

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

**“DESENVOLVIMENTO DE ROTAS DE VEICULAÇÃO DE
MICROORGANISMOS DE USO AGRÍCOLA”**

Bruna Lenzion Alves*

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Química, área de
concentração: FÍSICO-QUÍMICA

Orientador: Caue Ribeiro de Oliveira

*** Bolsista CAPES**

São Carlos - SP

2025



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Bruna Lenzion Alves, realizada em 26/11/2025.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Cauê Ribeiro de Oliveira (EMBRAPA)

gov.br CAUE RIBEIRO DE OLIVEIRA
Data: 01/12/2025 12:38:00-0300
Documento assinado digitalmente

Prof. Dr. Marco Antonio Nogueira (EMBRAPA)

gov.br MARCO ANTONIO NOGUEIRA
Data: 02/12/2025 15:40:26-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Jerri Édson Zilli (EMBRAPA)

gov.br JERRI EDSON ZILLI
Data: 15/12/2025 15:27:40-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

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

Dedicatória

Dedico este trabalho e o marco de se tornar mestre aos meus pais, Janice e Nelson, e ao meu irmão, Uiliam, que nunca mediram esforços para me apoiar de todas as formas possíveis e que sempre foram sinônimo de porto seguro para mim.

Também dedico este trabalho a Dona Antônia, minha avó do coração, que será sempre lembrada como figura de amor por mim e todos que a conheceram.

Agradecimentos

Com imenso prazer agradeço,

Ao Dr. Caue Ribeiro pelo acolhimento, orientação, paciência, confiança e por todos os ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Lucas Ribeiro pela amizade e por ter trilhado esse caminho ao meu lado. Seu papel foi essencial e indispensável na construção deste trabalho.

As analistas da Embrapa Instrumentação, Adriana, Viviane, Silviane, Joana, Alice, por todo o apoio, conselhos e prestatividade nesse período. Em especial a Ana, que sempre atendeu as necessidades desse trabalho, e esteve ao meu lado durante o processo.

A Dra Cristiane Farinas, pelo espaço cedido em seu laboratório.

A Dra Profa. Silvia Bettini e seu aluno Marcos Vinicius Basaglia pelas análises de SEC. A toda a equipe do laboratório de biotecnologia do solo (Embrapa Soja) pela recepção e treinamento no cultivo de *Azospirillum* e concessão do estoque, em especial a Ligia e Eduara.

A Dra Mariangela Hungria por todo o suporte prestado durante o trabalho.

Aos colegas do BB1, que tornaram o processo mais leve, e sempre estiveram dispostos a ajudar, em especial a Bianca, Vanessa, Mariana, Camila e Daiane.

Aos colegas do grupo CatFert, pelo acolhimento e conselhos, em especial a Stella, Fabiana, Raquel, Balena e Anelise.

Aos minha família de Maringá, em especial a Johanna e Zezinho, pela motivação e carinho de sempre.

Ao João Vitor, por ter me motivado e estar do meu lado mesmo nos momentos de estresse.

Ao CNPq e CAPES, por todo o auxílio financeiro.

E a todos que contribuíram de alguma forma para minha formação e para que esse trabalho fosse possível.

Lista de abreviações

AC – Ácido cítrico

ANOVA – Análise de variância

DMSO - Dimetilsulfóxido

DTG – Termogravimetria derivada

DSC – Calorimetria exploratória diferencial

DYGS – Meio de cultura contendo glicose, glicerol e extrato de levedura

FBN – Fixação biológica de nitrogênio

FD – Liofilização

FTIR – Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

GC – Grau de conversão dos grupos carboxílicos em ésteres

Gli – Glicerol

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

OD – Secagem em estufa de convecção

PGCit – Poliglicerol citrato

RPCP– Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas

pH – Potencial hidrogeniônico

RC – Meio Rojo Congo

rpm – Rotações por minuto

SD – Spray - drying

CET – Cromatografia de exclusão de tamanho

TGA – Termogravimetria

THF - Tetrahidrofurano

T_g – Temperatura de transição vítrea

UFC – Unidade formadora de colônias

Lista de tabelas

TABELA 2.1 - Exemplos de microrganismos, culturas de uso e mecanismo de ação.	4
TABELA 5.1 – Principais bandas observadas nos espectros de FTIR do PGCit, glicerol e ácido cítrico.	23
TABELA 5.2 – Picos de ¹³ C RMN na região entre 169 – 177 e suas atribuições.	25
TABELA 5.3 - Resumo dos dados de grau de conversão (GC) dos grupos ácido carboxílico em ésteres, das temperaturas dos picos dos eventos térmicos, das temperaturas de transição vítrea (Tg) e das perdas de massa até 260 °C, das amostras de PGCit.....	26
TABELA 5.4 - Viabilidade de <i>A. brasilense</i> recuperado de sementes de milho, não tratadas e previamente -tratadas com fungicida e inseticida, recobertas com inóculo líquido ou com inóculo sólido liofilizado.....	40

Lista de figuras

FIGURA 2.1 - Estruturas dos monômeros: glicerol e ácido cítrico e do poliglicerol citrato (PGCit). Em vermelho: hidroxilas primárias do glicerol; em verde: hidroxila secundária do glicerol; em rosa: carboxilas terminais; em azul: carboxila central do ácido cítrico.	13
FIGURA 4.1 - Sistema utilizado para a síntese das amostras poliméricas (A) e aspecto do polímero durante a síntese (B).	15
FIGURA 5.1 - Espectros normalizados de FTIR dos monômeros (AC e Gli) e das amostras de PGCit sintetizadas a 140 °C por 30 min usando razões molares Gli:AC de 1:2 e 1:1 (A) e das amostras de PGCit sintetizadas por 30 min, 60 min, 75 min, 90 min e 105 (B) min em razão equimolar (B).	23
FIGURA 5.2 - Espectros de RMN de ¹³ C (177–168 ppm) em DMSO deuterado dos monômeros AC e das amostras de PGCit sintetizadas por 30 min nas razões molares 1:2 e 1:1 (Gli:AC) (A), e das amostras de PGCit sintetizadas por 30, 60, 75, 90 e 105 min na razão equimolar (B).	24
FIGURA 5.3 - Estrutura proposta do PGCit, com os tipos de carbono marcados em vermelho.	25
FIGURA 5.4 - Curvas de termogravimetria (TGA) e sua primeira derivada (DTG) dos monômeros (AC e Gli) e das amostras de PGCit sintetizadas por 30 min utilizando razões molares Gli:CA de 1:2 e 1:1 (A e B, respectivamente), e das amostras de PGCit sintetizadas por 30, 60, 75, 90 e 105 min na razão equimolar (C e D, respectivamente).	27
FIGURA 5.5 - Curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) das amostras de PGCit sintetizadas por 30 min utilizando razões molares Gli:AC de 1:2 e 1:1 (A), e das amostras de PGCit sintetizadas por 30, 60, 75, 90 e 105 min com razão equimolar (B).	28
FIGURA 5.6 - Curvas de volume de retenção de cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) de amostras de PGCit sintetizadas por 30 min, 60 min, 75 min, 90 min e 105 min em razão equimolar.	30
FIGURA 5.7 - Espectros de FTIR normalizados de amostras de PGCit sintetizado por 75 minutos e do compósito produzido a partir do polímero pós reação com CaCO ₃	31
FIGURA 5.8 - Curvas de termogravimetria (TGA) e sua primeira derivada (DTG) do compósito (A) e do PGCit sintetizado por 75 min (B).	32

- FIGURA 5.9 - Imagens de MEV em ampliações de 50×, 500×, 2000× e 5000× dos inoculantes sólidos contendo *A. brasilense*, produzidos por diferentes métodos de secagem: *spray drying* (SD), liofilização (FD) e secagem em estufa de convecção (OD). As variações na morfologia e no tamanho das partículas refletem as distintas técnicas de processamento empregadas — moagem manual nos casos de FD e OD, e atomização no caso de SD.....34
- FIGURA 5.10 - Histograma de distribuição do tamanho de partículas obtido por *spray drying* de solução de PGCit com trealose.35
- FIGURA 5.11 - Viabilidade de *Azospirillum brasilense* em partículas obtidas por *spray drying* (SD), liofilização (FD) e secagem em estufa de convecção (OD), após armazenamento a 4 °C por 70 dias. A viabilidade bacteriana foi avaliada por meio da comparação entre os métodos de secagem em cada ponto de tempo (A) e pela análise das variações ao longo do tempo dentro de cada método (B). Os valores médios representam a média de três repetições técnicas. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$. 36
- FIGURA 5.12 - Placas de RC contendo material extraído das sementes tratadas com inóculo líquido (A) e material liofilizado (B)40

Resumo

DESENVOLVIMENTO DE ROTAS DE VEICULAÇÃO DE MICRORGANISMOS DE USO AGRÍCOLA. *Azospirillum brasilense*, uma das espécies mais empregadas em inoculantes mundialmente, é uma rizobactéria versátil que aumenta a eficiência de uso de nutrientes, principalmente nitrogênio, além de promover o crescimento vegetal. Embora os benefícios do *Azospirillum* na agricultura sejam bem estabelecidos, seu desempenho é frequentemente limitado pela inadequação das formulações convencionais. O aprimoramento da sua eficiência no campo pode ser alcançado pelo desenvolvimento de formulações projetadas para fornecer proteção robusta contra fatores estressantes à célula, como o encapsulamento da bactéria em polímeros. Neste estudo, buscou-se o desenvolvimento de uma nova formulação de inoculante em pó baseada em matriz de poliglicerol citrato (PGCit), um polímero biocompatível e sintetizado de forma sustentável, com adição de trealose, um osmoprotetor. A primeira etapa consistiu na padronização de uma metodologia de produção do PGCit, buscando estabelecer condições de síntese que otimizassem o equilíbrio entre o rendimento do polímero e solubilidade em água. Foram comparadas inicialmente duas razões molares (equimolar e com excesso de ácido cítrico), e tempos de reação de 30 a 105 minutos. A partir dos resultados das caracterizações estruturais e térmicas, o material obtido utilizando razão monomérica equimolar e 75 minutos de síntese foi selecionado. As formulações foram produzidas a partir do tratamento do polímero com carbonato de cálcio, visando o ajuste de pH e a formação de um pó. Para o processo de secagem do material contendo trealose e *Azospirillum*, três metodologias (convecção em estufa, liofilização e *spray-drying*) foram testadas. A viabilidade celular foi avaliada no tempo zero e ao longo de até 180 dias de armazenamento. Logo após a secagem, independentemente do método utilizado, as formulações apresentaram viabilidade na ordem de 10^8 UFC/g, enquanto a formulação liofilizada manteve esse nível durante 180 dias, demonstrando excelente estabilidade. Além disso, a formulação liofilizada foi testada em um ensaio de recuperação de *Azospirillum* em sementes de milho, apresentando desempenho superior ao do inoculante líquido utilizado como controle. Em resumo, os resultados demonstram o papel protetor celular da matriz à base de PGCit, estabelecendo um potencial novo veículo para inoculantes com aplicação via semente.

Abstract

DEVELOPMENT OF FORMULATION DELIVERY ROUTES FOR AGRICULTURAL MICROORGANISMS. *Azospirillum brasilense*, one of the most widely used species in inoculants worldwide, is a versatile rhizobacterium that enhances nitrogen availability and nutrient uptake, as well as promotes plant growth. Although the benefits of *Azospirillum* in agriculture are well established, its performance is often limited by the inadequacy of conventional formulations. Improving its field efficiency can be achieved through the development of formulations designed to provide robust protection against such challenges, such as those based on bacterial encapsulation in polymers. In this study, a novel powder formulation based on a poly(glycerol citrate) (PGCit) matrix, a biocompatible and sustainably synthesized polymer, was developed. The first stage consisted of standardizing a PGCit production methodology, aiming to establish synthesis conditions that optimize the balance between polymer yield and water solubility. Two molar ratios (equimolar and with excess citric acid) and reaction times ranging from 30 to 105 minutes were initially compared. Based on the structural and thermal characterization results, the material obtained under equimolar monomeric ratio and 75-minute synthesis time was selected. Formulations were produced by treating the polymer with calcium carbonate to adjust the pH and form powder. For drying the material containing trehalose and *Azospirillum*, three methods were tested (oven convection, freeze-drying, and spray-drying). Cell viability was assessed at time zero and up to 180 days of storage. Initially, regardless of the drying process, the formulations showed viability on the order of 10^8 CFU/g, and the freeze-dried formulation maintained this level throughout the evaluation period, demonstrating excellent stability. Moreover, the freeze-dried formulation was tested in an *Azospirillum* recovery assay on maize seeds, showing superior performance compared to the liquid inoculant used as a control. In summary, the results demonstrate the protective role of the PGCit-based matrix, establishing it as a promising new carrier for seed-applied inoculants.

Sumário

1 - Introdução	1
2 - Revisão Bibliográfica.....	3
2.1 - Inoculantes.....	3
2.2 - Gênero <i>Azospirillum</i>	5
2.3 - Desafios de colonização	6
2.4 - Formulações de inoculantes	7
2.5 - Tecnologias de encapsulamento	8
2.5.1 - Encapsulamento de <i>Azospirillum</i>	10
2.6 - Poliglicerol citrato	11
3 - Objetivos	14
4 - Materiais e Métodos	15
4.1 - Síntese dos polímeros	15
4.2 - Caracterização do polímero	16
4.3 - Cultivo de <i>Azospirillum brasilense</i>	17
4.3.1 - Estoque.....	17
4.3.2 - Preparo do inóculo.....	17
4.4 - Preparo dos inoculantes sólidos	18
4.5 - Caracterização morfológica	19
4.6 - Determinação da viabilidade celular	20
4.7 - Recuperação de <i>Azospirillum</i> em sementes de milho	20
4.8 - Análise Estatística	21
5 - Resultados e Discussões	22
5.1 - Caracterização dos polímeros	22
5.2 - Caracterização do compósito.....	30
5.3 - Produção do inoculante seco e estabilidade.....	33
5.4 - Recuperação de <i>Azospirillum</i> em sementes de milho	38

6 - Conclusões	41
7 - Referências Bibliográficas.....	42
Apêndice 1	51
Apêndice 2	52
Apêndice 3	53

1 - Introdução

O uso de inoculantes microbianos, também classificados como biofertilizantes em muitos países, representa uma estratégia sustentável para enfrentar o duplo desafio de alimentar uma população global crescente e reduzir a pegada ambiental da agricultura.^{1,2} Dentre esses microrganismos benéficos, destaca-se o *Azospirillum* spp., uma versátil rizobactéria promotora de crescimento vegetal (PGPR) que apresenta considerável potencial na redução da dependência de fertilizantes químicos na produção agrícola.³

Este gênero bacteriano atua no crescimento vegetal através de diferentes mecanismos, incluindo o aumento da disponibilidade de nitrogênio e da absorção de nutrientes pelas plantas, ao mesmo tempo que promove a síntese de fitormônios.⁴⁻⁶ Esses compostos, por sua vez, fazem com que o *Azospirillum* desempenhe um papel cada vez mais relevante no contexto das mudanças climáticas e da crescente incidência de secas, pois favorecem a absorção de água e aumentam a tolerância das plantas a estresses abióticos, como salinidade e seca.⁷⁻⁹

O *Azospirillum* é comumente fornecido como inoculante em formulações líquidas ou à base de turfa, sendo a inoculação de sementes por recobrimento o método mais amplamente adotado em escala comercial. No entanto, o uso rotineiro de tratamentos químicos de sementes, como fungicidas e inseticidas, representa um desafio significativo para a aplicação bem-sucedida de inoculantes microbianos, uma vez que esses agroquímicos podem reduzir a viabilidade microbiana mesmo antes de sua introdução no solo.^{10,11} Além disso, esses veículos oferecem proteção limitada às células bacterianas contra os efeitos tóxicos dos pesticidas, à competição com microrganismos nativos do solo, à predação pela microfauna e às flutuações ambientais.^{12,13}

Portanto, o desenvolvimento de sistemas de liberação protetores compatíveis com as práticas de tratamento de sementes é essencial para garantir a sobrevivência e a eficácia do *Azospirillum*. Dentre esses sistemas, os veículos poliméricos têm despertado interesse crescente devido à sua compatibilidade com células microbianas, sua capacidade de promover liberação controlada no solo e a possibilidade de produzir formulações personalizáveis, adaptadas a necessidades agrícolas específicas.¹⁴⁻¹⁸

O polímero de condensação poliglicerol citrato (PGCit) atende bem a esses requisitos, com a vantagem adicional de ser composto por glicerol e ácido cítrico, componentes de origem natural.^{19,20} Sua aplicação em uma formulação líquida contendo *Bradyrhizobium japonicum* em inoculação de sementes foi demonstrada por GIROTO et. al. (2024)²⁰, reforçando seu papel promissor como veículo e agente protetor para outros microrganismos sensíveis a condições ambientais adversas.

Assim, propomos o uso do PGCit no desenvolvimento de uma formulação em pó contendo a estirpe Ab-V5 de *A. brasilense*, estirpe amplamente utilizada em inoculantes comerciais no Brasil, adequada para aplicações de recobrimento de sementes. Foi investigado como o processo de secagem da formulação inoculada afeta a viabilidade celular ao longo do tempo, comparando três métodos distintos: secagem por atomização (*spray drying*), liofilização e convecção em estufa. Além disso, foi avaliado também o efeito protetor da formulação quando aplicada na superfície de sementes de milho não tratadas e tratadas quimicamente.

2 - Revisão Bibliográfica

2.1 - Inoculantes

Inoculantes são produtos que possuem em sua composição microrganismos vivos capazes de beneficiar o desenvolvimento das plantas.^{1,21} Esses microrganismos podem atuar de forma direta, por mecanismos como fixação de nitrogênio, solubilização de nutrientes, como fósforo e potássio, ou produção de fitormônios e sideróforos, e também indiretamente como no caso da supressão de patógenos.²¹⁻²⁴

Em termos funcionais, é usual a classificação de microrganismos benéficos em quatro grupos: (i) fixadores de nitrogênio (FBN), em que microrganismos podem ser simbióticos, de vida livre ou associativos em relação à planta; (ii) solubilizadores/mobilizadores de nutrientes; (iii) bactérias promotoras de crescimento vegetal, atuando pela produção de auxinas, citocininas, giberelinas e sideróforos; e (iv) agentes de biocontrole. No entanto, muitas cepas apresentam sobreposição de função, combinando diferentes mecanismos de ação.^{1,2} A tabela 2.1 inclui exemplos de inoculantes e por quais mecanismos atuam.

O uso de inoculantes tem adquirido papel estratégico na agricultura moderna, pois representa uma alternativa biotecnológica de baixo impacto ambiental e alta eficiência agrônômica. A aplicação de microrganismos promotores de crescimento contribui para a redução do consumo de fertilizantes minerais, especialmente nitrogenados, cuja produção e uso são fontes significativas de emissão de gases de efeito estufa, como o N_2O .²⁵ Além disso, os inoculantes aumentam a resiliência de plantas frente a estresses abióticos e favorecem o uso mais eficiente dos recursos do solo.^{9,15}

Os inoculantes podem ser aplicados por diferentes métodos, incluindo o revestimento de sementes, a aplicação via sulco de semeadura na forma líquida ou granular, a imersão de raízes de mudas e, em alguns casos, via foliar. Cada método apresenta vantagens e limitações quanto à dose efetiva de microrganismos na rizosfera, à exposição a estresses abióticos e à compatibilidade com tratamentos químicos de sementes.^{10,21,26} A escolha da via ideal deve considerar o tipo de microrganismo, a cultura e as condições climáticas, buscando maximizar a sobrevivência e o estabelecimento do microrganismo contido inoculante.^{1,10}

TABELA 2.1 - Exemplos de microrganismos, culturas de uso e mecanismo de ação.

Microrganismo	Principais Culturas	Mecanismo
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> / <i>B. diazoefficiens</i> / <i>B. elkanii</i>	Soja	FBN simbiótica (nodulação em leguminosas)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> / <i>R. tropici</i>	Feijão	FBN simbiótica
<i>Azospirillum brasilense</i>	Milho e trigo	FBN associativa; PGPR (auxinas, ACC desaminase, sideróforos)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Milho, arroz e cana	FBN endofítica/associativa; PGPR
<i>Bacillus subtilis</i>	Diversas	Solubilização de P/K; biocontrole
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Diversas	Solubilização de P; sideróforos
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Cereais e hortaliças	FBN de vida livre; PGPR

Fontes: SANTOS et. al (2019)¹, THOMAS E SINGH (2019)²¹ e CASSÁN E DIAZ-ZORITA (2016)²⁷ MAPA (2011)²⁸

Independentemente da espécie ou da formulação utilizada, a avaliação de qualidade de inoculantes costuma considerar: (i) concentração de células viáveis reportada como UFC/mL (líquidos) ou UFC/g (sólidos), já que a viabilidade celular e a densidade inicial elevada são fatores críticos para o sucesso da inoculação e a previsibilidade do desempenho agrônomo;^{15,22} (ii) pureza microbiológica (ausência de contaminantes relevantes), essencial para segurança e credibilidade de inoculantes;^{16,28} e (iii) estabilidade ao longo da vida-de-prateleira nas condições recomendadas: a qual determina a manutenção da viabilidade e da funcionalidade do microrganismo durante o armazenamento e transporte.^{15,28}

No Brasil, a Instrução Normativa MAPA nº 13/2011 estabelece especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem, incluindo a declaração de concentração mínima de microrganismos viáveis, um prazo de validade mínimo de 6 meses, e uma lista de microrganismos autorizados/recomendados.²⁸ Em paralelo, o Decreto nº 10.375/2020²⁹ (alterado pelo Decreto nº 11.940/2024)³⁰ instituiu o Programa Nacional de Bioinsumos (PNB), orientando políticas públicas para ampliar

e qualificar o uso de insumos biológicos no país, em convergência com as exigências técnicas e de qualidade já previstas nas normas setoriais.

O mercado brasileiro de inoculantes tem apresentado um crescimento contínuo nos últimos anos. Segundo a ANPII Bio (2024)³¹, o setor de insumos biológicos tem média de crescimento de 16 % ao ano, com a entrega de 206 milhões de doses de inoculantes em 2024, número bem superior aos 148 milhões entregues em 2023. Quanto aos microrganismos, o *Bradyrhizobium* (57 %) é o mais utilizado, seguido pelo *Azospirillum* (29 %), segundo o mesmo levantamento.³¹

2.2 - Gênero *Azospirillum*

O gênero *Azospirillum*, isolado de solos e raízes de diversas plantas, foi descrito pela primeira vez em 1978, por Tarrand, Krieg e Döbereiner, que identificaram duas espécies: *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasilense*. Este estudo também destacou o potencial fixador de nitrogênio dessas espécies, evidenciando seu papel promotor do crescimento vegetal.³² No Brasil, inoculantes contendo as estirpes de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 and Ab-V6 são largamente comercializados para gramíneas, e para uso em coinoculação com *Bradyrhizobium* spp. em leguminosas.¹

O *Azospirillum* é uma bactéria Gram-negativa, microaerófila e que não forma endósporos, classificada como rizobactéria promotora de crescimento de plantas (PGPR). Essas bactérias se associam à rizosfera das plantas, oferecendo diversos benefícios agronômicos, por meio de mecanismos como fixação biológica de nitrogênio, síntese de fitormônios e aumento da atividade da membrana.³ Esses benefícios agronômicos a tornam uma grande aliada para o aumento da absorção de nutrientes e água, à mitigação de estresses abióticos, como salinidade e seca, e a indução de resistência sistêmica a patógenos.^{7,8}

Por esse motivo, o *Azospirillum* pode ser usado como uma estratégia para redução do uso de fertilizantes químicos fontes nitrogenadas. Estudos mostraram que a inoculação desse microrganismo, associada a doses significativamente reduzidas de fertilizantes nitrogenados, permite obter mesma eficiência em parâmetros como produtividade, massa de planta e tamanho de raiz em culturas como milho, trigo e arroz.³³⁻³⁶ Outros estudos mostraram a melhora da tolerância de plantas a estresses abióticos, como a seca e salinidade, tendo efeito significativo do aumento da sobrevivência das plantas.^{8,37}

Os efeitos advindos do uso de bactérias do gênero *Azospirillum* vão além da fixação biológica de nitrogênio. Estudos verificaram que apenas entre 5 e 20% do nitrogênio total presente em plantas inoculadas era advindo dessa associação, indicando que outros fatores seriam responsáveis pelo seu efeito observado no crescimento vegetal.^{27,38} Sabe-se que essas bactérias também atuam por meio da produção de fitormônios, como auxinas, giberelinas e citocininas. Cepas como *Azospirillum brasilense* produzem ácido indolacético (AIA), principal auxina envolvida no alongamento e diferenciação celular. Esses efeitos hormonais estão diretamente relacionados à maior formação e aumento do comprimento radicular, o que melhora a absorção de água e nutrientes pelas plantas.^{9,39}

2.3 - Desafios de posicionamento de inoculantes

Apesar dos avanços tecnológicos e do aumento expressivo no uso de inoculantes microbianos nas últimas décadas, ainda persiste uma significativa janela de aprimoramento em sua eficácia agrônômica. A sobrevivência e o desempenho dos microrganismos inoculados estão diretamente condicionados à manutenção da viabilidade celular desde a formulação do produto até o momento da colonização efetiva da rizosfera.^{1,40}

Entre os fatores que afetam a viabilidade de bactérias não esporulantes, como o *Azospirillum*, destaca-se a desidratação após o recobrimento das sementes e armazenamento. Esse processo impõe estresse osmótico severo, capaz de desestabilizar membranas, proteínas e outras macromoléculas essenciais à sobrevivência.⁴⁰ RENOUD et al. (2022)⁴¹, por exemplo, reportaram que sementes de milho inoculadas em formulação turfosa com *A. lipoferum* CRT1 apresentaram queda da viabilidade celular, da ordem de 10^6 para 10^2 UFC/semente entre a inoculação e a semeadura.

Outro desafio amplamente documentado envolve a compatibilidade entre os microrganismos inoculados e os tratamentos químicos de sementes, prática rotineira na agricultura moderna.⁴² Fungicidas e inseticidas, utilizados para proteger as sementes contra patógenos, podem exercer efeito tóxico direto sobre as células bacterianas, reduzindo drasticamente sua viabilidade em poucas horas de contato.

Estudos conduzidos com *A. brasilense* evidenciam que fungicidas são mais deletérios que inseticidas e que o efeito negativo é intensificado pelo tempo de

exposição. SANTOS et al. (2020)⁴² verificaram reduções significativas na viabilidade de Ab-V5 e Ab-V6 após 24 h em sementes de milho tratadas, enquanto TAKAHASHI et al. (2021)⁴³ observaram queda acentuada na eficiência da bactéria em trigo quando a semeadura ocorria mais de quatro horas após a inoculação. Esses trabalhos reforçam que o tempo entre a inoculação e a semeadura é um fator crítico para o sucesso do inoculante.

Além dos efeitos abióticos e químicos, a competição biológica na rizosfera é um fator determinante na eficiência final da inoculação. O solo é um ecossistema altamente complexo e dinâmico, no qual a microbiota nativa ocupa nichos ecológicos específicos e apresenta forte capacidade competitiva por recursos e sítios de colonização.^{41,44}

A taxa de estabelecimento do microrganismo introduzido depende, portanto, de sua capacidade de quimiotaxia, adesão à superfície radicular e formação de biofilmes, mecanismos que conferem vantagem nas primeiras horas após a germinação de sementes inoculadas.⁴¹ PEDRINHO et al. (2023)⁴⁵ demonstraram que o desempenho de *A. brasilense* está diretamente relacionado ao tamanho da população inoculada e à janela inicial de colonização na cultura do milho, sendo que doses mais elevadas favorecem o estabelecimento competitivo frente à microbiota nativa.

Por fim, o desempenho da inoculação é modulado também por condições edafoclimáticas, como pH, salinidade, temperatura, teor de matéria orgânica e umidade, que influenciam simultaneamente a persistência microbiana e as respostas fisiológicas da planta hospedeira.^{1,40} ROZIER et al. (2017)⁴⁴, detectaram *A. lipoferum* somente até 57 dias após a semeadura, reforçando o caráter transitório da sobrevivência do microrganismo no ambiente do solo. Com isso, compreende-se que é necessário buscar estratégias que garantam a sobrevivência e a colonização do *Azospirillum* diante desses fatores.

2.4 - Formulações de inoculantes

A formulação de inoculantes microbianos é um dos fatores determinantes para garantir a viabilidade celular durante o armazenamento e a eficiência agrônômica após a aplicação em campo.⁴⁶⁻⁴⁹ Esse aspecto torna-se ainda mais relevante quando se trata de bactérias não esporulantes, como o *Azospirillum*

sp., *Pseudomonas* sp., *Rhizobium* sp., entre outras, que são mantidas na forma de células vegetativas, mais sensíveis que endósporos, por exemplo.⁴⁰

De forma geral, os inoculantes podem ser encontrados em formulações líquidas ou sólidas. As formulações líquidas compreendem suspensões à base de óleo ou água de concentrados celulares, emulsões ou pastas contendo partículas sólidas, que podem conter aditivos protetores, substâncias nutritivas, estabilizantes ou adesivas.^{16,40,50,51} As formulações líquidas são adequados para uma ampla gama de tecnologias de aplicação, incluindo pulverização, que pode ser feita em partes aéreas ou no solo, método vantajoso para uso em culturas perenes com plantações já estabelecidas, e também via semente ou sulco de semeadura.^{26,40,52} Entretanto, formulações líquidas são mais suscetíveis à contaminação por microrganismos indesejados, demandando rigorosos processos de produção asséptica e embalagens apropriadas. Outro fator limitante é a sensibilidade a variações ambientais, como temperatura, pH e oxigenação, além de, em sua maioria, apresentarem vida de prateleira menor que outros tipos de formulação.^{1,40}

As formulações sólidas, por sua vez, podem ser subdivididas em pós e grânulos, dependendo do tamanho de suas partículas, e em geral, são aplicadas como revestimento de sementes ou como condicionadores de solo.^{15,40,53} Além da turfa como material carreador padrão para formulações secas, diversas outras opções têm sido investigadas. Estas incluem carreadores não orgânicos (p. ex., carvão vegetal, argilas, turfa), carreadores orgânicos (p. ex., serragem, farelo de trigo/soja/aveia, bagaço de uva, esterco animal, lodo de esgoto, composto de cortiça) e materiais inertes (p. ex., perlita, vermiculita, bentonita, caulim, silicatos, talco, polímeros).^{40,54,55}

Inoculantes contendo *Azospirillum* são comumente aplicados ao solo via sementes, em carreadores líquidos ou sólidos à base de turfa. No entanto, como discutido acima, os inoculantes líquidos apresentam diversas desvantagens, e no geral não oferecem proteção adequada aos microrganismos. Já a turfa é um recurso natural limitado, associado a impactos ambientais, e sua composição físico-química apresenta grande variabilidade de depósitos, o que afeta a consistência dos resultados apresentados pelos inoculantes produzidos.⁵⁶

2.5 - Tecnologias de encapsulamento

O encapsulamento em matrizes poliméricas tem despertado interesse crescente devido à sua compatibilidade com células microbianas, sua capacidade de proporcionar liberação controlada no solo do microrganismo de interesse e pelo seu potencial de desenvolvimento de formulações personalizáveis, adaptadas às necessidades agrícolas específicas.^{14-16,57,58} No processo de encapsulamento, o microrganismo é aprisionado dentro de uma matriz, a qual forma uma camada protetora ao redor da célula.⁵⁹ Esta tecnologia permite proteger células vivas dentro de uma matriz sólida ou semissólida, criando uma barreira física contra estresses bióticos e abióticos, o que garante maior estabilidade durante o armazenamento, transporte e aplicação.⁶⁰

O processo pode ser classificado em microencapsulamento (1–1000 μm) e macroencapsulamento (>1000 μm), de acordo com o tamanho da partícula resultante.⁶¹ Além da classificação por tamanho, o encapsulamento pode ser classificado de acordo com as diferentes arquiteturas das partículas, como os tipos matriz e reservatório. Na arquitetura do tipo matriz, o ativo, no caso, as células microbianas, ficam dispersas no material carreador, enquanto no tipo reservatório, o material carreador forma uma camada envolvendo o ativo.⁶¹ O encapsulamento do tipo matriz pode ser obtido pela secagem de soluções ou dispersões poliméricas contendo as células ou compostos ativos. O princípio básico envolve preparar uma mistura homogênea entre o polímero e o bioativo, seguido da remoção controlada de água por diferentes rotas de secagem, como o *spray drying*, liofilização ou secagem em estufa, até formar um material sólido.^{60,62}

No método de secagem por *spray drying*, a suspensão polimérica contendo o microrganismo é atomizada em gotículas finas, que entram em contato com um fluxo de ar quente, promovendo evaporação instantânea da água e formação de microesferas sólidas.⁶⁰ Entre as vantagens, destacam-se o baixo custo operacional, a escalabilidade e o controle de morfologia e tamanho, o que faz com que o método seja aplicado em escala industrial.^{59,60} No entanto, para o encapsulamento de células, o método apresenta limitações, visto que a exposição térmica pode ocasionar danos celulares. Assim, é necessário ajustar as temperaturas nos parâmetros operacionais, como temperatura de entrada e saída, assim como selecionar corretamente o material carreador usado para esse processo.^{60,63}

Já a liofilização é um método de secagem por sublimação, realizado em temperaturas abaixo de zero e sob vácuo, sendo ideal para compostos e

microrganismos termossensíveis. O processo compreende três etapas: congelamento da amostra, sublimação do gelo (secagem primária) e remoção da água residual (secagem secundária).^{60,64} A principal vantagem da liofilização é a alta taxa de sobrevivência microbiana e a preservação da estrutura tridimensional da matriz. No entanto, trata-se de um processo caro, demorado e de difícil escalonamento industrial, com produtos geralmente porosos e higroscópicos.⁶⁴ Além disso, o uso de crioprotetores como trealose, sacarose e glicerol é essencial para evitar danos celulares durante o congelamento.⁶⁰

Na secagem em estufa, a solução polimérica contendo a bactéria é vertida em camada fina sobre uma superfície (placa ou bandeja) e mantida em estufa ventilada em temperaturas mais baixas se comparada a técnica de *spray-dryer* (30–60 °C) até a completa remoção de água. O produto obtido é um filme contínuo, que pode ser fragmentado após a secagem para formar flocos ou pós encapsulados.^{62,65} Essa técnica baseia-se na convecção forçada de ar quente, que promove a evaporação lenta do solvente.⁶⁶ A secagem por estufa tem se mostrado uma alternativa promissora por ser menos custosa operacionalmente e permitir uma redução volumétrica maior, em comparação com outros métodos, como a liofilização.⁶⁶

2.5.1 - Encapsulamento de *Azospirillum*

O encapsulamento de *Azospirillum* tem demonstrado potencial promissor como alternativa às formulações de inoculantes convencionalmente utilizadas. No trabalho de BASHAN et al. (1986)⁶⁷, *Azospirillum brasilense* Cd foi encapsulado por extrusão em matriz de alginato, formando macrocápsulas, que posteriormente foram secas por liofilização ou convecção em estufa. Os resultados mostraram que o *Azospirillum* possui elevada sensibilidade à dessecação, e que o uso de aditivos, como leite em pó, pode auxiliar em sua sobrevivência. O método resultou em níveis de colonização de raízes de plantas de trigo similares ao observados com o inoculante controle em matriz turfosa.

Desde então, outros trabalhos empregaram o uso de alginato como matriz no encapsulamento de *Azospirillum*. ZAGO et al. (2019)⁶⁸, estudaram a adição de trealose e ácido húmico como aditivos protetores em cápsulas de alginato. A presença desses aditivos prolongou a viabilidade celular por até 90 dias em

comparação à turfa e ao alginato puros, demonstrando o efeito protetor de açúcares e substâncias húmicas durante a secagem e o armazenamento. BASHAN et al. (2002)⁶⁹ e GONZÁLEZ et al. (2018)¹⁴ também utilizaram alginato para produzir microcápsulas contendo *A. brasilense*. Bashan et al. (2002)⁶⁹ produziram microesferas pela da aspersão de uma solução de alginato contendo a suspensão bacteriana em uma solução gelificante, as quais foram posteriormente aplicadas sobre as sementes. Já GONZÁLEZ et al. (2018)¹⁴ obtiveram microcápsulas por quebra mecânica de cápsulas secas previamente carregadas com *Azospirillum brasilense* Cd, aplicadas diretamente em raízes de mudas. Ambos os estudos apresentaram manutenção da viabilidade bacteriana satisfatória durante o armazenamento.

Outras matrizes poliméricas, como amido, poli(acrilato) de sódio, álcool polivinílico (PVA) e goma arábica, também vêm sendo utilizadas para o encapsulamento de *Azospirillum* sp.^{12,13,58,70-73} LIMA-TENÓRIO et al. (2023)¹³, desenvolveram um sistema de encapsulamento em macrocápsulas de amido catiônico e quitosana para encapsular *A. brasilense* AbV-5, alcançando viabilidade próxima a 10^8 UFC/g após 60 dias de armazenamento em temperatura ambiente. Em estudo subsequente,¹² os autores encapsularam, pelo método de difusão, *A. brasilense* AbV-5 em hidrogéis porosos milimétricos de goma arábica modificada. As formulações apresentaram populações em torno de 10^7 UFC/g durante sete meses a 18 °C.

De maneira geral, esses trabalhos reforçam a sensibilidade de *Azospirillum* sp. à dessecação, evidenciada pela redução da viabilidade após os processos de secagem empregados. Além disso, destacam o papel fundamental de aditivos osmoprotetores na preservação celular, também demonstram a aplicação de diferentes técnicas de encapsulamento, como macro e microencapsulamento por gelificação iônica, difusão em hidrogel, e cobertura por filmes poliméricos, assim como o potencial dessas matrizes poliméricas em prolongar a vida de prateleira dos inoculantes.

2.6 - Poliglicerol citrato

Poliésteres à base de glicerol, obtidos por policondensação do triálcool com ácidos dicarboxílicos e tricarboxílicos (p.ex., os ácidos succínico, sebácico, adípico e cítrico), formam uma família de polímeros promissora voltada para a redução

da dependência de plásticos de origem fóssil. Sua arquitetura molecular pode ser modulada pela composição dos monômeros e pelo processo de síntese, e os grupos hidroxila remanescentes viabilizam a funcionalização pós-polimerização.⁷⁴⁻⁷⁶

O poliglicerol citrato é resultado da policondensação entre ácido cítrico (2-hidroxi-propano-1,2,3-tricarboxílico) e glicerol (propano-1,2,3-triol), reação apresentada na FIGURA 2.1.⁷⁷ O ácido cítrico, um triácido alifático não tóxico de ampla disponibilidade, é amplamente obtido pela fermentação de certos microrganismos, sendo usado como bloco de construção em biomateriais.^{78,79} Na policondensação com glicerol, sua maior acidez favorece a autocatálise da esterificação, permitindo a síntese em rota *bulk* sem catalisador e com água como único subproduto.⁷⁹ O glicerol, por sua vez, é um triálcool renovável, biologicamente seguro e abundante, frequentemente obtido como coproduto da produção do biodiesel.^{80,81} Além disso, é válido destacar que ambos os monômeros estão presentes em sistemas biológicos e que a funcionalidade tripla de ambos favorece a ramificação e a reticulação das cadeias poliméricas.^{79,81,82} A presença de ligações éster e a origem natural dos monômeros conferem ao material caráter biodegradável e biocompatível. Além disso, estudos indicam que é possível modular as características físico-químicas desse polímero alterando as condições de síntese como estequiometria, tempo de reação e temperatura.^{77,83}

As aplicações do poliglicerol citrato abrangem áreas diversas, incluindo embalagens, engenharia de tecidos, liberação de fármacos e agricultura.^{19,20,77,79,84-86} LIU et. al. (2011)¹⁹, HALPERN et al. (2014)⁷⁹ e PRAMANICK e RAY (1988)⁸⁴, demonstraram o potencial promissor do poliglicerol citrato para aplicação em liberação controlada de medicamentos, utilizando teofilina, gentamicina e metildopa, confirmando a biocompatibilidade deste material. Na área agrícola, GIROTO et. al. (2023)⁷⁷ demonstraram o potencial do poliglicerol citrato como revestimento de sementes de soja, observando boa adesão, e não interferindo na germinação de sementes e crescimento da soja. Em um segundo estudo²⁰, os autores utilizaram poliglicerol citrato como carreador para *Bradyrhizobium japonicum*, obtendo resultados em casa de vegetação similares ao do inoculante à base de turfa.

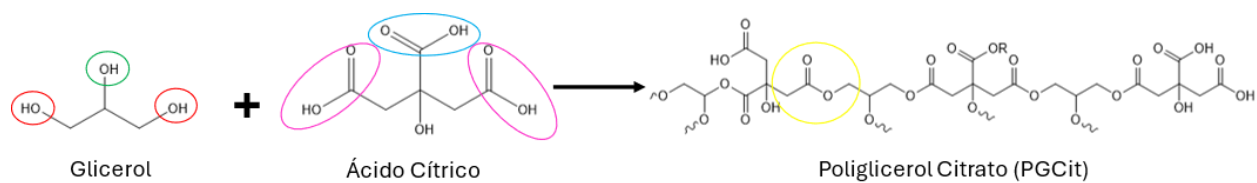


FIGURA 2.1 - Estruturas dos monômeros: glicerol e ácido cítrico e do políglicerol citrato (PGCit). Em vermelho: hidroxilas primárias do glicerol; em verde: hidroxila secundária do glicerol; em rosa: carboxilas terminais; em azul: carboxila central do ácido cítrico.

3 - Objetivos

O objetivo principal do trabalho foi desenvolver uma formulação em pó contendo *Azospirillum brasilense*, estirpe Ab-V5, largamente utilizada em inoculantes no Brasil, utilizando como matriz para encapsulamento o poliglicerol citrato (PGCit), aplicável em recobrimento de sementes. A hipótese central é que o processo de dessecação do *A. brasilense*, crítico para sua viabilidade no armazenamento em formulações secas, pode ser retardado por uma barreira polimérica compatível com células, sendo assim o PGCit um modelo para este sistema. Para isso, as seguintes etapas foram realizadas:

- a. Definição das condições de síntese do PGCit favoráveis à aplicação proposta;
- b. Avaliação de diferentes métodos de secagem quanto à preservação da viabilidade celular: estufa de convecção, liofilização e *spray-drying* e à interferências destes na viabilidade celular;
- c. Estudo da eficácia de proteção pela matriz desenvolvida para bactéria aplicada à superfície de sementes de milho com e sem tratamento com agroquímicos.

4 - Materiais e Métodos

4.1 - Síntese dos polímeros

Os polímeros foram sintetizados utilizando glicerina (P.A., 99,5 %, Dinâmica Química contemporânea Ltda, Indaiatuba - SP, Brasil) e ácido cítrico (anidro, 99,5 %, Êxodo Científica, Sumaré-SP, Brasil). A síntese ocorreu via reação de policondensação, em um copo de alumínio de 500 mL imerso em banho de glicerol. A temperatura foi mantida em aproximadamente 140 ± 2 °C controlada por um termopar acoplado a uma chapa de aquecimento (IKA C-MAG HS 7, Campinas – SP). Durante toda a síntese, a mistura foi agitada a 300 - 310 rpm em agitador mecânico (Fisatom 713DS, São Paulo-SP, Brazil), como mostrado na Figura 4.1.

Primeiro, foram realizadas sínteses com duas proporções molares diferentes dos monômeros, sendo elas 1:2 (glicerol : ácido cítrico) e 1:1 (glicerol : ácido cítrico) por 30 minutos. Para a síntese 1:1, 8,10 g de glicerol (Gli) e 16,90 g de ácido cítrico (AC) foram adicionados no copo e deixados sob temperatura e agitação. Já para a síntese 1:2, 4,83 g de glicerol e 20,17 g de ácido cítrico foram adicionados. A condição 1:1 foi selecionada, devido ao alto residual de ácido cítrico apresentado pela condição 1:2, e então testaram-se os tempos de síntese de 60, 75, 90 e 105 minutos.



FIGURA 4.1 - Sistema utilizado para a síntese das amostras poliméricas (A) e aspecto do polímero durante a síntese (B).

4.2 - Caracterização do polímero

Para confirmar a formação da ligação éster foram realizadas análises de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e ressonância magnética nuclear (RMN). As medidas de FTIR foram realizadas no espectrômetro Vertex 70 (Bruker, Bremen, Alemanha), utilizando a técnica de reflectância total atenuada (ATR). Os resultados correspondem à média obtida a partir de 32 varreduras na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} .

Para a análise RMN, aproximadamente 200 mg de cada amostra de PGCit foram dissolvidos em DMSO deuterado (0,7 mL) em um microtubo de 2 mL com agitação em vórtex até dissolução completa. Em seguida, a solução foi transferida para um tubo de RMN de 5 mm. A análise foi procedida com sequências de pulso padrão dos espectros de RMN de ^{13}C utilizando um espectrômetro Bruker Avance III™ HD de 600 MHz (Bruker, Bremen, Alemanha). O espectro de RMN de ^{13}C também foi utilizado para calcular o grau de conversão (GC) dos grupos de ácido carboxílico em grupos éster, pela equação 1, conforme descrito por WRZECIONEK e colaboradores (2021).⁸⁷

$$GC = \frac{\int E}{\int E + \int A} \times 100\% \quad (1)$$

A análise termogravimétrica (TGA) foi conduzida com o objetivo de avaliar a estabilidade térmica dos polímeros e dos monômeros residuais após o processo de policondensação, empregando um analisador térmico simultâneo (TA Instruments, modelo SDT 650), na faixa de 50 a 550 °C, sob atmosfera de N_2 e taxa de aquecimento de 10 °C/min. Adicionalmente, a calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizada para a determinação das temperaturas de transição vítrea, utilizando o equipamento DSC Q100 (TA Instruments). As amostras foram submetidas a dois ciclos de aquecimento, segundo o seguinte programa térmico: aquecimento inicial de 30 a 120 °C, a 10 °C/min, seguido de resfriamento até -50 °C, a 10 °C/min, e subsequente aquecimento de -50 a 120 °C, também a 10 °C/min. Todos os ensaios foram efetuados sob fluxo contínuo de N_2 de 50 mL/min.

A Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC) foi conduzida com o objetivo de avaliar a variação no comprimento médio das cadeias poliméricas em função do tempo de reação e da razão molar entre monômeros. Para tal, soluções de

diferentes amostras de PGCit (0,04 g/mL) foram preparadas em tetrahidrofurano (THF). As curvas de eluição foram obtidas a 50 °C, sob vazão de 1 mL/min, empregando-se um sistema Viscotek HT-GPC (Malvern), equipado com três colunas H-806 M (mistas) e detector de índice de refração.

4.3 - Cultivo de *Azospirillum brasilense*

4.3.1 - Estoque

O estoque de *Azospirillum brasilense* foi preparado a partir de uma ampola liofilizada de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 (= CNPSo 2083) cedida pela “Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas e Promotoras de Crescimento de Plantas da Embrapa Soja” (Coleção WFCC nº 1213, Coleção WDCM nº 1054), Londrina, Estado do Paraná, Brasil. O material da ampola foi recuperado utilizando meio DYGS¹¹ (Apêndice 1) e estriado em placa de petri de mesmo meio modificado com ágar e incubado em estufa bacteriológica a 28 °C por 72 h. As colônias de *A. brasilense* foram suspensas em meio DYGS suplementado com glicerol (30%), e a suspensão bacteriana concentrada obtida foi armazenada em ultra freezer, a -80 °C.

4.3.2 - Preparo do inóculo

O estoque criopreservado foi estriado em placas contendo meio DYGS solidificado com ágar e incubado em estufa bacteriológica a 28 °C por 48 a 72 h. Colônias obtidas dessas placas foram transferidas para frascos de 50 mL contendo 10 mL de meio DYGS líquido, para preparo do pré-inóculo. Os frascos foram então incubados em agitador orbital por 72 h, a 120 rpm e 28 °C. Após esse período, 1 mL da suspensão bacteriana foi transferida para um frasco de 250 mL contendo 100 mL de meio DYGS líquido e incubado em agitador orbital por 72 a 96 h, sob as mesmas condições de agitação e temperatura, resultando em inóculos de concentração média de $5,10 \times 10^8 \pm 1,69 \times 10^8$ UFC/mL. utilizados nos experimentos subsequentes.

4.4 - Preparo dos inoculantes sólidos

O PGCit sintetizado na razão equimolar por 75 minutos apresentou melhor balanço entre solubilidade e monômeros residuais, sendo selecionado para a fabricação do biofertilizante. Esse polímero foi solubilizado em água a 25 % (m/m) e mantido sob agitação a 120 rpm e 28 °C durante 12 horas. A solução resultante apresentou pH em torno de 3. Em seguida, adicionou-se lentamente carbonato de cálcio, correspondente a 30 % da massa do polímero, à solução obtida, o que resultou em evolução de gás e alteração da opacidade da solução, proveniente da formação de CO₂, passando de transparente para branco opaco, devido a formação de precipitados. A mistura foi centrifugada a 8000 rpm por 15 min a 20 °C, e o sobrenadante, contendo o PGCit parcialmente neutralizado (pH ≈ 5,3), foi seco em estufa de convecção a 60 °C por 48 h. O filme resultante foi moído até obtenção de pó fino e armazenado em temperatura ambiente.

O material obtido foi caracterizado por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC), como descrito na seção 4.2. para as amostras poliméricas. A análise termogravimétrica (TGA) também foi realizada como descrito na seção 4.2, estendendo-se a faixa de temperatura de até 1000 °C.

O pó de PGCit foi esterilizado em autoclave de bancada a 121 °C por 15 min, a fim de garantir ausência de contaminação durante o processamento em câmara de fluxo. Após a esterilização, o polímero foi misturado à trealose, que confere osmoproteção a matriz, na proporção de 3:1 (polímero: trealose) e solubilizado em meio DYGS a 25 % (m/v). O pH da solução foi ajustado para 6,87,0 utilizando solução de hidróxido de sódio 8 mol/L. Em seguida, o concentrado de *A. brasilense*, obtido pela centrifugação de inóculo a 6000 rpm por 15 minutos a 15 °C e suspenso em pequeno volume de meio DYGS, na proporção de 100 mL de inóculo para cada 5 g da mistura polímero-trealose, foi incorporado à solução polimérica, resultando em uma concentração média inicial de $1,13 \times 10^{10} \pm 1,49 \times 10^8$ UFC/g da mistura PGCit-trealose.

A suspensão final contendo *A. brasilense* foi submetida a três métodos distintos de secagem: estufa de convecção, liofilização e *spray drying*. No método de secagem em estufa (OD), a solução contendo 5,25 g de PGCit, 1,75 g de trealose, suspensão de células concentradas de *Azospirillum* (equivalente a 140 mL de inóculo)

e 28 mL de meio DYGS foi transferida para uma bandeja de polipropileno (17 cm × 6,5 cm × 25 cm) e mantida em estufa com circulação de ar a 30 °C por 26 h. Após esse período, o filme resultante foi removido da bandeja e moído em pó utilizando pistilo e almofariz.

No processo de liofilização (FD), uma solução de mesma composição foi preparada e distribuída em alíquotas de 10 mL em tubos de 50 mL. Os tubos foram congelados e submetidos à liofilização, no liofilizador Liobras LioTop L101 (Brasil) por 48 h. O material sólido obtido foi desaglomerado em pó fino utilizando pistilo e almofariz.

Para o método de *spray drying* (SD), preparou-se um volume maior da mesma solução, contendo 15 g de PGCit, 5 g de trealose, 400 mL de inóculo concentrado em pequeno volume e 80 mL de meio DYGS. Essa solução foi bombeada a 3 bar por um bico de 2 mm de diâmetro em um *spray dryer* LabPlant SD-06AG (UK), com temperatura de entrada ajustada para 90 °C e bomba regulada a 10 rpm (485 mL/h). A temperatura de saída manteve-se entre 41 °C e 52 °C durante o processo. Esse método demandou maior volume de solução em razão do menor rendimento, se comparado aos demais métodos, correspondendo a 40 % em relação à massa dos sólidos adicionados (PGCit e trealose).

Cada método de secagem foi realizado em triplicata, de forma independente, a fim de assegurar reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados. As amostras foram armazenadas em sacos a vácuo, sob refrigeração a 4 °C. A estabilidade foi monitorada por meio da recuperação celular ao longo de 180 dias em replicata, sendo os resultados expressos como unidades formadoras de colônia por massa de pó (UFC/g).

4.5 - Caracterização morfológica

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) (JEOL JSM6510, Japão) foi empregada para a análise da morfologia superficial dos materiais em pó obtidos pelos três métodos de secagem em estufa de convecção, liofilização e *spray drying*. As amostras foram fixadas sobre fita de carbono na superfície de um disco metálico (stub), o qual foi recoberto com uma fina camada de ouro em câmara de ionização (BalTec, Med. 020, Suíça). As imagens foram obtidas no modo de elétrons secundários.

4.6 - Determinação da viabilidade celular

A contagem de células bacterianas recuperadas do inoculante sólido submetido aos três métodos de secagem foi realizada pelo método de diluição seriada e gotas em placa (*drop plate*), a fim de avaliar a viabilidade celular representada como unidades formadoras de colônia (UFC) na massa do inoculante (UFC/g), ao longo do tempo de armazenamento. Inicialmente, os inoculantes obtidos pelos 3 métodos de secagem foram diluídos em solução estéril de cloreto de sódio 0,85 % (m/v) (solução salina), na proporção de 0,5 g de pó para 4,5 mL de solução salina, resultando em uma diluição 10^{-1} . Diluições seriadas subsequentes foram preparadas, e uma alíquota de 30 μ L das diluições de interesse foram cuidadosamente dispensadas em placas de Petri contendo meio de cultura Red Congo (RC)¹¹ (Apêndice 1). Nesse meio, o *Azospirillum* apresenta colônias vermelhas características, permitindo a diferenciação da bactéria frente a eventuais contaminantes.

Cada placa de Petri foi dividida em seis seções, sendo plaqueadas duas gotas para cada diluição, uma por seção. Foram utilizadas três placas por diluição. Duas amostras de cada repetição foram avaliadas. Após três a quatro dias de incubação procedeu-se à contagem das colônias, determinando-se a viabilidade bacteriana nos inoculantes sólidos. Processo semelhante foi realizado para o inóculo, utilizando-se a solução inicial como diluição 10^0 .

4.7 - Recuperação de células viáveis de *Azospirillum* em sementes de milho com e sem tratamento com agroquímicos

O inoculante sólido obtido por liofilização, com base em seu melhor desempenho quanto a manutenção da viabilidade celular durante o período testado, foi selecionado para os experimentos de recuperação celular em sementes de milho. Um total de 250 g de sementes de milho não tratadas e sementes comerciais pré-tratadas com os fungicidas Metaxil-M (2% m/v), Tiofanato-metílico (15% m/v) e Fludioxonil (2,5% m/v) (nome comercial MAXIM ADVANCED®, Syngenta) e inseticida Clotianidina (60% m/v) (nome comercial Poncho®, BASF), na proporção 1:5 (FS615PWU / FORSEED), foram expostas à luz UV por 60 minutos em câmara de fluxo.

As sementes foram acondicionadas em sacos plásticos, aos quais se adicionou 0,5 mL de solução de sacarose a 10 % (m/v), para assegurar adequada adesão do pó. Os sacos foram manualmente agitados para garantir a distribuição homogênea da solução sobre as sementes. Em seguida, adicionou-se 1,0 g de pó liofilizado contendo $3,4 \times 10^8$ UFC/g, com nova agitação até recobrimento uniforme. As sementes inoculadas foram deixadas secar por 2 ou 24 h, em temperatura ambiente. Adicionalmente, sementes de milho foram inoculadas com inóculo líquido preparado conforme descrito na seção “Preparo do Inóculo”. Nesse caso, a mesma quantidade de sementes foi inoculada com 1,0 mL de suspensão de *A. brasilense* a uma concentração de $6,0 \times 10^8$ UFC/mL.

Após a secagem, a recuperação celular foi avaliada segundo a metodologia descrita por ARAUJO et al. (2017)⁸⁸, substituindo-se o meio YM pelo meio RC específico para *Azospirillum*. Foram coletadas três alíquotas de 100 sementes após 2 e 24 horas de cada tratamento. Cada alíquota foi transferida para frasco de 250 mL contendo 100 mL de solução estéril de NaCl 0,85 % (m/v) + Tween 80 a 0,01 % (m/v). Os frascos foram submetidos à agitação orbital a 150 rpm por 15 min a fim de extrair as células bacterianas. Em seguida, procederam-se às diluições seriadas e à metodologia de determinação de viabilidade celular descrita na seção 4.6.

4.8 - Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de fator único, seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey, para avaliar diferenças significativas entre as médias, considerando-se nível de confiança de 95 % ($p < 0,05$). Todas as análises foram conduzidas no software GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, Califórnia, EUA).

5 - Resultados e Discussão

5.1 - Caracterização dos polímeros

Os parâmetros de polimerização investigados neste estudo (razões molares entre monômeros e os tempos de reação) foram testados com o objetivo de produzir um polímero com elevado rendimento e boa solubilidade em água, necessário para o processamento, ao mesmo tempo em que se buscou minimizar o tempo de reação. Variações nas condições de síntese, como tempo de reação e proporções molares dos monômeros, resultam em produtos com propriedades de desempenho distintas, incluindo comprimento de cadeia, propriedades térmicas e grau de esterificação.⁸³

A síntese do poliglicerol citrato (PGCit) foi confirmada por análises de FTIR e RMN. A Figura 5.1A apresenta os espectros de infravermelho dos monômeros (ácido cítrico e glicerol) e das amostras de PGCit sintetizadas por 30 minutos a 140 °C, utilizando razões molares Gli:AC de 1:2 e 1:1 (PGCit 1:2 e PGCit 1:1, respectivamente). Bandas características previamente reportadas para PGCit foram observadas em ambas as amostras, incluindo o deslocamento da banda de estiramento do C=O, inicialmente observada em torno de 1695 cm⁻¹ no ácido cítrico, para 1701 cm⁻¹ no PGCit 1:2 e 1713 cm⁻¹ no PGCit 1:1. Esse deslocamento para maiores números de onda (*blueshift*) indica a formação de ligações éster, conforme reportado por Berube et al. (2018)⁸², e uma nova banda, ausente nos monômeros, foi observada em 1174 cm⁻¹, correspondente ao estiramento C–O de éster, reforçando a ocorrência da esterificação.

Os espectros também revelaram outras bandas típicas de poliésteres, como o estiramento C–H em cadeias alifáticas, em aproximadamente 2950 cm⁻¹. Além disso, observou-se uma banda larga em torno de 3443 cm⁻¹, associada especificamente ao estiramento de grupos O–H. Esse sinal pode ser atribuído a grupos terminais hidroxila e carboxila, bem como à presença de monômeros não reagidos, uma vez que não foi realizado nenhum passo de purificação.^{82,89} Os espectros de FTIR correspondentes a outros tempos de síntese com proporções equimolares foram muito semelhantes aos obtidos em 30 minutos, como apresentado na Figura 5.1B. Um resumo das bandas observadas é apresentado na TABELA 5.1.

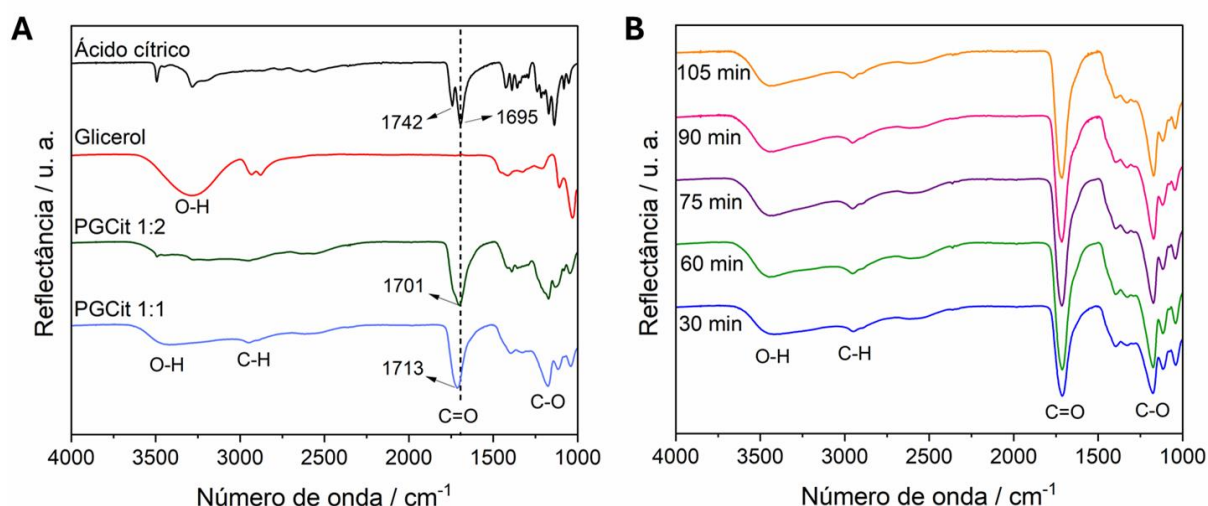


FIGURA 5.1 - Espectros normalizados de FTIR dos monômeros (AC e Gli) e das amostras de PGCit sintetizadas a 140 °C por 30 min usando razões molares Gli:AC de 1:2 e 1:1 (A) e das amostras de PGCit sintetizadas por 30 min, 60 min, 75 min, 90 min e 105 min em razão equimolar (B).

TABELA 5.1 – Principais bandas observadas nos espectros de FTIR do PGCit, glicerol e ácido cítrico.

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição	Composto
3441 - 3443	O-H	PGCit, Gli e AC
2950 - 2955	C-H	PGCit e Gli
1713 - 1715	C=O	PGCit
1742	C=O	AC
1695	C=O	AC
1171 - 1176	C-O	PGCit

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹³C (¹³C RMN) também foi utilizada para determinar a formação de ligações éster entre os monômeros. A região espectral selecionada, apresentada na Figura 5.2, corresponde aos sinais esperados para carbonos de grupos carboxílicos e carbonílicos, permitindo avaliar a formação da ligação éster. Em todos os espectros, os sinais dos carbonos das carboxilas em 174,50 ppm no ácido cítrico e em 174,35 ppm nas amostras

poliméricas, correspondem ao carbono carboxílico A1, indicado na estrutura de PGCit na Figura 5.3. Adicionalmente, os sinais em 171,26 ppm no ácido cítrico e em 171,09 ppm nos polímeros estão associados aos carbonos carboxílicos A2. Esses picos podem ser atribuídos ao ácido cítrico não reagido e aos grupos carboxila presentes nas cadeias poliméricas.

Além desses sinais, as amostras de PGCit exibiram picos adicionais em 172,66 ppm e 169,29 ppm. O primeiro pico foi previamente atribuído por WRZECIONEK et al. (2021)⁸⁷ ao carbono do éster formado a partir da reação do grupo carbonila A1 com o glicerol, indicado como E1 na Figura 5.3, enquanto o segundo pico corresponde ao carbono do éster resultante da esterificação do grupo carbonila A2, indicado como E2. Assim, tanto o PGCit 1:1 quanto o PGCit 1:2 apresentaram picos de carbonilas de éster, além dos grupos carboxílicos presentes no monômero ácido cítrico, corroborando os achados da análise de infravermelho e confirmando a síntese bem-sucedida do poliglicerol citrato. Ressalta-se que o glicerol não apresentou picos na região entre 177-169 ppm (Figura A3.1, Apêndice 3), confirmando que os deslocamentos observados são atribuídos exclusivamente ao polímero formado. Um resumo dos picos de RMN discutidos e suas atribuições podem ser encontrados na TABELA 5.2.

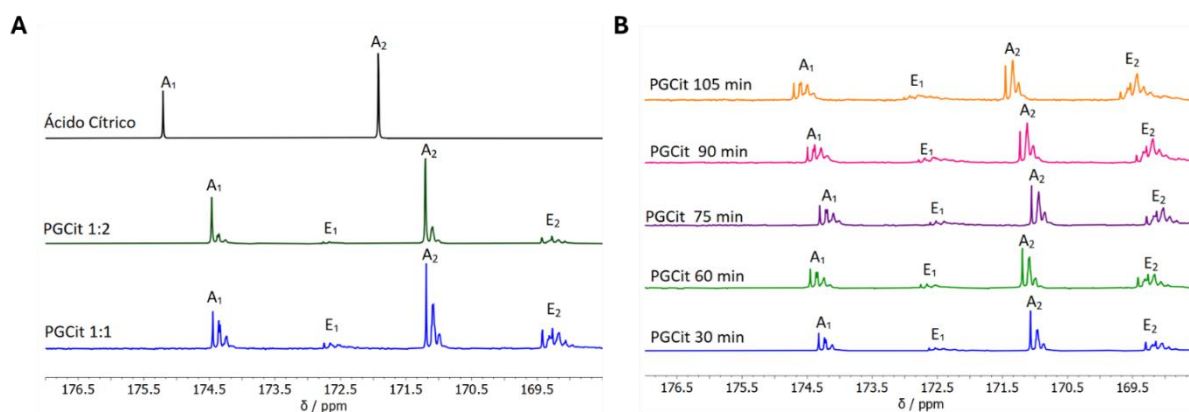


FIGURA 5.2 - Espectros de RMN de ¹³C (177–168 ppm) em DMSO deuterado dos monômeros AC e das amostras de PGCit sintetizadas por 30 min nas razões molares 1:2 e 1:1 (Gli:AC) (A), e das amostras de PGCit sintetizadas por 30, 60, 75, 90 e 105 min na razão equimolar (B).

Comparando-se os espectros de PGCit 1:2 e 1:1 (Figura 5.2A), ambos sintetizados por 30 minutos, observa-se diferença significativa na intensidade relativa dos picos E2 e E1. O sinal de E2 na amostra PGCit 1:2 é aproximadamente quatro

vezes mais intenso do que o pico correspondente a E1, ao passo que, no PGCit 1:1, E2 é cerca de três vezes mais intenso do que E1. Esse resultado sugere que a reação equimolar (1:1) favorece a esterificação nos grupos carbonila A1, enquanto o excesso de ácido cítrico promove em maior grau a esterificação do grupo carbonila central A2.

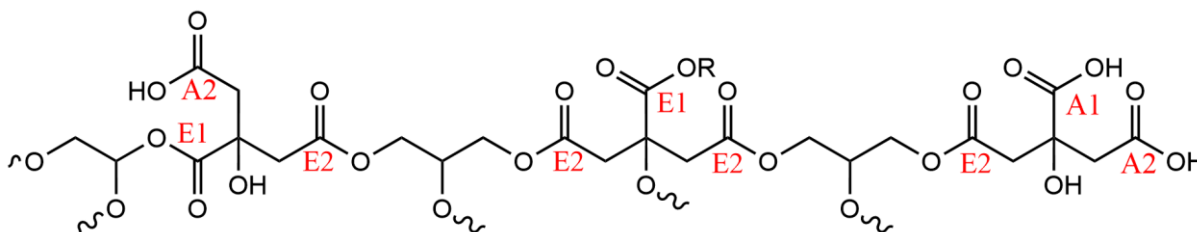


FIGURA 5.3 - Estrutura proposta do PGCit, com os tipos de carbono marcados em vermelho.

TABELA 5.2 – Picos de ^{13}C RMN na região entre 169 – 177 e suas atribuições.

Deslocamento químico (δ , ppm)	Atribuição	Tipo de carbono / Grupo funcional	Composto
174	C=O (A1)	Carbonos de ácido terminais	AC e PGCit
173	C=O (E1)	Carbonos de éster terminais	PGCit
171	C=O (A2)	Carbonos de ácido centrais	AC e PGCit
169	C=O (E2)	Carbonos de éster centrais	PGCit

A evolução da síntese de PGCit 1:1 ao longo do tempo também foi avaliada (Figura 5.2B). Todas as amostras apresentaram os mesmos picos característicos de ^{13}C RMN, confirmando a ocorrência da esterificação. Contudo, variações nas intensidades relativas desses picos indicaram diferentes graus de esterificação à medida que o tempo de reação aumentou. O grau de conversão de cada grupo carboxílico (A1 e A2) em carbonilas de éster (E1 e E2), mostrado na Tabela 5.3, está de acordo com os valores previamente reportados por WRZECIONEK et al. (2021)⁸⁷. A conversão de ambos os grupos A1 e A2 em ésteres, após 1 h de síntese, apresentou apenas pequena variação, sugerindo que a maior parte do consumo de monômeros ocorre nos estágios iniciais da reação, seguida pela formação mais lenta de cadeias poliméricas mais longas por esterificação adicional. Foi observada diferença pronunciada na conversão dos grupos A1 e A2 em ésteres ao se comparar

PGCit 1:2 e PGCit 1:1. A amostra PGCit 1:1 apresentou grau de esterificação quase duas vezes maior que a formulação 1:2. Uma vez que o cálculo considera a quantidade de ácido cítrico residual, essa diferença pode ser atribuída ao excesso de ácido cítrico presente na reação 1:2.

TABELA 5.3 - Resumo dos dados de grau de conversão (GC) dos grupos ácido carboxílico em ésteres, das temperaturas dos picos dos eventos térmicos, das temperaturas de transição vítrea (T_g) e das perdas de massa até 260 °C, das amostras de PGCit.

Razão molar (Gli:AC)	1:2	1:1				
Tempo de reação (min)	30	30	60	75	90	105
GC A1 (%)	10	23	27	34	42	39
GC A2 (%)	23	42	51	55	60	61
Picos dos eventos termogravimétricos (dw / dT (°C))	216	227	236	245	247	254
	-	306	317	321	319	327
	376	379	385	385	393	393
Perda de massa até 260 °C (%)	52	26	20	17	18	16
Temperatura de transição vítrea (°C)	-11	-4	6	7	11	17

Para uma compreensão abrangente da estrutura e das propriedades dos polímeros sintetizados, foram realizadas análises térmicas, incluindo análise termogravimétrica (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). A TGA mostrou-se particularmente elucidativa na avaliação da estabilidade térmica. Como ilustrado na Figura 5.4A e B, tanto PGCit 1:2 quanto PGCit 1:1 apresentaram maior estabilidade térmica em comparação aos monômeros individuais, independentemente do tempo reacional. A perda de massa inicial mais pronunciada nas amostras poliméricas pode ser atribuída a uma fração de monômeros residuais, uma vez que parte da faixa de temperatura desse primeiro evento se sobrepõe às temperaturas de degradação do ácido cítrico e do glicerol, os quais degradam completamente em um único evento de perda de massa.

Além disso, a amostra PGCit 1:1 exibiu maior estabilidade térmica quando comparada ao material sintetizado com excesso de ácido cítrico. O primeiro evento, considerando temperatura máxima de 260 °C, correspondeu a 26 % de perda de massa para a amostra PGCit 1:1, enquanto para PGCit 1:2, essa perda de massa correspondeu a 52 %. Essa diferença sugere a presença de cadeias mais curtas na amostra 1:2, indicando maior grau de esterificação na reação equimolar e, conseqüentemente, maior estabilidade térmica.

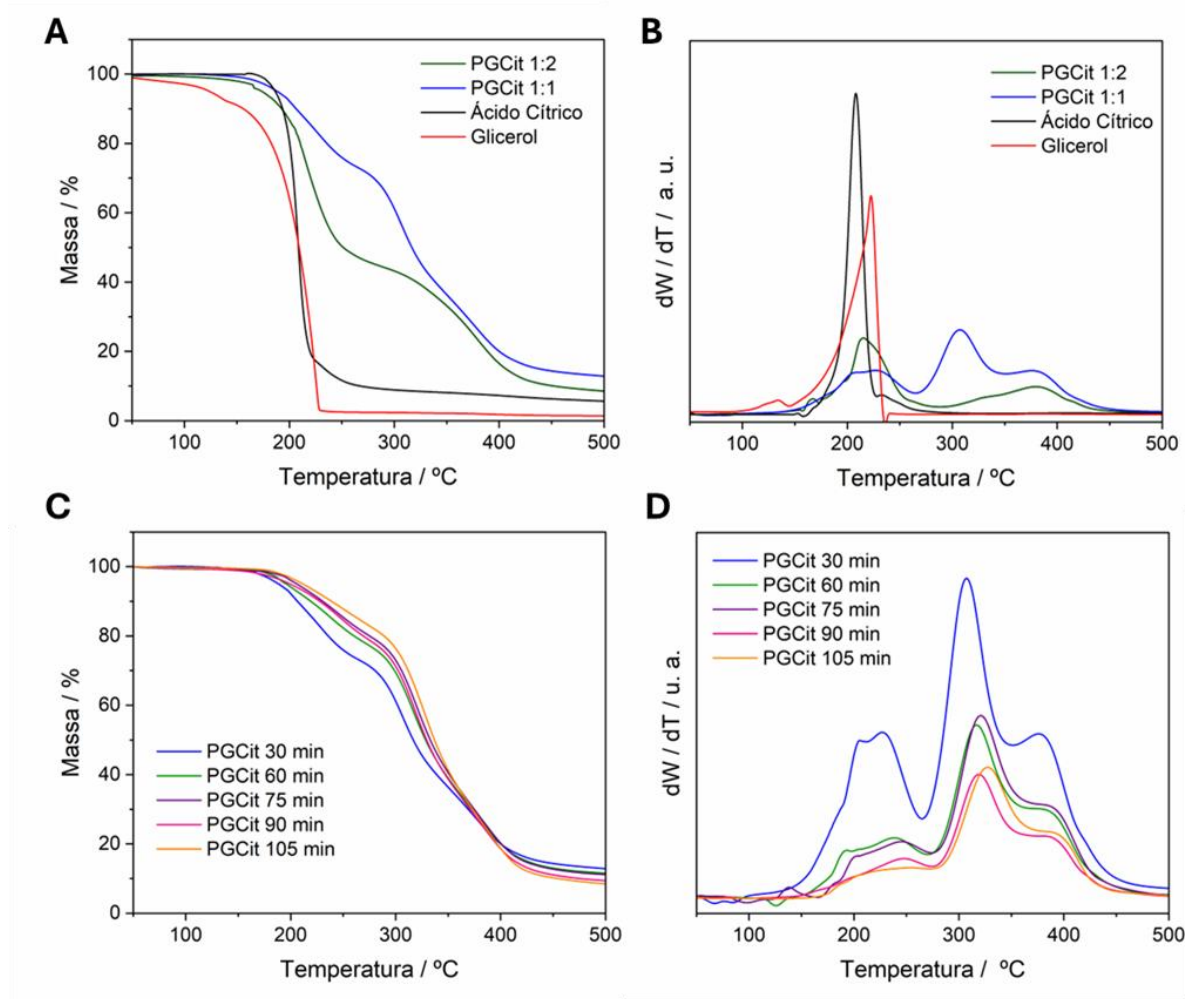


FIGURA 5.4 - Curvas de termogravimetria (TGA) e sua primeira derivada (DTG) dos monômeros (AC e Gli) e das amostras de PGCit sintetizadas por 30 min utilizando razões molares Gli:CA de 1:2 e 1:1 (A e B, respectivamente), e das amostras de PGCit sintetizadas por 30, 60, 75, 90 e 105 min na razão equimolar (C e D, respectivamente).

Esses achados estão em consonância com os resultados reportados por GIROTO et al. (2023)⁷⁷ para poliglicerol citrato sintetizado com as mesmas razões. Ademais, os perfis de degradação distintos entre as duas formulações sugerem que

o crescimento das cadeias poliméricas ocorreu por mecanismos diferentes, dependendo da razão monomérica empregada na síntese, o que está alinhado com as diferenças observadas na razão de conversão A1/A2 (Figura 5.2A).⁷⁷

A influência do tempo de reação na estabilidade térmica do material final também foi avaliada. Os perfis de degradação observados para os poliésteres sintetizados por maiores intervalos de tempo foram semelhantes ao da amostra sintetizada em 30 minutos, com os valores máximos dos picos de degradação aumentando de forma mais sutil a partir de 60 minutos de reação. Esse comportamento é consistente com o maior grau de conversão dos grupos carboxila em grupos carbonila. Da mesma forma, a perda de massa até 260 °C diminuiu com o aumento do tempo de reação, conforme mostrado na Tabela 5.3. Após 75 minutos de reação, a perda de massa apresentou pequenas variações, cerca de 1% entre as amostras.

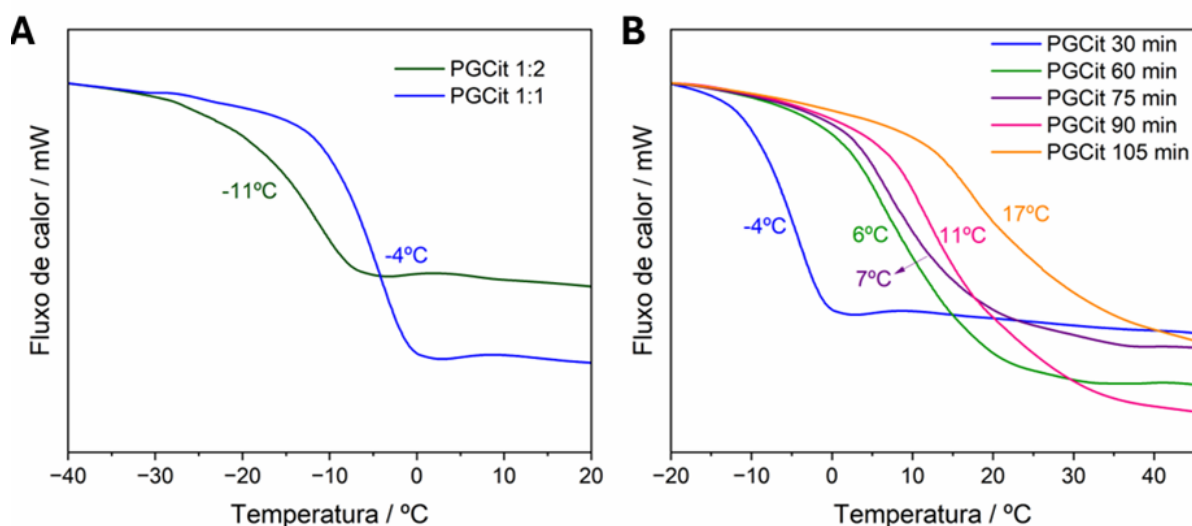


FIGURA 5.5 - Curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) das amostras de PGCit sintetizadas por 30 min utilizando razões molares Gli:AC de 1:2 e 1:1 (A), e das amostras de PGCit sintetizadas por 30, 60, 75, 90 e 105 min com razão equimolar (B).

As análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC) também foram realizadas para determinação da temperatura de transição vítrea (T_g), conforme apresentado na Tabela 5.3. As curvas de DSC exibiram apenas o deslocamento da linha de base característico da transição vítrea (Figura 5.5A e B), sem ocorrência de eventos primários. Ao comparar PGCit 1:2 e PGCit 1:1, este último apresentou T_g aproximadamente 7 °C superior ao da amostra sintetizada com excesso de ácido

cítrico. Essa diferença pode ser atribuída à maior concentração de monômeros residuais, que atuam como plastificantes, bem como à presença de cadeias poliméricas mais curtas, ambos fatores que aumentam a mobilidade das cadeias e reduzem o T_g . Essa observação está em concordância com a análise termogravimétrica apresentada na Figura 5.4A, uma vez que ambas sugerem que o PGCit produzido com a estequiometria 1:2 (Gli : AC) resulta em maior quantidade de monômeros não reagidos no material coletado, ocasionando a diminuição da T_g . A maior estabilidade térmica do PGCit 1:1 indica maior grau de polimerização, reduzindo a mobilidade das cadeias e elevando a T_g .

Além disso, os dados de transição vítrea expressos na Tabela 5.1 evidencia uma tendência clara de aumento da temperatura de transição vítrea à medida que o tempo de polimerização foi prolongado, o que pode estar relacionado ao aumento no comprimento das cadeias, corroborando a elevação do grau de esterificação. Como cadeias mais longas promovem maior entrelaçamento e reduzem a mobilidade, essa tendência é esperada.

A análise por SEC confirmou o aumento do comprimento das cadeias ao longo do tempo, conforme ilustrado na Figura 5.6. Nessa técnica, cadeias menores tendem a apresentar maior tempo de eluição, pois conseguem penetrar mais facilmente nos poros da fase estacionária. Em contraste, cadeias mais longas são excluídas dos poros e eluem mais rapidamente. As curvas obtidas evidenciam um aumento no índice de refração em volumes de eluição mais baixos à medida que o tempo de reação aumenta, indicando a formação de cadeias poliméricas mais longas. Essa tendência é ainda corroborada pela diminuição da intensidade do segundo pico, que corresponde a amostras menos reagidas e de menor tempo de síntese.

Portanto, o aumento observado na temperatura de transição vítrea (T_g) correlaciona-se com esse crescimento de cadeia, uma vez que cadeias mais longas reduzem a mobilidade devido ao maior entrelaçamento, em consonância com maior grau de esterificação. Contudo, não foi possível determinar a massa molar média de cada amostra nessa análise de SEC, pois parte da curva de eluição ficou abaixo do limite inferior da calibração de massa molar utilizada.

Cabe destacar também que o padrão empregado na calibração era um polímero linear, enquanto os monômeros provavelmente formam estruturas ramificadas em virtude de sua reatividade. Isso indica que a reação pode ocorrer tanto nos grupos carboxila terminais quanto nos centrais do ácido cítrico, como

demonstrado pelo RMN. Essas moléculas ramificadas possuem raios hidrodinâmicos menores (mais compactos) em comparação aos polímeros lineares com mesma quantidade de unidades repetitivas, o que resulta em maior volume de retenção e, conseqüentemente, subestimação de suas massas molares.⁸⁶

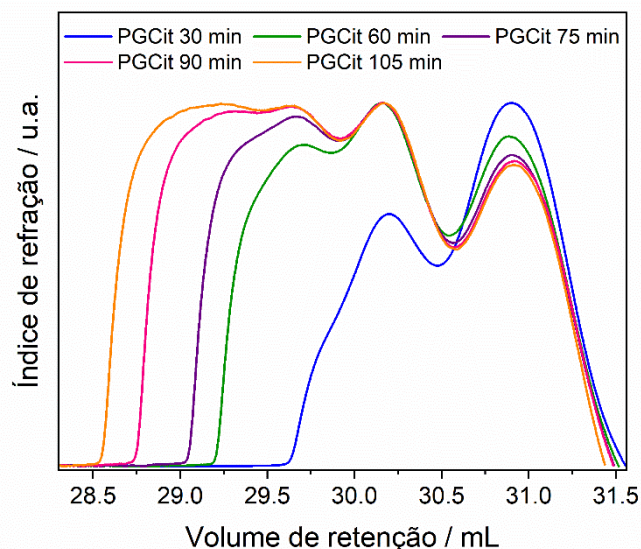


FIGURA 5.6 - Curvas de volume de retenção de cromatografia de exclusão de tamanho (CET) de amostras de PGCit sintetizadas por 30 min, 60 min, 75 min, 90 min e 105 min em razão equimolar.

Para formulação do inoculante, o polímero sintetizado com razão equimolar e tempo de síntese de 75 minutos foi selecionado, considerando que a quantidade de monômeros residuais não apresentou variação significativa após esse período de síntese e que a solubilidade em água era essencial para o processamento subsequente.

5.2 - Caracterização do compósito

Após o processo de neutralização, foi investigada a modificação estrutural no material obtido pela análise de FTIR. A Figura 5.7 apresenta os espectros das amostras de PGCit sintetizado por 75 min e do material recuperado após a neutralização do polímero, centrifugação da solução polimérica para remoção de precipitado e secagem do sobrenadante (compósito).

Como discutido anteriormente, o espectro do PGCit (75 min) apresenta uma banda intensa em 1713 cm^{-1} , atribuída ao estiramento C=O de grupos éster,⁸² que, após a reação com CaCO_3 , se desloca para 1724 cm^{-1} . O deslocamento dessa banda para número de onda maior, se comparado à amostra de polímero pós-síntese, está provavelmente relacionado à reação do ácido cítrico residual da polimerização com o CaCO_3 e à posterior retirada de material precipitado (citrato de cálcio) pela centrifugação.

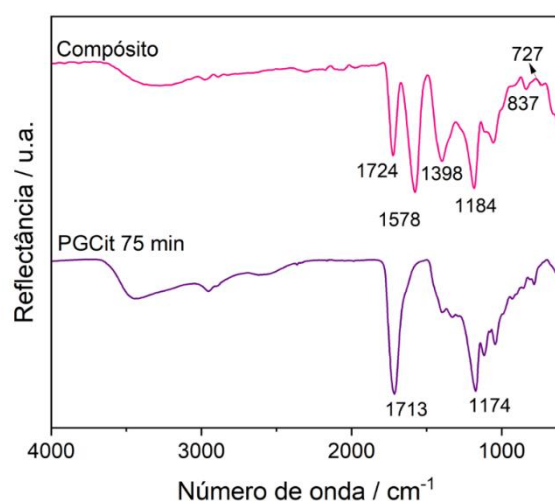


FIGURA 5.7 - Espectros de FTIR normalizados de amostras de PGCit sintetizado por 75 minutos e do compósito produzido a partir do polímero pós reação com CaCO_3 .

No compósito surgem duas novas bandas em 1578 cm^{-1} e 1398 cm^{-1} , correspondentes aos estiramentos dos modos vibracionais assimétrico e simétrico do grupo carboxilato ($-\text{COO}^-$) coordenado ao cálcio, respectivamente.^{90,91} Por outro lado, a presença de bandas em 837 cm^{-1} , referente à flexão no plano C-O, e 727 cm^{-1} , referente à flexão fora do plano da ligação C-O, são características de carbonato de cálcio, indicando sua presença no material mesmo após descarte da parte insolúvel.

Além disso, o alargamento da região em torno de 1400 cm^{-1} , sugere que há sobreposição do modo vibracional dos estiramentos do grupo carboxilato e do carbonato, cuja banda intensa ocorre tipicamente entre $1400 - 1480\text{ cm}^{-1}$.⁹²⁻⁹⁴ Embora parte da banda em $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ provenha do carbonato, a detecção simultânea do par $1578/1398\text{ cm}^{-1}$ confirma a formação de carboxilatos de cálcio ($-\text{COO}^- \text{Ca}^+$) na matriz polimérica. Assim, a coexistência das bandas de carboxilato e CaCO_3 evidencia que

o processo de neutralização entre o PGCit e o CaCO_3 resulta em um compósito híbrido, composto pelo carbonato de cálcio e o polímero.

A formação do compósito foi confirmada pela análise termogravimétrica. A Figura 5.8. apresenta as curvas termogravimétricas do polímero escolhido e do material obtido após a reação com CaCO_3 , assim como suas derivadas. É possível identificar um aumento na estabilidade térmica do material, enquanto o PGCit a 500 °C apresenta um residual mássico de aproximadamente 10 %, o compósito tem cerca de 40 % ainda, sugerindo a presença de carbonato de cálcio, cuja decomposição tem início próximo a 600 °C nas condições testadas (Figura A3-2).

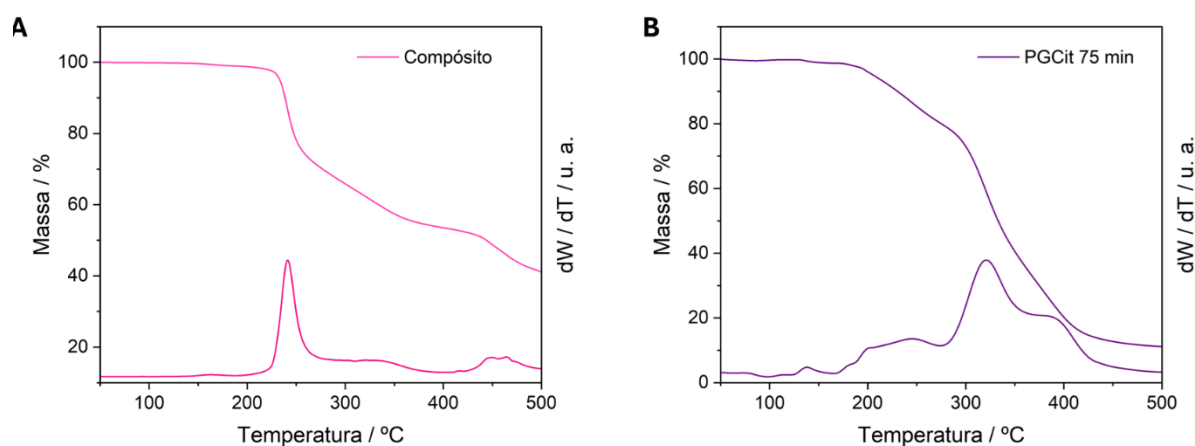


FIGURA 5.8 - Curvas de termogravimetria (TGA) e sua primeira derivada (DTG) do compósito (A) e do PGCit sintetizado por 75 min (B).

Outra característica evidente é o estreitamento da faixa de temperatura da primeira degradação, a qual tem seu início deslocado para temperaturas mais altas no compósito, em comparação ao polímero. Esse comportamento pode estar relacionado à remoção de ácido cítrico residual no processo de neutralização e descarte do precipitado. Além disso, é possível observar uma perda de massa 10 % maior até 260 °C no compósito do que no polímero.

CAI et al. (2015)⁹⁵ relataram uma diminuição da energia de ativação de poli (L- ácido láctico) pela adição de CaCO_3 , enquanto KUMAR, DEV e GUPTA (2014)⁹⁶ mostraram que a adição de CaCO_3 , também em poli(L-ácido láctico), reduziu a temperatura de degradação do polímero, inferindo que a natureza básica do CaCO_3 pode ter catalisado a despolimerização das ligações éster do polímero. Considerando que o PGCit também é um poliéster, é possível que o mesmo fenômeno ou algo

semelhante tenha ocorrido. Ainda assim, a estabilidade térmica apresentada pelo compósito, com temperatura inicial de degradação próxima de 200 °C, é suficiente para a aplicação proposta.

A análise de DSC, nas temperaturas testadas, não revelou eventos térmicos, incluindo a transição vítrea previamente observada na amostra de PGCit. A ausência de T_g no compósito PGCit-CaCO₃ indica uma restrição da mobilidade segmentar das cadeias poliméricas, possivelmente relacionadas com a formação de ligações iônicas -COO⁻-Ca²⁺-OOC- e da interação da matriz com a fase inorgânica.⁹⁶

Portanto, do ponto de vista de aplicação, o compósito obtido apresenta os requisitos necessários, incluindo a formação de um pó em temperatura ambiente, temperatura de degradação acima da temperatura de esterilização (121 °C), e pH mais elevado se comparado ao polímero puro.

5.3 - Produção do inoculante seco e estabilidade

Um fator crítico na produção de biofertilizantes é a capacidade de manter a viabilidade microbiana ao longo de períodos prolongados de armazenamento.⁹⁷ Isso é particularmente relevante para *A. brasilense*, uma bactéria Gram negativa promotora de crescimento de plantas que, portanto, não forma endósporos, tornando-a mais suscetível a estresses ambientais e à perda de viabilidade.^{40,98} Assim, a estirpe Ab-V5 foi encapsulada em uma matriz de PGCit, com intuito de proteger as células bacterianas durante o armazenamento e a aplicação, além de atuar como substrato nutricional, uma vez que é composta por ácido cítrico e glicerol, componentes comuns em sistemas biológicos.^{78,80}

O encapsulamento foi realizado por três rotas distintas: (i) secagem em estufa a 30 °C de um filme composto por uma mistura de PGCit e soluções concentradas de Ab-V5, em concentrações em torno 1×10^{10} UFC/g_{mistura}, seguida de moagem manual; (ii) liofilização da mesma suspensão, produzindo um material sólido, posteriormente desaglomerado manualmente; e (iii) *spray drying*, em que a suspensão foi atomizada a 90 °C para formação de um pó fino, sem processamento adicional.

Ressalta-se que, no processo de liofilização, o uso de um crioprotetor é essencial para preservar a viabilidade celular, uma vez que a formação de cristais de gelo durante o congelamento pode romper membranas celulares e levar à morte

celular.⁹⁹ A liofilização de *Azospirillum* sem trealose resultou em uma redução de duas ordens de magnitude em sua viabilidade inicial, se comparado ao material contendo o osmoprotetor (Figura A3.3).

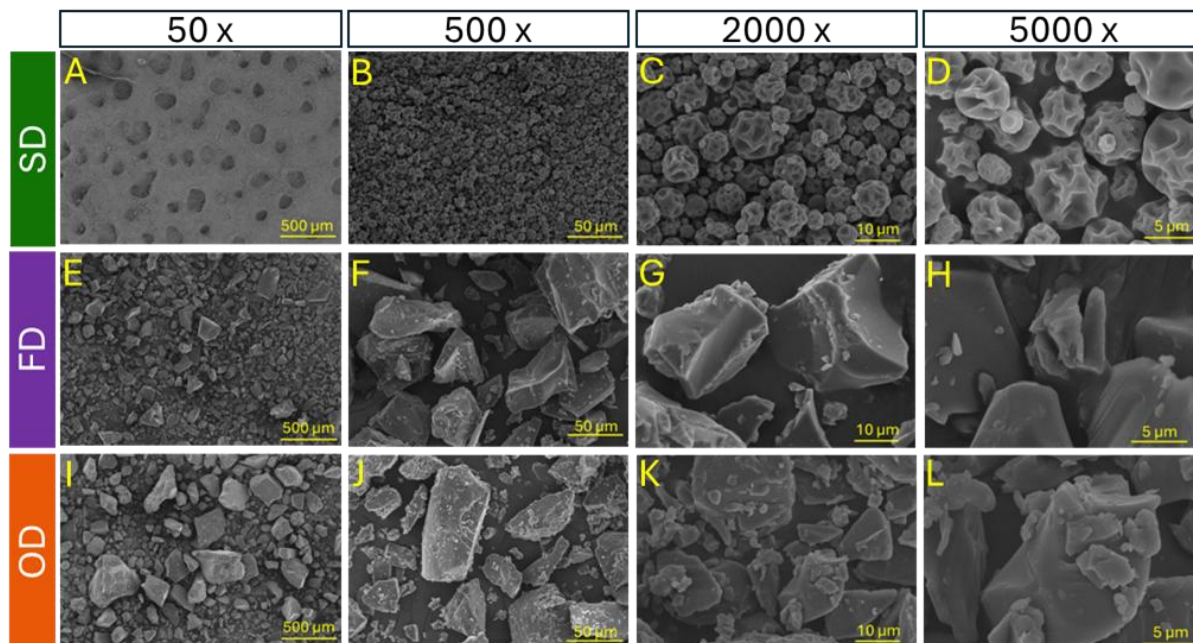


FIGURA 5.9 - Imagens de MEV em ampliações de 50×, 500×, 2000× e 5000× dos inoculantes sólidos contendo *A. brasilense*, produzidos por diferentes métodos de secagem: *spray drying* (SD), liofilização (FD) e secagem em estufa de convecção (OD). As variações na morfologia e no tamanho das partículas refletem as distintas técnicas de processamento empregadas — moagem manual nos casos de FD e OD, e atomização no caso de SD.

Para garantir condições equivalentes e permitir comparação entre os três métodos, todas as suspensões foram formuladas com trealose na proporção de 3:1 (PGCit:trealose), assegurando que as diferenças observadas na viabilidade durante o armazenamento fossem atribuídas especificamente ao processo de encapsulamento, e não a variações de formulação.

A morfologia e o tamanho médio das partículas contendo as bactérias foram analisados por microscopia eletrônica de varredura. Conforme ilustrado nas Figuras 5.9E–L, os pós obtidos por moagem manual (ou seja, materiais secos em estufa e liofilizados) apresentaram partículas heterogêneas, de formato irregular, com dimensões em torno de 300 μm e bordas serrilhadas ou fraturadas. Em contraste, os pós obtidos por *spray drying*, mostrados nas Figuras 5.A–D, exibiram morfologia

subesférica, típica de materiais obtidos por atomização, e superfícies com depressões característica frequentemente associada à secagem de partículas de menor densidade.^{100,101}

A falta de uniformidade nas amostras obtidas por moagem manual é esperada, considerando que ela não permite controle preciso do tempo, da pressão ou da energia aplicada.^{102,103} Por outro lado, as partículas produzidas por *spray drying* apresentaram distribuição de tamanho relativamente uniforme, conforme demonstrado no histograma (Figura 5.10), com diâmetro médio de aproximadamente 4,60 μm .

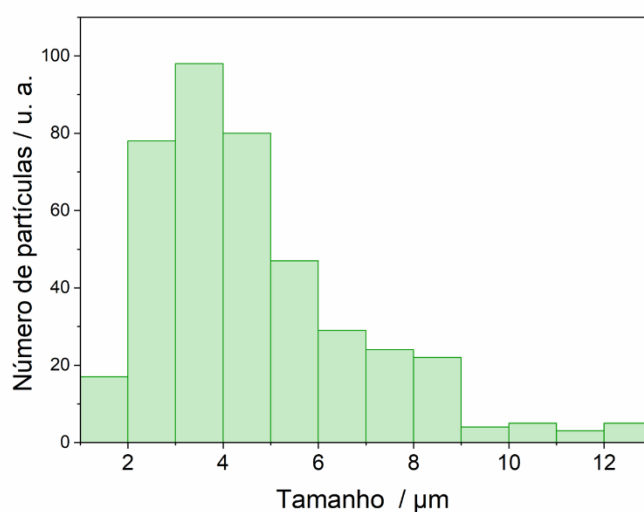


FIGURA 5.10 - Histograma de distribuição do tamanho de partículas obtido por *spray drying* de solução de PGCit com trealose.

A contagem de UFC recuperado nos materiais logo após o preparo foi realizada para confirmar se o *Azospirillum* estava contido no material e estabelecer o ponto zero do ensaio de estabilidade (*shelf-life*).

Todos os inóculos exibiram alta viabilidade inicial de *A. brasilense*, próxima de 10^8 UFC/g, sem diferenças significativas entre os três métodos de secagem. Além disso, todas as metodologias resultaram em uma perda de viabilidade de cerca de duas ordens de magnitude (10^2 UFC/g) durante o processo de secagem, em todas as formulações. LIMA-TENÓRIO et al. (2023)¹³ observaram redução semelhante na viabilidade de *A. brasilense* encapsulado em microesferas secas de amido catiônico com dupla reticulação. Essa redução pode ser atribuída à presença de bactérias não encapsuladas e à proteção incompleta conferida pela matriz.

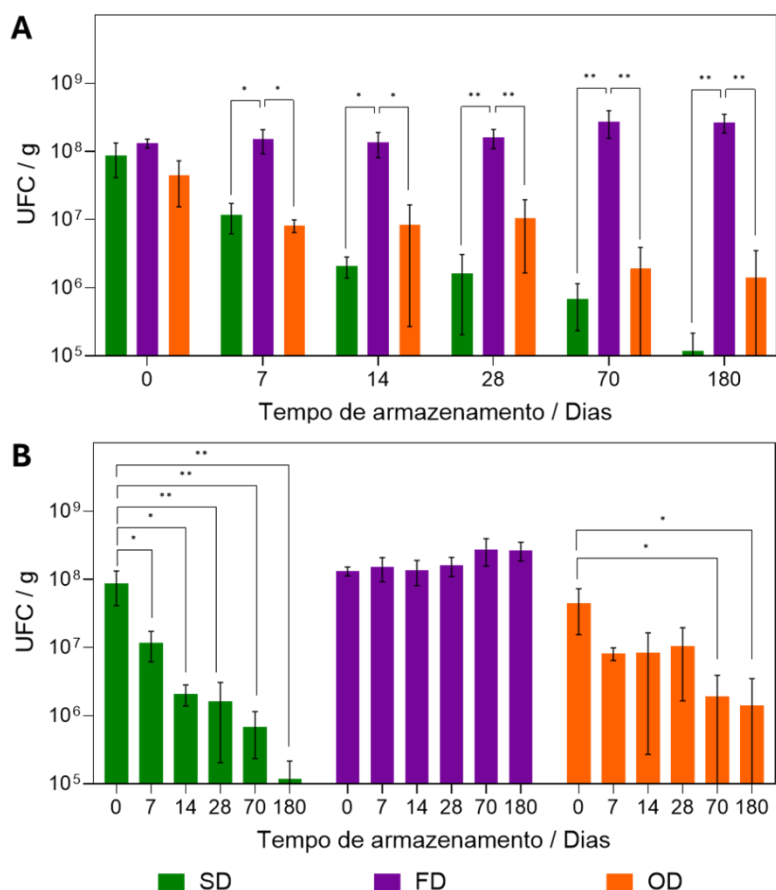


FIGURA 5.11 - Viabilidade de *Azospirillum brasilense* em partículas obtidas por *spray drying* (SD), liofilização (FD) e secagem em estufa de convecção (OD), após armazenamento a 4 °C por 70 dias. A viabilidade bacteriana foi avaliada por meio da comparação entre os métodos de secagem em cada ponto de tempo (A) e pela análise das variações ao longo do tempo dentro de cada método (B). Os valores médios representam a média de três repetições técnicas. Os dados foram analisados por ANOVA unifatorial, seguida do teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

O comportamento de queda significativa, no primeiro período analisado, pode ser atribuído aos efeitos combinados da desidratação, da inativação térmica e do estresse causado pelo processo de secagem.¹⁰⁴ A eficiência de encapsulamento também pode ter contribuído para esse resultado, visto que o *spray drying* produziu partículas com diâmetro em torno de 3–5 μm , comparável ao tamanho esperado das bactérias, possivelmente oferecendo cobertura protetora insuficiente. Em conjunto, essas observações sugerem que a otimização do processo de *spray drying*, para geração de partículas maiores e com camadas de matriz mais espessas, poderia melhorar a proteção bacteriana. Além disso, é plausível que algumas células tenham

sobrevivido ao processo de *spray drying*, mas tenham sido comprometidas, impactando nos resultados ao longo do tempo. Importante informar que o dado referente ao 180º dia é resultado da média de apenas 2 replicatas, devido à presença de contaminação na terceira amostra.

Ainda assim, os resultados obtidos são expressivos, considerando que trabalhos prévios relatam níveis de recuperação celular muito inferiores para bactérias semelhantes. KAPISHON et al. (2023)¹⁰⁵ alcançaram viabilidade de 7×10^4 UFC/g para *Pseudomonas fluorescens* após encapsulamento por *spray drying* utilizando poli(ácido itacônico). *P. fluorescens* é uma bactéria Gram-negativa, sensível e não formadora de esporos, assim como o *Azospirillum*. O fato de a formulação proposta nesse trabalho possibilitar a manutenção de viabilidade quatro ordens de magnitude superior em uma bactéria de sensibilidade comparável, aliado à ausência de estudos prévios sobre *spray drying* de *Azospirillum*, evidencia a relevância dos resultados apresentados. Portanto, esses resultados em conjunto demonstram que a matriz PGCit-trealose representa um sistema de encapsulamento promissor para a produção de inoculantes sólidos por *spray drying*, particularmente adequado para aplicações imediatas ou para armazenamento de curto prazo.

O método de encapsulamento em filme não apresentou diferenças estatísticas significativas na viabilidade entre 0 e 28 dias. Isso provavelmente se deve à menor reprodutibilidade do método de secagem em estufa, que resultou em pós com concentrações muito distintas de *A. brasilense*, ocasionando valores de viabilidade estatisticamente equivalentes ao longo dessas quatro semanas. Comparado aos resultados do *spray drying*, sugere-se que o encapsulamento em filme foi superior, ainda que deva ser visto com cautela pela representatividade estatística. Após 70 dias, a redução de viabilidade foi mais evidente, mas ainda assim os valores se mostraram superiores aos observados para os pós obtidos por *spray drying* no mesmo período. Embora o processo possa gerar maior heterogeneidade, as partículas de maior dimensão formadas pela secagem em estufa proporcionam melhor proteção às células encapsuladas, sugerindo que a barreira física desempenha papel relevante na manutenção da viabilidade bacteriana.

Por outro lado, o material liofilizado apresentou viabilidade celular significativamente superior em relação aos demais métodos de secagem nos tempos entre 7 e 180 dias. Isso indica que o processo de liofilização impõe menor estresse às células bacterianas, provavelmente devido à inativação celular ocorrer após o

congelamento da solução para a remoção da água em temperatura extremamente baixa. Ademais, a maior homogeneidade da mistura durante a secagem, reflete na maior probabilidade de obter-se um encapsulamento mais uniforme, fatores que contribuem para a proteção celular. Dessa forma, a liofilização mostra-se particularmente eficaz na preservação de elevadas concentrações de células viáveis de bactérias não formadoras de esporos, evidenciado pela incapacidade dos outros dois métodos em manter níveis de viabilidade acima de 10^8 UFC/g.

BASHAN et al. (1986)⁶⁷ encapsularam *Azospirillum brasilense* Cd em macrocápsulas de matriz de alginato contendo leite em pó como aditivo. Os autores reportaram uma redução na viabilidade próxima de três ordens de grandeza após a secagem por liofilização das macrocápsulas obtidas. Além disso, observaram uma viabilidade entre 10^7 e 10^8 após 3 meses de armazenamento das cápsulas secas a 4 °C. No mesmo estudo, os autores também utilizaram o método de secagem em estufa de convecção, obtendo viabilidades iniciais na ordem de 10^2 , valores significativamente inferiores aos observados para as cápsulas úmidas, cuja viabilidade ultrapassava 10^{10} . Esses resultados reforçam a sensibilidade do *Azospirillum* à dessecação, assim como o papel fundamental da matriz protetora para a manutenção da viabilidade bacteriana tanto nos processos de liofilização quanto de secagem em estufa.

Considerando sua alta reprodutibilidade, elevado rendimento, capacidade de preservar a viabilidade celular e os níveis finais de viabilidade obtidos, os pós liofilizados inoculados foram selecionados para os testes de aplicação subsequentes.

5.4 - Recuperação de *Azospirillum* em sementes de milho

Alguns estudos produziram formulações sólidas capazes de permitir o armazenamento e a proteção de *A. brasilense* após sua aplicação, incluindo cápsulas de hidrogel úmidas e secas.^{12,13,58,106} No entanto, essas metodologias resultam em um produto final que só pode ser aplicado diretamente ao solo. Nosso objetivo foi desenvolver um inoculante em pó seco que possibilitasse o uso dessa bactéria em etapas distintas do processo de semeadura, como o recobrimento de sementes. O sucesso dessa abordagem depende criticamente da manutenção da viabilidade tanto do inoculante quanto das próprias sementes. Isso é particularmente crucial para

bactérias sensíveis, como *Azospirillum*, que apresentam baixas taxas de sobrevivência em sementes de milho, mesmo na ausência de pesticidas, conforme relatado por SANTOS et al. (2020).⁴² Além disso, a viabilidade de *Azospirillum* é severamente afetada pelo contato com fungicidas e inseticidas, incluindo aqueles previamente aplicados às sementes.^{42,43}

Tendo isso em vista, foi avaliada a recuperação celular em sementes de milho tanto não tratadas quanto pré-tratadas com produto comercial contendo fungicida e inseticida. Dois tipos de inoculantes foram testados: a formulação liofilizada e uma formulação líquida (controle). Os inoculantes foram aplicados com base na massa, resultando em $4,58 \times 10^5$ e $8,39 \times 10^5$ UFC/semente para os inoculantes liofilizado e líquido, respectivamente, em sementes tratadas; e $4,04 \times 10^5$ e $7,40 \times 10^5$ UFC/semente em sementes não tratadas (Tabela 5.4).

A recuperação de células viáveis a partir de sementes de milho inoculadas com a formulação líquida falhou em todas as condições testadas. As contagens de colônias ficaram abaixo do limite de detecção ($<10^2$ UFC/semente), e apenas colônias contaminantes foram observadas nas placas (Figura 5.12A). A contaminação possivelmente é advinda das sementes, já que o inóculo utilizado não apresentava contaminação. Resultados semelhantes foram obtidos por SANTOS et al. (2020)¹¹, que empregaram a mesma metodologia de recuperação e relataram baixas contagens de *A. brasilense*. Esses autores atribuíram tal resultado à agregação celular sob condições de estresse, particularmente em superfícies de sementes secas e nutricionalmente pobres, o que pode levar à subestimação da viabilidade.

Em contraste, as sementes inoculadas com a formulação liofilizada permitiram a recuperação de células viáveis de *A. brasilense*, com redução de aproximadamente uma ordem de magnitude na viabilidade após 2 h de secagem, conforme apresentado na Tabela 5.4. Esse resultado sugere que o material liofilizado ofereceu proteção frente aos estresses ambientais encontrados na superfície das sementes. Contudo, a redução observada na contagem celular pode ainda estar relacionada à agregação celular ou à perda parcial de viabilidade em tais condições adversas, ou até mesmo limitação da técnica.

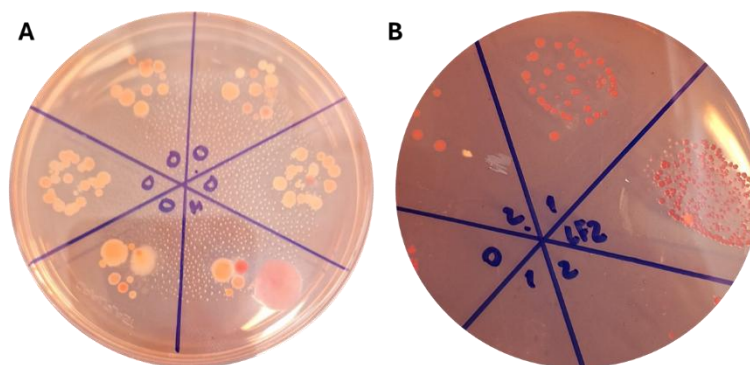


FIGURA 5.12 - Placas contendo meio de cultura RC inoculado com material extraído das sementes tratadas com inóculo líquido (A) e material liofilizado (B)

Importante destacar que a secagem prolongada e a exposição a tratamentos químicos não afetaram significativamente a recuperação bacteriana quando comparadas à condição basal (2 h de secagem sem tratamento químico) e que houve a supressão dos contaminantes (Figura 5.12B). Ademais, o baixo desvio-padrão observado na recuperação de viabilidade entre as amostras indica que o método de aplicação proporcionou dispersão uniforme do inoculante sobre as sementes.

Portanto, esses resultados sugerem que o aumento do tempo de secagem e os tratamentos químicos avaliados não comprometeram substancialmente a viabilidade celular. Isso reforça o potencial do PGCit em proteger *A. brasilense* nessas condições e evidencia seu potencial como estratégia viável para a inoculação de sementes com bactérias sensíveis e não formadoras de esporos.

TABELA 5.4 - Viabilidade de *A. brasilense* recuperado de sementes de milho, não tratadas e previamente -tratadas com fungicida e inseticida, inoculadas com inoculante líquido ou sólido liofilizado.

Tempo (horas)	Inoculante líquido (UFC/semente)		Inoculante liofilizado (UFC/semente)	
	Semente	Semente previamente tratada	Semente	Semente previamente tratada
2	$<10^2$	$<10^2$	$5,19 \times 10^4 \pm 1,70 \times 10^4$	$4,76 \times 10^4 \pm 1,80 \times 10^4$
24	$<10^2$	$<10^2$	$2,31 \times 10^4 \pm 1,11 \times 10^4$	$3,01 \times 10^4 \pm 2,95 \times 10^4$

6 - Conclusões

Em resumo, o *A. brasilense* foi encapsulado com sucesso em uma matriz de poliglicerol citrato (PGCit) sintetizada em condições equimolares por 75 minutos, resultando em materiais com baixo teor de monômeros residuais e boa processabilidade. O material obtido foi submetido a três diferentes métodos de secagem, o que permitiu a recuperação de materiais em pó com alta concentração de células viáveis após a secagem. Dentre os métodos, a liofilização demonstrou ser a forma mais eficaz de proteção, mantendo a viabilidade celular ao longo de 180 dias de armazenamento à 4 °C, sugerindo que o método de secagem influencia de maneira significativa a manutenção da viabilidade bacteriana, principalmente a longo prazo.

Embora o *spray drying* tenha apresentado um declínio gradual da viabilidade celular ao longo do tempo, a elevada contagem inicial representa um resultado positivo, especialmente diante da ausência de estudos prévios sobre *spray drying* de *Azospirillum* e da viabilidade significativamente menor relatada para outras bactérias sensíveis em condições semelhantes.

Adicionalmente, os ensaios de inoculação de sementes indicaram que o material produzido utilizando como método de secagem a liofilização, protegeu de forma eficaz as células de *Azospirillum* contra as condições adversas da superfície das sementes e dos tratamentos químicos aplicados, reforçando a aplicabilidade prática desse método na agricultura.

De forma geral, os resultados evidenciam o potencial da tecnologia seca desenvolvida para a entrega de *A. brasilense* em aplicações agrícolas utilizando a matriz de PGCit. Pesquisas futuras devem concentrar-se na avaliação da resposta de plantas de milho à inoculação com esse material encapsulado e em melhorias nos outros métodos de secagem em estufa por convecção e *spray drying*.

7 - Referências Bibliográficas

1. SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A. & HUNGRIA, M. "Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture". *AMB Express*, **9** (1): 205, 2019.
2. AHMAD, M.; PATACZEK, L.; HILGER, T. H.; ZAHIR, Z. A.; HUSSAIN, A.; RASCHE, F.; SCHAFLEITNER, R. & SOLBERG, S. O. "Perspectives of Microbial Inoculation for Sustainable Development and Environmental Management". *Front Microbiol*, **9**: 2992, 2018.
3. SAYYED, R. Z.; ILYAS, N.; TABASSUM, B.; HASHEM, A.; ABD_ALLAH, E. F. & JADHAV, H. P. "Plausible Role of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in Future Climatic Scenario". IN: *Environmental Biotechnology: For Sustainable Future*. (Eds.). 2019. p. 175.
4. GUREEVA, M. V. & GUREEV, A. P. "Molecular Mechanisms Determining the Role of Bacteria from the Genus *Azospirillum* in Plant Adaptation to Damaging Environmental Factors". *Int J Mol Sci*, **24** (11) 2023.
5. OLIVEIRA, A. L. M.; SANTOS, O.; MARCELINO, P. R. F.; MILANI, K. M. L.; ZULUAGA, M. Y. A.; ZUCARELI, C. & GONCALVES, L. S. A. "Maize Inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 Cells Enriched with Exopolysaccharides and Polyhydroxybutyrate Results in High Productivity under Low N Fertilizer Input". *Front Microbiol*, **8**: 1873, 2017.
6. CASSÁN, F.; CONIGLIO, A.; LÓPEZ, G.; MOLINA, R.; NIEVAS, S.; DE CARLAN, C. L. N.; DONADIO, F.; TORRES, D.; ROSAS, S.; PEDROSA, F. O.; DE SOUZA, E.; ZORITA, M. D.; DE-BASHAN, L. & MORA, V. "Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond". *Biology and Fertility of Soils*, **56** (4): 461, 2020.
7. CURA, J. A.; FRANZ, D. R.; FILOSOFIA, J. E.; BALESTRASSE, K. B. & BURGUENO, L. E. "Inoculation with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum* sp. Bacteria Increases the Tolerance of Maize to Drought Stress". *Microorganisms*, **5** (3) 2017.
8. RODRIGUEZ-SALAZAR, J.; SUAREZ, R.; CABALLERO-MELLADO, J. & ITURRIAGA, G. "Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants". *FEMS Microbiol Lett*, **296** (1): 52, 2009.
9. FUKAMI, J.; OLLERO, F. J.; MEGIAS, M. & HUNGRIA, M. "Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth". *AMB Express*, **7** (1): 153, 2017.
10. CHAI, Y. N.; FUTRELL, S. & SCHACHTMAN, D. P. "Assessment of Bacterial Inoculant Delivery Methods for Cereal Crops". *Front Microbiol*, **13**: 791110, 2022.
11. SANTOS, M. S.; RODRIGUES, T. F.; FERREIRA, E.; MEGIAS, M.; NOGUEIRA, M. A. & HUNGRIA, M. "Method for Recovering and Counting Viable Cells from Maize

Seeds Inoculated with *Azospirillum brasilense*". Journal of Pure and Applied Microbiology, **14** (1): 195, 2020.

12. LIMA-TENÓRIO, M. K.; KARAS, L. P.; FURMAM-CHEROBIM, F.; GUERLINGUER, E.; RUBIRA, A. F.; STEFFENS, M. B. R.; GALVÃO, C. W.; TENÓRIO-NETO, E. T. & ETTO, R. M. "Encapsulation of Plant Growth-Promoting Bacteria with Gum Arabic Hydrogels: A Potential System for Sustainable Agriculture". Journal of Polymers and the Environment, **32** (11): 5702, 2024.

13. LIMA-TENORIO, M. K.; FURMAM-CHEROBIM, F.; KARAS, P. R.; HYEDA, D.; TAKAHASHI, W. Y.; PINTO JUNIOR, A. S.; GALVAO, C. W.; TENORIO-NETO, E. T. & ETTO, R. M. "*Azospirillum brasilense* AbV5/6 encapsulation in dual-crosslinked beads based on cationic starch". Carbohydr Polym, **308**: 120631, 2023.

14. GONZALEZ, E. J.; HERNANDEZ, J.-P.; DE-BASHAN, L. E. & BASHAN, Y. "Dry micro-polymeric inoculant of *Azospirillum brasilense* is useful for producing mesquite transplants for reforestation of degraded arid zones". Applied Soil Ecology, **129**: 84, 2018.

15. BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R. & HERNANDEZ, J.-P. "Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013)". Plant and Soil, **378** (1-2): 1, 2014.

16. MALUSA, E.; SAS-PASZT, L. & CIESIELSKA, J. "Technologies for beneficial microorganisms inocula used as biofertilizers". ScientificWorldJournal, **2012**: 491206, 2012.

17. CESARI, A. B.; PAULUCCI, N. S.; YSLAS, E. I. & DARDANELLI, M. S. "Immobilization of Bradyrhizobium and *Azospirillum* in alginate matrix for long time of storage maintains cell viability and interaction with peanut". Appl Microbiol Biotechnol, **104** (23): 10145, 2020.

18. PEREIRA, J. F.; OLIVEIRA, A. L. M.; SARTORI, D.; YAMASHITA, F. & MALI, S. "Perspectives on the Use of Biopolymeric Matrices as Carriers for Plant-Growth Promoting Bacteria in Agricultural Systems". Microorganisms, **11** (2) 2023.

19. LIU, S.; JIANG, M.; YE, S.; XU, X.; LU, P. & DONG, J. "Biodegradable poly(glycerin citrate) and its application to controlled release of theophylline". Journal of Applied Polymer Science, **124** (5): 3633, 2011.

20. GIROTO, A. S.; VALLE, S. F.; GUIMARÃES, G. G. F.; OHREM, B.; BRESOLIN, J.; LÜCKE, A.; WISSEL, H.; HUNGRIA, M.; RIBEIRO, C.; MATTOSO, L. H. C. & JABLONOWSKI, N. D. "Polyglycerol citrate: A novel coating and inoculation material for soybean seeds". Environmental Technology & Innovation, **34** 2024.

21. THOMAS, L. & SINGH, I. "Microbial Biofertilizers: Types and Applications". IN: Biofertilizers for Sustainable Agriculture and Environment. (Eds.). 2019. p. 1.

22. WANG, J.; LI, R.; ZHANG, H.; WEI, G. & LI, Z. "Beneficial bacteria activate nutrients and promote wheat growth under conditions of reduced fertilizer application". BMC Microbiol, **20** (1): 38, 2020.

23. KUAN, K. B.; OTHMAN, R.; ABDUL RAHIM, K. & SHAMSUDDIN, Z. H. "Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Inoculation to Enhance Vegetative Growth, Nitrogen Fixation and Nitrogen Remobilisation of Maize under Greenhouse Conditions". *PLoS One*, **11** (3): e0152478, 2016.
24. XIAO, M.; LIU, X.; WANG, X.; LU, W.; ZHANG, T. & YANG, Y. "Microbial inoculants drive disease suppression and rhizosphere modulation for effective management of pepper phytophthora blight". *Applied Soil Ecology*, **208** 2025.
25. MENEGAT, S.; LEDO, A. & TIRADO, R. "Greenhouse gas emissions from global production and use of nitrogen synthetic fertilisers in agriculture". *Sci Rep*, **12** (1): 14490, 2022.
26. FUKAMI, J.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. & HUNGRIA, M. "Assessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*". *AMB Express*, **6** (1): 3, 2016.
27. CASSÁN, F. & DIAZ-ZORITA, M. "*Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field". *Soil Biology and Biochemistry*, **103**: 117, 2016.
28. *Instrução Normativa nº 13, de 24 de março de 2011*. 2011, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA): Brasil.
29. *Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020. Institui o Programa Nacional de Bioinsumos – PNB*. 2020, Diário Oficial da União: Brasília, DF.
30. *Decreto nº 11.940, de 7 de março de 2024. Altera o Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020, que institui o Programa Nacional de Bioinsumos e o Conselho Estratégico do Programa Nacional de Bioinsumos*. 2024, Diário Oficial da União: Brasília, DF.
31. BIOLÓGICOS, A. N. D. P. E. I. D. I. D., *ESTATÍSTICAS 2024*. 2024.
32. TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R. & DÖBEREINER, J. "A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov.". *Canadian Journal of Microbiology*, **24** (12): 967, 1978.
33. GALINDO, F. S.; RODRIGUES, W. L.; FERNANDES, G. C.; BOLETA, E. H. M.; JALAL, A.; ROSA, P. A. L.; BUZETTI, S.; LAVRES, J. & TEIXEIRA FILHO, M. C. M. "Enhancing agronomic efficiency and maize grain yield with *Azospirillum brasilense* inoculation under Brazilian savannah conditions". *European Journal of Agronomy*, **134** 2022.
34. GALINDO, F. S.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; BUZETTI, S.; RODRIGUES, W. L.; SANTINI, J. M. K. & ALVES, C. J. "Nitrogen fertilisation efficiency and wheat grain yield affected by nitrogen doses and sources associated with *Azospirillum brasilense*". *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*, **69** (7): 606, 2019.
35. MATTOS, M. L. T.; VALGAS, R. A. & MARTINS, J. F. D. S. "Evaluation of the Agronomic Efficiency of *Azospirillum brasilense* Strains Ab-V5 and Ab-V6 in Flood-Irrigated Rice". *Agronomy*, **12** (12) 2022.

36. CONDORI, T.; ALARCON, S.; HUASASQUICHE, L.; GARCIA-BLASQUEZ, C.; PADILLA-CASTRO, C.; VELASQUEZ, J. & SOLORZANO, R. "Inoculation with *Azospirillum brasilense* as a Strategy to Reduce Nitrogen Fertilization in Cultivating Purple Maize (*Zea mays* L.) in the Inter-Andean Valleys of Peru". *Microorganisms*, **12** (10) 2024.
37. DEGON, Z.; DIXON, S.; RAHMATALLAH, Y.; GALLOWAY, M.; GULUTZO, S.; PRICE, H.; COOK, J.; GLAZKO, G. & MUKHERJEE, A. "*Azospirillum brasilense* improves rice growth under salt stress by regulating the expression of key genes involved in salt stress response, abscisic acid signaling, and nutrient transport, among others". *Front Agron*, **5** 2023.
38. LEVANONY, Y. B. H. "Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture". *Canadian Journal of Microbiology*, **36**: 591, 1990.
39. TIEN, T.-M.; GASKINS, M. H. & HUBBELL, D. H. "Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum*).". *Applied and Environmental Microbiology*, **37** (5): 1016, 1979.
40. BERNINGER, T.; GONZALEZ LOPEZ, O.; BEJARANO, A.; PREININGER, C. & SESSITSCH, A. "Maintenance and assessment of cell viability in formulation of non-sporulating bacterial inoculants". *Microb Biotechnol*, **11** (2): 277, 2018.
41. RENOUD, S.; VACHERON, J.; ABROUK, D.; PRIGENT-COMBARET, C.; LEGENDRE, L.; MULLER, D. & MOENNE-LOCCOZ, Y. "Field Site-Specific Effects of an *Azospirillum* Seed Inoculant on Key Microbial Functional Groups in the Rhizosphere". *Front Microbiol*, **12**: 760512, 2022.
42. SANTOS, M. S.; RONDINA, A. B. L.; NOGUEIRA, M. A. & HUNGRIA, M. "Compatibility of *Azospirillum brasilense* with Pesticides Used for Treatment of Maize Seeds". *Int J Microbiol*, **2020**: 8833879, 2020.
43. TAKAHASHI, W. Y.; GALVAO, C. W.; URREA-VALENCIA, S.; GONCALVES, D. R. P.; HYEDA, D.; CAIRES, E. F. & ETTO, R. M. "Impact of seed-applied fungicide and insecticide on *Azospirillum brasilense* survival and wheat growth-promoting ability". *Lett Appl Microbiol*, **74** (4): 604, 2021.
44. ROZIER, C.; HAMZAOU, J.; LEMOINE, D.; CZARNES, S. & LEGENDRE, L. "Field-based assessment of the mechanism of maize yield enhancement by *Azospirillum lipoferum* CRT1". *Sci Rep*, **7** (1): 7416, 2017.
45. PEDRINHO, A.; MENDES, L. W.; DO RÊGO BARROS, F. M.; BOSSOLANI, J. W.; KÜHN, T. N.; QUECINE, M. C. & ANDREOTE, F. D. "The interplay between *Azospirillum brasilense* and the native bacterial communities in the soil and rhizosphere of maize (*Zea mays* L.)". *Soil Biology and Biochemistry*, **189** 2023.
46. TEMPRANO, F. J.; ALBAREDA, M.; CAMACHO, M.; DAZA, A.; SANTAMARIA, C. & RODRIGUEZ-NAVARRO, D. N. "Survival of several *Rhizobium/Bradyrhizobium* strains on different inoculant formulations and inoculated seeds". *Int Microbiol*, **5** (2): 81, 2002.

47. KOUAM, I. D.; TCHAMANI, L.; NTSOLI, G.; BEDINE, M. A.; TITTI, R. W. & YAOUBA, A., Effect of Different Carriers and Storage Temperatures on the Viability of *Bacillus thuringiensis* B9 and *Bacillus pacificus* B11 Isolated from Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Rhizosphere, in The 2nd International Online Conference on Agriculture. 2024.
48. O'CALLAGHAN, M.; BALLARD, R. A. & WRIGHT, D. "Soil microbial inoculants for sustainable agriculture: Limitations and opportunities". *Soil Use and Management*, **38** (3): 1340, 2022.
49. CONCEIÇÃO, F. R. S. D.; BESSA, L. A.; TEIXEIRA, M. B.; CRUVINEL, B. G. & VITORINO, L. C. "An Evaluation of Inoculant Additives on Cell Viability and Their Effects on the Growth and Physiology of *Glycine max* L". *Agronomy*, **15** (7) 2025.
50. LEE, S. K.; LUR, H. S.; LO, K. J.; CHENG, K. C.; CHUANG, C. C.; TANG, S. J.; YANG, Z. W. & LIU, C. T. "Evaluation of the effects of different liquid inoculant formulations on the survival and plant-growth-promoting efficiency of *Rhodopseudomonas palustris* strain PS3". *Appl Microbiol Biotechnol*, **100** (18): 7977, 2016.
51. FERRARI, P. F.; BUFALINI, C.; CAMPARDELLI, R.; BRONDOLO, A.; ERCOLE, E.; PALOMBO, D. & PEREGO, P. "Stabilization of microbial strains in long-lasting double emulsions as a new strategy for liquid biofertilizer formulation". *Food and Bioproducts Processing*, **148**: 611, 2024.
52. KORDATZAKI, G.; KATSENIOS, N.; GIANNOGLOU, M.; ANDREOU, V.; CHANIOTI, S.; KATSAROS, G.; SAVVAS, D. & EFTHIMIADOU, A. "Effect of foliar and soil application of plant growth promoting bacteria on kale production and quality characteristics". *Scientia Horticulturae*, **301** 2022.
53. ZAYED, M. S. "Advances in Formulation Development Technologies". IN: *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*. (Eds.). 2016. p. 219.
54. ALBAREDA, M.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, D. N.; CAMACHO, M. & TEMPRANO, F. J. "Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations". *Soil Biology and Biochemistry*, **40** (11): 2771, 2008.
55. DENTON, M. D.; PEARCE, D. J.; BALLARD, R. A.; HANNAH, M. C.; MUTCH, L. A.; NORNG, S. & SLATTERY, J. F. "A multi-site field evaluation of granular inoculants for legume nodulation". *Soil Biology and Biochemistry*, **41** (12): 2508, 2009.
56. HERRMANN, L. & LESUEUR, D. "Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation". *Appl Microbiol Biotechnol*, **97** (20): 8859, 2013.
57. BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. & PRABHU, S. R. "Superior Polymeric Formulations and Emerging Innovative Products of Bacterial Inoculants for Sustainable Agriculture and the Environment". IN: *Agriculturally Important Microorganisms*. (Eds.). 2016. p. 15.
58. PEREZ, J. J.; FRANCOIS, N. J.; MARONICHE, G. A.; BORRAJO, M. P.; PEREYRA, M. A. & CREUS, C. M. "A novel, green, low-cost chitosan-starch hydrogel

as potential delivery system for plant growth-promoting bacteria". *Carbohydr Polym*, **202**: 409, 2018.

59. ALI, M.; CYBULSKA, J.; FRAC, M. & ZDUNEK, A. "Application of polysaccharides for the encapsulation of beneficial microorganisms for agricultural purposes: A review". *Int J Biol Macromol*, **244**: 125366, 2023.

60. LUFT, L. & MAZUTTI, M. A. "Freeze and Spray Drying Technologies to Produce Solid Microbial Formulations for Sustainable Agriculture". *Processes*, **13** (7) 2025.

61. MISRA, S.; PANDEY, P.; DALBHAGAT, C. G. & MISHRA, H. N. "Emerging Technologies and Coating Materials for Improved Probiotication in Food Products: a Review". *Food Bioproc Tech*, **15** (5): 998, 2022.

62. LODI, L. A.; BORGES, R.; BORTOLETTO-SANTOS, R.; OLIVEIRA-PAIVA, C. A. D.; RIBEIRO, C. & FARINAS, C. S. "Biodegradable PVA-based films for delivery of *Bacillus megaterium* as seed coating". *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **12** (6) 2024.

63. JOHN, R. P.; TYAGI, R. D.; BRAR, S. K.; SURAMPALLI, R. Y. & PREVOST, D. "Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery". *Crit Rev Biotechnol*, **31** (3): 211, 2011.

64. AGRIOPOULOU, S.; TARAPOULOUZI, M.; VARZAKAS, T. & JAFARI, S. M. "Application of Encapsulation Strategies for Probiotics: From Individual Loading to Co-Encapsulation". *Microorganisms*, **11** (12) 2023.

65. SOUKOULIS, C.; SINGH, P.; MACNAUGHTAN, W.; PARMENTER, C. & FISK, I. D. "Compositional and physicochemical factors governing the viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG embedded in starch-protein based edible films". *Food Hydrocoll*, **52**: 876, 2016.

66. TAN, D. T.; POH, P. E. & CHIN, S. K. "Microorganism preservation by convective air-drying—A review". *Drying Technology*, **36** (7): 764, 2017.

67. BASHAN, Y. "Alginate Beads as Synthetic Inoculant Carriers for Slow Release of Bacteria That Affect Plant Growth". *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, **51** (05): 1089, 1986.

68. ZAGO, S. L.; SANTOS, M. F. D.; KONRAD, D.; FIORINI, A.; ROSADO, F. R.; MISSIO, R. F. & VENDRUSCOLO, E. C. G. "Shelf Life of *Azospirillum brasilense* in Alginate Beads Enriched With Trehalose and Humic Acid". *Journal of Agricultural Science*, **11** (6) 2019.

69. BASHAN, Y.; HERNANDEZ, J.-P.; LEYVA, L. & BACILIO, M. "Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria". *Biology and Fertility of Soils*, **35** (5): 359, 2002.

70. SCHOEBITZ, M.; SIMONIN, H. & PONCELET, D. "Starch filler and osmoprotectants improve the survival of rhizobacteria in dried alginate beads". *J Microencapsul*, **29** (6): 532, 2012.

71. VERCELHEZE, A. E. S.; MARIM, B. M.; OLIVEIRA, A. L. M. & MALI, S. "Development of biodegradable coatings for maize seeds and their application for *Azospirillum brasilense* immobilization". *Appl Microbiol Biotechnol*, **103** (5): 2193, 2019.
72. WANG, Y. P.; CHEN, N. L.; WANG, R. M.; XIONG, Y. B. & ZHA, R. T. "Preparation of a multifunctional bacterial fertilizer by living *azospirillum* simplex cells immobilized on poly(sodium acrylate)". *Polymers for Advanced Technologies*, **15** (1-2): 81, 2004.
73. CHAPARRO-RODRIGUEZ, M.; ESTRADA-BONILLA, G.; ROSAS-PEREZ, J.; GOMEZ-ALVAREZ, M. & CRUZ-BARRERA, M. "Hydrogel capsules as new approach for increasing drying survival of plant biostimulant gram-negative consortium". *Appl Microbiol Biotechnol*, **107** (21): 6671, 2023.
74. GODINHO, B.; NOGUEIRA, R.; GAMA, N. & FERREIRA, A. "Synthesis of Prepolymers of Poly(glycerol-co-diacids) Based on Sebacic and Succinic Acid Mixtures". *ACS Omega*, **8** (18): 16194, 2023.
75. VALERIO, O.; HORVATH, T.; POND, C.; MANJUSRI, M. & MOHANTY, A. "Improved utilization of crude glycerol from biodiesel industries: Synthesis and characterization of sustainable biobased polyesters". *Industrial Crops and Products*, **78**: 141, 2015.
76. ZAMBOULIS, A.; NAKIOU, E. A.; CHRISTODOULOU, E.; BIKIARIS, D. N.; KONTONASAKI, E.; LIVERANI, L. & BOCCACCINI, A. R. "Polyglycerol Hyperbranched Polyesters: Synthesis, Properties and Pharmaceutical and Biomedical Applications". *Int J Mol Sci*, **20** (24) 2019.
77. GIROTO, A. S.; VALLE, S. F.; BORGES, R.; COLNAGO, L. A.; RIBEIRO, T. S.; JABLONOWSKI, N. D.; RIBEIRO, C. & MATTOSO, L. H. C. "Revealing the Structure Formation on Polyglycerol Citrate Polymers-An Environmentally Friendly Polyester as a Seed-Coating Material". *Polymers (Basel)*, **15** (21) 2023.
78. KSIAZEK, E. "Citric Acid: Properties, Microbial Production, and Applications in Industries". *Molecules*, **29** (1) 2023.
79. HALPERN, J. M.; URBANSKI, R.; WEINSTOCK, A. K.; IWIG, D. F.; MATHERS, R. T. & VON RECUM, H. A. "A biodegradable thermoset polymer made by esterification of citric acid and glycerol". *J Biomed Mater Res A*, **102** (5): 1467, 2014.
80. POBLETE-CASTRO, I.; WITTMANN, C. & NIKEL, P. I. "Biochemistry, genetics and biotechnology of glycerol utilization in *Pseudomonas* species". *Microb Biotechnol*, **13** (1): 32, 2020.
81. ALBERTS, A. H. & ROTHENBERG, G. "Plantics-GX: a biodegradable and cost-effective thermoset plastic that is 100% plant-based". *Faraday Discuss*, **202**: 111, 2017.
82. BERUBE, M.-A.; SCHORR, D.; BALL, R. J.; LANDRY, V. & BLANCHET, P. "Determination of In Situ Esterification Parameters of Citric Acid-Glycerol Based Polymers for Wood Impregnation". *Journal of Polymers and the Environment*, **26** (3): 970, 2017.

83. GADOMSKA-GAJADHUR, A.; BANDZEREWICZ, A.; WRZECIONEK, M. & RUŚKOWSKI, P. "Biobased poly(glycerol citrate) synthesis optimization via design of experiments". *Polymers for Advanced Technologies*, **32** (10): 3982, 2021.
84. PRAMANICK, D. & RAY, T. T. "Synthesis and biodegradation of copolyesters from citric acid and glycerol". *Polymer Bulletin*, (4): 365, 1988.
85. CHANDRA KUMARI, M. & JAISANKAR, V. "Synthesis and Characterisation of Poly (Glycerol-co-Citrate)/ n-HAp Composite for Biomedical Applications". *Materials Today: Proceedings*, **5** (2): 8824, 2018.
86. WRZECIONEK, M.; BANDZEREWICZ, A.; DUTKOWSKA, E.; DULNIK, J.; DENIS, P. & GADOMSKA-GAJADHUR, A. "Poly(glycerol citrate)-polylactide nonwovens toward tissue engineering applications". *Polymers for Advanced Technologies*, **32** (10): 3955, 2021.
87. WRZECIONEK, M.; MATYSZCZAK, G.; BANDZEREWICZ, A.; RUŚKOWSKI, P. & GADOMSKA-GAJADHUR, A. "Kinetics of Polycondensation of Citric Acid with Glycerol Based on a Genetic Algorithm". *Organic Process Research & Development*, **25** (2): 271, 2021.
88. ARAUJO, R. S.; DA CRUZ, S. P.; SOUCHIE, E. L.; MARTIN, T. N.; NAKATANI, A. S.; NOGUEIRA, M. A. & HUNGRIA, M. "Preinoculation of Soybean Seeds Treated with Agrichemicals up to 30 Days before Sowing: Technological Innovation for Large-Scale Agriculture". *Int J Microbiol*, **2017**: 5914786, 2017.
89. KOLBUK, D.; JEZNACH, O.; WRZECIONEK, M. & GADOMSKA-GAJADHUR, A. "Poly(Glycerol Succinate) as an Eco-Friendly Component of PLLA and PLCL Fibres towards Medical Applications". *Polymers (Basel)*, **12** (8) 2020.
90. FILOPOULOU, A.; VLACHOU, S. & BOYATZIS, S. C. "Fatty Acids and Their Metal Salts: A Review of Their Infrared Spectra in Light of Their Presence in Cultural Heritage". *Molecules*, **26** (19) 2021.
91. CAMPAÑONE, L.; BRUNO, E. & MARTINO, M. "Effect of microwave treatment on metal-alginate beads". *Journal of Food Engineering*, **135**: 26, 2014.
92. F. BOSCH REIG, J. V. G. A., M.C.M. MOYA MORENO "FTIR quantitative analysis of calcium carbonate (calcite) and silica (quartz) mixtures using the constant ratio method. Application to geological samples". *Talanta*, **58**: 811, 2002.
93. MATEI, C.; BERGER, D.; DUMBRAVA, A.; RADU, M. D. & GHEORGHE, E. "Calcium carbonate as silver carrier in composite materials obtained in green seaweed extract with topical applications". *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, **93** (2): 315, 2019.
94. OLTEANU, R. L.; RADULESCU, C.; STIHI, C.; DULAMA, I. D.; NICOLESCU, C. M.; STANESCU, S. G.; BUCURICA, I. A.; GURGU, I. V.; STIRBESCU, R. M.; GHEBOIANU, A. I.; LET, D. D.; TEODORESCU, S.; OLTEANU, L. & STIRBESCU, N. M. "Indoor Microclimatic Variables Assessment by Vibrational Spectroscopy on Original Structure of Tropaeum Traiani Monument, Adamclisi". *Journal of Science and Arts*, **20** (4): 977, 2020.

95. YAN-HUA CAI, Y.-C. X., YING-TANG AND LI-SHA ZHAO "Thermal Decomposition Kinetics of Poly(L-lactic acid) after Heat Treatment". *The Open Materials Science Journal*, **9**: 28, 2015.
96. KUMAR, V.; DEV, A. & GUPTA, A. P. "Studies of poly(lactic acid) based calcium carbonate nanocomposites". *Composites Part B: Engineering*, **56**: 184, 2014.
97. FADIJI, A. E.; XIONG, C.; EGIDI, E. & SINGH, B. K. "Formulation challenges associated with microbial biofertilizers in sustainable agriculture and paths forward". *Journal of Sustainable Agriculture and Environment*, **3** (3) 2024.
98. YOUNG, C.-C.; LIN, S.-Y.; SHEN, F.-T. & LAI, W.-A. "Molecular Tools for Identification and Characterization of Plant Growth Promoting Rhizobacteria with Emphasis in *Azospirillum* spp". IN: *Handbook for Azospirillum*. (Eds.). 2015. p. 27.
99. FIGIEL, S.; RUSEK, P.; RYSZKO, U. & BRODOWSKA, M. S. "Microbially Enhanced Biofertilizers: Technologies, Mechanisms of Action, and Agricultural Applications". *Agronomy*, **15** (5) 2025.
100. BOEL, E.; KOEKOEKX, R.; DEDROOG, S.; BABKIN, I.; VETRANO, M. R.; CLASEN, C. & VAN DEN MOOTER, G. "Unraveling Particle Formation: From Single Droplet Drying to Spray Drying and Electro spraying". *Pharmaceutics*, **12** (7) 2020.
101. NGUYEN, P. T. N.; VO, T. T.; TRAN, T. Y. N.; LE, T. H. N.; MAI, H. C.; TRAN, T. T. & LONG, G. B. "Encapsulation efficiency and thermal stability of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil microencapsulated by the spray-drying process". *Food Research*, **5** (1): 195, 2020.
102. BROSEGHINI, M.; D'INCAU, M.; GELISIO, L.; PUGNO, N. M. & SCARDI, P. "Homogeneity of ball milled ceramic powders: Effect of jar shape and milling conditions". *Data Brief*, **10**: 186, 2017.
103. NAIK, S. & CHAUDHURI, B. "Quantifying Dry Milling in Pharmaceutical Processing: A Review on Experimental and Modeling Approaches". *J Pharm Sci*, **104** (8): 2401, 2015.
104. CAMPOS, D. C.; ACEVEDO, F.; MORALES, E.; ARAVENA, J.; AMIARD, V.; JORQUERA, M. A.; INOSTROZA, N. G. & RUBILAR, M. "Microencapsulation by spray drying of nitrogen-fixing bacteria associated with lupin nodules". *World J Microbiol Biotechnol*, **30** (9): 2371, 2014.
105. KAPISHON, V.; LORRAIN, M.-J.; LEUNG, A. C. W.; GÉLINAS, A.-M.; WU, M.; SARRAZIN, M.; HRAPOVIC, S.; PAGÉ, A.; MONTEIL-RIVERA, F. & HEMRAZ, U. D. "Encapsulation of Plant Growth-Promoting Bacteria in Poly(itaconic acid) Microspheres by Spray Drying". *ACS Agricultural Science & Technology*, **3** (12): 1185, 2023.
106. IVANOVA, E.; TEUNOU, E. & PONCELET, D. "Alginate Based Macrocapsules as Inoculants Carriers for Production of Nitrogen Biofertilizers". *Proceedings of the Balkan Scientific Conference of Biology*: 90, 2005.

Apêndice 1

Composição meio DYGS (g/L):

- Glicose: 2
- Ácido málico: 2
- Peptona bacteriológica: 1,5
- Extrato de levedura: 2
- Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4): 0,5
- Sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$): 0,5
- Ácido glutâmico: 1,5

O pH é ajustado para 6,7 - 6,9 com solução de hidróxido de sódio 3M.

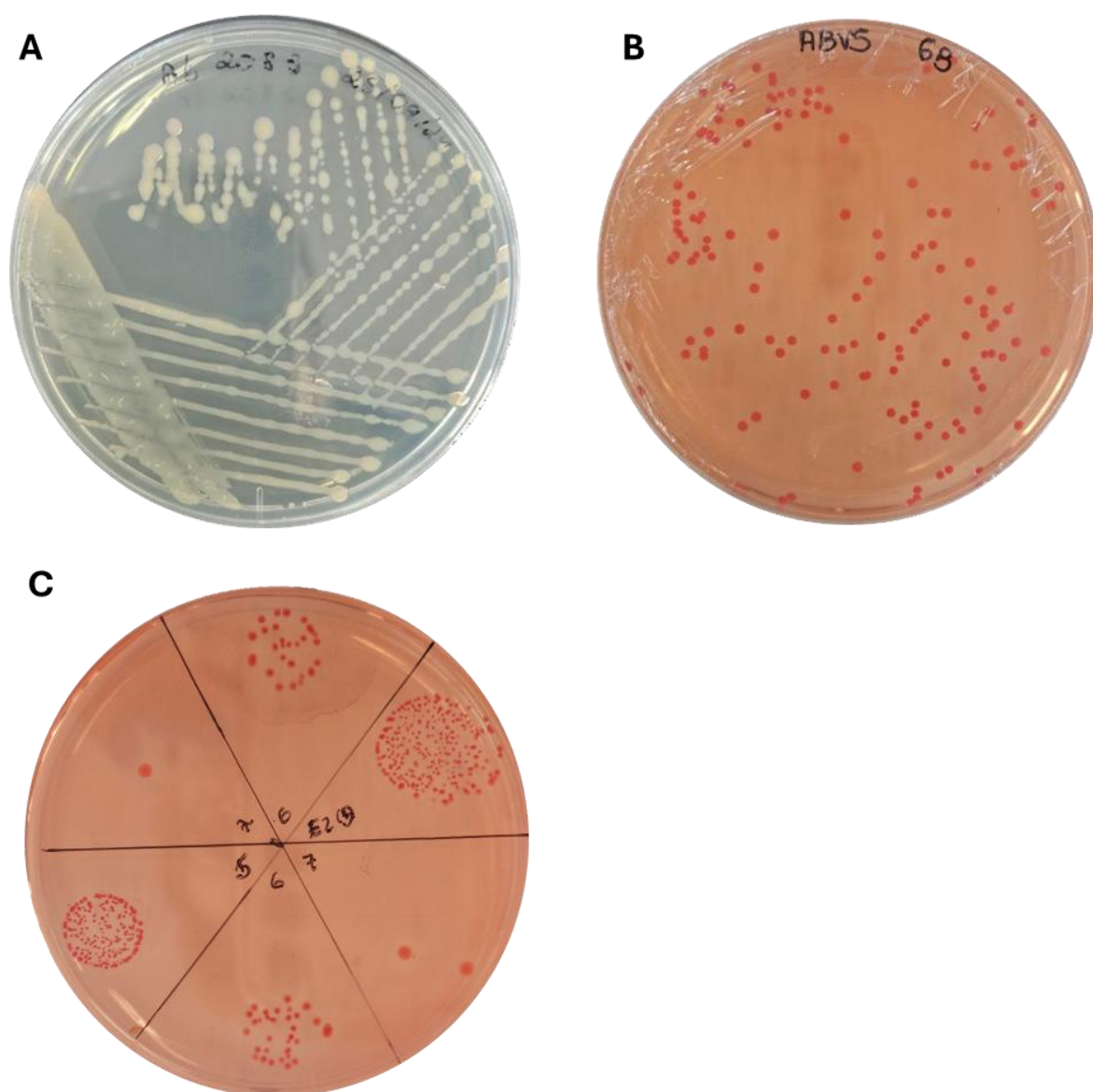
Composição meio RC (g/L)

- Ácido málico: 5
- Fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4): 0,5
- Sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$): 0,2
- Cloreto de sódio (NaCl): 0,1
- Extrato de levedura: 0,5
- Cloreto férrico hexahidratado ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$): 0,015
- Hidróxido de potássio (KOH): 4,8
- Solução de vermelho congo (0,25 % m/v): 15 mL

O pH é ajustado para 6,9 – 7,0 com solução de hidróxido de sódio 3M.

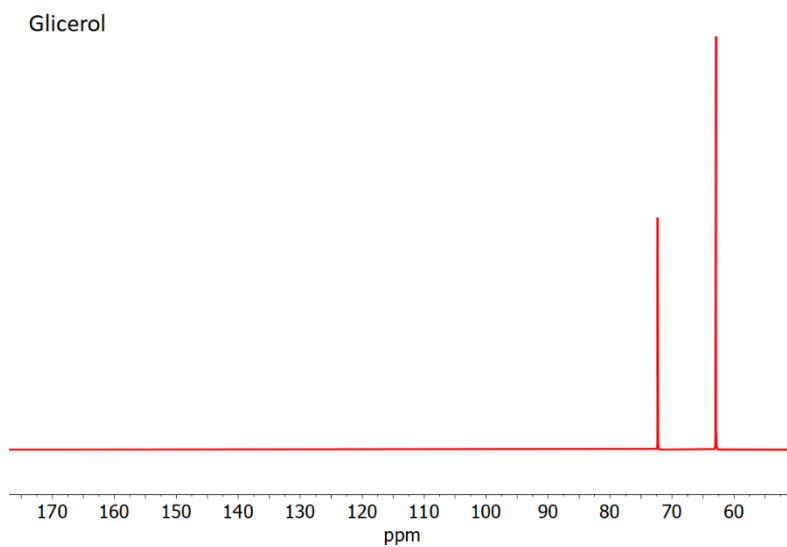
*Para meios sólidos adiciona-se ágar numa proporção de 15 g / L

Apêndice 2



FIGURAA2.1 - Placa contendo estriamento de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 em meio DYGS (A) e colônias de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 em meio RC plaqueadas pelo método de espalhamento (B) e pelo método da gota (C).

Apêndice 3



FIGURAA3.1 - Espectro de RMN de ^{13}C do glicerol em DMSO deuterado

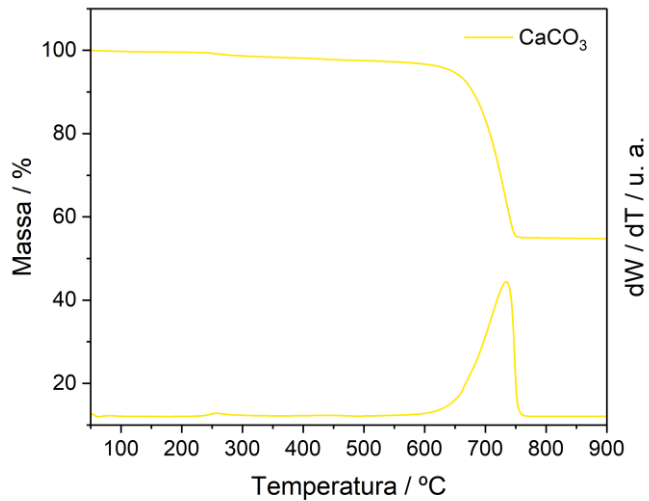
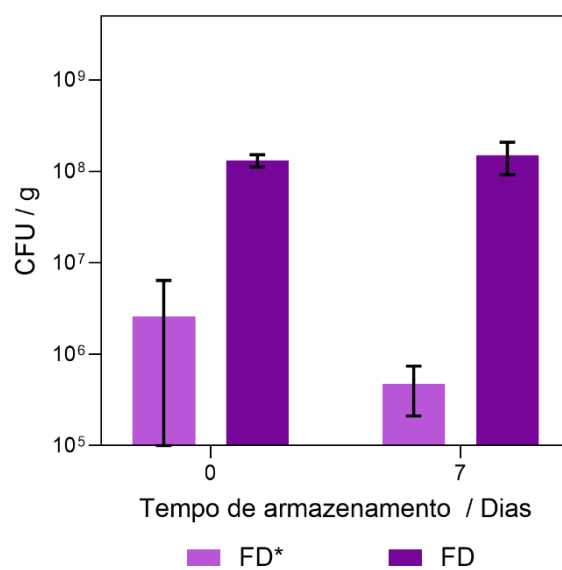


FIGURA A3.2 - Curvas de termogravimetria (TGA) e sua primeira derivada (DTG) de carbonato de cálcio.



FIGURAA3.3 - Viabilidade de *A. brasilense* em partículas obtidas por liofilização sem osmoprotetor (FD*) e com adição de trealose (FD). O inoculante sólido foi armazenado a 4 °C por 7 dias.