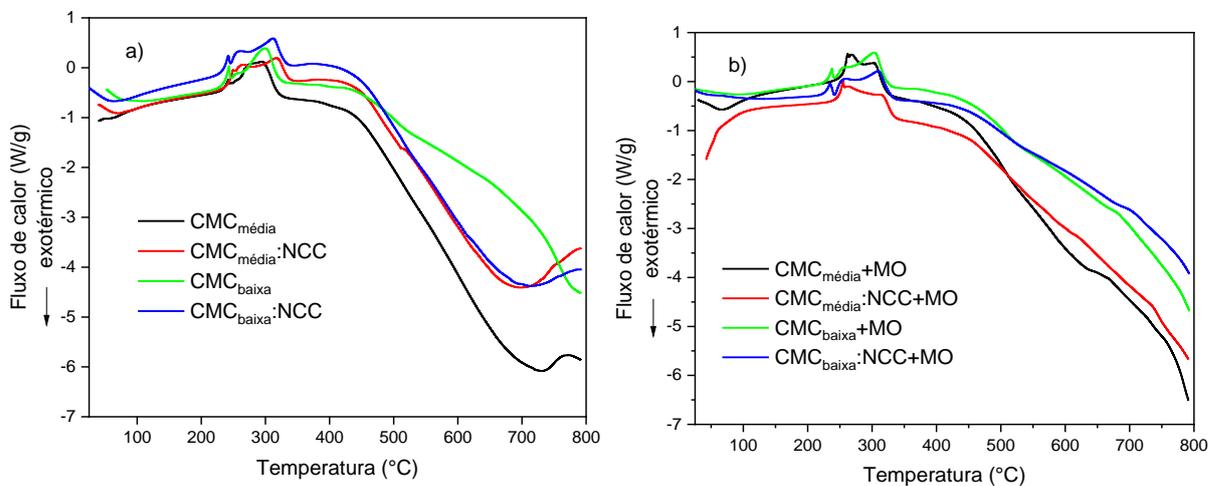
Com base nos dados contidos na Tabela 6 relacionados aos filmes sem MO, foi possível observar que todos os filmes apresentaram um pico endotérmico em 80-247°C. Esses picos estão relacionados à evaporação da umidade absorvida e água ligada das amostras (Voronova et al., 2012; Li et al., 2020). Também ocorreu um segundo pico endotérmico em 247- 340°C, esse pico está relacionado com a degradação térmica da celulose (Li et al., 2020).

De acordo com os dados da Tabela 6, relacionados aos filmes com MO, foi observado a presença de um pico endotérmico em 150-240°C para os filmes de  $\text{CMC}_{\text{baixa}}+\text{MO}$  e  $\text{CMC}_{\text{baixa}}:\text{NCC}+\text{MO}$ , que corresponde a evaporação da umidade dos materiais (Voronova et al., 2012; Li et al., 2020). E todos os filmes com MO tiveram um pico em 150-340°C que está relacionado a degradação das amostras (Li et al., 2020). Comparando os filmes de  $\text{CMC}_{\text{média}}+\text{MO}$  e o nanocompósito  $\text{CMC}_{\text{média}}:\text{NCC}+\text{MO}$ , pode-se observar que a temperatura do pico de degradação térmica para o nanocompósito  $\text{CMC}_{\text{média}}:\text{NCC}+\text{MO}$  (254°C) foi inferior ao do filme de  $\text{CMC}_{\text{média}}+\text{MO}$  (260°C). Esse resultado pode ser atribuído a presença de grupos sulfatos dos NCCs (Tan et al., 2015; Li et al., 2020).

Comparando os filmes de CMC (baixa e média viscosidade), os nanocompósitos ( $\text{CMC}_{\text{média}}:\text{NCC}$  e  $\text{CMC}_{\text{baixa}}:\text{NCC}$ ) sem e com microrganismo (MO) foi possível observar que os filmes apresentaram um comportamento semelhante. As diferenças observadas estão associadas com a presença e/ou interação entre os microrganismos e as matrizes poliméricas.

**Tabela 4** – Curvas de DSC dos filmes de CMC e CMC:NCC sem e com microrganismo.

DSC	Filmes	Temperatura (°C)	Principais observações
	CMC <sub>média</sub> CMC <sub>média</sub> :NCC	80 – 247	Pico endotérmico (evaporação de água) maior intensidade para os filmes de CMC <sub>baixa</sub> e CMC <sub>baixa</sub> :NCC
	CMC <sub>baixa</sub> CMC <sub>baixa</sub> :NCC	247- 340	Pico endotérmico (degradação dos materiais)
	CMC <sub>baixa</sub> +MO CMC <sub>baixa</sub> :NCC+MO	150 - 240	Pico endotérmico (evaporação de água)
	CMC <sub>média</sub> :NCC+MO CMC <sub>baixa</sub> +MO CMC <sub>baixa</sub> :NCC+MO	150 - 340	Pico endotérmico (degradação dos materiais)

**Figura 11** – a) Curvas de DSC dos filmes de CMC<sub>média</sub>, CMC<sub>média</sub> NCC, CMC<sub>baixa</sub> e CMC<sub>baixa</sub>:NCC e b) dos filmes de CMC<sub>média</sub>+MO, CMC<sub>média</sub>:NCC+MO, CMC<sub>baixa</sub>+MO e CMC<sub>baixa</sub>:NCC+MO.

#### 5.1.4 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A FTIR é uma técnica utilizada para analisar a composição química do material e identificar grupos funcionais presentes (Schmitt & Flemming, 1998). No contexto deste estudo de filmes poliméricos sem e com microrganismo, a FTIR pode ser utilizada também para avaliar as interações químicas entre os componentes do filme e os microrganismos.

Os espectros FTIR dos filmes formados a partir da dispersão dos materiais (CMC<sub>média</sub>, CMC<sub>baixa</sub>, NCC sem e com microrganismo) em água contidos na Figura 12 (a e b), exibiram bandas características da celulose e evidenciaram uma semelhança na estrutura química entre a CMC e os NCCs o que condiz com a literatura (Li, et al., 2020, El Achaby, et al., 2018).

No caso dos filmes de CMC puros, as bandas a  $3329\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas ao alongamento de grupos hidroxilas -OH da celulose (Li et al., 2020; El Achaby, et al., 2018, Brondi et al., 2022). As bandas em  $2886\text{ cm}^{-1}$  correspondem à vibração de estiramento C-H (Abdulkhani, et al., 2016), enquanto as bandas de absorção em  $1594\text{ cm}^{-1}$  são devidas às vibrações assimétrica de alongamento do grupo carboxilato (Zhang, 2013). As duas bandas localizadas em  $1411\text{ cm}^{-1}$  e  $1323\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas a vibrações de alongamento - CH<sub>2</sub> e flexão -OH, respectivamente. As bandas que se estendem entre  $1035$  e  $802\text{ cm}^{-1}$  são associadas ao alongamento C=O no esqueleto polissacarídeo (Yadollahi; Namazi, 2014).

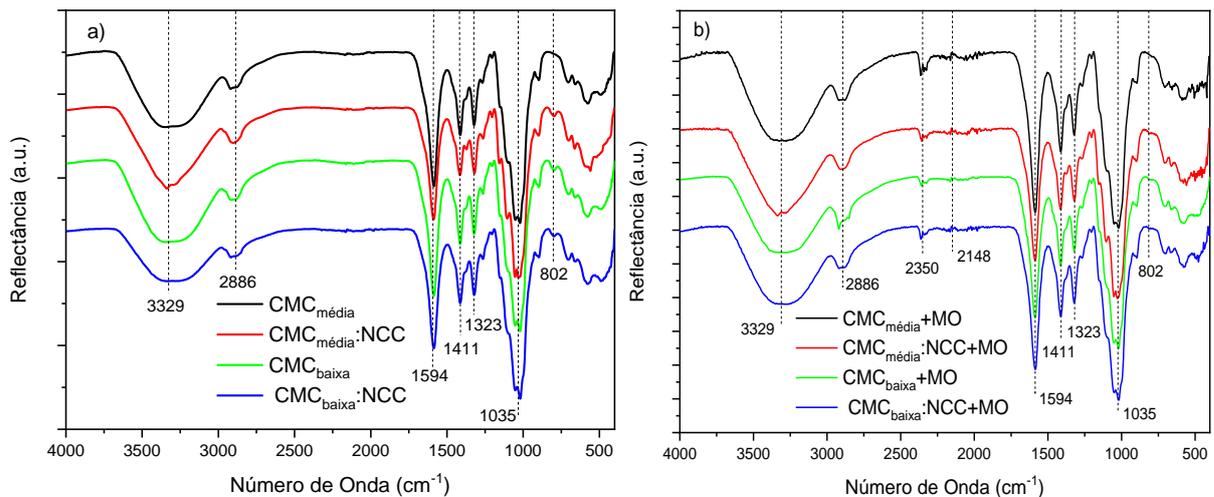
Após a incorporação dos NCCs nas matrizes, não foram observadas alterações significativas nos espectros dos nanocompósitos CMC<sub>média</sub>:NCC e CMC<sub>baixa</sub>:NCC (Figura 12). Essa ausência de variação pode ser explicada pela similaridade entre as estruturas químicas da CMC e NCC. Foi observado que os picos de ambos os materiais ficaram praticamente sobrepostos no espectro com uma ressalva no compósito CMC<sub>baixa</sub>:NCC, onde houve uma diminuição na intensidade das bandas do grupo -OH em  $3329\text{ cm}^{-1}$  e a banda do grupo -COO em  $1594\text{ cm}^{-1}$  foi enfraquecida. Isso pode ser explicado pela formação de ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila e carboxila na CMC, bem como aos abundantes grupos hidroxila que estão presentes na superfície do NCC. Resultados semelhantes foram previamente reportados na literatura (Almasi et al., 2010, El Miri, et al., 2015, El Achaby, et al., 2018).

Quando o fungo *T. harzianum* foi encapsulado nas matrizes de CMC e CMC:NCC (Figura 12b) observou-se a presença de dois picos em torno de  $2350\text{ cm}^{-1}$  e  $2148\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída a ligações de nitrogênio do tipo amida, resultantes do estiramento C-N e das deformações N-H, presentes no grupamento amida. O grupamento amida pode estar presente nos aminoácidos que constituem os microrganismos (Bet et al., 2001).

Essa observação indica uma possível alteração na composição química ou nas interações moleculares na presença do fungo *T. harzianum*, o que pode ser relevante para a caracterização e compreensão das propriedades dos filmes poliméricos encapsulados. Para um estudo mais aprofundado, seria necessário realizar análises adicionais, como FTIR mais detalhada (uma curva apenas do *T. harzianum*).

É relevante destacar que em um estudo conduzido por Maruyama e colaboradores (2020), foi observada a presença de um único pico e um deslocamento para  $3681\text{ cm}^{-1}$ , indicativos de interação entre o fungo e as micropartículas durante o processo de encapsulamento de *T. harzianum* em esferas de alginato.

**Figura 12** – a) Espectros FTIR dos filmes de  $\text{CMC}_{\text{média}}$ ,  $\text{CMC}_{\text{média}}:\text{NCC}$ ,  $\text{CMC}_{\text{baixa}}$  e  $\text{CMC}_{\text{baixa}}:\text{NCC}$  e b) dos filmes de  $\text{CMC}_{\text{média}}+\text{MO}$ ,  $\text{CMC}_{\text{média}}:\text{NCC}+\text{MO}$ ,  $\text{CMC}_{\text{baixa}}+\text{MO}$  e  $\text{CMC}_{\text{baixa}}:\text{NCC}+\text{MO}$ .



### 5.1.5 Análise Mecânica

A análise mecânica desempenha um papel fundamental na avaliação das propriedades dos filmes poliméricos utilizados no processo de encapsulamento de microrganismos na agricultura, garantindo resistência, flexibilidade e integridade para suportar manuseio, armazenamento e aplicação, protegendo eficazmente os microrganismos. A adição de agentes de reforço, como NCCs, pode otimizar esses parâmetros, resultando em filmes nanocompósitos com melhores propriedades mecânicas para prevenir o colapso do material (Oun & Rhim, 2016; El Miri et al., 2015; Oun & Rhim, 2015).

O efeito da incorporação de NCCs nas propriedades mecânicas de filmes à base de  $\text{CMC}_{\text{média}}$  foi avaliado. Vale ressaltar que não foi realizado o experimento para os filmes de  $\text{CMC}_{\text{baixa}}$  e  $\text{CMC}_{\text{baixa}}:\text{NCC}$ , devido à dificuldade em fazer as amostras para a análise.

Os resultados dessas análises são apresentados na Tabela 2. A partir desses resultados, é notável que o filme nanocompósito ( $\text{CMC}_{\text{média}}:\text{NCC}$ ) apresentou parâmetros mecânicos superiores em relação ao biopolímero  $\text{CMC}_{\text{média}}$  puro, à exceção do alongamento na ruptura,

confirmando assim a influência positiva da inclusão de NCC nas propriedades mecânicas desejadas para o biopolímero CMC<sub>média</sub>.

O filme de CMC<sub>média</sub> puro apresentou uma resistência à tração de 52,23 MPa, um módulo de elasticidade de 1980,8 MPa e um alongamento na ruptura de 6,58%, indicando que o filme de CMC<sub>média</sub> é rígido com flexibilidade moderada. Esses parâmetros mecânicos estão de acordo com os relatados na literatura para CMC<sub>média</sub> puro (El Achaby et al., 2018).

Após a adição de NCC, o filme nanocompósito apresentou um considerável aumento na resistência à tração, atingindo 94,39 MPa, e no módulo de elasticidade, com valor de 2886 MPa, conforme apresentado na Tabela 5. Esta acentuada melhoria na resistência à tração e módulo de elasticidade é atribuída principalmente a fortes interações interfaciais entre os grupos hidroxila e carboxila do biopolímero CMC e os grupos hidroxila do NCC por meio da formação de ligações de hidrogênio (El Miri et al., 2015). Ademais, a introdução de novos grupos sulfato na superfície do NCC por meio do processo de hidrólise ácida pode induzir a formação de novas ligações de hidrogênio intermoleculares, resultando em um aumento adicional das interações interfaciais. Estudos anteriores têm enfatizado um notável aprimoramento nas propriedades mecânicas de filmes de CMC mediante a incorporação de NCC (Oun & Rhim, 2016; El Miri et al., 2015; Oun & Rhim, 2015).

Em relação ao alongamento na ruptura, uma tendência distinta foi observada no filme nanocompósito (CMC<sub>média</sub>:NCC). A adição de NCC resultou em uma diminuição no alongamento na ruptura de 6,58% (filme de CMC puro) para 2,95% (CMC<sub>média</sub>:NCC). Esta redução pode ser atribuída à presença do NCC como um agente nanométrico de reforço, que limita a mobilidade das cadeias macromoleculares da CMC durante a deformação, promovendo, assim, um aprimoramento no módulo de tração e na resistência do filme nanocompósito resultante, ao mesmo tempo que reduz o alongamento na ruptura.

Resultados semelhantes foram encontrados por El Achaby e colaboradores (2018), onde o filme puro de CMC exibiu um módulo de elasticidade de 1057 MPa e uma resistência à tração de 52 MPa. Com a incorporação de 5% em peso de NCC, houve um significativo aumento dessas propriedades para 2423 MPa no módulo de elasticidade e 91 MPa na resistência à tração. Bem como para outros biopolímeros, incluindo poli(álcool vinílico)/CMC (El Achaby et al., 2017) e CMC (Oun & Rhim, 2016). Ressalta-se que concentrações de NCC acima de 5% podem diminuir as propriedades mecânicas. Esse fenômeno é provavelmente atribuído à aglomeração do NCC, que reduz as interações (El Achaby et al., 2018).

**Tabela 5** - Propriedades mecânicas dos filmes de CMC<sub>média</sub> e CMC<sub>média</sub>:NCC.

Filmes	Resistência à tração	Módulo de Elasticidade	Alongamento na ruptura
	(MPa)	(MPa)	(%)
CMC <sub>média</sub>	52,23 ± 5,59 B	1980,8 ± 297,76 B*	6,58 ± 1,66 A**
CMC <sub>média</sub> :NCC	94,39 ± 8,13 A	2886,0 ± 506 A*	2,95 ± 1,38 B**

Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). A letra acompanhada de (\*) e (\*\*) são referentes a estatística do Módulo de Elasticidade e Alongamento na ruptura, respectivamente.

### 5.1.6 Grau de intumescimento e solubilidade

A análise do grau de intumescimento e de solubilidade é importante para entender como os filmes poliméricos interagem com o meio ambiente. Isso permite determinar a capacidade do filme de absorver água e sua estabilidade quando exposto a líquidos (Bortolin et al., 2013) o que é crucial para garantir a eficácia do encapsulamento dos microrganismos e sua proteção durante o armazenamento e aplicação. Nesse contexto, o presente estudo investigou tais parâmetros visando compreender a dinâmica da matriz à base de CMC<sub>média</sub> reforçada com NCC no que diz respeito à capacidade de absorção de água e estabilidade estrutural.

Observou-se que a CMC<sub>média</sub> apresentou um notável aumento no grau de intumescimento nos primeiros 30 minutos do ensaio. Tal comportamento é previsível devido à reconhecida hidrofiliabilidade da CMC, uma característica que vem sendo explorada na agricultura, onde é aplicada como hidrogel superabsorvente para retenção de água no solo (Zheng et al., 2015).

Analisando a Figura 13a, observa-se um maior GI da matriz de CMC<sub>média</sub> pura em comparação ao nanocompósito (CMC<sub>média</sub>:NCC). Esse aumento pode ser atribuído à incorporação de NCC, que resultou em uma rede polimérica mais densa e reduziu a capacidade de absorção de água (Seefeldt, 2014).

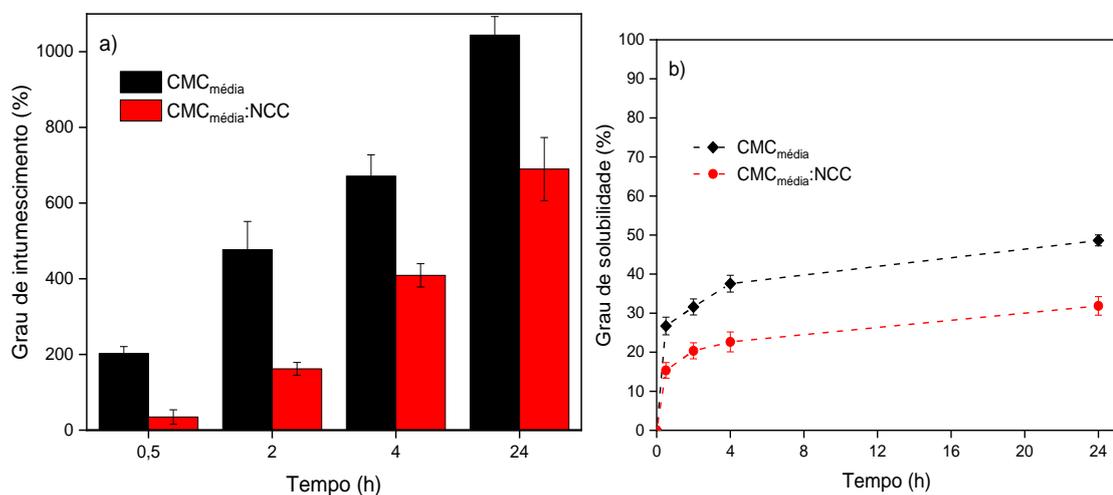
Yang e colaboradores (2013) conduziram um estudo que evidenciou os benefícios dos hidrogéis injetáveis reforçados com NCCs. Nesse estudo, foi observada uma maior elasticidade e menor intumescimento desses hidrogéis quando comparados aos géis não reforçados. Os hidrogéis não reforçados apresentaram um aumento de massa de  $310 \pm 5\%$ , enquanto os hidrogéis reforçados com nanocristais apresentaram um inchaço mais controlado, com aumento de massa de  $260 \pm 5\%$ . É importante destacar que taxas mais elevadas de

intumescimento estão intrinsecamente ligadas a uma maior entrada de água nas redes poliméricas, as quais se expandem mais facilmente.

Em relação ao grau de solubilidade (Figura 13b), observou-se que os filmes de CMC<sub>média</sub> puro apresentaram maiores taxas de solubilidade em comparação com os filmes nanocompósitos CMC<sub>média</sub>:NCC. O grau de solubilidade é uma medida da quantidade de massa de um material que se solubiliza durante o ensaio, e nesse contexto, taxas mais altas indicam uma maior susceptibilidade à dissolução.

A solubilidade dos filmes está diretamente relacionada à abertura de cadeias poliméricas e/ou ruptura de ligações químicas durante o ensaio (Seefeldt, 2014). Notavelmente, os filmes de CMC<sub>média</sub> puro exibiram maiores graus de solubilidade, sugerindo uma maior propensão à degradação ou dissolução dos materiais. Por outro lado, os filmes nanocompósitos CMC<sub>média</sub>:NCC mostraram os menores graus de solubilidade, indicando uma maior estabilidade estrutural e uma menor suscetibilidade à dissolução. Esses resultados são consistentes com estudos anteriores que investigaram os efeitos dos NCCs na estabilidade de materiais poliméricos. Por exemplo, De Paula e colaboradores (2011) estudaram a influência dos NCCs na degradação hidrolítica do poli(D,L-lactídeo), PDLLA, em meio de tampão fosfato. Eles observaram que a presença dos nanocristais induziu a uma diminuição na velocidade de degradação da matriz polimérica, sugerindo uma maior estabilidade estrutural e uma menor suscetibilidade à degradação. Esses resultados são consistentes com a menor solubilidade observada nos filmes nanocompósitos CMC<sub>média</sub>:NCC neste estudo, indicando que a incorporação de NCC na matriz de CMC contribuiu para uma maior resistência à dissolução e, portanto, para uma maior estabilidade dos filmes.

**Figura 13** – a) Perfis de intumescimento, acompanhado nos tempos de 0,5, 2, 4 e 24 horas, dos filmes de CMC<sub>média</sub> e CMC<sub>média</sub>:NCC; b) Perfis de solubilidade dos filmes de CMC<sub>média</sub> e CMC<sub>média</sub>:NCC.



A Figura 13 (a e b), mostra que as matrizes  $CMC_{m\u00e9dia}$  e  $CMC_{m\u00e9dia}:NCC$ , apresentaram grau de intumescimento de 1044% e 689,88% e solubilidade de 49% e 32%, respectivamente em 24 horas. Isso permite afirmar que mesmo em porcentagens pequenas os NCCs influenciaram o perfil de intumescimento e solubilidade dos materiais o que est\u00e1 de acordo com o estudo realizado por Yang e colaboradores (2013).

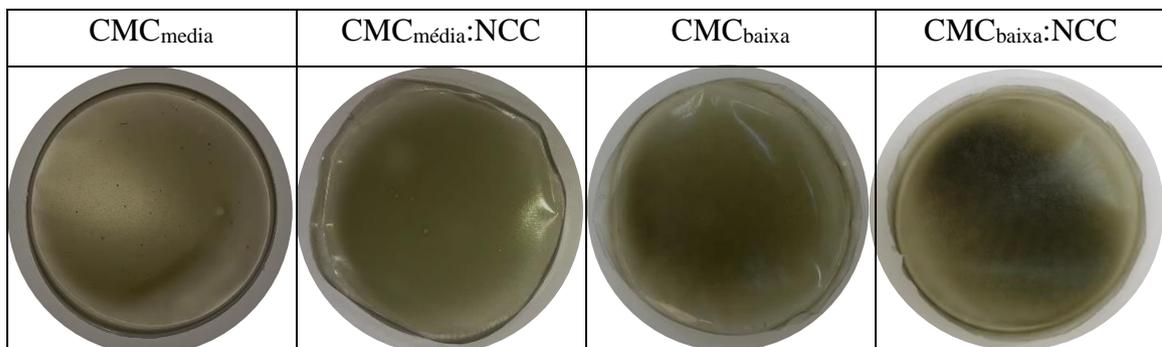
Em uma an\u00e1lise prospectiva voltada para o encapsulamento microbiano pode-se dizer previamente, que a matriz de  $CMC_{m\u00e9dia}$  puro possivelmente apresentar\u00e1 uma libera\u00e7\u00e3o mais r\u00e1pida dos microrganismos no meio, devido as altas taxas de intumescimento e solubilidade. Em contrapartida, a matriz do comp\u00f3sito  $CMC_{m\u00e9dia}:NCC$  ter\u00e1 libera\u00e7\u00e3o mais controlada, devido as taxas menores de intumescimento e solubilidade (Yao et al., 2020). Vale salientar que n\u00e3o foi poss\u00edvel realizar o mesmo experimento para a matriz de  $CMC_{baixa}$  e  $CMC_{baixa}:NCC$ , pois a mesma se solubilizou completamente em menos de 30 minutos.

## 5.2. ENCAPSULAMENTO DO MICRORGANISMO

### 5.2.1 Caracteriza\u00e7\u00e3o do Microrganismo encapsulado

Ap\u00f3s o encapsulamento do microrganismo nas matrizes polim\u00e9ricas de CMC e nos nanocomp\u00f3sitos  $CMC:NCC$ , foi poss\u00edvel observar que n\u00e3o houve altera\u00e7\u00f5es nos aspectos visuais dos filmes e os mesmos continuaram homog\u00eaneos, demonstrando que todas as matrizes foram eficientes no encapsulamento do *T. harzianum* conforme pode ser observado na Figura 14.

**Figura 14** – Apar\u00eancia dos filmes com o *T. harzianum* incorporado nas matrizes de CMC puras e nos nanocomp\u00f3sitos  $CMC:NCC$ .

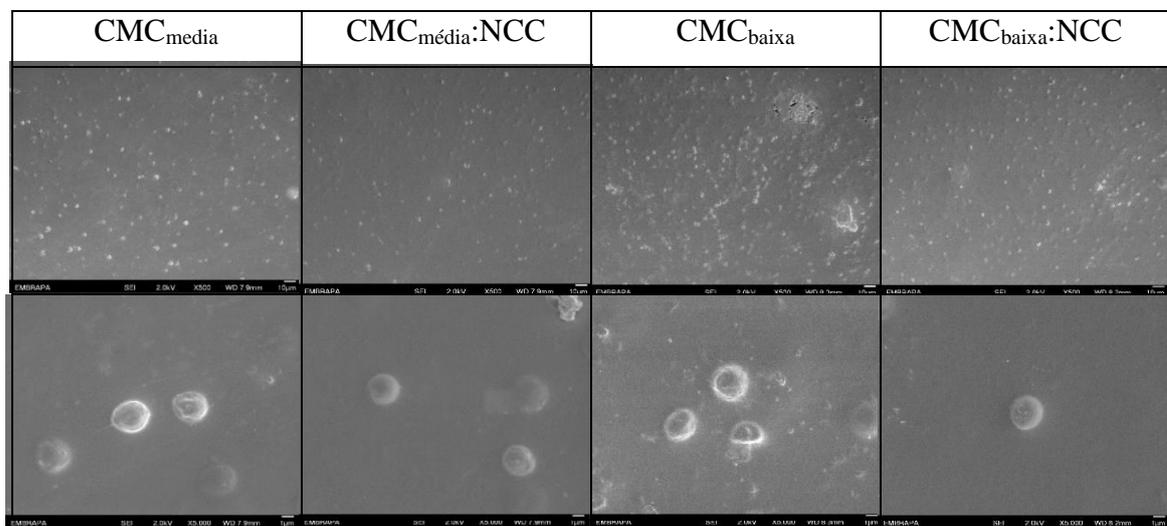


Fonte: arquivo pessoal (2023)

### 5.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Através das imagens MEV apresentadas na Figura 15 foi possível observar a presença dos esporos do *T. harzianum* em todas as matrizes de encapsulamento. Os esporos de *T. harzianum* exibiram um tamanho de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$ , o que está em consonância com o tamanho médio mencionado na literatura (Muñoz-Celay, et al., 2012).

**Figura 15** - Imagens MEV do *T. harzianum* encapsulado nas matrizes de CMC<sub>média</sub>, CMC<sub>média</sub>:NCC, CMC<sub>baixa</sub> e CMC<sub>baixa</sub>:NCC.

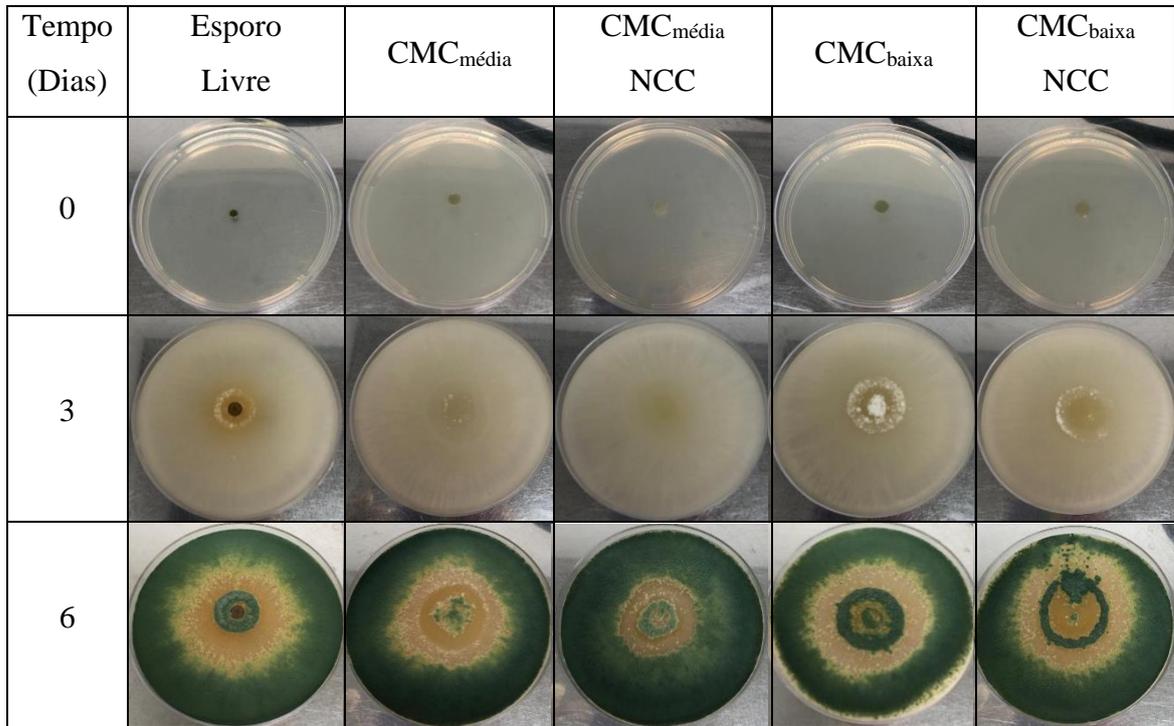


### 5.2.3 Crescimento em placa

Na Figura 16, foi possível visualizar o efeito do encapsulamento no crescimento do *T. harzianum* em placas de Petri contendo meio nutritivo PDA. Os filmes de CMC puros e os filmes nanocompósitos, nos quais o microrganismo foi incorporado, foram armazenados em temperatura ambiente e os esporos livres suspensos em solução salina (0,85%) foram armazenados sob refrigeração. Analisando as imagens, foi possível observar que todas as condições apresentaram taxas de crescimento similares.

É importante salientar que o material utilizado nessa etapa estava armazenado em temperatura ambiente por um período de 1 mês antes da realização do experimento. O bom desenvolvimento do fungo indica potencial da matriz polimérica em proteger o microrganismo durante o armazenamento.

**Figura 16** - Crescimento do *T. harzianum* em placa, 6 dias, esporo livre e filmes de CMC<sub>média</sub>, CMC<sub>média</sub>:NCC, CMC<sub>baixa</sub> e CMC<sub>baixa</sub>:NCC.



Fonte: arquivo pessoal (2023)

Entretanto, com base nesse experimento não foi possível escolher as melhores matrizes, uma vez que todas as matrizes se mostraram eficientes tanto no encapsulamento quanto no crescimento do microrganismo. Entre os resultados discutidos até o momento, as matrizes de CMC<sub>média</sub> e o nanocompósito CMC<sub>média</sub>:NCC, demonstraram resultados satisfatórios em relação a resistência mecânica, estabilidade térmica, perfis de intumescimento e solubilidade mais lentos em água. Sendo assim, as matrizes de CMC<sub>média</sub> e o nanocompósito CMC<sub>média</sub>:NCC deram continuidade na pesquisa em relação aos ensaios de liberação do microrganismo, viabilidade celular no armazenamento de 3 meses e aplicação no revestimento de grânulos MAP.

#### 5.2.4 Liberação do Microrganismo

Uma matriz eficaz para revestimento deve garantir uma alta densidade celular, condições ideais para manter a viabilidade do microrganismo durante o armazenamento e um ambiente propício para sua liberação e desenvolvimento no solo (Ma, 2019). Nesse contexto, a matriz de CMC<sub>média</sub> e o nanocompósito CMC<sub>média</sub>:NCC foram avaliadas quanto à liberação

do *T. harzianum* em solução salina estéril (NaCl 0,85%) sob condições controladas de temperatura e agitação. O perfil de liberação dessas matrizes é ilustrado na Figura 17.

Foram adicionados 0,01 g do material encapsulado (equivalente a uma concentração de  $1,5 \times 10^9$  esporos/g de polímero) em frascos Erlenmeyer individuais, contendo 10 mL de uma solução salina (NaCl a 0,85%). Esse procedimento resultou em uma inoculação com uma densidade de  $1,5 \times 10^6$  esporos/mL na quantidade de 0,01 g do material. Após 2 horas de experimento, a matriz CMC<sub>média</sub> liberou  $7,5 \times 10^4$  esporos/mL enquanto a matriz do nanocompósito não apresentou liberação. Após 30 dias, a matriz CMC<sub>média</sub> liberou  $2,4 \times 10^6$  esporos/mL e o nanocompósito liberou  $1,1 \times 10^6$  esporos/mL.

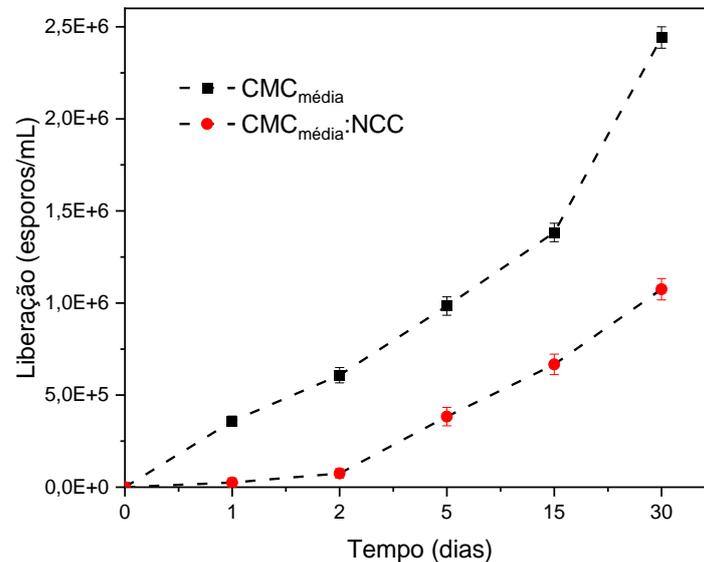
Observa-se na Figura 17 que apenas a partir do 12º dia houve liberação total das células na matriz de CMC<sub>média</sub> enquanto no nanocompósito CMC<sub>média</sub>:NCC essa liberação total não ocorreu mesmo após 30 dias. Isso sugere que as células estão adsorvidas e protegidas na estrutura da matriz, o que pode proporcionar um perfil de liberação celular controlado em condições de campo, sendo uma propriedade desejada para aplicação agrícola como inoculantes microbianos (Takei et al., 2018).

As altas taxas de intumescimento e maior solubilidade das formulações de CMC<sub>média</sub> podem ter contribuído para seu perfil de liberação mais pronunciado em comparação com as formulações de CMC<sub>média</sub>:NCC. Esses resultados estão relacionados à maior penetração de água nas redes poliméricas das formulações de CMC<sub>média</sub>, facilitando a liberação das células encapsuladas (Ma, 2019).

Esta discussão mostra que tanto os resultados do perfil de liberação celular quanto viabilidade no armazenamento são propriedades importantes e complexas das formulações, envolvendo a combinação e influência de diversos fatores de formas mais ou menos pronunciadas.

Além disso, o uso de NCCs influenciou o perfil de liberação, tornando a matriz mais densa e estruturada, o que reduziu a taxa de solubilização e prolongou a liberação do microrganismo encapsulado. Esse efeito está associado às propriedades da matriz, demonstrando o papel das alterações estruturais induzidas pela presença de NCC no perfil de liberação controlada do microrganismo (Kaboarani et al., 2017).

**Figura 17** – Perfil de liberação do microrganismo encapsulado nas matrizes de CMC<sub>média</sub> e CMC<sub>média</sub>:NCC, durante o período de 30 dias.



### 5.2.5 Viabilidade do microrganismo durante o armazenamento

A Figura 18 apresenta os resultados da viabilidade dos materiais encapsulados e do microrganismo (MO) livre, após 3 meses de armazenamento em temperatura ambiente e na geladeira a 4°C.

Os filmes de CMC<sub>média</sub> e CMC<sub>média</sub>:NCC armazenados na geladeira apresentaram os melhores resultados em relação a viabilidade durante o armazenamento, com valores de  $9,62 \times 10^8$  UFC/g e  $7,87 \times 10^8$  UFC/g, respectivamente, como pode ser visto na Tabela 8. Ambas as formulações perderam apenas 1 ordem de grandeza após 3 meses de armazenamento, enquanto as demais formulações, especialmente o microrganismo livre, apresentaram uma diminuição gradual na viabilidade ao longo do período estudado. Após os 3 meses, houve uma perda de três ordens de grandeza para o microrganismo livre armazenado em temperatura ambiente e duas ordens de grandeza para o microrganismo livre armazenado na geladeira a 4°C, em comparação com o início do experimento como pode ser visualizado na Figura 18.

**Tabela 6** - Viabilidade do *T. harzianum* encapsulados matrizes CMC<sub>média</sub> e CMC<sub>média</sub>:NCC, armazenado em temperatura ambiente e na geladeira por um período de 3 meses.

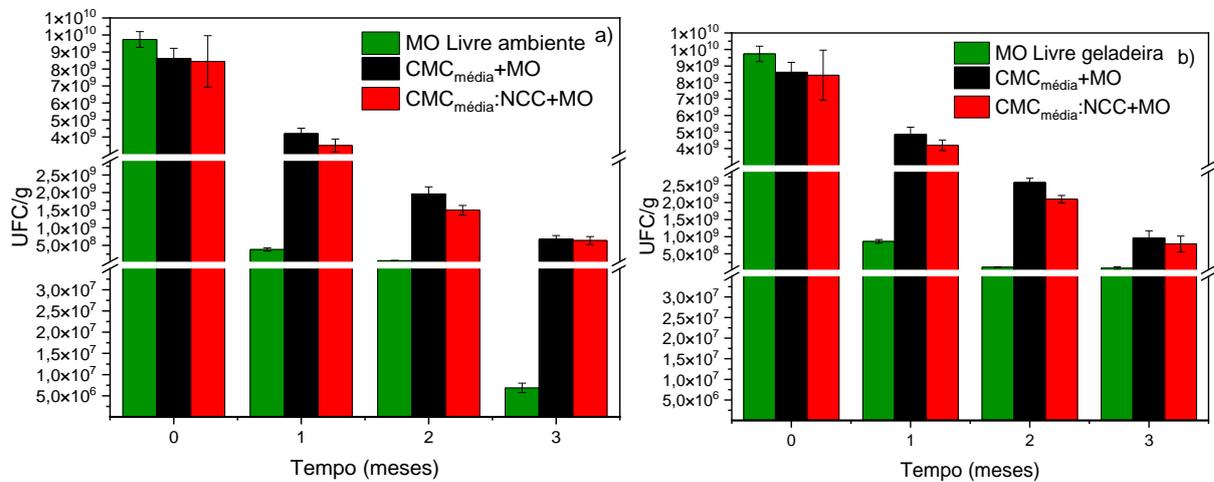
Armazenamento	Formulações	Concentração (UFC g <sup>-1</sup> )			
		0	1 mês	2 meses	3 meses
Temperatura Ambiente	MO livre+MO	9,73x10 <sup>9</sup>	3,81x10 <sup>8</sup>	6,37x10 <sup>7</sup>	6,87x10 <sup>6</sup>
	CMC <sub>média</sub> +MO	8,62x10 <sup>9</sup>	4,2x10 <sup>9</sup>	1,96x10 <sup>9</sup>	6,75x10 <sup>8</sup>
	CMC <sub>média</sub> :NCC+MO	8,44x10 <sup>9</sup>	3,5x10 <sup>9</sup>	1,5x10 <sup>9</sup>	6,37x10 <sup>8</sup>
Geladeira a 4°C	MO livre+MO	9,73x10 <sup>9</sup>	8,62x10 <sup>8</sup>	1,07x10 <sup>8</sup>	8,00x10 <sup>7</sup>
	CMC <sub>média</sub> +MO	8,62x10 <sup>9</sup>	4,85x10 <sup>9</sup>	2,58x10 <sup>9</sup>	9,62x10 <sup>8</sup>
	CMC <sub>média</sub> :NCC+MO	8,44x10 <sup>9</sup>	4,26x10 <sup>9</sup>	2,10x10 <sup>9</sup>	7,87x10 <sup>8</sup>

Quanto aos diferentes tipos de armazenamento (temperatura ambiente e geladeira a 4°C) utilizados neste estudo, observou-se que os filmes armazenados na geladeira a 4°C teve um impacto positivo na viabilidade celular, resultando nos melhores resultados. Por outro lado, os filmes armazenados em temperatura ambiente, as formulações apresentaram perdas de viabilidade mais significativas, especialmente o microrganismo livre.

Apesar das perdas de viabilidade observadas durante o armazenamento, as formulações de CMC<sub>média</sub> e CMC<sub>média</sub>:NCC demonstraram ser eficientes na manutenção da viabilidade durante o armazenamento. Durante o período de 3 meses, essas formulações conseguiram manter um número satisfatório de células viáveis, perdendo apenas uma ordem de grandeza, o que é um resultado significativo considerando o contexto da aplicação almejada para essas formulações, que é na agricultura.

A capacidade dessas formulações de manter uma boa viabilidade microbiana durante o armazenamento as torna candidatas promissoras para serem utilizadas como inoculantes microbianos. Este resultado é particularmente relevante, pois as concentrações de *Trichoderma* em produtos de biocontrole geralmente variam de 1x10<sup>5</sup> para 1x10<sup>9</sup> unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de produto (Sokhandani et al., 2016; Natsiopoulou et al., 2022).

**Figura 18** – Viabilidade do *T. harzianum* encapsulados matrizes CMC<sub>média</sub> e CMC<sub>média</sub>:NCC, armazenado por um período de 3 meses a) armazenado em temperatura ambiente b) armazenado na geladeira

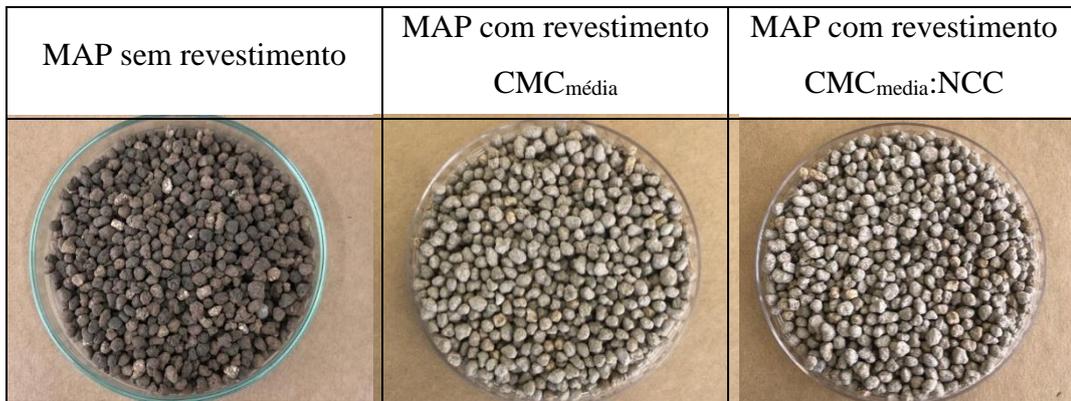


### 5.3 REVESTIMENTO DOS GRÂNULOS DE FERTILIZANTE FOSFATO MONOAMÔNICO (MAP)

#### 5.3.1 Preparo e revestimento de MAP com as matrizes de CMC, NCC e microrganismo.

Com base na Figura 19, foi possível realizar uma análise visual da aparência dos grânulos MAP sem e com revestimento. Os grânulos de MAP sem revestimento apresentam uma coloração amarronzada, enquanto os grânulos revestidos exibem uma aparência ligeiramente esbranquiçada, devido à presença do revestimento composto pelas matrizes poliméricas de CMC e CMC:NCC. As matrizes poliméricas foram eficientes no revestimento dos grânulos de MAP, pois foi possível visualizar aderência da camada de revestimento sobre os grânulos, como observado posteriormente nas imagens MEV.

**Figura 19** - Aparência dos grânulos de MAP sem revestimento e revestidos com as matrizes de  $CMC_{m\u00e9dia}$  e o nanocomp\u00f3sito  $CMC_{m\u00e9dia}:NCC$ .



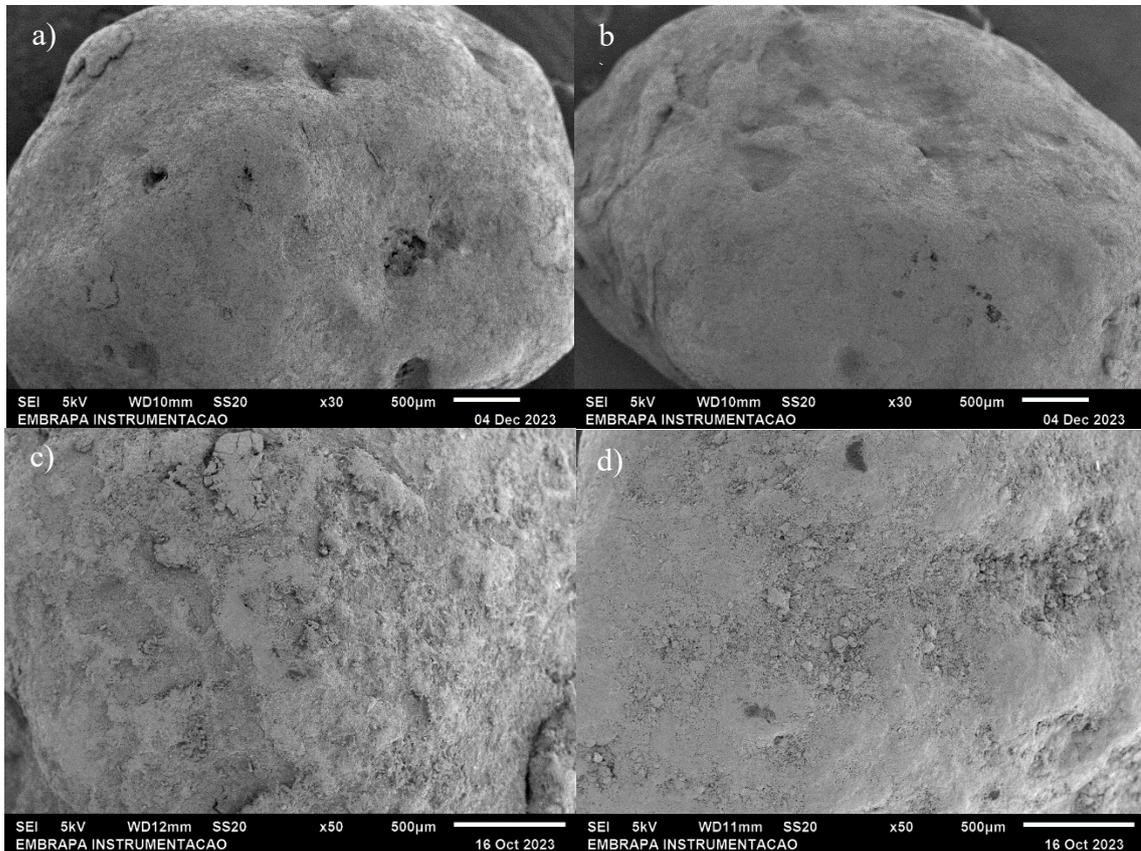
Fonte: arquivo pessoal (2023)

### 5.3.2 Caracteriza\u00e7\u00e3o morfol\u00f3gica por MEV dos gr\u00e2nulos de MAP

A Figura 20 (a, b, c e d) apresenta a superf\u00edcie dos gr\u00e2nulos de MAP sem e com a camada de revestimento das matrizes de CMC e CMC:NCC. As micrografias do MAP n\u00e3o revestido exibiu uma superf\u00edcie rugosa e presen\u00e7a de alguns poros, conforme mostrado nas Figuras 20a e 20c. Por outro lado, as Figuras 20b e 20d mostraram que a superf\u00edcie dos gr\u00e2nulos de fertilizantes ficou uniformemente coberta por uma camada, com espessura de 20,22nm, ap\u00f3s o processo de revestimento, com a presen\u00e7a de pequenas part\u00edculas espalhadas na superf\u00edcie do revestimento como mostrado na Figura 20d. Estas part\u00edculas distribu\u00eddas observadas podem ser originadas do p\u00f3 de fertilizante resultante de colis\u00f5es de gr\u00e2nulos girados durante o processo de revestimento.

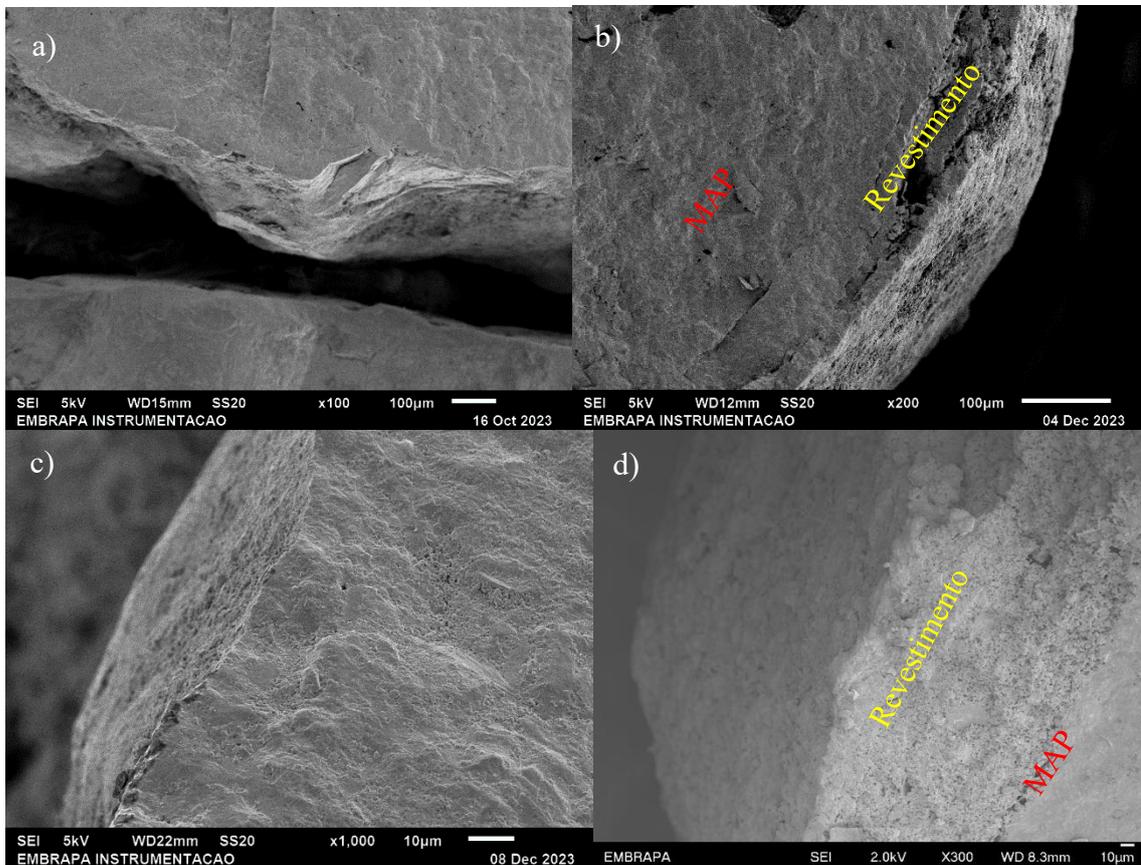
Al\u00e9m disso, nota-se que a espessura do revestimento contribuiu significativamente para reduzir as irregularidades da superf\u00edcie dos gr\u00e2nulos. Isso pode melhorar a propriedade de barreira do revestimento, reduzindo a penetra\u00e7\u00e3o de umidade, bem como a poeira gerada frequentemente devido \u00e0 presen\u00e7a de bordas e n\u00e3o uniformidades de produtos n\u00e3o revestidos (Liu et al., 2020).

**Figura 20** – Imagens MEV das superfícies dos grânulos de MAP a) MAP sem revestimento; b) MAP revestido com a matriz de  $CMC_{\text{média}}$ ; c) MAP sem revestimento; d) MAP revestido com a matriz de  $CMC_{\text{média}}:NCC$ .



Nas Figuras 21a, 21b, 21c e 21d, é exibido as fraturas dos grânulos MAP, sendo possível observar a camada de revestimento formada a partir das matrizes de  $CM_{\text{média}}$  e  $CMC_{\text{média}}:NCC$ . A camada de revestimento apresentou boa aplicabilidade, uniformidade e adesão sobre a superfície do grânulo de MAP, como pode ser visto nas Figuras 21b e 21d.

**Figura 21** – Imagens MEV das fraturas dos grânulos de MAP a) MAP sem revestimento; b) MAP revestido com a matriz de CMC<sub>média</sub>; c) MAP sem revestimento; d) MAP revestido com a matriz de CMC<sub>média</sub>:NCC.



### 5.3.3 Ensaio de crescimento em placa com meio nutritivo de aveia

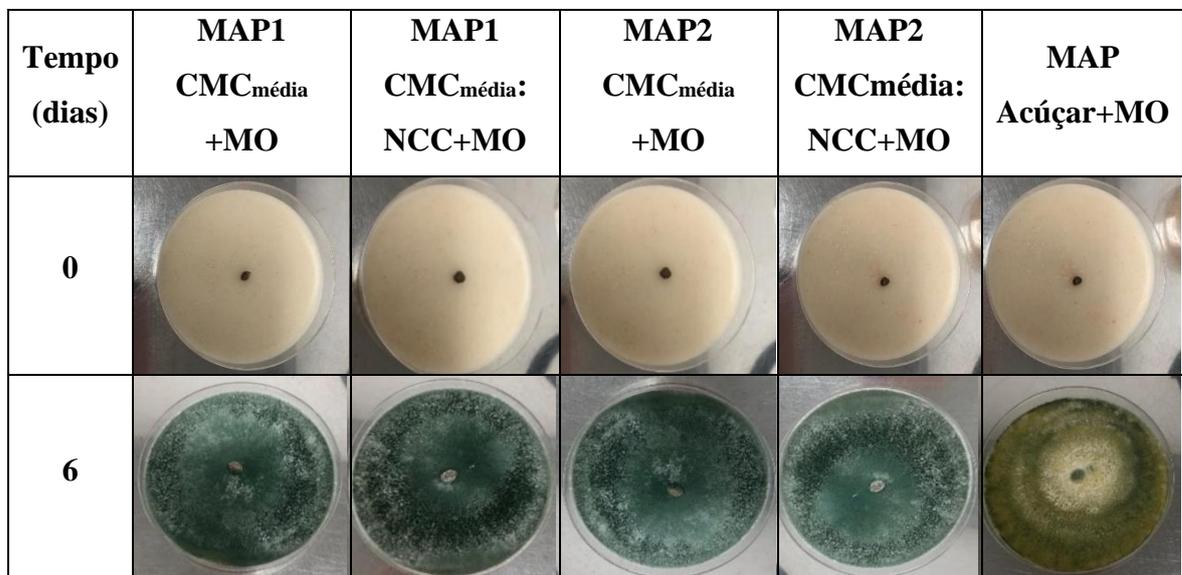
Na Figura 22 pode-se visualizar o efeito do revestimento de grânulos MAP no crescimento do *T. harzianum* em placas de Petri contendo meio nutritivo de aveia. Os grânulos revestidos, tanto com matrizes poliméricas (CMC e CMC:NCC) quanto com uma calda de açúcar, nos quais o microrganismo foi incorporado, foram armazenados em temperatura ambiente em dessecador por 24 horas antes de realizar o ensaio de crescimento em placa.

Analisando as imagens, foi possível observar que em todas as placas contendo os grânulos revestidos com a matriz polimérica + microrganismo houve o crescimento do fungo. Esse resultado está alinhado com os resultados previamente discutidos em relação ao fungo encapsulado nas matrizes poliméricas de CMC e CMC:NCC. Da mesma forma, os grânulos

revestidos com a calda de açúcar + microrganismo, também demonstraram crescimento do fungo.

Vale destacar que o ensaio foi realizado no primeiro dia após a completa secagem dos grânulos revestidos. A princípio, não foi possível observar diferenças entre os revestimentos poliméricos com uma ou duas camadas. No entanto, foi notada uma diferença na coloração das placas contendo matrizes poliméricas e calda de açúcar. Apesar disso, todas as condições foram eficazes no crescimento do *T. harzianum*.

**Figura 22** - Crescimento do *T. harzianum* em placa com meio nutritivo de aveia, 6 dias, grânulos de MAP revestidos em diferentes tratamentos, ensaio realizado após 24h do revestimento dos grânulos.



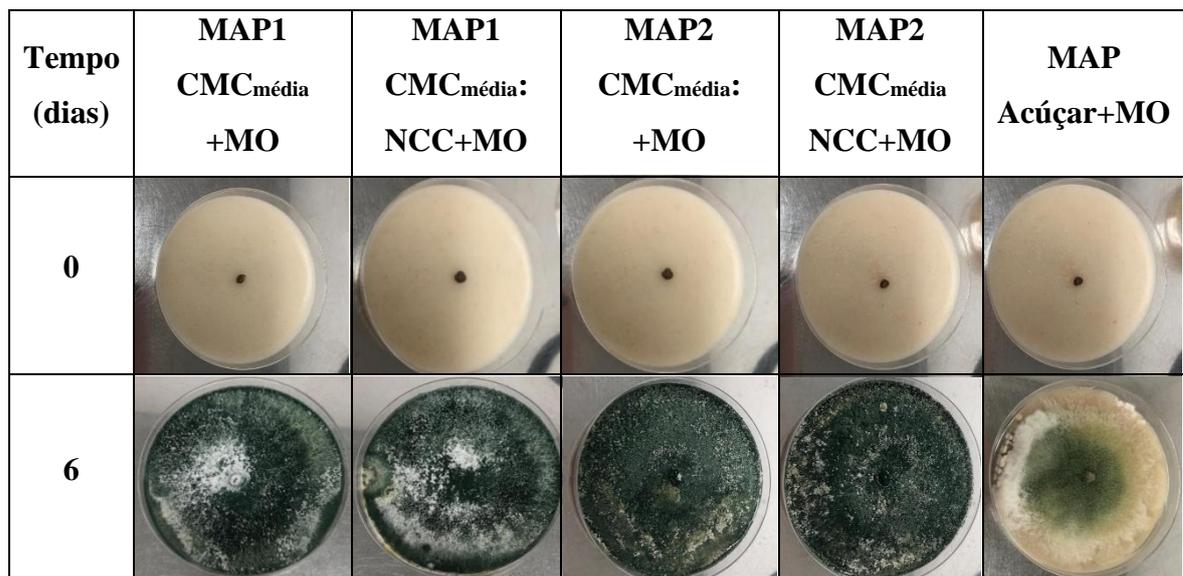
Após um período de 30 dias desde que os grânulos MAP haviam sido revestidos, foi realizado o mesmo experimento com o objetivo de avaliar o efeito do revestimento no crescimento do *T. harzianum* após o armazenamento. As imagens capturadas no primeiro e último dia do crescimento do fungo estão representadas na Figura 23. Este experimento proporcionou uma análise visual preliminar, no entanto, experimentos adicionais são necessários para uma avaliação mais abrangente.

A análise das imagens, considerando todas as condições de revestimento, após 6 dias de crescimento do fungo, revelou que não houve alteração na taxa de crescimento das hifas do fungo. No entanto, observou-se uma mudança na esporulação do fungo, sendo os grânulos revestidos com matrizes poliméricas + microrganismo associados a uma maior esporulação em comparação com os grânulos revestidos com a calda + microrganismo. Na literatura, foram identificados estudos relacionados ao uso de fontes de diferentes fontes de carbono,

nitrogênio e/ou substrato para aumentar a quantidade de esporos de *T. harzianum* (Rai & Tewari, 2016; Tewari & Bhanu 2004). Assim, um maior número de esporos pode ser considerado desejável, uma vez que os esporos são a forma de propagação do fungo e são frequentemente empregados em aplicações agrícolas para o controle de doenças de plantas.

Os resultados até aqui apresentados destacam a eficácia e o potencial de aplicação das matrizes poliméricas à base de CMC reforçadas com NCC como veículo de revestimento para o *T. harzianum* em grânulos de fertilizantes MAP. Além disso, essa abordagem oferece uma alternativa sustentável e ecologicamente correta para o controle de patógenos no solo, contribuindo para a promoção da agricultura sustentável e a redução do uso de pesticidas químicos. No entanto, são necessários estudos adicionais para uma compreensão mais abrangente do processo.

**Figura 23** - Crescimento do *T. harzianum* em placa com meio nutritivo de aveia, 6 dias, grânulos de MAP revestidos em diferentes tratamentos, ensaio realizado após 30 dias de armazenamento dos grânulos revestidos.



Fonte: arquivo pessoal (2023)

## 6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que foi possível desenvolver matrizes promissoras para encapsulamento microbiano. A adição de NCC nas matrizes de CMC afetou de forma positiva as características físicas, químicas e térmicas dos filmes produzidos. Entre as quatro matrizes estudadas, a matriz  $CMC_{média}$  e o nanocompósito  $CMC_{média}:NCC$  se sobressaíram ao apresentar melhores resultados em termos de resistência mecânica, estabilidade térmica, perfis de solubilidade mais lentos em água, liberação mais controlada do microrganismo a partir da matriz. Além de manter a viabilidade dos microrganismos ao longo do tempo, a aplicação dessas matrizes poliméricas para o revestimento de grânulos de fertilizantes MAP também teve impactos positivos no crescimento do fungo *T. harzianum*. Esses resultados destacam a eficácia desses materiais como veículos de revestimento para o *T. harzianum* em grânulos de fertilizantes MAP, destacando sua relevância na promoção da agricultura sustentável e na redução do uso de pesticidas químicos.

### SUGESTÕES PARA ETAPAS FUTURAS

Com base nos resultados promissores obtidos até o presente momento, sugerem-se algumas etapas futuras para a continuidade neste estudo:

- Realizar ensaio de viabilidade do microrganismo encapsulado dentro das matrizes poliméricas ao longo do armazenamento, em 6 meses.
- Conduzir estudos de campo para avaliar a eficácia das matrizes poliméricas como veículos de revestimento para o fungo *T. harzianum* em grânulos de fertilizantes MAP sob diferentes condições de cultivo e ambientes agrícolas.
- Realizar análises de ciclo de vida para avaliar o impacto ambiental da utilização dessas matrizes poliméricas como veículos de revestimento para o *T. harzianum* em comparação com os métodos convencionais de aplicação de pesticidas químicos.
- Realizar análises econômicas para avaliar a viabilidade financeira da produção em larga escala dessas matrizes poliméricas e sua implementação na agricultura comercial.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBEY JA, PERCIVAL D, ABBEY L, ASIEDU SK, PRITHIVIRAJ B, SCHILDER A. Biofungicidas como alternativa aos fungicidas sintéticos no controle do mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) – perspectivas e desafios. **Biocontrol sci**, v.29, p. 207-228, 2019.
- ALBUQUERQUE RB, SOUZA EL, STAMFORD TLM, STAMFORD TCM. Perspectiva e potencial aplicação de quitosana como inibidor de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos. **Rev. Iberoam. de Polím**, v. 10, p. 260-274, 2009.
- ALMASI, H. et al. Physicochemical properties of starch–CMC–nanoclay biodegradable films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 46, n. 1, p. 1-5, 2010.
- BADER, A. N.; SALERNO, G. L.; COVACEVICH, F.; CONSOLO, V. F. Native *Trichoderma harzianum* strains from Argentina produce indole-3 acetic acid and phosphorus solubilization, promote growth and control wilt disease on tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Journal of King Saud University-Science**, v. 32, n. 1, p. 867-873, 2020.
- BASHAN, Y., HOLGUIN, G., & DE-BASHAN, L. E. (2014). Azospirillum–plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). **Canadian Journal of Microbiology**, 50(8), 521-577.
- BET, M. R.; GOISSIS, G.; LACERDA, C. A. Characterization of Polyanionic Collagen Prepared by Selective Hydrolysis of Asparagine and Glutamine Carboxamide Side Chains. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 4, p. 1074–1079, dez. 2001. <https://doi.org/10.1021/bm0001188>
- Biológico, 7., 1992, São Paulo. Anais... São Paulo: **Instituto Biológico**, 1992. p. 1-6.
- BORELLI, L. M. F. Fertilizantes de eficiência aprimorada – perspectivas e potencial de uso de biopolímeros como matrizes de liberação lenta ou controlada. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Agrônoma) - Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2020.
- BORTOLETTO-SANTOS, R.; RIBEIRO, C.; POLITO, W. L. Controlled release of nitrogen-source fertilizers by natural-oil-based poly- (urethane) coatings: The kinetic aspects of urea release. **Journal of Applied Polymer Science.**, v. 133, p. 43790, 2016.

BORTOLIN, A. Desenvolvimento de nanocompósitos baseados em hidrogéis aplicados à liberação de nutrientes agrícolas. 90 p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

BRONDI M, FLORENCIO, C, MATTOSO L, RIBEIRO C, FARINAS, C. Encapsulation of *Trichoderma harzianum* with nanocellulose/carboxymethyl cellulose nanocomposite, **Carbohydr. Polym.**, v. 295, p. 119876, 2022.

CAMARERO-ESPINOSA, S.; BODAY, D. J.; WEDER, C.; FOSTER, E. J. Cellulose nanocrystal driven crystallization of poly (d, l-lactide) and improvement of the thermomechanical properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 10.

COSTA, C. L. Avaliação da disponibilidade de fósforo em fertilizantes encapsulados. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2021.

DE PAULA, E. L.; MANO, V.; PEREIRA, F. V. Influence of cellulose nanowhiskers on the hydrolytic degradation behavior of poly (d, l-lactide). **Polymer Degradation and Stability**, v. 96, n. 9, p. 1631-1638, 2011.

EHRENSTEIN, G. W. Faserverbund-Kunststoffe. Carl Hanser, Munich, 1992.

EL ACHABY, M.; EL MIRI, N.; HANNACHE, H.; GMOUH, S.; ABOULKAS, A. Production of cellulose nanocrystals from vine shoots and their use for the development of nanocomposite materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 592-600, 2018.

EL ASSIMI, T., BLAŽIĆ, R., VIDOVIĆ, E., RAIHANE, M., EL MEZIANE, A., BAOUAB, M. H. V., ... & LAHCINI, M. (2021). Polylactide/cellulose acetate biocomposites as potential coating membranes for controlled and slow nutrients release from water-soluble fertilizers. **Progress in Organic Coatings**, 156, 106255.

EL IDRISSE, A., EL GHARRAK, A., ACHAGRI, G., ESSAMLALI, Y., AMADINE, O., AKIL, A., ... & ZAHOUILY, M. (2022). Synthesis of urea-containing sodium alginate-g-poly (acrylic acid-co-acrylamide) superabsorbent-fertilizer hydrogel reinforced with carboxylated cellulose nanocrystals for efficient water and nitrogen utilization. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 10(5), 108282

EL MIRI, N. et al. Bio-nanocomposite films reinforced with cellulose nanocrystals: rheology of film-forming solutions, transparency, water vapor barrier and tensile properties of films. **Carbohydrate Polymers**, v. 129, p. 156-167, 2015.

ETESAMI, Hassan; MAHESHWARI, Dinesh K. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 156, p. 225-246, 2018.

FERNANDES JÚNIOR, P. I.; ROHR, T. G.; OLIVEIRA, P. J. D.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Polymers as carriers for rhizobial inoculant formulations. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 1184-1190, 2009.

FERNÁNDEZ-SANTOS, J. et al. Composites of cellulose nanocrystals in combination with either cellulose nanofibril or carboxymethylcellulose as functional packaging films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 211, p. 218-229, 2022.

FLORENCIO, C., BORTOLETTO-SANTOS, R., FAVARO, C. P., BRONDI, M. G., VELLOSO, C. C., KLAIC, R., ... & MATTOSO, L. H. (2022). Avanços na produção e formulação de inoculantes microbianos visando uma agricultura mais sustentável. **Química Nova**, 45, 1133-1145.

GOPALAKRISHNAN, S. et al. Formulations of plant growth-promoting microbes for field applications. In: ARORA, N. K.; MEHNAZ, S.; BALESTRINI, R. (Eds.). **Bioformulations for sustainable agriculture**, pp. 239-251, Springer, 2016.

GUOHUA Z, YA L, CUILAN F, MIN Z, CAIQIONG Z, ZONGDAO C. Water resistance, mechanical properties and biodegradability of methylated-cornstarch/poly(vinyl alcohol) blend film. **Polym Degrad Stab** v. 91, p. 703–711, 2006.

HASHMI, M.; ULLAH, S.; ULLAH, A.; AKMAL, M.; SAITO, Y.; HUSSAIN, N.; KIM, I. S. Optimized loading of carboxymethyl cellulose (CMC) in tri-component electrospun nanofibers having uniform morphology. **Polymers**, v. 12, n. 11, p. 2524, 2020.

HUQ, T.; FRASCHINI, C.; KHAN, A.; RIEDL, B.; BOUCHARD, J.; LACROIX, M. Alginate based nanocomposite for microencapsulation of probiotic: Effect of cellulose nanocrystal (CNC) and lecithin. **Carbohydrate Polymers**, v. 168, p. 61-69, 2017.

I. A. Sacui, R. C. Nieuwendaal, D. J. Burnett, S. J. Stranick, M. Jorfi, C. Weder, E. J. Foster, R. T. Olsson, J. W. Gilman. **Acs Appl. Mater. Inter.** 2014, 6, 6127.

JOHN, M. J.; THOMAS, S. Biofibres and biocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, n. 3, p. 343-364, 2008.

KALE, R. D.; GORADE, V. G. Aplicação potencial de resíduos de algodão medicinal para compósito auto-reforçado. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 124, p. 25-33, 2019.

KASSEM, I., ABLOUH, E. H., EL BOUCHTAOUI, F. Z., KASSAB, Z., KHOULOU, M., SEHAQUI, H., ... & EL ACHABY, M. (2021). Cellulose nanocrystals-filled poly (vinyl alcohol) nanocomposites as waterborne coating materials of NPK fertilizer with slow release and water retention properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, 189, 1029-1042.

KONO H, FUJITA S, OEDA I. Comparative study of homogeneous solvents for the esterification crosslinking of cellulose with 1,2,3,4-butanetetracarboxylic dianhydride and water absorbency of the reaction products, **J. Appl. Polym. Sci**, v. 127, p. 478–486, 2013.

LI, H. et al. Preparation and characterization of carboxymethyl cellulose-based composite films reinforced by cellulose nanocrystals derived from pea hull waste for food packaging applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 4104-4112, 2020.

LIEBNER F, PIRCHER N, ROSENAU T. Bacterial NanoCellulose Aerogels. **Bacterial Nanocellulose**, Elsevier, p. 73–108, 2016.

LIU, H.; LIU, D.; YAO, F.; WU, Q. Fabrication and properties of transparent polymethylmethacrylate/cellulose nanocrystals composites. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 14, p. 5685-5692, 2010.

LIU, L. et al. Sustainable and biodegradable copolymers from SO<sub>2</sub> and renewable eugenol: a novel urea fertilizer coating material with superior slow release performance. **Macromolecules**, v. 53, n. 3, p. 936-945, 2020.

LIU, L., NI, Y., ZHI, Y., ZHAO, W., PUDUKUDY, M., JIA, Q., ... & LI, X. (2020). Sustainable and biodegradable copolymers from SO<sub>2</sub> and renewable eugenol: a novel urea

fertilizer coating material with superior slow release performance. **Macromolecules**, 53(3), 936-945.

MACHADO DF, M PARZIANELLO FR, DA SILVA ACF, ANTONIOLLI ZI. Trichoderma no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciên Agrár**, v. 35, p. 274-288, 2012.

MALLAKPOUR, S.; ABDOLMALEKI, A.; KHALESİ, Z.; BORANDEH, S. Surface functionalization of GO, preparation and characterization of PVA/TRIS-GO nanocomposites. **Polymer**, v. 81, p. 140-150, 2015.

MANDAL, A; CHAKRABARTY, D. Studies on mechanical, thermal, and barrier properties of carboxymethyl cellulose film highly filled with nanocellulose. **Journal of Thermoplastic Composite Materials**, v. 32, n. 7, p. 995-1014, 2019.

MCMULLEN, R. L.; OZKAN, S.; GILLECE, T. Physicochemical properties of cellulose ethers. **Cosmetics**, v. 9, n. 3, p. 52, 2022.

MELO, I. S. Controle biológico de fitopatógenos. Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 1998. 38 p.

MORAIS, S. C. Avaliação da disponibilidade de fósforo em fertilizantes encapsulados. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

NATSIPOULOS D, TZIOLIAS A, LAGOIANNIS I, MANTZOUKAS S, ELIOPOULOS PA. Growth-promoting and protective effect of *Trichoderma atrobrunneum* and *T. simmonsii* on tomato against soil-borne fungal pathogens. **Crops**. 2022;2(3):202–217. doi: 10.3390/crops2030015.

NETO, W. P. F., Silvério, H. A., Vieira, J. G., da Costa e Silva Alves, H., Pasquini, D., de Assunção, R. M. N., & Dantas, N. O. (2012, September). Preparation and characterization of nanocomposites of carboxymethyl cellulose reinforced with cellulose nanocrystals. **Macromolecular Symposia**, 319(1), 93-98.

NISHINO, T.; MATSUDA, I.; HIRAO, K. All-cellulose composite. **Macromolecules**, v. 37, n. 20, p. 7683-7687, 2004.

OBELE, C. M.; IBENTA, M. E.; CHUKWUNEKE, J. L.; NWANONENYI, S. C. Carboxymethyl cellulose and cellulose nanocrystals from cassava stem as thickeners in reactive printing of cotton. **Cellulose**, v. 28, p. 2615-2633, 2021.

OLIVEIRA TÍS, ROSA MF, RIDOUT MJ, CROSS K, BRITO ES, SILVA LM, AZEREDO HM. Bionanocomposite films based on polysaccharides from banana peels. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 101, p. 1-8, 2017.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. (2019). Relatório de Recursos Mundiais: Criando um Futuro Alimentar Sustentável. Nova York: Organização das Nações Unidas.

OUN AA; RHIM JW. Characterization of carboxymethyl cellulose-based nanocomposite films reinforced with oxidized nanocellulose isolated using ammonium persulfate method. **Carbohydr. polym.**, v. 174, p. 484-492, 2017.

OUN, A. A.; RHIM, J. W. Isolation of cellulose nanocrystals from grain straws and their use for the preparation of carboxymethyl cellulose-based nanocomposite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 187-200, 2016

OUN, A. A.; RHIM, J. W. Preparation and characterization of sodium carboxymethyl cellulose/cotton linter cellulose nanofibril composite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 127, p. 101-109, 2015.

PANG, L.; GAO, Z.; FENG, H.; WANG, S.; WANG, Q. Cellulose based materials for controlled release formulations of agrochemicals: A review of modifications and applications. **Journal of Controlled Release**, v. 316, p. 105–115, 2019.

PETERSSON, L.; KVIEN, I.; OKSMAN, K. Structure and thermal properties of poly (lactic acid)/cellulose whiskers nanocomposite materials. **Composites Science and Technology**, v. 67, n. 11-12, p. 2535-2544, 2007.

RAI, D.; TEWARI, A. K. Evaluation of different carbon and nitrogen sources for better growth and sporulation of *T. harzianum* (Th14). **Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development**, v. 8, n. 8, p. 67-70, 2016.

REDFERN, J. P.; POWELL, J. Polymer and Other Degradation Studies Using Thermal Analysis Techniques. 1994. 81-102.

SABERI RISEH, R.; GHOLIZADEH VAZVANI, M.; HASSANISAADI, M.; SKORIK, Y. A. Micro-/Nano-Carboxymethyl Cellulose as a Promising Biopolymer with Prospects in the Agriculture Sector: A Review. **Polymers (Basel)**, v. 15, n. 2, p. 440, 2023. DOI: 10.3390/polym15020440.

SANTOS VS, SANTOS VSD, FERNANDES RDS, FERREIRA JÚNIOR CR, AOUADA FA, AMÉRICO-PINHEIRO JH, MOURA MRD, Avaliação e caracterização de biofilme comestível de carboximetilcelulose contendo nanopartículas de quitosana e Cúrcuma longa, Res. **Matéria**, v, 26, 2021.

SCHMITT, J.; FLEMMING, H. Espectroscopia FTIR em análise microbiana e de materiais. **Biodeterioração e Biodegradação Internacional**, v. 41, n. 1, p. 1-11, 1998.

SCHOEBITZ, M.; BELCHI, M. D. L. Encapsulation techniques for plant growth-promoting rhizobacteria. In: ARORA, N. K.; MEHNAZ, S.; BALESTRINI, R. (Eds.). **Bioformulations for sustainable agriculture**, pp. 251-265, Springer, 2016.

SCHOEBITZ, M; LÓPEZ, M, D.; ROLDÁN, A. Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil–plant fertilization. A review. **Agronomy for sustainable development**, v. 33, p. 751-765, 2013.

SEEFELDT AT, Síntese e caracterização de hidrogéis híbridos termo e pH sensíveis, baseados em acrilamida, apma e nipam, Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

SIQUEIRA G, ABDILLAHI H, BRAS J, DUFRESNE A, High reinforcing capability cellulose nanocrystals extracted from *Syngonanthus nitens*(CapimDourado). **Cellul. Chem**, v. 17, p. 289–298, 2010.

SM, E. A., EL-SAADONY, M. T., SAAD, A. M., DESOKY, E. S. M., EL-TAHAN, A. M., RADY, M. M., ... & EL-TARABILY, K. A. (2022). Correction: The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: A review. **European Journal of Plant Pathology**, 162(4), 1007-1007.

SOKHANDANI Z, MOOSAVI MR, BASIRNIA T. Optimum concentrations of *Trichoderma longibrachiatum* and *cadusafos* for controlling *Meloidogyne javanica* on zucchini plants. **J Nematol**. 2016;48(1):54–63. doi: 10.21307/jofnem-2017-009.

STUMMER, B. E. et al. Plant pathogen defence volatiles at the boundary between the plant and the atmosphere: a review. **Annals of Applied Biology**, v. 177, n. 3, p. 320-337, 2020.

SYED AB RAHMAN, S. F. et al. Mechanisms of action of *Trichoderma* spp. against *Fusarium* species, pathogens of maize and other cereals: a review. **Fungal Biology Reviews**, v. 32, n. 3, p. 133-161, 2018.

- TAN, X. Y.; ABD HAMID, S. B.; LAI, C. W. Preparation of high crystallinity cellulose nanocrystals (CNCs) by ionic liquid solvolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 584-591, 2015.
- TEWARI, L.; BHANU, C. Screening of various substrates for sporulation and mass multiplication of bio-control agent *Trichoderma harzianum* through solid state fermentation. **Indian Phytopathology**, v. 56, n. 4, p. 476-478, 2003.
- TRABELSI, D., & MHAMDI, R. (2013). Microbial Inoculants and Their Impact on Soil Microbial Communities: A Review. **Biomed Research International**, 2013.
- TRACHE, D., HUSSIN, M. H., HAAFIZ, M. M., & THAKUR, V. K. (2017). Recent progress in cellulose nanocrystals: sources and production. **Nanoscale**, 9(5), 1763-1786.
- USOV, I. et al. Understanding nanocellulose chirality and structure-properties relationship at the single fibril level. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 7564, 2015.
- VALDERRAMA, M.; BUZETTI, S. Fertilizantes de eficiência aprimorada. Jaboticabal: Funep, 2017.
- VASSILEV, N., BONILLA, A. P., VASSILEVA, M., PINTADO, M., & NIKOLAEVA, I. (2020). Azospirillum and Other Plant Growth-Promoting Bacteria as Biofertilizers: Principles, Mechanisms of Action, and Recent Developments. **Agriculture**, 10(4), 268.
- VASSILEV, N., MEDINA, A., AZCON, R., VASSILEVA, M., & GARCIA DE SALAMONE, I. E. (2014). Applications of plant growth-promoting bacteria in production agriculture. **In Advances in agronomy** (Vol. 130, pp. 1-134). Academic Press.
- VASSILEVA, M. et al. Fermentation strategies to improve soil bio-inoculant production and quality. **Microorganisms**, v. 9, n. 6, p. 1254, 2021.
- VORONOVA, M. I. et al. The effect of drying technique of nanocellulose dispersions on properties of dried materials. **Materials letters**, v. 68, p. 164-167, 2012.
- WEI, J., JIA, S., ZHANG, L., ZHOU, Y., LV, Y., ZHANG, X., & SHAO, Z. (2021). Preparation of treelike and rodlike carboxymethylated nanocellulose and their effect on carboxymethyl cellulose films. **Journal of Applied Polymer Science**, 138(13), 50092.
- WOLLERDORFER, M.; BADER, H. Influence of natural fibres on the mechanical properties of biodegradable polymers. **Industrial Crops and Products**, v. 8, n. 2, p. 105-112, 1998

YADAV, M. et al. Cellulose nanocrystal reinforced chitosan based UV barrier composite films for sustainable packaging. **Polymers**, v. 12, n. 1, p. 202, 2020.

YADOLLAHI, M.; NAMAZI, H.; BARKHORDARI, S. Preparation and properties of carboxymethyl cellulose/layered double hydroxide bionanocomposite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 108, p. 83-90, 2014.

YANG X, BAKAIC E, HOARE T, CRANSTON ED. Injectable polysaccharide hydrogels reinforced with cellulose nanocrystals: morphology, rheology, degradation, and cytotoxicity. **Biomacromolecules**, v. 14 p. 4447-4455, 2013.

ZABIHOLLAHI, N. et al. Development and characterization of carboxymethyl cellulose based probiotic nanocomposite film containing cellulose nanofiber and inulin for chicken fillet shelf life extension. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 160, p. 409-417, 2020.

ZHANG, J. et al. All-cellulose nanocomposites reinforced with in situ retained cellulose nanocrystals during selective dissolution of cellulose in an ionic liquid. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 4, n. 8, p. 4417-4423, 2016

ZHANG, L. F. Psychosocial development and the big five personality traits among Chinese university students. **Learning and Individual Differences**, v. 23, p. 163-167, 2013.

ZHENG WJ, GAO J, WEI Z, ZHOU J, CHEN YM. Facile fabrication of self-healing carboxymethyl cellulose hydrogels. **Eur Polym J**, v. 72, p. 514-522, 2015.