

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

William Merlini

**ENCAPSULAMENTO DE *Azospirillum brasilense* EM MATRIZ A BASE DE  
CARBOXIMETILCELULOSE E TREALOSE PARA MELHORIA DA  
VIABILIDADE**

São Carlos

2025

William Merlini

**ENCAPSULAMENTO DE *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* EM MATRIZ A  
BASE DE CARBOXIMETILCELULOSE E TREALOSE PARA MELHORIA DA  
VIABILIDADE**

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 Mestre em Engenharia Química.

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

São Carlos

2025



## 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 do candidato William Merlini, realizada em 26/08/2025.

#### Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas (EMBRAPA)

Profa. Dra. Mariana Govoni Brondi Wolf (EMBRAPA)

Profa. Dra. Vanessa Molina de Vasconcellos (IU)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais Lírío e Nilce pelo contínuo suporte e incentivo na minha educação. Ao meu marido Matheus, que sem seu total apoio não seria possível a realização deste mestrado. À minha irmã, Lilian, bem como familiares Guido, Paula, Nathália, Gabriel, Terezinha e Amarides.

Agradeço à Prof. Dra. Cristiane pela oportunidade, conhecimento e orientação, à Embrapa Instrumentação pela ótima estrutura e materiais disponibilizados, ao PPG de Engenharia Química da UFSCAR. Ao pessoal do laboratório, em especial Ana, que nunca deixa nada nos faltar. Vanessa, Camila, Lucas, Bruna pela companhia e gentilezas.

Agradeço às minhas amigas Ana, Amanda e Agatha pela amizade de décadas. Aos amigos Alessandra, Lucas e Zé Davi pela amizade verdadeira e pelo apoio durante as disciplinas.

Um agradecimento especial para Jéssica Marciano, que enfrentou madrugadas comigo no laboratório fazendo experimentos, que inúmeras vezes não deram certo, mas que não me deixou desistir. Lutou comigo em todos os momentos. Obrigado, você é uma grande amiga.

Agradeço a CAPES e o CNPQ pelo suporte financeiro para realização deste trabalho.

## **APOIO FINANCEIRO**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## Resumo

A inoculação de cultivares com bactérias diazotróficas como *Azospirillum brasilense* pode tornar a lavoura mais produtiva e sustentável, visto que diminui a necessidade de aplicação de fertilizantes químicos nitrogenados. Entretanto, é necessário o desenvolvimento de formulações bioinoculantes que mantenham a viabilidade celular durante longos períodos e que forneçam proteção contra estresses bióticos e abióticos. Estresses osmótico, salino, de radiação e temperatura representam desafios para a sobrevivência das células de *A. brasilense*. Como alternativa ao problema, objetiva-se encapsular as células de *A. brasilense* em matrizes biodegradáveis através do método de gelificação ionotrópica, caracterizar o material e acessar a viabilidade celular durante o armazenamento. O método consiste na formação de macroesferas das matrizes contendo o microrganismo, através do gotejamento e reticulação de uma dispersão polimérica em solução de  $\text{FeCl}_3$ . O material escolhido foi a carboximetilcelulose (CMC) por ser um material renovável, abundante e comercial e a trealose por sua capacidade de proteção osmótica e térmica. Foram produzidas esferas com *A. brasilense* na proporção fixa de 2,5% (m/v) de CMC contendo 0, 1, 5 e 10% (m/v) de trealose e armazenadas úmidas a 25 °C. As cápsulas com CMC sem trealose apresentaram maior eficiência de encapsulamento e melhor viabilidade até o 15º dia armazenamento a 25 °C. A Análise de FTIR evidenciou a formação da estrutura química da reticulação do CMC com  $\text{Fe}^{3+}$  e a análise de MEV evidenciou a superfície regular das esferas. Entretanto, a formulação de inoculantes de *Azospirillum* requer investigações adicionais, sobretudo quanto às concentrações ideais de CMC e trealose e sua influência sobre a estabilidade da matriz e a sobrevivência celular em períodos prolongados de armazenamento.

**Palavras-chave:** *Azospirillum brasilense*; inoculantes; encapsulamento; carboximetilcelulose; trealose.

## Abstract

Inoculation of cultivars with diazotrophic bacteria such as *Azospirillum brasilense* can make crops more productive and sustainable, since it reduces the need for nitrogenous chemical fertilizers. However, it is necessary to develop bioinoculant formulations that maintain cell viability for long periods and provide protection against biotic and abiotic stresses. Osmotic, saline, radiation and temperature stresses represent challenges for the prevalence of *A. brasilense* cells in soil. As an alternative to this problem, the aim is to encapsulate *A. brasilense* cells in biodegradable matrices through the ionotropic gelation method, characterize the material and assess cell viability during storage. The method consists of forming macrobeads of the matrices containing the microorganism, through the dripping and crosslinking of a polymeric dispersion in a  $\text{FeCl}_3$  solution. The material chosen was carboxymethyl cellulose (CMC) because it is a renewable, abundant and commercial material and trehalose because of its thermal protection capacity. Beads with a fixed amount of 2.5% CMC and 4 treatments containing 0%, 1%, 5% and 10% trehalose were produced and stored moist at 4 °C and 25 °C; and after drying at 25 °C. The CMC capsules without trehalose showed higher encapsulation efficiency and better viability up to the 15th day of storage at 25 °C. FTIR analysis evidenced the formation of the chemical structure of CMC crosslinking with  $\text{Fe}^{3+}$ , and SEM analysis revealed a regular surface of the spheres. However, the formulation of *Azospirillum* inoculants requires further investigation, particularly regarding the optimal concentrations of CMC and trehalose and their influence on matrix stability and cell survival during prolonged storage.

**Keywords:** *Azospirillum brasilense*; inoculants; encapsulation; carboxymethylcellulose; trehalose.

## Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	10
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1	Inoculantes microbianos .....	13
2.1.1	Azospirillum brasilense.....	14
2.2	Formulação de inoculantes microbianos .....	16
2.2.1	Encapsulamento .....	16
2.3	Carboximetilcelulose.....	18
2.4	Trealose .....	19
3.	OBJETIVOS.....	21
3.1	Objetivo geral .....	21
3.2	Objetivos específicos.....	21
4.	METODOLOGIA.....	22
4.1	Manutenção da cultura bacteriana .....	22
4.1.1	Contagem de células viáveis no cultivo de A. brasilense .....	22
4.2	Encapsulamento.....	22
4.2.1	Ensaio de Toxicidade do agente reticulante.....	22
4.2.2	Preparo do inóculo de A. brasilense.....	23
4.2.3	Produção das esferas .....	24
4.2.4	Teste de dissolução .....	25
4.3	Características Estruturais e Funcionais .....	26
4.3.1	Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	26
4.3.2	Determinação do diâmetro das esferas.....	26
4.3.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	26
4.3.4	Caracterização térmica .....	26
4.3.5	Eficiência do encapsulamento.....	26
4.3.6	Viabilidade no Armazenamento.....	27

5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	28
5.1	Encapsulamento.....	28
5.1.1	Definição da concentração de CMC .....	28
5.1.2	Ensaio de toxicidade do agente reticulante .....	29
5.1.3	Obtenção das esferas .....	30
5.1.4	Teste de dissolução .....	31
5.2	Características Estruturais e Funcionais .....	31
5.2.1	Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	31
5.2.2	Determinação do diâmetro das esferas.....	33
5.2.3	Análise termogravimétrica (TGA).....	35
5.2.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	36
5.2.5	Eficiência no Encapsulamento e Viabilidade no armazenamento ..	37
6.	CONCLUSÕES FINAIS .....	42
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43

## 1. INTRODUÇÃO

A fim de superar desafios e cumprir com a demanda mundial de alimentos, o setor agrícola vem apostando em inovações sustentáveis que proporcionam aumento de produtividade e superação de vulnerabilidades (Garcia et al., 2021). Dessa forma, a utilização de microrganismos na agricultura se insere como uma tecnologia capaz de oferecer alternativas sustentáveis para problemas como dependência de fertilizantes químicos, empobrecimento e perda de biodiversidade do solo, uso de pesticidas e estresses bióticos e abióticos (Alzate Zuluaga et al., 2024; Backer et al., 2018; Bhat et al., 2022).

Algumas espécies das chamadas Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCP) são capazes de capturar o nitrogênio da atmosfera e torná-lo disponível às plantas, através do mecanismo de fixação biológica de nitrogênio (Marinho Viana *et al.*, 2024). Além disso, as BPCP são conhecidas por produzirem uma gama de fitohormônios que regulam positivamente o crescimento das plantas, induzem resistência sistêmica e tolerância a estresses abióticos (Andreatta *et al.*, 2024). O Brasil possui um grande legado de pesquisa, desenvolvimento e utilização de microrganismos benéficos para agricultura (de Paiva Rolla-Santos *et al.*, 2024). Atualmente, a inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio é o principal mecanismo de fornecimento de nitrogênio para a soja brasileira, com o destaque para bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, muitas vezes co-inoculadas com *Azospirillum* (Hungria; Mendes, 2015; Shimoia *et al.*, 2023).

*Azospirillum brasilense* é uma bactéria de vida livre, diazotrófica, gram negativa, não esporulante, encontrada naturalmente em solos por todo planeta (Cassán *et al.*, 2020). Destaca-se pela produção de fitohormônios e outros compostos que estimulam o crescimento e resiliência das plantas, sendo estes as auxinas, como o ácido indol-3-acético (AIA) (Spaepen; Vanderleyden, 2015), giberilinas (Cohen *et al.*, 2009), citicininas (Hussain; Hasnain, 2011), etileno (Elías *et al.*, 2018) e ácido salicílico (Sahoo *et al.*, 2014). Estes possuem ação através de uma gama de propriedades como absorção de nutrientes e água, desenvolvimento das raízes, germinação das sementes, divisão celular, entre outros (Fukami; Cerezini; Hungria, 2018; Kudoyarova *et al.*, 2019). A aplicação de *A. brasilense* usualmente se dá na inoculação das sementes, através do tratamento das sementes antes do plantio, no sulco ou diretamente no solo. Os veículos para entrega da bactéria são geralmente líquidos, na forma de um *pool* de células, ou turfoso (Bashan; De-Bashan, 2015).

Entretanto, há uma preocupação com a viabilidade das células de inoculantes formulados nestes veículos tradicionais, porque estes não fornecem uma proteção adequada às células, ainda mais tratando-se de uma espécie bacteriana não esporulante, como o *A. brasilense*. As formulações devem se manter na concentração ideal desde sua fabricação, armazenamento, transporte até aplicação desses microrganismos no solo. Fatores como a incerta compatibilidade dos inóculos com as diversas classes de agroquímicos utilizados e à exposição às condições ambientais, como a radiação solar e temperatura, representam desafios à formulação de inoculantes e à máxima produtividade da inoculação, e conseqüentemente da lavoura, como um todo (Bashan; De-Bashan, 2015; Lima-Tenório *et al.*, 2023).

Dessa forma, o desenvolvimento de formulações que proporcionem proteção física às células contra estresses bióticos e abióticos mostra-se necessário para que *A. brasilense* prospere no solo (Lima-Tenório *et al.*, 2023). O encapsulamento, através da imobilização de células viáveis em matrizes poliméricas, fornece uma estrutura estável que protege contra fatores ambientais e estresses, potencialmente melhorando sua viabilidade tanto no armazenamento quanto na aplicação, provendo uma melhor entrega e adaptação do microrganismo ao ambiente (Brondi *et al.*, 2022; Schoebitz; López; Roldán, 2013).

Polímeros naturais têm sido amplamente estudados como matrizes para encapsulamento de inoculantes, devido às suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, durabilidade e baixo custo (Saberri Riseh *et al.*, 2023). Exemplos notáveis incluem o amido (Lopes; Oliveira-Paiva; Farinas, 2023), a celulose (Brondi *et al.*, 2022), a quitosana (Bhuvanachandra *et al.*, 2021), alginato (Pour; Riseh; Skorik, 2022; Szopa *et al.*, 2022) e a gelatina (Gowthaman *et al.*, 2021). Dentre eles, a carboximetilcelulose (CMC), um derivado da celulose, se destaca por sua versatilidade, abundância, resistência mecânica, biocompatibilidade, hidroflicidade ajustável, atoxicidade e capacidade de liberação controlada de substâncias (Saberri Riseh *et al.*, 2023). Além disso, a carboximetilcelulose sal-sódica, ao entrar em contato com soluções de cátions com valência maior ou igual a 2, pode formar esferas de gel através de ligações de *crosslinking*, oferecendo uma solução eficaz para o encapsulamento de microrganismos, garantindo sua proteção e gradual liberação no ambiente agrícola (Farhadnejad *et al.*, 2018; Zare-Akbari *et al.*, 2016).

Além da matriz principal, é possível agregar aditivos para melhor as propriedades da fórmula encapsulada. Um aditivo interessante é a trealose, que vem sendo estudada

devido a sua característica de proteção osmótica, que auxilia na manutenção de uma membrana celular intacta em situações de dessecação. A adição de trealose pode melhorar a sobrevivência celular dos microrganismos, especialmente quando a matriz passa por processo de secagem (Riseh *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2023).

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi desenvolver macrocarregadores de carboximetilcelulose com diferentes concentrações de trealose para o encapsulamento de *A. brasilense*, visando melhorar a viabilidade durante o armazenamento e protegê-lo contra fatores ambientais e estresses. Para isso, foram avaliadas a eficiência e estabilidade desses macrocarregadores buscando sua aplicação como um produto com potencial tecnológico para uso como inoculante no setor agrícola.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Inoculantes microbianos

Inoculantes microbianos são microrganismos benéficos que promovem o crescimento das plantas e são aplicados na lavoura para aumento da produtividade agrícola. Compostos por bactérias e fungos, esses inoculantes estabelecem relações de simbiose e outras interações com as plantas, contribuindo para seu crescimento e a saúde vegetal, absorção de nutrientes e proteção contra patógenos (Santos; Nogueira; Hungria, 2019).

Os inoculantes mais comuns são as Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCP), que em dadas espécies, promovem o desenvolvimento vegetal por meio de mecanismos indiretos, como controle biológico de patógenos e indução de resistência sistêmica, e mecanismos diretos, como a produção de fitormônios, fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fósforo e outros nutrientes, além da produção de sideróforos (Andreato *et al.*, 2024). Entre as BPCP, destacam-se as bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Rhizobium* e *Azospirillum*, e as solubilizadoras de nutrientes como as do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas* (Fadiji *et al.*, 2022).

A aplicação de BPCP representa uma solução à dependência da adubação química nitrogenada, que é um processo que necessita de altas quantidades de fertilizante e possui considerável impacto ambiental, quando utilizado de forma indiscriminada. Dado a possibilidade de lixiviação, que no caso de fertilizantes nitrogenados causa eutrofização, que é o acúmulo de nutrientes em rios e lagos, levando a redução do oxigênio da água e, conseqüentemente, à perda da biodiversidade. Além disso, a contaminação por nitratos pode causar sérios riscos à saúde dos seres vivos. Esses fertilizantes também representa uma parcela significativa do custo de uma safra (Santos; Nogueira; Hungria, 2021).

Na soja brasileira, a co-inoculação de sementes ou no sulco do plantio por *Bradyrhizobium japonicum* e *Azospirillum brasilense*, que são bactérias fixadoras de nitrogênio, apresentou excelentes resultados. Em um estudo de validação da aplicação da co-inoculação em propriedades rurais, Prando e colaboradores (2024) confirmaram um aumento de 35% de nodulação, 8% de produtividade em grãos e retorno até US\$ 111,5 há<sup>1</sup> por colheita, ao longo de cinco anos. Isto reflete numa independência do uso de fertilizantes nitrogenados, tornando a sojicultura mais sustentável e econômica (Hungria; Nogueira; Araujo, 2015; Martin *et al.*, 2023). Além disso, a inoculação contribui dentro do conceito da agricultura regenerativa, que visa preservar as condições naturais do solo

e promover a biodiversidade (Adjuik; Nokes; Montross, 2022).

Além da fixação biológica de nitrogênio (FBN), as BPCP contribuem para o crescimento vegetal por meio da solubilização de minerais como fósforo, da produção de hormônios de crescimento, como as auxinas, que promovem o desenvolvimento das folhas, raízes e caule, e a citocinina que promovem a divisão celular, além da indução de resistência sistêmica (Hernandes Filho, 2021). Esses mecanismos resultam em aumento da altura, biomassa da parte aérea, desenvolvimento de raízes e caule e na formação de pelos radiculares e foliares, que também auxiliando na redução dos sintomas de doenças causadas por patógenos (Kumar *et al.*, 2022).

Um dos gêneros de BPCP mais estudados e utilizados na agricultura brasileira é o *Azospirillum*. Esse microrganismo, descoberto no Brasil, tem grande potencial como inoculante e é naturalmente adaptada aos tipos de solo e às condições climáticas do país, o que facilita a sua aplicação regional (Duarte; Ruff; Santos, 2021; Hungria, 2016).

### 2.1.1 *Azospirillum brasilense*

Isolada na década de 1970, o *Azospirillum brasilense* compreende-se de alphaproteobactérias gram-negativas, não esporulantes, de vida livre e fixadoras de nitrogênio, com formato de vibrião ou hastes em forma de espirilo, que exercem grande impacto positivo no crescimento e na produtividade de culturas de importância comercial (Cassán *et al.*, 2020).

O Brasil desempenhou um papel pioneiro nos estudos sobre o *Azospirillum*, inicialmente classificado como *Spirillum*. A nomenclatura foi alterada para incluir o prefixo "Azo", relacionado ao nitrogênio, após a pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Dra. Johanna Döbereiner, isolar *A. brasilense* e descrever sua capacidade de fixar nitrogênio em associação com gramíneas (Santos; Nogueira; Hungria, 2021).

Ao contrário de *Bradyrhizobium japonicum*, que é uma bactéria endofítica e formadora de nódulos, *A. brasilense* fixa nitrogênio de forma associativa às plantas. Ou seja, coloniza as raízes e superfícies radiculares e lá encontra um ambiente microaerofílico adequado para a produção da enzima dinitrogenase, que converte nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) em amônia (NH<sub>3</sub>), que é absorvido pelas plantas (Hungria, 2011).

A exploração do processo de FBN do *A. brasilense* com o milho foi capaz de demonstrar resultados de diminuição da dose de adubação nitrogenada. Em seu estudo,

Hungria e colaboradores (2022a) demonstraram que através da inoculação do milho com *A. brasilense* e aplicando somente 75% da dose usual de fertilizante nitrogenado é possível obter 100% de rendimento na adubação, o que equivale a uma diminuição de 25% no uso de adubo, o que aumenta a lucratividade da operação e diminui a pegada de carbono.

Em adição à FBN, há destaque para a capacidade de síntese de fitormônios por *A. brasilense* que promovem crescimento vegetal, sobretudo auxinas. Estas aumentam o fluxo de água e sais minerais no xilema, impulsionam o crescimento radicular, controlam o crescimento vegetal e influenciam na geração de pigmentos e nos processos de fotossíntese e biossíntese de metabólitos, bem como na resistência a estresses abióticos e bióticos (Fukami; Cerezini; Hungria, 2018). A auxina mais produzida pelo gênero *Azospirillum* é o ácido-indol-3-acético (Malhotra; Srivastava, 2009). Outros fitohormônios e compostos de importância produzidos por *Azospirillum* spp. são citocininas (Hussain; Hasnain, 2011), giberilinas (Cohen *et al.*, 2009), etileno (Elías *et al.*, 2018) e ácido abscísico (Cohen *et al.*, 2009).

A capacidade que o *A. brasilense* possui de promover maior crescimento (ou alongação) das raízes através da produção de fitormônios implica em demais benefícios à planta, como melhor absorção de água e nutrientes (Fukami; Cerezini; Hungria, 2018). Além disso, *A. brasilense* também pode auxiliar na atenuação de estresses abióticos, como seca e salinidade, através do processo de indução de resistência sistêmica (Fukami *et al.*, 2018; Fukami; Cerezini; Hungria, 2018; Yang; Kloepper; Ryu, 2009).

Bashan e de-Bashan (2010) propuseram a "Teoria dos Múltiplos Mecanismos" para explicar os benefícios que *Azospirillum* spp. proporciona às plantas. Segundo essa teoria, o crescimento vegetal e outras vantagens oferecidas por esses microrganismos resultam de uma combinação de mecanismos que podem ocorrer de forma simultânea ou em sequência.

O mercado brasileiro comercializa as cepas naturais *A. brasilense* sp7, denominadas Ab-V5 (CNPSO 2083) e Ab-V6 (CNPSO 2084), que são amplamente utilizadas em culturas como soja, milho e trigo (Garcia; Nogueira; Hungria, 2021). Estudos demonstram o aumento significativo da produtividade dessas culturas quando inoculadas com *A. brasilense*. (Fukami *et al.*, 2016; Hungria *et al.*, 2010, Hungria *et al.*, 2010, 2022; Prando *et al.*, 2024). O produtos à base de *A. brasilense* são comercializados em formulação líquida ou turfosa.

## **2.2 Formulação de inoculantes microbianos**

A formulação de inoculantes envolve a imobilização de microrganismos benéficos ou seus metabólitos em materiais preferencialmente inertes, com o objetivo de proteger e manter a viabilidade celular desde o transporte até a aplicação no campo. Uma formulação ideal deve ser atóxica, quimicamente estável, de fácil obtenção, e capaz de garantir a sobrevivência dos microrganismos. As formulações podem ser classificadas em sólidas ou líquidas (Balla et al., 2022; Chaudhary et al., 2020).

As formulações sólidas geralmente consistem na combinação de microrganismos com veículos sólidos porosos, como a turfa, sendo também utilizados materiais como biochar, pó molhável e grânulos dispersáveis em água (Balla et al., 2022). Por outro lado, as formulações líquidas são suspensões de células em água ou óleo, frequentemente enriquecidas com aditivos como glicerol, ácido húmico ou surfactantes e dispersantes a fim de melhorar a qualidade físico-química (Balla et al., 2022). Essas formulações permitem que os microrganismos cheguem rapidamente às plantas, oferecendo benefícios imediatos. No entanto, em formulações líquidas, a falta de proteção adequada ao longo do tempo ainda representa um grande desafio, especialmente no que diz respeito à viabilidade durante o armazenamento e à sobrevivência prolongada no solo após a aplicação (Balla et al., 2022; Chaudhary et al., 2020).

Dada a crescente demanda por inoculantes de BPCP e o papel fundamental da formulação para o sucesso desses produtos, a pesquisa tem avançado no desenvolvimento de novas formulações capazes de superar as limitações dos métodos tradicionais (Balla et al., 2022; Lopes; Oliveira-Paiva; Farinas, 2023). Além de garantir a viabilidade dos microrganismos durante o armazenamento e aplicação, essas formulações inovadoras também devem ser eficazes em condições adversas, como solos salinos, ácidos ou alcalinos, bem como em ambientes de altas temperaturas, seca e intensa exposição solar (Balla et al., 2022; Çakmakçı, 2019). Nesse contexto, a encapsulação de microrganismos em materiais adequados, como polímeros biodegradáveis, apresenta-se como uma tecnologia promissora, em constante evolução, que pode oferecer maior proteção, eficiência no campo e produtos mais sustentáveis.

### **2.2.1 Encapsulamento**

O encapsulamento ou imobilização é fundamentado na capacidade de prover uma estrutura protetiva que permita o aprisionamento, liberação e funcionalidade. Dessa

forma, é possível reduzir a exposição dos microrganismos a condições ambientais, o que tende a estabilizar células e aumentar a viabilidade celular durante armazenamento e aplicação (Schoebitz; López; Roldán, 2013).

Diversas técnicas de encapsulamento são relatadas na literatura. Dentre elas destacam-se emulsão, spray drying e gelificação ionotrópica (Balla *et al.*, 2022b). Dentre elas, a gelificação ionotrópica é uma técnica muito apreciada e vantajosa nos estudos de encapsulamento de microrganismos, devido ao seu baixo custo, metodologia simplificada e condições brandas (Perez *et al.*, 2018). Este método consiste basicamente na dispersão ou gotejamento de uma solução aquosa contendo a matriz polimérica, adicionada de microrganismos, em uma solução reticulante, geralmente uma entidade iônica. A interação da cadeia polimérica negativamente carregada com a solução reticulante solidifica a gota, formando um hidrogel em forma de macroesfera. Esse processo químico é conhecido como *crosslinking* e é responsável pela estabilização da partícula, formando uma estrutura tridimensional robusta (Lima-Tenório *et al.*, 2024). As macroesferas de hidrogel formadas podem ser utilizadas em sua forma hidratada, ou podem passar por processo de secagem.

Entre os materiais aplicados para síntese de macroesferas, destaca-se os polímeros naturais devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, o que os torna mais sustentáveis. Além disso, são materiais atóxicos, ou seja, seguros para a saúde e amplamente disponíveis, reduzindo seu custo. Materiais poliméricos que possibilitam a reticulação em três dimensões, como os hidrogéis, são bastante promissores devido à sua capacidade de retenção de água e fluidos biológicos (Lima-Tenório *et al.*, 2023; Pellá *et al.*, 2020). A estrutura reticulada tridimensional dos hidrogéis cria uma barreira temporária de proteção para a bactéria e um microssistema capaz de suportar a viabilidade celular. A degradação lenta do hidrogel possibilita a liberação controlada do microrganismo no solo, facilitando a colonização da planta e a permanência desta microflora por mais tempo (Szopa *et al.*, 2022b)

Pode-se citar como matrizes poliméricas utilizadas no encapsulamento de inoculantes microbianos alginato de sódio (Zhang *et al.*, 2023), amido (Lima-Tenório *et al.*, 2023) pectina (Lopes; Oliveira-Paiva; Farinas, 2023), quitosana (Beula Isabel *et al.*, 2024), álcool polivinílico (Lodi *et al.*, 2024) e gelatina (Pour; Riseh; Skorik, 2022b). Sendo o alginato de sódio seguramente o mais utilizado. Entretanto, formulações com alginato de sódio geralmente necessitam de aditivos para reforçar a estrutura e propriedades mecânicas e é relatado também a desintegração de cápsulas em pH mais

elevados, o que pode comprometer a durabilidade e eficiência das cápsulas em solos alcalinos (Cao *et al.*, 2024). O alginato tende a formar géis menos resistentes, enquanto a adição de CMC pode contribuir para o reforço da matriz, conferindo maior estabilidade estrutural (Morozkina *et al.*, 2022). Dessa forma, sua combinação ou substituição pode resultar em cápsulas potencialmente mais firmes e estáveis. Logo, o estudo de carboximetilcelulose como matriz mostra-se como uma abordagem relevante para promover a eficiência e a viabilidade dos inoculantes microbianos.

### 2.3 Carboximetilcelulose

Carboximetilcelulose (CMC), um dos mais importantes derivados da celulose, é um éter de celulose solúvel em água, obtido através da reação da celulose com ácido acético, na presença de um catalisador alcalino (Farhadnejad *et al.*, 2018; Zare-Akbari *et al.*, 2016). A macromolécula de CMC possui muitos grupos funcionais carboxil e hidroxil, sendo classificada como um polissacarídeo linear, possui unidades de carboxil-glucose que se repetem e são ligadas por ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas (Akter *et al.*, 2021; Saberi Riseh *et al.*, 2023b).

Por ser uma molécula solúvel em água (ao contrário da celulose), possui resistência moderada, biodegradabilidade, biocompatibilidade, além de ser inodora, insípida, flexível, transparente e resistente a óleos e gorduras, o CMC é um material de grande interesse para diversas aplicações. Dessa forma, é amplamente estudada em diversas áreas, como desenvolvimento de produtos alimentícios, indústrias têxteis, indústria farmacêutica, engenharia biomédica, tratamento de efluentes e também na agricultura (Akter *et al.*, 2021; Saberi Riseh *et al.*, 2023b).

Sabe-se que uma solução de carboximetilcelulose sódica ao entrar em contato com soluções de cátions trivalentes, como  $\text{Fe}^{3+}$  ou  $\text{Al}^{3+}$ , sofre uma reação de reticulação (*crosslinking*) e forma um gel por meio do método de gelificação ionotrópica, (Saberi Riseh *et al.*, 2023; Zare-Akbari *et al.*, 2016). Essa reação é influenciada pelo grau de substituição (DS) do CMC, que indica o número médio de grupos carboximetila substituídos nas hidroxilas da cadeia de celulose. Quanto maior o DS, maior a quantidade de grupos carboxilato disponíveis para interagir com cátions multivalentes, favorecendo a formação de uma rede mais densa e estável. Dessa forma, o DS está diretamente relacionado à capacidade de reticulação e às propriedades mecânicas e de absorção do gel formado (Pant; Upadhyaya, 2022). Por ser capaz de formar um gel superabsorvente, o CMC tem sido aplicado em diversas áreas, e tem se tornado interessante para o

desenvolvimento de soluções para a agricultura, como agente de remediação de solos e água contaminados pesticidas (Devasia; John, 2021; Dolatabadi; Naidu; Ahmadzadeh, 2022) e revestimento para frutas (*coating*) devido a sua ótima formação de filmes (Li *et al.*, 2023; Saberi Riseh *et al.*, 2023b).

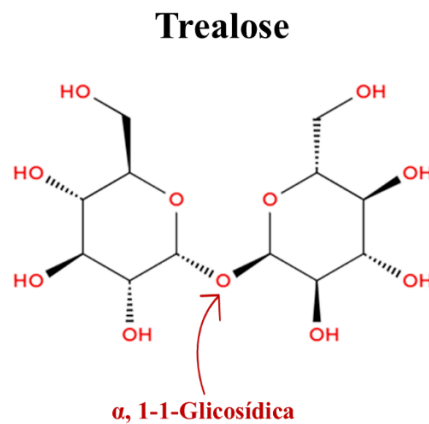
Estudos recentes propõe a utilização de CMC para a liberação controlada de defensivos agrícolas e fertilizantes. Dardeer; Gad; Mahgoub, (2024) desenvolveram um hidrogel a base de CMC e ácido poliacrílico (PAA) para encapsulamento de vinhaça como um fertilizante orgânico de liberação controlada. Os resultados mostraram que o hidrogel apresentou uma melhor retenção de nutrientes (até 50 dias de permanência de fósforo), a diminuição da condutividade elétrica em apenas 6 horas (menor acúmulo de sais) e um aumento em 15% na produtividade por feddan (1,038 acres) da cana-de-açúcar, no experimento de campo. Enquanto, Brondi e colaboradores (2022) propuseram o encapsulamento dos esporos do fungo de controle biológico *Trichoderma harzianum* em esferas reticuladas com íons  $Ca^{2+}$ , formadas por uma matriz de CMC associada a cristais de nanocelulose. Os autores observaram que essa matriz favoreceu o crescimento do fungo após 10 dias de armazenamento em condições secas, destacando o potencial das matrizes à base de CMC para o encapsulamento de microrganismos.

Os materiais poliméricos empregados em encapsulamento podem ter suas propriedades aprimoradas por meio da incorporação de cargas e compostos auxiliares. Esses componentes podem englobar açúcares, proteínas e outros elementos que proporcionam estabilidade e proteção extra às biomoléculas encapsuladas. A trealose, em particular, é uma molécula destacada por sua capacidade de preservar as células em situações de estresse, como desidratação. A incorporação dela em formulações de encapsulamento aumenta a estabilidade das estruturas biológicas e intensifica as características de proteção e longevidade dos materiais.

## **2.4 Trealose**

A trealose é um dissacarídeo não redutor formado por duas moléculas de glicose unidas por uma ligação 1-1glicosídica, conforme apresentado na Figura 1. Dificilmente a molécula de trealose é quebrada em duas glucoses, com exceção na presença da enzima trealase, encontrada no citoplasma celular (Elbein , 2003; Iturriaga; Suárez; Nova-Franco, 2009).

Figura 1 – Estrutura química da trealose



Fonte: Autoria Própria

A trealose está presente na natureza através de seu isômero  $\alpha$ - $\alpha$ -trealose em bactérias, fungos, leveduras e plantas. Microrganismos em anidrobiose (estado extremo de dessecação) têm a sua capacidade de sobreviver longos períodos sem água relacionada com níveis consideráveis de trealose encontrados em seu organismo (Elbein *et al.*, 2003; Iturriaga; Suárez; Nova-Franco, 2009). Alguns estudos sugerem a utilização de trealose com veículo na criopreservação em laboratório de microrganismos (De Giulio *et al.*, 2005), células e tecidos (Murray; Kilbride; Gibson, 2024) dado o seu potencial de proteção sob condições de estresse, como desidratação, congelamento e altas temperaturas. Além disso, contribui para a preservação da integridade de proteínas e membranas celulares.

De acordo com Iturriaga; Suárez; Nova-Franco, (2009), esta atuação da trealose em biomoléculas pode ser explicada através de três mecanismos principais, que não se excluem mutuamente. O primeiro é a substituição de água, onde a trealose substitui as moléculas de água na camada de hidratação das macromoléculas, estabilizando-as durante a desidratação e o congelamento, prevenindo a desnaturação irreversível. O segundo mecanismo é a formação vítrea, pela qual a trealose forma cristais amorfos estáveis que preservam biomoléculas em um estado vítreo, permitindo sua recuperação completa após reidratação. O terceiro envolve a interação química, em que a flexível ligação glicosídica da trealose permite sua interação com grupos polares de outras macromoléculas, contribuindo para a estabilização estrutural.

Já em plantas, a trealose ocorre naturalmente em menor quantidade. Atua como um metabólito sinalizador nas interações das plantas com microrganismos, tanto patógenos quanto simbióticos. Além disso, em plantas vasculares, a trealose está presente

na resposta contra estresses salinos, de frio, na condutância estomática e eficiência de uso de água (Lunn *et al.*, 2014). Estudos sugerem a aplicação exógena de trealose, a fim de melhorar a respostas das plantas a estresses abióticos como seca, calor, metais pesados e salinidade (Hassan *et al.*, 2023; Zulfiqar *et al.*, 2021).

Estudos apontam a possibilidade da incorporação da trealose na formulação de inoculantes devido aos seus efeitos benéficos. Os autores Focaroli *et al.*, (2019) demonstraram que a trealose amorfa obtida por *spray drying* protege o composto de Lecitina contra degradação e absorção de umidade. Streeter (2003) mostrou que a adição de trealose à cultura de *B. japonicum* durante o crescimento e, o subsequente acúmulo desta no citoplasma, favorece a sobrevivência celular e a proteção contra a dessecação. Já Aukema *et al.*, (2022) evidenciaram que matrizes contendo trealose como composto central aumentam significativamente a estabilidade de *Bradyrhizobium* desidratado, ao longo de 20 dias a 32°C e 50% de umidade relativa, em comparação com tampão sem aditivos.

Desta forma, em uma matriz de CMC, espera-se que a adição de trealose pode melhorar a estabilidade durante o armazenamento e aumentar a viabilidade celular dos microrganismos encapsulados. Isto posto, será desenvolvido um material a base de CMC adicionado de trealose para encapsulamento de *A. brasilense*.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho foi encapsular a bactéria de importância agrícola *A. brasilense* em matrizes de carboximetilcelulose e trealose a fim de garantir a viabilidade celular durante seu armazenamento.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- a) Encapsular a bactéria em matrizes de CMC e trealose formando esferas, pelo método de gelificação ionotrópica;
- b) Caracterizar as esferas de CMC e trealose quanto as propriedades físico-químicas e morfológicas;
- c) Avaliar a viabilidade do material no armazenamento;

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Manutenção da cultura bacteriana

O microrganismo utilizado neste trabalho foi a estirpe ab-V5 de *Azospirillum brasilense*, cedida pela Embrapa Soja de Londrina – PR. A estirpe é autorizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e recomendada para uso como inoculante nas culturas do milho, trigo e arroz. A estirpe foi mantida criopreservada em 20% de glicerol ultrapuro em ultrafreezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.1.1 Contagem de células viáveis no cultivo de *A. brasilense*

Todas as avaliações de viabilidade e concentração celular foram feitas por plaqueamento pelo método da gota. Inicialmente, 100  $\mu\text{L}$  de amostra foram transferidos para 900  $\mu\text{L}$  de solução NaCl estéril a 0,85% (m/v) (diluição  $10^{-1}$ ) e, em duplicata (séries A e B), procedeu-se a diluições decimais sucessivas até  $10^{-7}$ , com homogeneização em agitador de tubos após cada transferência de 100  $\mu\text{L}$ . Em seguida, cada placa contendo o meio ágar-RC (*Rojo Congo*) (Cassan et al., 2010) foi dividida em seis setores e 30  $\mu\text{L}$  de cada diluição ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$ , séries A e B) foram depositados em dois setores correspondentes, deixando as gotas secar por completo antes de inverter as placas para incubação.

Seis placas divididas em seis setores foram utilizadas (três por série); para a contagem, escolheu-se a placa com 10–30 colônias e calculou-se a média das duas gotas, descartando-se placas com variação superior a 50% em relação à média da mesma série e assegurando desvio inferior a 20% entre as médias das séries A e B. A Equação 1 foi utilizada para determinar a concentração na medida de Unidade de Formação de Colônias (UFC)/mL.

$$\text{Concentração} = \frac{(\text{fator de diluição})(\text{média das duas séries})}{\text{volume pipetado para a placa}} = \text{UFC/mL} \quad (1)$$

### 4.2 Encapsulamento

#### 4.2.1 Ensaio de Toxicidade do agente reticulante

Para o ensaio visual de toxicidade do cloreto de ferro em *A. brasilense*, foram preparadas soluções de  $\text{FeCl}_3$  nas concentrações de 0,0075 M, 0,005 M e 0,0025 M. Em placas de Petri contendo meio DYGS solidificado, depositaram-se 100  $\mu\text{L}$  de cada

solução sobre a superfície e realizou-se o espalhamento uniforme com alça bacteriológica estéril. As placas foram incubadas a 28 °C por 48 horas e, ao final do período, o crescimento das colônias foi avaliado visualmente, o que permite comparar o grau de inibição bacteriana em função da concentração de FeCl<sub>3</sub>.

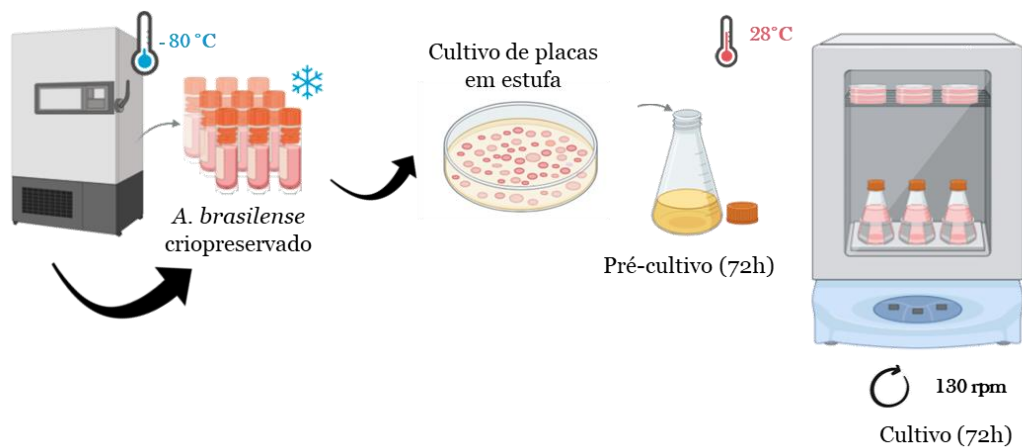
#### 4.2.2 Preparo do inóculo de *A. brasilense*

Um criotubo foi retirado do ultrafreezer e o seu conteúdo estriado em placas de Meio ágar-DYGS (*Dextrose, Yeast, Glucose Sucrose*) (Fukami; Cerezini; Hungria, 2018), que foram incubadas a 28 °C por 3 dias. Em seguida, uma colônia isolada foi selecionada com auxílio de alça descartável e inoculada em 10 mL de meio DYGS líquido (pré-inóculo), permanecendo em agitador orbital a 28 °C e 120 rpm por 3 dias. Por fim, 1 mL desse pré-inóculo foi transferido para 100 mL de meio DYGS e incubado sob as mesmas condições por mais 3 dias. Esse procedimento foi realizado para cinco cultivos distintos, sendo um correspondente ao controle e os demais aos quatro tratamentos.

Cada cultivo foi dividido em dois tubos falcons de 50 mL e centrifugado a 8000 rpm por 15 min a 4°C, como ilustrado na Figura 2. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram ressuspensos em 10 mL de solução salina 0,85%, um falcon foi vertido no outro, constituindo uma amostra de concentrado bacteriano.

Para determinar a concentração bacteriana, foi realizada o plaqueamento através do método da gota, em meio ágar-RC.

Figura 2 - Preparo da bactéria anterior ao encapsulamento



Fonte: Autoria Própria

### 4.2.3 *Produção das esferas*

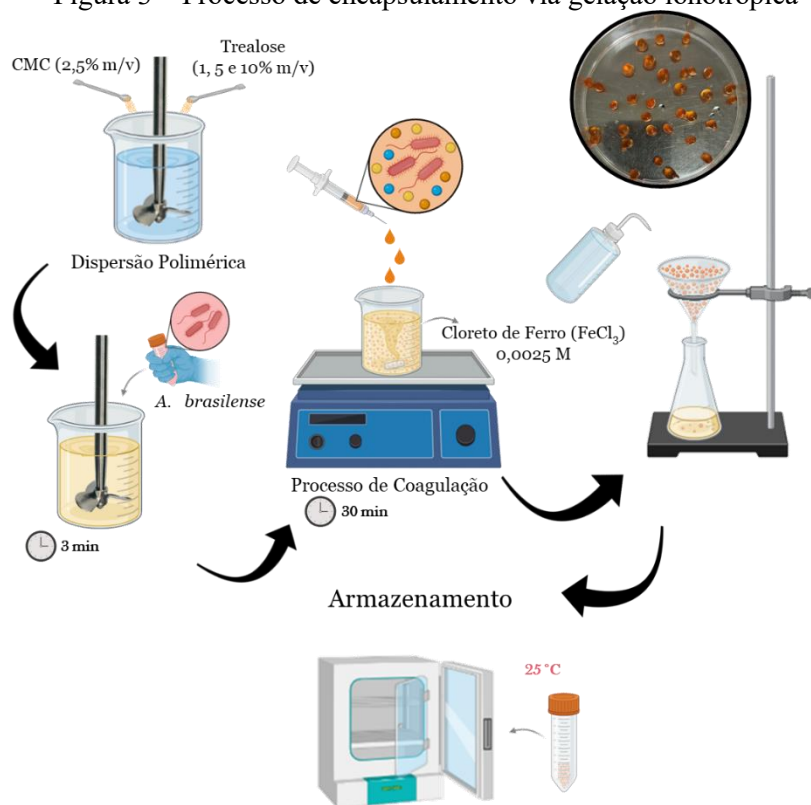
Para a produção das esferas, foram elaboradas soluções poliméricas em 4 tratamentos diferentes. O teor de carboximetilcelulose sal sódico de média viscosidade (1000/2000 CP) (Dinâmica) foi fixado em 2,5% (m/v) e variou-se os teores de trealose (Inlab) em 0, 1, 5 e 10% (m/v).

Dentro da câmara de fluxo laminar e com o uso do agitador mecânico foram preparadas 4 soluções poliméricas com 100 mL de água, 2,5 g de CMC e a quantidade de trealose correspondente ao tratamento. A solução permaneceu em agitação até total dissolução por até 20 minutos, formando um gel. A este gel fora adicionado a ressuspensão bacteriana, equivalente a 0,5 mL, permanecendo sob agitação por 5 min para homogeneização da ressuspensão na matriz.

Com o auxílio de uma seringa de 3 mL e uma agulha de 1,20 x 40 mm, a solução polimérica contendo microrganismo foi gotejada em uma solução de *crosslinking* de FeCl<sub>3</sub> 0,0025M sob agitação, conforme Zare-Akbari et al. (2016). As esferas recém-formadas de CMC-Trealose-*Azospirillum* permaneceram sob agitação na solução de *crosslinking* por 30 min, para que houvesse uma reticulação adequada. Logo após, as esferas foram lavadas com água destilada para remover o excesso de sal, peneiradas e deixadas em contato com papel para absorção da água excedente.

As esferas então foram armazenadas úmidas em tubos de 5 mL e colocadas na estufa a 25°C para o ensaio de viabilidade no armazenamento. O processo como um todo pode ser visualizado na Figura 3.

Figura 3 – Processo de encapsulamento via gelação ionotrópica



Fonte: Autoria Própria

#### 4.2.4 Teste de dissolução

Devido à natureza insolúvel em água que o CMC adquire quando reticulado com íons  $\text{Fe}^{3+}$  em formas de esferas, foi necessário investigar uma forma de romper as esferas de forma rápida e eficiente para que seja possível realizar as análises de viabilidade celular.

Neste teste foram colocadas esferas secas de 2,5% CMC e 1% de trealose em três soluções diferentes, na concentração de 0,1g de esferas por 5 mL de solução, sob rotação de 150 rpm e 25°C. As soluções foram solução salina 0,85% (padrão), tampão fosfato de potássio monobásico e dibásico 0,25M de pH 6,4 (Zago *et al.*, 2019) e solução tampão Citrato de sódio e ácido cítrico 100 mM, de pH 4,8, a fim de avaliar o comportamento da esfera em diferentes faixas de pH.

### 4.3 Características Estruturais e Funcionais

#### 4.3.1 *Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)*

A estrutura química das esferas foi estudada através da análise de Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), com o equipamento Burker Vertex 70 equipado com acessório de reflectância atenuada total (ATR).

#### 4.3.2 *Determinação do diâmetro das esferas*

Para cada tratamento, esferas úmidas foram dispostas em uma placa, ao lado de uma régua, fotografadas e subidas ao software ImageJ que através da análise digital dos pixels retorna o diâmetro médio das esferas.

#### 4.3.3 *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

Para observar a morfologia das esferas encapsuladas com inoculante, foi realizada a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com o microscópio JEOL JSM6510. O equipamento operou com uma tensão acelerada de 5 kV e ampliação de 1000x. As esferas foram liofilizadas e colocadas em stubs de alumínio com fita de carbono dupla face e revestidas com ouro.

#### 4.3.4 *Caracterização térmica*

A análise termogravimétrica (TGA) foi obtida com o analisador Q500 da *TA Instruments* a fim de observar o comportamento térmico do material. O gás utilizado foi nitrogênio na vazão de 50 mL/min.

#### 4.3.5 *Eficiência do encapsulamento*

A eficiência do encapsulamento (EE) foi acessada comparando-se o valor de UFC obtido da ressuspensão bacteriana adicionada no processo e das esferas logo após o encapsulamento (viabilidade *after loading*), multiplicando-se o resultado por 100., conforme equação 2.

$$EE (\%) = \left( \frac{\frac{UFC}{g} \text{ Após o encapsulamento}}{\frac{UFC}{g} \text{ da ressuspensão bacteriana adicionada}} * 100 \right) \quad (2)$$

Conforme Zago et al., (2019), as esferas encapsuladas foram dissolvidas em 5 mL solução tampão fosfato de potássio monobásico e dibásico 0,25M (pH 6,4) sob agitação

constante, para obtenção da alíquota necessária para análise de concentração celular. E então, foi realizada a contagem conforme descrito no item 4.1.1.

#### **4.3.6 Viabilidade no Armazenamento**

As esferas contendo o microrganismo encapsulado foram armazenadas em tubos falcons de 15 mL na estufa a 25 °C.

Para determinar a sobrevivência das células ao longo do tempo foram retiradas amostras nos tempos 1, 7 e 15 dias. Cada amostragem consiste em 5 esferas, que são dissolvidas em tubos falcons contendo 5 mL de tampão fosfato (pH 6,4) sob agitação. Após a dissolução das esferas, foi retirada uma alíquota de 100 µL para diluição seriada e determinação da concentração celular conforme descrito no item 4.1.1.

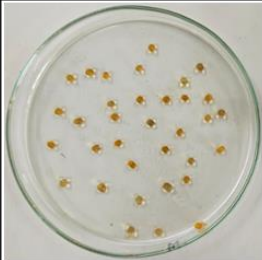



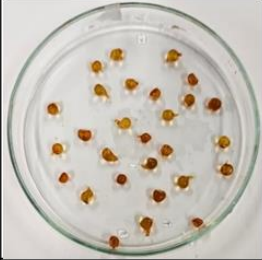
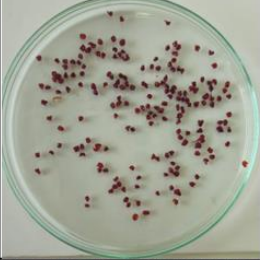

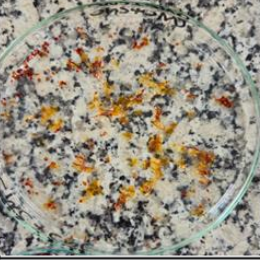
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Encapsulamento

#### 5.1.1 Definição da concentração de CMC

Para determinar a concentração ideal de CMC para encapsular o microrganismo, foram realizados testes visuais com soluções de CMC em diferentes concentrações (1, 2, 2,5 e 3% m/v). Essas soluções foram gotejadas em uma solução de  $\text{FeCl}_3$  0,0025M, e as esferas resultantes foram avaliadas visualmente quanto à uniformidade e integridade. A Figura 4 apresenta as diferenças visuais observadas nas esferas formadas em cada concentração testada.

Figura 4 – Formação de esferas de CMC em diferentes concentrações.

Concentração	Após reticulação em $\text{FeCl}_3$	Após Secagem	Observações
1% de CMC			Esferas uniformes, porém, ao secarem diminuem consideravelmente de tamanho.
2% de CMC			Esferas uniformes, bem reticuladas e formação pontiaguda devido à maior concentração no escoamento da agulha
2,5% de CMC			Esferas uniformes, rígidas e com pequena formação pontiaguda.
3% de CMC			Esferas formadas não uniformes. Dificuldade na formação da gota na extrusão com a agulha devido a mistura polimérica ser um gel muito espesso.

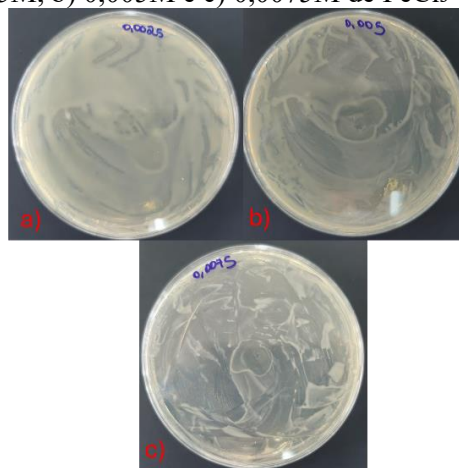
Fonte: Autoria Própria

Partindo de um pressuposto de que concentrações mais elevadas de CMC podem proporcionar uma matriz mais densa e protetora, essencial para manter a viabilidade do microrganismo e de que, no entanto, uma alta viscosidade pode comprometer a formação uniforme das esferas, prejudicando a eficiência do encapsulamento (Singh *et al.*, 2017). Como resultado, foi estabelecida uma concentração máxima de CMC que oferecesse equilíbrio entre estabilidade e manipulação da solução sem comprometer a morfologia das esferas. Com base nessa avaliação preliminar, a concentração de CMC selecionada para a continuação do trabalho na formação de esferas de CMC com adição de trealose para encapsulamento de *A. brasilense* foi de 2,5%. Esta concentração foi escolhida por se tratar do ponto máximo em que o gel apresentou formação de esferas uniformes e rígidas, características ideais para manter a estabilidade estrutural necessária durante o processo de encapsulamento.

### 5.1.2 *Ensaio de toxicidade do agente reticulante*

A partir das placas de cultivo em meio DYGS apresentadas na Figura 5, observa-se que *A. brasilense* apresentou crescimento uniforme mesmo na presença do agente reticulante cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), indicando uma certa tolerância à presença do íon  $\text{Fe}^{3+}$  nas concentrações testadas. Não foram observadas zonas de inibição ou redução significativa no desenvolvimento bacteriano, o que sugere ausência de efeito tóxico inicial grave. Ainda assim, considerando que concentrações mais elevadas poderiam afetar a viabilidade microbiana a longo prazo, optou-se por empregar a menor concentração eficaz (0,0025 M) para a obtenção das cápsulas, de modo a garantir o equilíbrio entre eficiência de reticulação e a viabilidade do microrganismo.

Figura 5 – Teste de toxicidade do agente reticulante em *A. brasilensis* inoculado com a) 0,0025M, b) 0,005M e c) 0,0075M de  $\text{FeCl}_3$

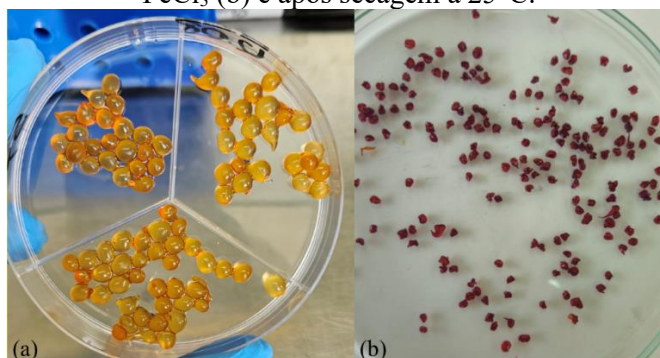


Fonte: Autoria Própria

### 5.1.3 Obtenção das esferas

O aspecto das esferas recém-formadas e após a secagem em estufa a 25 °C por 24 h é apresentada na Figura 6. As esferas possuem aspecto rígido, sem perder água com facilidade. A cor alaranjada é adquirida devido a reticulação com a solução de FeCl<sub>3</sub>.

Figura 6 – Exemplo das esferas de 2,5% CMC/5% Trealose-*Azospirillum* (a) após a extrusão em FeCl<sub>3</sub> (b) e após secagem a 25°C.



Fonte: Autoria Própria

Devido a existência de muitos grupos carboxil, o CMC sál-sódica sofre reticulação, ou *cross-linking*, na presença de cátions trivalentes como Fe<sup>3+</sup> ou Al<sup>3+</sup>. Quando a dispersão de CMC-Na, contendo suspensão de *A. brasilense* concentrado e trealose foi gotejada na solução de FeCl<sub>3</sub>, formaram-se esferas gelificadas instantaneamente. Isso ocorre devido à troca iônica entre os íons Na<sup>+</sup> do CMC e Fe<sup>3+</sup> da solução reticulante. Os íons de Fe<sup>3+</sup> deslocam os íons Na<sup>+</sup> e ligam-se a dois ou mais grupos carboxilato (-COO<sup>-</sup>) de cadeias diferentes, promovendo uma reticulação iônica e a formação de uma cadeia tridimensional (Kumar *et al.*, 2020). Consequentemente, as cadeias de CMC solúveis individualmente em água são transformadas em géis insolúveis precipitados em forma de esferas, devido ao método de dispersão de gotejamento (Zare-Akbari *et al.*, 2016a).

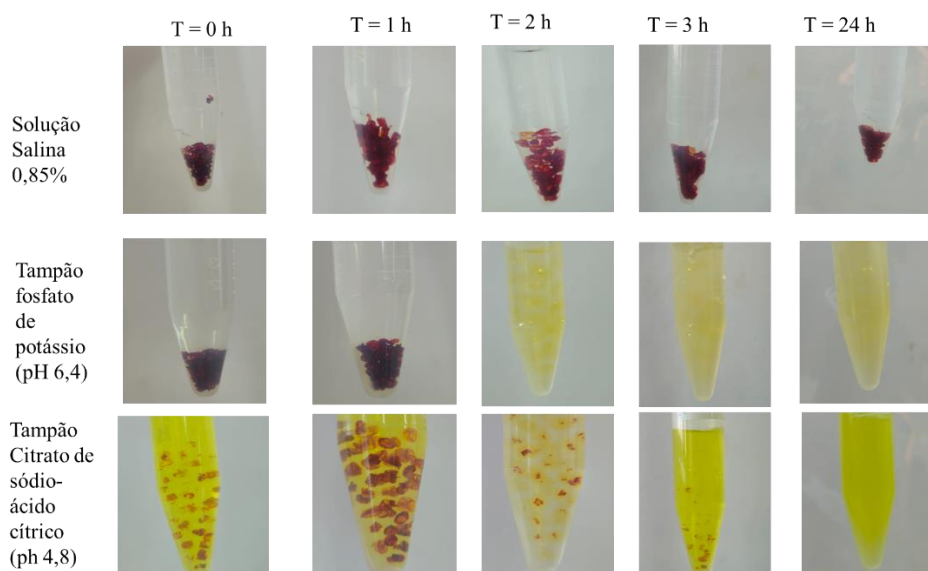
As esferas apresentam aspecto uniforme, com uma leve formação pontiaguda, resultante da reologia de formação da gota na agulha e da concentração de CMC, fixada em 2,5%. Entre os tratamentos contendo 0, 1, 5 e 10% (m/v) de trealose não se observou diferença visual entre as esferas. Aquelas que foram deixadas em estufa a 25 °C por 24 h para secagem apresentaram perda significativa da umidade, exibindo aspecto mais rugoso.

Em suma, o processo de encapsulamento por gelação ionotrópica foi eficiente na formação de esferas uniformes, resistentes à manipulação e destaca-se por ser um procedimento simples, reproduzível e que requer condições brandas.

### 5.1.4 Teste de dissolução

O comportamento de dissolução da mesma quantidade de esferas em diferentes soluções testadas, conforme o tempo de exposição pode ser visualizado na Figura 7.

Figura 7 - Diferenças visuais entre as soluções testadas para a dissolução das esferas  
TESTE DE DISSOLUÇÃO DE ESFERAS SECAS DE CMC (2,5%) E TREALOSE (1%)



Fonte: Autoria Própria

A partir deste teste foi possível observar que a solução salina não é capaz de dissolver esferas de CMC, e que, apesar de visível formação de gel, os tampões fosfato de potássio e citrato de sódio e ácido cítrico atuam melhor na dissolução do CMC. Desta forma, para prosseguimento do trabalho foi escolhido o tampão fosfato de potássio para dissolução das esferas para análises de viabilidade, devido a sua melhor dissolução e por apresentar pH de 6,4 que é próximo ao pH 6,8, ideal para bactéria *A. brasilense*.

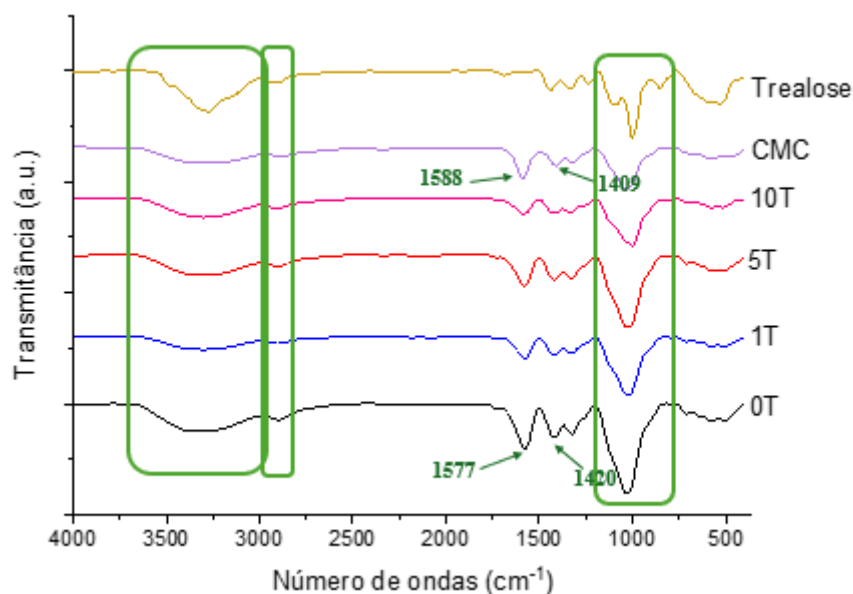
## 5.2 Características Estruturais e Funcionais

### 5.2.1 Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para avaliar a composição química do material das esferas reticuladas, identificar os grupos funcionais e verificar as interações entre os componentes, foi realizada análise do espectro de FTIR para as esferas nos 4 tratamentos estudados, bem como, a fim de comparação, os espectros dos reagentes CMC-Na (sal sódico) e trealose. Os espectros

normalizados obtidos podem ser visualizados na Figura 8.

Figura 8 – Espectro de FTIR normalizado das esferas de 2,5%CMC-Trealose-*Azospirillum* em tratamentos com diferentes quantidades de trealose e espectro de CMC e trealose completos



Fonte: Autoria Própria

As bandas observadas na região de  $3200 - 3300 \text{ cm}^{-1}$ , tanto nas esferas quanto para o CMC e a trealose, são características de alongamento de grupos hidroxilas (-OH) e interações intramoleculares e intermoleculares do hidrogênio. Por se tratar de um derivado de celulose e um açúcar, é uma faixa bastante comum de ser observada (Zare-Akbari *et al.*, 2016a). A região em torno de  $2900 \text{ cm}^{-1}$  está associada ao estiramento C-H, enquanto, as bandas em 1420 e 1600 são atribuídas as vibrações simétricas e assimétricas dos grupos carboxilas (Farhadnejad *et al.*, 2018a; Zare-Akbari *et al.*, 2016a). Além disso, as bandas entre  $1000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$  observa-se o estiramento de O-C-O-, comum para polissacarídeos como o CMC e a trealose (Zare-Akbari *et al.*, 2016a).

A faixa entre  $1400 \text{ e } 1600 \text{ cm}^{-1}$  está relacionada a ligação de *crosslinking* entre o CMC-Na e os íons metálicos da solução reticulante (Zare-Akbari *et al.*, 2016a). A reticulação do CMC ocorre pela incorporação dos ligante carboxilato ao íon  $\text{Fe}^{3+}$ . Neste composto de coordenação formado, há uma variação ( $\Delta\nu$ ) entre as vibrações de estiramento simétrico e assimétrico de grupos COO- em relação ao sal de ácido carboxílico. Esta variação indica qual a interação do ferro com a estrutura polimérica.

Se  $\Delta\nu$  do composto formado em relação ao polímero inicial é menor, está relacionada a uma coordenação quelante bi-dentado, se  $\Delta\nu$  é próxima, trata-se de coordenação ponte bi-dentado, e se  $\Delta\nu$  é maior que a coordenação metal-carboxilato, a coordenação não é identificada (Nakamoto, 2006). Comparando-se os picos de CMC-Na

(1588  $\text{cm}^{-1}$  e 1409  $\text{cm}^{-1}$ ) com a esfera reticulada 0T (1577  $\text{cm}^{-1}$  e 1420  $\text{cm}^{-1}$ ), percebe-se um  $\Delta\nu$  menor (157  $\text{cm}^{-1}$ ) para as esferas reticuladas com  $\text{Fe}^{3+}$ , se comparada com o CMC-Na (179  $\text{cm}^{-1}$ ) o que indica que a coordenação metal-carboxil formada para a reticulação dos macrocarreadores é de natureza quelante bi-dentado. Esta ligação ocorre quando o íon de ferro se coordena com dois pontos da ligação, que são os grupos carboxila ou hidroxila, de uma mesma cadeia de CMC ou de cadeias diferentes e próximas.

Os autores da Silva Bezerra; França; da Costa Marques (2021) obtiveram resultados semelhantes no espectro FTIR de um catalisador a base de CMC, em que, para as bandas assimétricas e simétricas dos grupos carboxilatos de CMC-Na encontraram picos de 1588  $\text{cm}^{-1}$  e 1440  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. Já nas amostras de CMC-Fe a frequência da banda assimétrica mudou de 1588  $\text{cm}^{-1}$  para 1577  $\text{cm}^{-1}$ , já a de 1420  $\text{cm}^{-1}$  permaneceu a mesma. Desta forma, os autores constataram a formação de coordenação quelante bi-dentado para CMC-Fe, porque a separação das bandas ( $\Delta\nu$ ) de CMC-Fe é menor que a de CMC-Na.

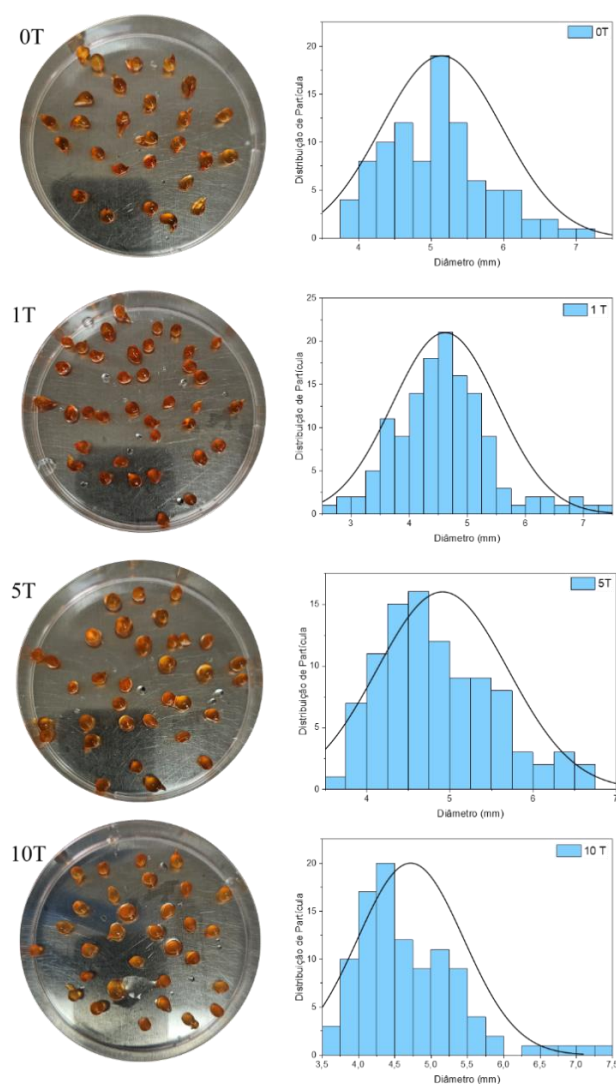
### 5.2.2 Determinação do diâmetro das esferas

O tamanho das esferas de gel formadas depende do método utilizado para extrusão dos aditivos e no caso da gelação ionotrópica, do tamanho da abertura da agulha. A Figura 9 apresenta as esferas utilizadas na medição do diâmetro e a distribuição dos resultados, obtidos pelo software ImageJ. A Tabela 1 apresenta o diâmetro médio das esferas úmidas de CMC com 0, 1, 5 e 10% de trealose.

Tabela 1 – Diâmetro médio das esferas úmidas de CMC-Trealose-*Azospirillum*

Tratamento	Diâmetro (mm)
0T	5,15 ± 0,83
1T	4,62 ± 0,91
5T	4,91 ± 0,80
10T	4,72 ± 0,73

Figura 9 – Esferas úmidas de CMC-Trealose-*Azospirillum* e a distribuição de partícula por diâmetro (mm)



Fonte: Autoria Própria

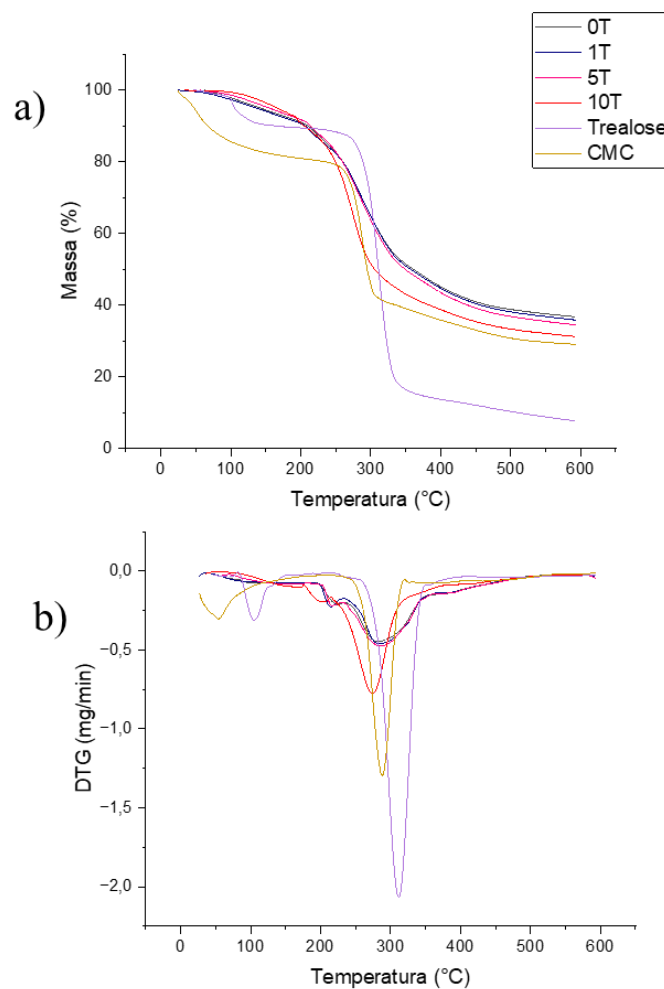
Obteve-se um diâmetro médio do macrocarregador 0T de 5,15 mm, enquanto para os macrocarregadores contendo trealose, obteve-se diâmetros entre 4,62 e 4,91 mm. Trabalhos de encapsulamento com CMC que trazem o diâmetro das esferas são escassos na literatura. Zago e colaboradores (2019) encapsularam *A. brasilense* em esferas de alginato de sódio com trealose com o método de gelação ionotrópica e obtiveram, através de análise morfométrica, diâmetros de 3,3, 4,4 e 4,0 mm para tratamentos com 0,1M, 0,5M e 1M de trealose, utilizando-se de uma pipeta de Pasteur para gotejamento. Tratando-se de esferas formadas por alginato de sódio, é frequente encontrar trabalhos com resultados de diâmetro de partículas maiores de 1 mm, o que as conferem a denominação de macrocarregadores (Szopa *et al.*, 2022c).

O tamanho dos macrocarregadores oferece vantagens na aplicação no sulco de plantio, onde os macrocarregadores podem liberar os microrganismos nas proximidades do sistema radicular, promovendo uma colonização precoce e eficaz à medida que a planta se desenvolve (De Gregorio *et al.*, 2017).

### 5.2.3 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise de termogravimétrica é uma ferramenta para se avaliar as características térmicas de um material sob aquecimento, bem como sua dinâmica de degradação térmica. Portanto, o instrumento mede a variação da massa do material em função da temperatura (Escalante *et al.*, 2022). Os resultados da curva de TGA e DTG (Derivada Termogravimétrica) são apresentados na Figura 10.

Figura 10 – a) Curva termogravimétrica (TGA) e b) curva da derivada termogravimétrica (DTG) para amostras de esferas de CMC com diferentes tratamentos de trealose em (%) e amostras de trealose e CMC puros.



Fonte: Autoria Própria

Na Tabela 2 observa-se os resultados para a  $T_{\text{onset}}$  ( $^{\circ}\text{C}$ ), tida como a temperatura onde se inicia a degradação do material (considera-se 10% do material degradado) e a  $T_{\text{máx}}$  ( $^{\circ}\text{C}$ ), Temperatura Máxima de Decomposição, é onde ocorre a perda máxima de massa de material em função do calor.

Tabela 2 – Resultados da análise termogravimétrica para os diferentes tratamentos e materiais puros trealose e CMC.

<b>Tratamento</b>	<b><math>T_{\text{onset}}</math> (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>	<b><math>T_{\text{máx}}</math> (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>
<b>0T</b>	210,78	281,44
<b>1T</b>	206,51	283,78
<b>5T</b>	214,03	284,24
<b>10T</b>	204,95	273,91
<b>Trealose</b>	164,26	311,72
<b>CMC</b>	67,14	287,96

Observa-se uma variação no parâmetro  $T_{\text{onset}}$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) conforme a quantidade de trealose na esfera. O Tratamento 5T obteve o maior valor de  $T_{\text{onset}}$  (214,03  $^{\circ}\text{C}$ ) e o tratamento 10T o menor (204,95  $^{\circ}\text{C}$ ). Dessa forma, é possível inferir que o aumento gradual de trealose na formulação não aumenta de forma consistente a estabilidade do material. Entretanto, comparando-se a trealose pura (164,26  $^{\circ}\text{C}$ ) e o CMC puro (67,14  $^{\circ}\text{C}$ ), é possível inferir que a produção de um material reticulado baseado nestes dois materiais, neste caso as esferas, pode oferecer uma maior resistência térmica.

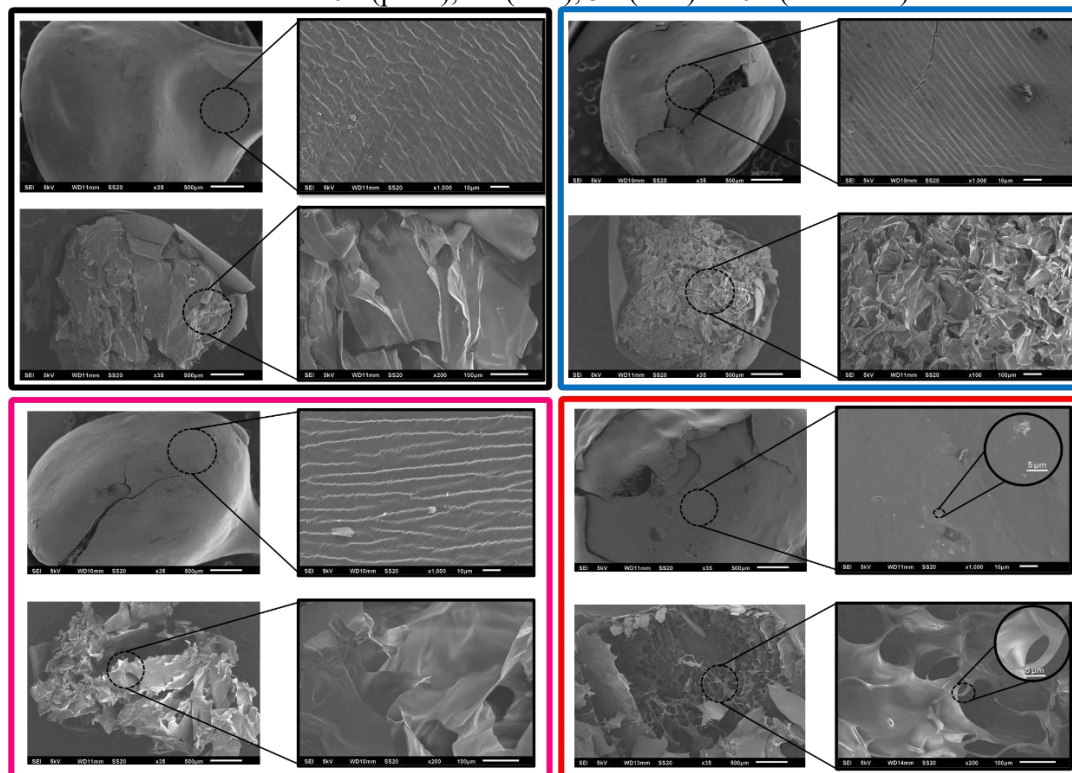
Entre os tratamentos 0T e 5T houve um pequeno aumento de até 5% na  $T_{\text{máx}}$  conforme a quantidade de trealose na matriz. Entretanto, no tratamento 10T houve queda da temperatura máxima, o que pode indicar que altas concentrações de trealose no material pode prejudicar a resistência térmica na temperatura máxima de decomposição. Entre tanto, não se trata de uma preocupação visando a aplicação na agricultura, uma vez que todo o processo se passa em temperatura ambiente ( $\sim 25^{\circ}\text{C}$ )

#### 5.2.4 *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

A morfologia das esferas liofilizadas foi avaliada por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura e podem ser observadas na Figura 11. As imagens do MEV revelam que não há separação de fases no material, dentro dos limites de detecção do equipamento, o que indica que a mistura dos reagentes que compõe a superfície externa das esferas foi eficiente. Exceto para os tratamentos 5T e 10T em que podem ser visualizados pequenos grumos na superfície, que podem ser oriundos dos cristais de trealose, exibindo um excesso do açúcar na formação do material.

Através da interpretação das imagens, é possível notar que as esferas, em todos os tratamentos, possuem camada de superfície regular e lisa. No entanto, o aumento da concentração de trealose demonstra aumentar a rugosidade da camada superficial das esferas.

Figura 11 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das esferas liofilizadas e secas nos tratamentos 0T (preto), 1T (azul), 5T (rosa) e 10T (vermelho)



Fonte: Autoria Própria

### 5.2.5 Eficiência no Encapsulamento e Viabilidade no armazenamento

A Tabela 3 apresenta os resultados da viabilidade celular (UFC/g de polímero) após o encapsulamento, 7 e 15 dias de armazenamento, bem como resultados de eficiência de encapsulamento, que em caso de 100% significaria que todas as células adicionadas à solução forma incorporadas a matriz. Esferas encapsuladas com *A. brasilense* em 4 tratamentos a base de 2,5% CMC (0, 1, 5 e 10% de trealose) foram armazenados de forma úmida na estufa a 25 °C A escolha dessa temperatura de armazenamento se deu em função da inviabilidade de sobrevivência da bactéria encapsulada a 4 °C, conforme verificado em testes preliminares realizados em geladeira. Os resultados evidenciam que as esferas mantiveram carga bacteriana somente até o 15º dia de experimento, após isso não foi detectado presença do microrganismo alvo nas esferas.

Tabela 3 - Viabilidade das esferas no encapsulamento (after loading) e após 15 dias de armazenamento em diferentes tratamentos.

Tratamento	0 dias <i>-after loading</i> (UFC/g)	7 dias de armazenamento (UFC/g)	15 dias de armazenamento (UFC/g)	Eficiência de Encapsulamento (%)
<b>Controle Líquido</b>	$9,19 \times 10^{11}$ $\pm 1,09 \times 10^7$	$9,40 \times 10^{10}$ $\pm 9,86 \times 10^6$	$7,00 \times 10^{10}$ $\pm 1,10 \times 10^7$	-
<b>2,5% CMC + 0% Trealose</b>	$1,97 \times 10^{10}$ $\pm 1,49 \times 10^9$	$2,26 \times 10^6$ $\pm 1,32 \times 10^5$	$5,56 \times 10^4$ $\pm 3,93 \times 10^3$	69,7
<b>2,5% CMC + 1% Trealose</b>	$8,36 \times 10^9$ $\pm 2,28 \times 10^8$	$0,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	63,5
<b>2,5% CMC + 5% Trealose</b>	$4,43 \times 10^9$ $\pm 2,14 \times 10^8$	$2,46 \times 10^7 \pm$ $2,16 \times 10^6$	$0,00 \times 10^0$	47,9
<b>2,5% CMC + 10% Trealose</b>	$5,44 \times 10^9$ $\pm 4,00 \times 10^8$	$0,00 \times 10^0$	$0,00 \times 10^0$	62,5

A maior retenção de células viáveis foi observada na formulação de 2,5% CMC sem adição de trealose, além de apresentar maior eficiência de encapsulamento (69,7%) e maior viabilidade, ainda que reduzida, entre os 7 e 15 dias de armazenamento ( $2,26 \times 10^6$  e  $5,56 \times 10^4$  UFC/g, respectivamente). Estes dados divergem daquelas cápsulas em que houve adição de trealose (1, 5 e 10%), que apresentam declínio total da viabilidade celular durante o armazenamento, o que sugere que a adição de trealose à matriz, nas condições testadas, não proporcionou o efeito protetor esperado.

A trealose tem capacidade de proteger os microrganismos de estresses como dessecação e congelamento, atuando para preservar a estrutura das membranas e proteínas, entretanto é preciso observar as condições em que é aplicada (Santivarangkna; Kulozik; Foerst, 2007). É possível que a adição do dissacarídeo tenha apresentado efeito contrário ao esperado devido à propriedade de higroscopicidade, que nesse sistema à temperatura ambiente, tenha favorecido a retenção de umidade (Tapia; Koshland, 2014). O que pode ter ocasionado reação de degradação da matriz polimérica, bem como aceleração do metabolismo residual das células, resultando em perda precoce da viabilidade. Além disso, a quantidade de trealose adicionada pode ter sido excessiva, resultando em efeitos adversos na estabilidade da matriz e sobrevivência celular.

Pontualmente, o tratamento contendo 5% de trealose apresentou maior viabilidade no 7º dia ( $2,46 \times 10^7$  UFC/g), que pode estar relacionado a uma liberação de células viáveis. Adicionalmente, pode-se considerar que a concentração de trealose incorporada aos tratamentos tenha sido muito alta.

Além disso, as esferas de CMC-trealose podem não ter suportado viabilidade do microrganismo durante mais tempo por fatores como a ausência na matriz de nutrientes

essenciais para o metabolismo de *Azospirillum*, dentre eles, vitaminas e aminoácidos.

Neste estudo, a adição de trealose deu-se durante a formação do gel de CMC e água, resultando em alta proporção de trealose na relação de massa/massa do polímero, o que pode ter prejudicado a sobrevivência da bactéria, visto que a matriz possuía mais trealose que CMC.

Zago e colaboradores (2019) realizaram o encapsulamento de *A. brasilense* em alginato de sódio a 3% adicionado de trealose em solução a concentrações de 0,1M, 0,3M e 0,5M (m/v), na proporção volumétrica de 2:2:1 (alginato/solução de trealose/bactéria), ou seja, uma proporção bem menor que o presente estudo. Os autores observaram que no tratamento com maior quantidade de trealose (1M) houve um decréscimo de viabilidade de 60% nas primeiras 24h de armazenamento.

Os grânulos resultantes do estudo de Zago e colaboradores (2019) tiveram viabilidade limitada a apenas 30 dias após a gelificação e o armazenamento. Os autores seguiram o método da gelificação ionotrópica de encapsulamento em alginato de sódio, com posterior armazenamento a 21°C. Konrad (2016) obteve viabilidade celular até o 45º dia de armazenamento, observando queda na viabilidade de  $1,32 \times 10^{11}$  UFC/mL no momento do encapsulamento (dia 0) para cerca de  $10^6$  UFC/mL aos 15 dias, o que representa uma queda de aproximadamente cinco ordens de magnitude. A autora relaciona a queda viabilidade à uma fase de adaptação da célula pós-encapsulamento e a falta de aditivos como ácido húmico, lactose ou amido na fórmula.

Esse desempenho pode refletir uma dificuldade das bactérias do gênero *Azospirillum* em permanecerem viáveis em matrizes sólidas com baixa disponibilidade de nutrientes. Em contraste, as PGBR do gênero *Bacillus* demonstram maior estabilidade. No estudo de Lopes; Oliveira-Paiva; Farinas (2023), por exemplo, *Bacillus subtilis* encapsulado em amido e pectina com  $\text{CaCl}_2$  0,1 M manteve viabilidade de  $10^9$  UFC/g por até 6 meses a 4°C.

A diferença na viabilidade relatada entre bactérias do gênero *Azospirillum* e *Bacillus* em formulações encapsuladas pode estar relacionada às distintas características fisiológicas e morfológicas que estes gêneros possuem. *Azospirillum*, em suspensão, possui estrutura celular bastonete curvo e não forma esporos (Maroniche *et al.*, 2024), o que pode tornar mais sensível à carência nutricional e ao estresse físico-químico em matrizes sólidas, como esferas de alginato ou CMC sem suplementação adequada. Por outro lado, *Bacillus* produzem endósporos resistentes, capazes de manter a viabilidade celular em condições adversas (Khimmakthong *et al.*, 2020; Krastev *et al.*, 2025). A

robustez da parede celular, a menor exigência nutricional em estado esporulado e a alta resistência a variações de umidade e temperatura permitem que *Bacillus* sobreviva por períodos significativamente maiores (Bressuire-Isoard; Broussolle; Carlin, 2018; Elisashvili; Kachlishvili; Chikindas, 2019). No mesmo sentido, trabalhos que encapsularam fungos esporulantes como *Trichoderma spp.* em matrizes de CMC obtiveram maiores resultados de viabilidade ao longo do tempo (Bronzi *et al.*, 2022a; Ferreira, 2024).

Ademais, durante a reticulação, a solução de cloreto de ferro individualmente representa um fator prejudicial ao microrganismo, por possuir alta acidez (pH entre 1 e 3). Durante o processo de encapsulamento, o contato direto com esse meio ácido pode comprometer a estabilidade da bicamada lipídica da membrana celular, interferindo no transporte seletivo de íons (Guan; Liu, 2019). Adicionalmente, essa condição pode induzir a célula a um estresse ácido, exigindo maior consumo energético para manter o pH intracelular estável, o que pode comprometer funções metabólicas essenciais. Como consequência, pode ocorrer morte celular ou redução significativa na viabilidade do microrganismo. No trabalho de isolamento de *Azospirillum* em solos com diferentes faixas de pH, os autores New; Kennedy (1989) observaram a presença da bactéria em solos com pH entre 5,0 e 6,0, mas relataram sua ausência em ambientes com pH inferior a 4,5, indicando uma limitação na sobrevivência e estabelecimento de *Azospirillum* em condições de acidez elevada.

Por conseguinte, é possível que parte do cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) não tenha sido completamente removida durante a etapa de lavagem das cápsulas, resultando na retenção de resíduos na matriz polimérica. Com o tempo de armazenamento, esses resíduos podem liberar íons férricos ( $\text{Fe}^{3+}$ ), que podem sofrer reação de Fenton, liberando espécies reativas de oxigênio, que podem danificar membranas, lipídeos e DNA (Cornelis *et al.*, 2011). Este processo caracteriza um estresse oxidativo, que pode levar à redução da viabilidade celular e morte das bactérias encapsuladas.

Outro fator que pode ter contribuído para a perda de viabilidade celular é a força de cisalhamento, que ocorre, no processo de encapsulamento, durante a agitação mecânica do gel de CMC-trealose com a suspensão bacteriana. Em seu estudo com *Bradyrhizobium spp.*, Carrillo-Mora *et al.*, (2024) demonstraram que fluxos de cisalhamento elevados podem quebrar filamentos flagelares, reduzindo a motilidade, ainda que ocorra recuperação parcial após algumas horas. Dessa forma, o estudo sugere que cisalhamento mecânico intenso pode causar dano físico a estruturas celulares

delicadas, potencialmente prejudicando a motilidade da bactéria no meio adicionado, bem como afetar a sobrevivência celular.

A formulação de inoculantes agrícolas à base de *Azospirillum brasilense* que mantenham elevada viabilidade celular durante o armazenamento ainda representa um desafio significativo. Embora promissora, a tecnologia de encapsulamento desse microrganismo em matrizes biodegradáveis demanda avanços e estudos em relação à aditivos que forneçam proteção celular, bem como nas condições ideais de armazenamento.

## 6. CONCLUSÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos, foram desenvolvidas esferas de CMC encapsuladas para proteção e armazenamento o microrganismo inoculante agrícola *A. brasilense*. Na quantidade em que foi adicionada, a trealose não mostrou o efeito esperado de osmoproteção.

As macroesferas formadas através da gelificação ionotrópica do CMC com solução de  $\text{FeCl}_3$  formou um composto de coordenação metálica e as esferas mostraram-se de morfologia uniforme, sem muita porosidade.

Dessa forma, o encapsulamento de *A. brasilense* com material biodegradável CMC e aditivo ainda precisa ser devidamente estudada em suas particularidades, para que seja viável para a formulação de inoculantes. Dentro do escopo que foi abordado nesse trabalho, sugere-se para trabalhos futuros, a investigação de outras estratégias de proteção celular, como o uso combinado de crioprotetores, variações na concentração de CMC e trealose, métodos de secagem e armazenamento. Além disso, é importante a realização de análises do comportamento matriz polimérica ao longo do tempo, bem como avaliação da umidade, da integridade estrutural das cápsulas e da presença de íons  $\text{Fe}^{3+}$  residuais.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADJUIK, Toby A.; NOKES, Sue E.; MONTROSS, Michael D. Evaluating the feasibility of using lignin–alginate beads with starch additive for entrapping and releasing *Rhizobium* spp. *Journal of Applied Polymer Science*, [s. l.], vol. 139, no 47, 2022.

AKTER, Maimuna *et al.* Cellulose-Based Hydrogels for Wastewater Treatment: A Concise Review. *Gels* 2021, Vol. 7, Page 30, [s. l.], vol. 7, no 1, p. 30, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2310-2861/7/1/30/htm>. Acesso em: 8 out. 2024.

ALZATE ZULUAGA, Monica Yorlady *et al.* Plant-microbe interactions in the rhizosphere for smarter and more sustainable crop fertilization: the case of PGPR-based biofertilizers. *Frontiers in Microbiology*, [s. l.], vol. 15, p. 1440978, 2024. Disponível em: <https://sdgs.un.org/goals>. Acesso em: 3 out. 2024.

ANDREATA, Matheus F.L. *et al.* Microbial Fertilizers: A Study on the Current Scenario of Brazilian Inoculants and Future Perspectives. *Plants*, [s. l.], vol. 13, no 16, p. 2246, 2024. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11360115/>. Acesso em: 26 out. 2024.

AUKEMA, Kelly G. *et al.* Core-shell encapsulation formulations to stabilize desiccated Bradyrhizobium against high environmental temperature and humidity. *Microbial Biotechnology*, [s. l.], vol. 15, no 9, p. 2391–2400, 2022. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1751-7915.14078>. Acesso em: 13 out. 2025.

BACKER, Rachel *et al.* Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. *Frontiers in plant science*, [s. l.], vol. 9, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30405652/>. Acesso em: 3 out. 2024.

BALLA, Amel *et al.* Recent Advances in Encapsulation Techniques of Plant Growth-Promoting Microorganisms and Their Prospects in the Sustainable Agriculture. *Applied Sciences* 2022, Vol. 12, Page 9020, [s. l.], vol. 12, no 18, p. 9020, 2022a. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3417/12/18/9020/htm>. Acesso em: 22 out. 2024.

BALLA, Amel *et al.* Recent Advances in Encapsulation Techniques of Plant Growth-Promoting Microorganisms and Their Prospects in the Sustainable Agriculture. *Applied Sciences* 2022, Vol. 12, Page 9020, [s. l.], vol. 12, no 18, p. 9020, 2022b. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-3417/12/18/9020/htm>. Acesso em: 1 ago.

2025.

BASHAN, Yoav; DE-BASHAN, Luz E. Inoculant Preparation and Formulations for *Azospirillum* spp. Handbook for *Azospirillum*: Technical Issues and Protocols, [s. l.], p. 469–485, 2015. Disponível em: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-06542-7\\_26](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-06542-7_26). Acesso em: 3 out. 2024.

BEULA ISABEL, J. *et al.* Chitosan-encapsulated microbial biofertilizer: A breakthrough for enhanced tomato crop productivity. *International Journal of Biological Macromolecules*, [s. l.], vol. 260, p. 129462, 2024. Disponível em: Acesso em: 27 out. 2024.

BHAT, Basharat Ahmad *et al.* The role of plant-associated rhizobacteria in plant growth, biocontrol and abiotic stress management. *Journal of Applied Microbiology*, [s. l.], vol. 133, no 5, p. 2717–2741, 2022. Disponível em: Acesso em: 3 out. 2024.

BHUVANACHANDRA, Bhoopal *et al.* New Class of Chitosanase from *Bacillus amyloliquefaciens* for the Generation of Chitooligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [s. l.], vol. 69, no 1, p. 78–87, 2021.

BRESSUIRE-ISOARD, Christelle; BROUSSOLLE, Véronique; CARLIN, Frédéric. Sporulation environment influences spore properties in *Bacillus*: evidence and insights on underlying molecular and physiological mechanisms. *FEMS Microbiology Reviews*, [s. l.], vol. 42, no 5, p. 614–626, 2018. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/femsre/fuy021>. Acesso em: 11 jul. 2025.

BRONDI, Mariana *et al.* Encapsulation of *Trichoderma harzianum* with nanocellulose/carboxymethyl cellulose nanocomposite. *Carbohydrate Polymers*, [s. l.], vol. 295, 2022a.

BRONDI, Mariana *et al.* Encapsulation of *Trichoderma harzianum* with nanocellulose/carboxymethyl cellulose nanocomposite. *Carbohydrate Polymers*, [s. l.], vol. 295, 2022b.

ÇAKMAKÇI, Ramazan. A Review of Biological Fertilizers Current use, New Approaches, and Future Perspectives. *International Journal of Innovative Studies in Sciences and Engineering Technology*, [s. l.], 2019. Disponível em: [www.ijisset.org](http://www.ijisset.org). Acesso em: 22 out. 2024.

CAO, Lin *et al.* Food-based biomaterials: pH-responsive alginate/gellan gum/carboxymethyl cellulose hydrogel beads for lactoferrin delivery. *Biomaterials advances*, [s. l.], vol. 165, 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39213959/>. Acesso em: 13 out. 2025.

CARRILLO-MORA, Juan Pablo *et al.* Damage and recovery of flagella in soil bacteria exposed to shear within long microchannels. [*s. l.*], 2024. Disponível em: <https://arxiv.org/abs/2410.10932v2>. Acesso em: 11 jul. 2025.

CASSÁN, Fabricio *et al.* Everything you must know about Azospirillum and its impact on agriculture and beyond. [*S. l.*]: Springer, 2020.

CHAUDHARY, Twinkle *et al.* Techniques for improving formulations of bioinoculants. 3 biotech, [*s. l.*], vol. 10, p. 199, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02182-9>.

COHEN, Ana C. *et al.* Participation of abscisic acid and gibberellins produced by endophytic Azospirillum in the alleviation of drought effects in maize. <https://doi.org/10.1139/B09-023>, [*s. l.*], vol. 87, no 5, p. 455–462, 2009. Disponível em: <https://cdnsiencepub.com/doi/10.1139/B09-023>. Acesso em: 26 out. 2024.

CORNELIS, Pierre *et al.* Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria Iron Q1 homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. [*s. l.*], 2011. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/51121544>. Acesso em: 13 jul. 2025.

DA SILVA BEZERRA, Diego; FRANÇA, Rodrigo José; DA COSTA MARQUES, Mônica Regina. A Novel Catalytic Process for Degradation of Bisphenol A in Aqueous Solutions Using Fe Supported on Alginate/Carboxymethylcellulose. Catalysis Letters, [*s. l.*], vol. 151, no 5, p. 1477–1487, 2021. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10562-020-03403-9>. Acesso em: 14 nov. 2024.

DARDEER, Hemat M.; GAD, Ahmed N.; MAHGOUB, Mohamed Y. Promising superabsorbent hydrogel based on carboxymethyl cellulose and polyacrylic acid: synthesis, characterization, and applications in fertilizer engineering. BMC Chemistry, [*s. l.*], vol. 18, no 1, p. 1–13, 2024. Disponível em: <https://bmcchem.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13065-024-01244-w>. Acesso em: 8 out. 2024.

DARIO CASSAN, Fabricio *et al.* Control de Calidad de Inoculantes que contienen Azospirillum sp. Manual de Procedimientos II. [*S. l.*]: [*s. d.*], 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/215588677>.

DE GIULIO, B. *et al.* Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying. World Journal of Microbiology and Biotechnology, [*s. l.*], vol. 21, no 5, p. 739–746, 2005. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-004-4735-2>. Acesso em: 27 out. 2024.

DE GREGORIO, Priscilla Romina *et al.* Beneficial rhizobacteria immobilized in nanofibers for potential application as soybean seed bioinoculants. *PLOS ONE*, [s. l.], vol. 12, no 5, p. e0176930, 2017. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0176930>. Acesso em: 10 nov. 2024.

DE PAIVA ROLLA-SANTOS, Amanda Alves *et al.* Developing a genomic-based strategy to confirm microbial identity in bio-inputs containing multiple strains: an easy, fast, and low-cost multiplex PCR applied to inoculants carrying soybean Bradyrhizobium. *Brazilian Journal of Microbiology*, [s. l.], vol. 55, no 3, p. 2869–2877, 2024. Disponível em: <https://link-springer-com.ez31.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s42770-024-01441-8>. Acesso em: 3 out. 2024.

DEVASIA, Linta; JOHN, Neetha. Carboxymethyl Cellulose-Starch-Gelatin Based Hydrogel Membranes for Heavy Metal Removal. *International Journal of Innovative Science and Research Technology*. [S. l.]: [s. d.], 2021. Disponível em: [www.ijisrt.com](http://www.ijisrt.com).

DOLATABADI, Maryam; NAIDU, Haripriya; AHMADZADEH, Saeid. Adsorption characteristics in the removal of chlorpyrifos from groundwater using magnetic graphene oxide and carboxy methyl cellulose composite. *Separation and Purification Technology*, [s. l.], vol. 300, p. 121919, 2022. Disponível em: Acesso em: 8 out. 2024.

DUARTE, Jefersson Pereira; RUFF, Oilhan Jonas; SANTOS, Carlos Leandro Rodrigues dos. Inoculação de milho com inoculante à base de *Azospirillum brasilense* sob doses de nitrogênio em solo arenoso. *Scientific Electronic Archives*, [s. l.], vol. 14, no 8, 2021. Disponível em: <https://scientificelectroncarchives.org/index.php/SEA/article/view/1391>. Acesso em: 13 out. 2025.

ELBEIN, Alan D. *et al.* New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, [s. l.], vol. 13, no 4, p. 17R-27R, 2003. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/glycob/cwg047>. Acesso em: 8 out. 2024.

ELÍAS, J. M. *et al.* Role of ethylene and related gene expression in the interaction between strawberry plants and the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Plant Biology*, [s. l.], vol. 20, no 3, p. 490–496, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/plb.12697>. Acesso em: 26 out. 2024.

ELISASHVILI, Vladimir; KACHLISHVILI, Eva; CHIKINDAS, Michael L. Recent Advances in the Physiology of Spore Formation for Bacillus Probiotic Production. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, [s. l.], vol. 11, no 3, p. 731–747, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12602-018-9492-x>. Acesso em: 11 jul. 2025.

ESCALANTE, Jamin *et al.* Pyrolysis of lignocellulosic, algal, plastic, and other biomass wastes for biofuel production and circular bioeconomy: A review of thermogravimetric analysis (TGA) approach. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, [s. l.], vol. 169, p. 112914, 2022. Disponível em: Acesso em: 10 nov. 2024.

FADIJI, Ayomide Emmanuel *et al.* The Potential Role of Microbial Biostimulants in the Amelioration of Climate Change-Associated Abiotic Stresses on Crops. *Frontiers in Microbiology*, [s. l.], vol. 12, p. 829099, 2022. Disponível em: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org). Acesso em: 22 out. 2024.

FARHADNEJAD, Hassan *et al.* Facile preparation and characterization of pH sensitive Mt/CMC nanocomposite hydrogel beads for propranolol controlled release. *International Journal of Biological Macromolecules*, [s. l.], vol. 111, p. 696–705, 2018a.

FARHADNEJAD, Hassan *et al.* Facile preparation and characterization of pH sensitive Mt/CMC nanocomposite hydrogel beads for propranolol controlled release. *International Journal of Biological Macromolecules*, [s. l.], vol. 111, p. 696–705, 2018b.

FERREIRA, Aline Medeiro. Filmes Poliméricos A Base De Carboximetil Celulose Reforçados Com Nanocelulose Com Potencial Para Encapsular O Agente De Biocontrole *Trichoderma harzianum*. 2024. 1–70 f. - Universidade Federal De São Carlos, São Carlos, 2024.

FOCAROLI, S. *et al.* A Design of Experiment (DoE) approach to optimise spray drying process conditions for the production of trehalose/leucine formulations with application in pulmonary delivery. *International journal of pharmaceuticals*, [s. l.], vol. 562, p. 228, 2019. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6562166/>. Acesso em: 13 out. 2025.

FUKAMI, Josiane *et al.* Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. *AMB Express*, [s. l.], vol. 6, no 1, p. 1–13, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13568-015-0171-y>. Acesso em: 26 out. 2024.

FUKAMI, Josiane *et al.* Antioxidant activity and induction of mechanisms of resistance to stresses related to the inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Archives of Microbiology*, [s. l.], vol. 200, no 8, p. 1191–1203, 2018. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00203-018-1535-x>. Acesso em: 26 out. 2024.

FUKAMI, Josiane; CERZINI, Paula; HUNGRIA, Mariangela. Azospirillum: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express* 2018 8:1, [s. l.], vol. 8, no 1, p. 1–12, 2018. Disponível em: <https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-018-0608-1>. Acesso em: 3 out. 2024.

GARCIA, Marcos Vinícios Conceição; NOGUEIRA, Marco Antonio; HUNGRIA, Mariangela. Combining microorganisms in inoculants is agronomically important but industrially challenging: case study of a composite inoculant containing Bradyrhizobium and Azospirillum for the soybean crop. *AMB Express*, [s. l.], vol. 11, no 1, 2021.

GOWTHAMAN, N.S.K. *et al.* Advantages of biopolymers over synthetic polymers: social, economic, and environmental aspects. *In: SABU THOMAS, Sreeraj Gopi and Augustine Amalraj (org.). Biopolymers and their Industrial Applications.* [S. l.]: Elsevier, 2021. p. 351–372. Disponível em: Acesso em: 7 out. 2024.

GUAN, Ningzi; LIU, Long. Microbial response to acid stress: mechanisms and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, [s. l.], vol. 104, no 1, p. 51, 2019. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6942593/>. Acesso em: 13 jul. 2025.

HASSAN, Muhammad Umair *et al.* Trehalose: A Key Player in Plant Growth Regulation and Tolerance to Abiotic Stresses. *Journal of Plant Growth Regulation*, [s. l.], vol. 42, no 8, p. 4935–4957, 2023. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00344-022-10851-7>. Acesso em: 8 out. 2024.

HERNANDES FILHO, Nilton Sérgio. Diversidade metabólica e fisiológica em Azospirillum brasilense Ab-V5 cultivado em formulações inoculantes para a agricultura. 2021. 1–67 f. - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

HUNGRIA, Mariangela. AZOSPIRILLUM: UM VELHO NOVO ALIADO. [s. l.], Disponível em: Acesso em: 13 out. 2025.

HUNGRIA, Mariangela *et al.* Improving maize sustainability with partial replacement of N fertilizers by inoculation with Azospirillum brasilense. *Agronomy Journal*, [s. l.], vol. 114, no 5, p. 2969–2980, 2022a. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/agj2.21150>. Acesso em: 12 ago. 2025.

HUNGRIA, Mariangela *et al.* Improving maize sustainability with partial replacement of N fertilizers by inoculation with Azospirillum brasilense. *Agronomy Journal*, [s. l.], vol. 114, no 5, p. 2969–2980, 2022b. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/agj2.21150>. Acesso em: 26 out. 2024.

HUNGRIA, Mariangela. Inoculação com *Azospirillum* brasileiro: inovação em rendimento a baixo custo. Documentos. Londrina: [s. d.], 2011. Disponível em: [www.cnpso.embrapa.br](http://www.cnpso.embrapa.br). Acesso em: 26 out. 2024.

HUNGRIA, Mariangela *et al.* Inoculation with selected strains of *Azospirillum* brasileiro and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil*, [s. l.], vol. 331, no 1, p. 413–425, 2010. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-009-0262-0>. Acesso em: 26 out. 2024.

HUNGRIA, Mariangela; MENDES, Iêda Carvalho. Nitrogen Fixation with Soybean: The Perfect Symbiosis?. *In: BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION*. [S. l.]: Wiley Blackwell, 2015. vol. 2–2, p. 1009–1024.

HUNGRIA, Mariangela; NOGUEIRA, Marco Antonio; ARAUJO, Ricardo Silva. Soybean Seed Co-Inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum* brasileiro: A New Biotechnological Tool to Improve Yield and Sustainability. *American Journal of Plant Sciences*, [s. l.], vol. 6, p. 811–817, 2015. Disponível em: <http://www.scirp.org/journal/ajps><http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2015.66087><http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2015.66087><http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

HUSSAIN, Anwar; HASNAIN, Shahida. Interactions of bacterial cytokinins and IAA in the rhizosphere may alter phytostimulatory efficiency of rhizobacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, [s. l.], vol. 27, no 11, p. 2645–2654, 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-011-0738-y>. Acesso em: 26 out. 2024.

ITURRIAGA, Gabriel; SUÁREZ, Ramón; NOVA-FRANCO, Barbara. Trehalose Metabolism: From Osmoprotection to Signaling. *International Journal of Molecular Sciences* 2009, Vol. 10, Pages 3793-3810, [s. l.], vol. 10, no 9, p. 3793–3810, 2009. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/10/9/3793/htm>. Acesso em: 8 out. 2024.

KHIMMAKTHONG, Umaporn *et al.* The Efficiency of Microencapsulation with Alginate, Gelatin, and Chitosan on the Survival of *Bacillus subtilis*. *684 CMU J. Nat. Sci*, [s. l.], vol. 19, no 4, p. 685, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.12982/CMUJNS.2020.0044>. Acesso em: 11 jul. 2025.

KONRAD, Daniela. AVALIAÇÃO DO TEMPO DE ARMAZENAGEM SOBRE A MICROBIOTA DE INOCULANTES ENCAPSULADOS. 2016. 1–30 f. - Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2016.

KRASTEV, Vladimir *et al.* Encapsulation of *Bacillus subtilis* in Chitosan Gel Beads for Eco-Friendly Crop Protection. *Gels*, [s. l.], vol. 11, no 4, p. 302, 2025. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2310-2861/11/4/302/htm>. Acesso em: 11 jul. 2025.

KUDOYAROVA, Guzel *et al.* Phytohormone Mediation of Interactions Between Plants and Non-Symbiotic Growth Promoting Bacteria Under Edaphic Stresses. *Frontiers in Plant Science*, [s. l.], vol. 10, p. 483140, 2019. Disponível em: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org). Acesso em: 3 out. 2024.

KUMAR, Satish *et al.* *Biofertilizers: An ecofriendly technology for nutrient recycling and environmental sustainability*. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2022.

KUMAR, Bijender *et al.* Nanoporous Sodium Carboxymethyl Cellulose-g-poly (Sodium Acrylate)/FeCl<sub>3</sub> Hydrogel Beads: Synthesis and Characterization. *gels*, [s. l.], vol. 49, p. 1–12, 2020. Disponível em: [www.mdpi.com/journal/gels](http://www.mdpi.com/journal/gels). Acesso em: 14 out. 2025.

LI, Tingting *et al.* Locust bean gum/carboxycellulose nanocrystal coating incorporating ZnO clusters built by the accretion of micro spindles or sheets for strawberries preservation. *International Journal of Biological Macromolecules*, [s. l.], vol. 226, p. 267–278, 2023. Disponível em: Acesso em: 8 out. 2024.

LIMA-TENÓRIO, Michele K. *et al.* *Azospirillum brasilense* AbV5/6 encapsulation in dual-crosslinked beads based on cationic starch. *Carbohydrate Polymers*, [s. l.], vol. 308, 2023.

LIMA-TENÓRIO, Michele Karoline *et al.* Encapsulation of Plant Growth-Promoting Bacteria with Gum Arabic Hydrogels: A Potential System for Sustainable Agriculture. *Journal of Polymers and the Environment*, [s. l.], vol. 32, no 11, p. 5702–5712, 2024. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10924-024-03339-w>. Acesso em: 1 ago. 2025.

LODI, Ludimila A. *et al.* Biodegradable PVA-based films for delivery of *Bacillus megaterium* as seed coating. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, [s. l.], p. 114539, 2024. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213343724026708>. Acesso em: 27 out. 2024.

LOPES, Marina Momesso; OLIVEIRA-PAIVA, Christiane Abreu de; FARINAS, Cristiane Sanchez. Modification of pectin/starch-based beads with additives to improve *Bacillus subtilis* encapsulation for agricultural applications. *International Journal of*

Biological Macromolecules, [s. l.], vol. 246, 2023.

LUNN, John Edward *et al.* Trehalose metabolism in plants. *The Plant Journal*, [s. l.], vol. 79, no 4, p. 544–567, 2014. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/tpj.12509>. Acesso em: 8 out. 2024.

MALHOTRA, Mandira; SRIVASTAVA, Sheela. Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. *European Journal of Soil Biology*, [s. l.], vol. 45, no 1, p. 73–80, 2009. Disponível em: Acesso em: 28 nov. 2023.

MARINHO VIANA, Marcelo *et al.* Maize seed inoculated with *Azospirillum brasilense* as strategy to improve photosynthetic nitrogen use efficiency in the Amazonian periphery. *Journal of Plant Nutrition*, [s. l.], 2024. Disponível em: <https://www-tandfonline-com.ez31.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.1080/01904167.2024.2393432>. Acesso em: 3 out. 2024.

MARONICHE, G. A. *et al.* Phenogenetic profile and agronomic contribution of *Azospirillum argentinense* Az39T, a reference strain for the South American inoculant industry. *Microbiological Research*, [s. l.], vol. 283, p. 127650, 2024. Disponível em: Acesso em: 11 jul. 2025.

MARTIN, Thomas Newton *et al.* How did the coinoculation of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* become indispensable for soybean production in Brazil?. *Symbiosis* 2023 91:1, [s. l.], vol. 91, no 1, p. 119–137, 2023. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13199-023-00951-7>. Acesso em: 22 out. 2024.

MOROZKINA, Svetlana *et al.* The Fabrication of Alginate–Carboxymethyl Cellulose-Based Composites and Drug Release Profiles. *Polymers* 2022, Vol. 14, Page 3604, [s. l.], vol. 14, no 17, p. 3604, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4360/14/17/3604/htm>. Acesso em: 13 out. 2025.

MURRAY, Alex; KILBRIDE, Peter; GIBSON, Matthew I. Trehalose in cryopreservation. Applications, mechanisms and intracellular delivery opportunities. *RSC Medicinal Chemistry*, [s. l.], vol. 15, no 9, p. 2980–2995, 2024. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2024/md/d4md00174e>. Acesso em: 27 out. 2024.

NAKAMOTO, Kazuo. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds. *Handbook of Vibrational Spectroscopy. Handbook of Vibrational Spectroscopy*, [s. l.], p. 1872–1892, 2006. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/0470027320.s4104>.

NEW, Peter B.; KENNEDY, Ivan R. Regional distribution and pH sensitivity of *Azospirillum* associated with wheat roots in Eastern Australia. *Microbial Ecology*, [s. l.], vol. 17, no 3, p. 299–309, 1989. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/258336192\\_Regional\\_distribution\\_and\\_pH\\_sensitivity\\_ofAzospirillum\\_associated\\_with\\_wheat\\_roots\\_in\\_Eastern\\_Australia](https://www.researchgate.net/publication/258336192_Regional_distribution_and_pH_sensitivity_ofAzospirillum_associated_with_wheat_roots_in_Eastern_Australia). Acesso em: 11 jul. 2025.

PANT, Bhoj Raj; UPADHYAYA, Jitendra. Effect of degree of substitution of carboxyl groups on cross-linking of carboxymethyl starch. *Scientific World*, [s. l.], vol. 15, no 15, p. 18–25, 2022.

PELLÁ, Michelly Cristina Galdioli *et al.* Magnetic chitosan microgels: Synthesis, characterization, and evaluation of magnetic field effect over the drug release behavior. *Carbohydrate Polymers*, [s. l.], vol. 250, p. 116879, 2020. Disponível em: Acesso em: 22 out. 2024.

PEREZ, J. J. *et al.* A novel, green, low-cost chitosan-starch hydrogel as potential delivery system for plant growth-promoting bacteria. *Carbohydrate Polymers*, [s. l.], vol. 202, p. 409–417, 2018. Disponível em: Acesso em: 1 ago. 2025.

POUR, Mojde Moradi; RISEH, Roohallah Saberi; SKORIK, Yury A. Sodium Alginate–Gelatin Nanoformulations for Encapsulation of *Bacillus velezensis* and Their Use for Biological Control of Pistachio Gummosis. *Materials*, [s. l.], vol. 15, no 6, 2022a.

POUR, Mojde Moradi; RISEH, Roohallah Saberi; SKORIK, Yury A. Sodium Alginate–Gelatin Nanoformulations for Encapsulation of *Bacillus velezensis* and Their Use for Biological Control of Pistachio Gummosis. *Materials* 2022, Vol. 15, Page 2114, [s. l.], vol. 15, no 6, p. 2114, 2022b. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1996-1944/15/6/2114/htm>. Acesso em: 27 out. 2024.

PRANDO, André Mateus *et al.* Benefits of soybean co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: Large-scale validation with farmers in Brazil. *European Journal of Agronomy*, [s. l.], vol. 155, 2024. Disponível em: Acesso em: 22 out. 2024.

RISEH, Roohallah Saberi *et al.* Encapsulation of Plant Biocontrol Bacteria with Alginate as a Main Polymer Material. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 11165, [s. l.], vol. 22, no 20, p. 11165, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/20/11165/htm>. Acesso em: 7 out. 2024.

SABERI RISEH, Roohallah *et al.* Micro-/Nano-Carboxymethyl Cellulose as a

Promising Biopolymer with Prospects in the Agriculture Sector: A Review. *Polymers* 2023, Vol. 15, Page 440, [s. l.], vol. 15, no 2, p. 440, 2023a. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4360/15/2/440/htm>. Acesso em: 7 out. 2024.

SABERI RISEH, Roohallah *et al.* Micro-/Nano-Carboxymethyl Cellulose as a Promising Biopolymer with Prospects in the Agriculture Sector: A Review. *Polymers* 2023, Vol. 15, Page 440, [s. l.], vol. 15, no 2, p. 440, 2023b. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4360/15/2/440/htm>. Acesso em: 8 out. 2024.

SAHOO, Ranjan K. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of native Azospirillum strains from rice fields to improve crop productivity. *Protoplasma*, [s. l.], vol. 251, no 4, p. 943–953, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00709-013-0607-7>. Acesso em: 3 out. 2024.

SANTIVARANGKNA, Chalut; KULOZIK, Ulrich; FOERST, Petra. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnology Progress*, [s. l.], vol. 23, no 2, p. 302–315, 2007. Disponível em: Acesso em: 13 jul. 2025.

SANTOS, Mariana Sanches; NOGUEIRA, Marco Antonio; HUNGRIA, Mariangela. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Express* 2019 9:1, [s. l.], vol. 9, no 1, p. 1–22, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s13568-019-0932-0>. Acesso em: 22 out. 2024.

SANTOS, Mariana Sanches; NOGUEIRA, Marco Antonio; HUNGRIA, Mariangela. Outstanding impact of azospirillum brasilense strains ab-v5 and ab-v6 on the brazilian agriculture: Lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, [s. l.], vol. 45, 2021.

SCHOEBITZ, Mauricio; LÓPEZ, Maria D.; ROLDÁN, Antonio. Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil-plant fertilization. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, [s. l.], vol. 33, no 4, p. 751–765, 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13593-013-0142-0>. Acesso em: 6 out. 2024.

SHIMOIA, E. P. *et al.* Co-inoculation of Seeds with Bradyrhizobium , Azospirillum, and Rhizophagus Improves Nitrogen Assimilation and Growth in Soybean Plants Subjected to Waterlogging. *Russian Journal of Plant Physiology*, [s. l.], vol. 70, no 6, 2023.

SINGH, P. *et al.* Development of carboxymethyl cellulose-chitosan hybrid micro-

and macroparticles for encapsulation of probiotic bacteria. *Carbohydrate Polymers*, [s. l.], vol. 175, p. 87–95, 2017. Disponível em: Acesso em: 12 nov. 2024.

SPAEPEN, Stijn; VANDERLEYDEN, Jos. Auxin Signaling in *Azospirillum brasilense*: A Proteome Analysis. In: FRANS J. DE BRUIJN (org.). *Biological Nitrogen Fixation*. [S. l.]: John Wiley & Sons, Ltd, 2015. vol. 2–2, p. 937–940. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/9781119053095.ch91>. Acesso em: 3 out. 2024.

STREETER, J. G. Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. *Journal of applied microbiology*, [s. l.], vol. 95, no 3, p. 484–491, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12911696/>. Acesso em: 13 out. 2025.

SZOPA, Daniel *et al.* Encapsulation efficiency and survival of plant growth-promoting microorganisms in an alginate-based matrix – A systematic review and protocol for a practical approach. *Industrial Crops and Products*, [s. l.], vol. 181, no March, 2022a.

SZOPA, Daniel *et al.* Encapsulation efficiency and survival of plant growth-promoting microorganisms in an alginate-based matrix – A systematic review and protocol for a practical approach. *Industrial Crops and Products*, [s. l.], vol. 181, 2022b.

SZOPA, Daniel *et al.* Encapsulation efficiency and survival of plant growth-promoting microorganisms in an alginate-based matrix – A systematic review and protocol for a practical approach. *Industrial Crops and Products*, [s. l.], vol. 181, p. 114846, 2022c. Disponível em: Acesso em: 10 nov. 2024.

TAPIA, Hugo; KOSHLAND, Douglas E. Trehalose is a versatile and long-lived chaperone for desiccation tolerance. *Current Biology*, [s. l.], vol. 24, no 23, p. 2758–2766, 2014. Disponível em: <https://www.cell.com/action/showFullText?pii=S0960982214012810>. Acesso em: 13 jul. 2025.

YANG, Jungwook; KLOPPER, Joseph W.; RYU, Choong Min. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*, [s. l.], vol. 14, no 1, p. 1–4, 2009. Disponível em: Acesso em: 26 out. 2024.

ZAGO, Sharlini Laís *et al.* Shelf Life of *Azospirillum brasilense* in Alginate Beads Enriched With Trehalose and Humic Acid. *Journal of Agricultural Science*, [s. l.], vol. 11, no 6, p. 269, 2019.

ZARE-AKBARI, Zhila *et al.* PH-sensitive bionanocomposite hydrogel beads

based on carboxymethyl cellulose/ZnO nanoparticle as drug carrier. *International Journal of Biological Macromolecules*, [s. l.], vol. 93, p. 1317–1327, 2016a.

ZARE-AKBARI, Zhila *et al.* PH-sensitive bionanocomposite hydrogel beads based on carboxymethyl cellulose/ZnO nanoparticle as drug carrier. *International Journal of Biological Macromolecules*, [s. l.], vol. 93, p. 1317–1327, 2016b. Disponível em: Acesso em: 8 out. 2024.

ZARE-AKBARI, Zhila *et al.* PH-sensitive bionanocomposite hydrogel beads based on carboxymethyl cellulose/ZnO nanoparticle as drug carrier. *International Journal of Biological Macromolecules*, [s. l.], vol. 93, p. 1317–1327, 2016c. Disponível em: Acesso em: 8 out. 2024.

ZHANG, Wenjin *et al.* Eco-friendly bio-encapsulation from sodium alginate-trehalose-kaolin and its performance evaluation in improving plant growth under salt or/and drought conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, [s. l.], vol. 225, p. 123–134, 2023.

ZULFIQAR, Faisal *et al.* Foliar Application of Trehalose or 5-Aminolevulinic Acid Improves Photosynthesis and Biomass Production in Drought Stressed *Alpinia zerumbet*. *Agriculture* 2021, Vol. 11, Page 908, [s. l.], vol. 11, no 10, p. 908, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2077-0472/11/10/908/htm>. Acesso em: 8 out. 2024.