

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIAS E
MATERIAIS AVANÇADOS

LETÍCIA RODRIGUES CUEBAS HERNANDES

**MICROPARTÍCULAS ANTIFÚNGICAS DE ALGINATO DE
CÁLCIO CONTENDO *Bacillus amyloliquefaciens* PARA O
CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS**

Santo André, SP

2021

LETÍCIA RODRIGUES CUEBAS HERNANDES

MICROPARTÍCULAS ANTIFÚNGICAS DE ALGINATO DE
CÁLCIO CONTENDO *Bacillus amyloliquefaciens* PARA O
CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Nanociências e
Materiais Avançados da Universidade
Federal do ABC como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre Nanociências e
Materiais Avançados.

Orientador: Prof. Dr. Derval dos Santos Rosa

Santo André, SP

2021

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do ABC
Elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFABC
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Rodrigues Cuebas Hernandez, Leticia
Micropartículas antifúngicas de alginato de cálcio
contendo *Bacillus amyloliquefaciens* para o controle
biológico de fitopatógenos / Leticia Rodrigues Cuebas
Hernandes. — 2021.

134 fls. : il.

Orientador: Derval dos Santos Rosa

Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do ABC,
Programa de Pós-Graduação em Nanociências e Materiais
Avançados, Santo André, 2021.

1. microencapsulação. 2. controle biológico. 3. alginato.
4. micropartículas. 5. planejamento de experimentos. I. dos
Santos Rosa, Derval. II. Programa de Pós-Graduação em
Nanociências e Materiais Avançados, 2021. III. Título.

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, de acordo com as observações levantadas pela banca no dia da defesa, sob responsabilidade única do(a) autor(a) e com a anuência do(a) orientador(a).

Santo André



5

de

Novembro

de

2021

Assinatura do(a) autor(a):

Leticia Cuelar

Assinatura do(a) orientador(a):

Amalia da Rosa



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Fundação Universidade Federal do ABC

Avenida dos Estados, 5001 – Bairro Santa Terezinha – Santo André – SP
CEP 09210-580 · Fone: (11) 4996-0017

FOLHA DE ASSINATURAS

Assinaturas dos membros da Banca Examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato, LETÍCIA RODRIGUES CUEBAS HERNANDES realizada em 07 de Outubro de 2021:

Prof.(a) EDUARDO ROBERTO DE ALMEIDA BERNARDO
- Membro Titular

Prof.(a) JULIANA MARCHI
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC - Membro Titular

Prof.(a) AMEDEA BAROZZI SEABRA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC - Membro Suplente

Prof.(a) JEVERSON TEODORO ARANTES JUNIOR
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC - Membro Suplente

Prof.(a) SONIA MARIA MALMONGE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC - Membro Suplente

Prof.(a) DERVAL DOS SANTOS ROSA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ABC - Presidente

* Por ausência do membro titular, foi substituído pelo membro suplente descrito acima: nome completo, instituição e assinatura

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

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação é fruto do esforço e dedicação de muitas pessoas, sem as quais esta não seria possível.

Agradeço a Deus, por ter me concedido o misterioso presente da vida.

Agradeço a meus pais, por todo amor dedicado a mim.

A minha irmã, Thais, por não deixar que eu esqueça quem sou.

A toda a minha família, por todos os momentos que vivenciamos juntos.

Agradeço também ao meu orientador, Prof. Derval, por embarcar na jornada de fazer um projeto de cooperação Universidade-Empresa, pelos ensinamentos, incentivos nos momentos de insegurança e pelo ombro amigo.

Agradeço ao Eduardo Bernardo, Diretor de Inovação da Agrivalle, pela confiança a mim dispendida em palavras e por meio da concessão da minha bolsa de estudos para a realização deste trabalho. Ao Iron e a Isabella, por todo suporte durante esse período.

Agradeço aos colegas da Acil-Weber, Luciana e Adriano, pelas análises de tamanho de partícula.

Aos meus amigos de pesquisa, que com sua alegria e companheirismo tornaram esse período leve e digno de saudade: Rafaela, Leonardo, Marina, Sueli, Alana, Rennan, Paulo, Daniel, Éder, Jéssica, Lucas, Giovanni, Maurício, Nathan e Greicy.

E por fim, agradeço aos professores, técnicos de laboratório e todos os funcionários da UFABC, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

*Grandes são as obras do SENHOR,
Dignas de estudo para quem as ama.*

Salmos 111.2

RESUMO

Junto ao grande desenvolvimento da agricultura, a necessidade da utilização de agentes de controle de fitopatógenos de plantas tornou-se essencial para atingir altas produções de alimentos demandadas pelo rápido crescimento populacional mundial do último século. Dentre as muitas tecnologias utilizadas para a redução dos problemas fitossanitários, as micropartículas contendo agentes de controle microbiológico destacam-se por ser uma alternativa ao controle químico. Dito isto, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de micropartículas de alginato de cálcio adequadas para a pulverização (menores que 150 μm) e que contenham a bactéria *Bacillus amyloliquefaciens*. Dois planejamentos experimentais foram realizados a fim de estudar a relação de duas etapas do processo de emulsificação e otimizar o tamanho das partículas. Após escolha das formulações F1, F2, F3 e F4, o microrganismo escolhido foi microencapsulado nas mesmas. O processo de microencapsulação apresentou contagens de células viáveis finais coerentes com valores de produtos comerciais e a eficiência de encapsulação foi superior a 90% para todas as amostras. A avaliação morfológica mostrou que as micropartículas produzidas podem ser microcápsulas ou microesferas, e que os microrganismos ficam localizados na parte interna das partículas. O comportamento de liberação das amostras foi semelhante e apresentou o efeito “Burst” nas primeiras horas de liberação. A viabilidade dos microrganismos nas micropartículas foi avaliada por um período de 30 dias resultando de uma perda média de 18%. O teste de proteção UV mostrou que as micropartículas foram eficientes quanto proteção à radiação UVB por 60 minutos, resultando em concentrações finais maiores que o branco. No entanto, para a radiação UVC o resultado foi inferior ao branco. Por último, as formulações F2 e F4 foram eficientes no controle dos fitopatógenos inibindo completamente seu crescimento nas placas.

Palavras-chave: micropartículas de alginato, emulsificação, planejamento de experimentos, otimização de processo, agente de controle microbiológico.

ABSTRACT

Along with the great agriculture development, using disease control agents in plants has become essential to increase crop yield production demanded by the last century's fast-growing human population. Among the many technologies used for pest control, microcapsules containing microbiological control agents. This work aimed to develop sprayable calcium alginate microparticles (smaller than 150 μm) and containing *Bacillus amyloliquefaciens*. Two experimental designs were carried out to study the two-step relationship of the emulsification process and to optimize the particle size. After choosing the F1, F2, F3 and F4 formulations, the chosen microorganism was microencapsulated in them. The microencapsulation process showed final viable cell counts consistent with commercial product values and the encapsulation efficiency was greater than 90% for all samples. The morphological evaluation showed that the microparticles produced can be microcapsules or microspheres, and that the microorganisms are located inside the particles. The release behavior of the samples was similar and showed the Burst effect in the first hours of release. The viability of microorganisms in the microparticles was evaluated for a period of 30 days resulting in an average loss of 18%. The UV protection test showed that microparticles were effective in protecting against UVB radiation for 60 minutes, resulting in higher final concentrations than blank. However, for UVC radiation the result was inferior to the blank. Finally, the F2 and F4 formulations were efficient in controlling the phytopathogens, completely inhibiting their growth in the plates.

Keywords: alginate microparticles, emulsification method, design of experiments, microbial pest control.

Lista de abreviaturas e siglas

| | |
|---------|-------------------------------------------------------------|
| ADN | Ácido Desoxirribonucleico |
| AGROFIT | Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários |
| AMC | Agente Microbiológico de Controle |
| ANOVA | Análise de Variância |
| ARN | Ácido Ribonucleico |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| ATR | Refletância Total Atenuada |
| BBD | <i>Box-Behnken Design</i> |
| BHI | <i>Brain Heart Infusion</i> |
| BOD | <i>Biochemical Oxygen Demand</i> |
| CCD | <i>Central Composite Design</i> |
| CNPEM | Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais |
| DO | Densidade Óptica |
| DOE | <i>Design Of Experiments</i> |
| DTG | Termogravimetria Derivada |
| EDTA | Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético |
| EE | Eficiência de encapsulação |
| EMBRAPA | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FD | Fator de diluição |
| FS | Suspensão Concentrada para Tratamento de Sementes |
| G | ácido α -L-gulurônico |
| HLB | Balanço Hidrofílico-Lipofílico |
| ISO | <i>International Organization for Standardization</i> |
| FTIR | Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier |
| Ltd. | <i>Limited</i> |
| Ltda. | Limitada |
| M | ácido β -D-manurônico |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| NP | Nanopartícula |

| | |
|--------|---------------------------------------------|
| OGM | Organismo Geneticamente Modificado |
| OFAT | <i>One Factor at a Time</i> |
| OVAT | <i>One Variable at Time</i> |
| PLA | Poli(ácido láctico) |
| PCL | Policaprolactona |
| PEIO | Planejamento Experimental I-Ótimo |
| PEFC | Planejamento Experimental Fatorial Completo |
| PLGA | Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) |
| PVY | <i>Potato virus Y</i> |
| S.A. | Sociedade Anônima |
| SC | Suspensão Concentrada |
| SP20 | Span™ 20 |
| SP80 | Span™ 80 |
| SPTW20 | Span™-Tween™ 20 |
| SPTW80 | Span™-Tween™ 80 |
| RSM | Metodologia de Superfície de Resposta |
| TGA | Análise Termogravimétrica |
| TSB | <i>Tryptic Soy Broth</i> |
| TSWV | <i>Tomato spotted wilt virus</i> |
| TW20 | Tween™ 20 |
| TW80 | Tween™ 80 |
| UFC | Unidade Formadora de Colônia |
| UV-Vis | Ultravioleta-Visível |
| WG | Grânulos Dispersíveis em Água |
| WP | Pó Molhável |

Lista de símbolos

| | |
|--------------------------|-----------------------------------------------------|
| Al^{3+} | cátion trivalente de Alumínio |
| Ba^{2+} | cátion bivalente de Bário |
| $^{\circ}\text{C}$ | grau Celsius |
| Ca^{2+} | cátion bivalente de Cálcio |
| CaCO_3 | Carbonato de Cálcio |
| CaCl_2 | Cloreto de Cálcio |
| cm^{-1} | inverso de centímetro |
| cm^2 | centímetro quadrado |
| cm^3 | centímetro cúbico |
| Da | dalton |
| D_{90} | tamanho de partícula referente a 90% das partículas |
| DO_{600} | Densidade Óptica a 600 nanômetros |
| Fe^{3+} | cátion trivalente Ferro |
| FeSO_4 | Sulfato de Ferro (II) |
| g | grama |
| H_2O | água |
| K | Potássio |
| kg | quilograma |
| K_2HPO_4 | Fosfato dipotássico |
| L | Litro |
| M | Massa molar |
| MgCl_2 | Cloreto de Magnésio |
| min | minuto |
| mL | mililitro |
| mm | milímetro |
| MnSO_4 | sulfato de manganês |
| N | Nitrogênio |
| NaCl | Cloreto de Sódio |
| nm | nanômetro |

| | |
|------------------|-------------------------------|
| P | Fósforo |
| pH | potencial hidrogeniônico |
| R ² | Coeficiente de determinação |
| rpm | rotações por minuto |
| Sr ²⁺ | cátion bivalente de Estrôncio |
| TiO ₂ | Dióxido de Titânio |
| μm | micrômetro |

SUMÁRIO

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 22 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 24 |
| 2.1 Microencapsulação | 24 |
| 2.1.1 Alginato..... | 28 |
| 2.1.2 Microencapsulação pelo método de emulsificação..... | 31 |
| 2.2 Controle biológico | 33 |
| 2.2.1 Controle microbiológico | 34 |
| 2.2.2 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | 35 |
| 2.2.3 Microencapsulação de microrganismos na agricultura | 39 |
| 2.3 Estado da arte..... | 43 |
| 2.4 Planejamento de experimentos..... | 46 |
| 2.4.1 Metodologia de Superfície de Resposta (RSM)..... | 49 |
| 2.4.2 Planejamento Ótimo-I (<i>I-Optimal Design</i>) | 49 |
| 3. OBJETIVOS..... | 53 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 54 |
| 4.1 Materiais | 54 |
| 4.2 Obtenção das micropartículas pelo método de microencapsulação por emulsificação | 54 |
| 4.3 Planejamento de experimentos..... | 55 |
| 4.3.1 Otimização do processo de microencapsulação por emulsificação | 55 |
| 4.3.2 Estudo das emulsões no processo de microencapsulação | 56 |
| 4.4 Caracterizações físico-químicas das micropartículas | 57 |
| 4.4.1 Determinação da viscosidade das soluções de alginato de sódio | 57 |
| 4.4.2 Determinação da densidade das micropartículas | 57 |
| 4.4.3 Análise de distribuição de tamanho de partícula | 57 |
| 4.4.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) | 58 |
| 4.4.5 Análise termogravimétrica (TGA)..... | 58 |
| 4.5 Microencapsulação do microrganismo..... | 58 |
| 4.5.1 Manutenção e cultivo da cultura | 58 |
| 4.5.2 Curva de crescimento celular | 59 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.5.3 Contagem de células viáveis | 59 |
| 4.5.4 Processo de microencapsulação dos microrganismos | 60 |
| 4.5.5 Contagem de células viáveis nas micropartículas | 62 |
| 4.5.6 Eficiência de encapsulação | 63 |
| 4.5.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) | 63 |
| 4.5.8 Liberação sustentada de <i>B. amyloliquefaciens</i> encapsulado <i>in vitro</i> | 64 |
| 4.5.9 Estabilidade das micropartículas contendo <i>B. amyloliquefaciens</i> | 64 |
| 4.5.10 Proteção ultravioleta das micropartículas contendo <i>B. amyloliquefaciens</i> | 64 |
| 4.5.11 Avaliação do antagonismo das micropartículas contendo <i>B. amyloliquefaciens</i> | 65 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 65 |
| 5.1 Planejamento de experimentos | 66 |
| 5.1.1 Estudo das emulsões no processo de microencapsulação | 66 |
| 5.1.2 Estudo da otimização do processo de microencapsulação | 72 |
| 5.2 Caracterização físico-química das micropartículas | 80 |
| 5.2.1 Determinação da viscosidade das soluções de alginato | 80 |
| 5.2.2 Determinação da densidade aparente | 82 |
| 5.2.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier | 83 |
| 5.2.4 Análise termogravimétrica | 85 |
| 5.2.5 Análise morfológica | 87 |
| 5.3 Estudo das micropartículas contendo <i>B. amyloliquefaciens</i> | 88 |
| 5.3.1 Curva de crescimento celular | 88 |
| 5.3.2 Contagem de células viáveis nas micropartículas | 90 |
| 5.3.3 Eficiência de encapsulação | 92 |
| 5.3.4 Análise morfológica das micropartículas contendo <i>B. amyloliquefaciens</i> .. | 94 |
| 5.3.5 Liberação sustentada <i>in vitro</i> | 95 |
| 5.3.6 Estabilidade das micropartículas contendo <i>B. amyloliquefaciens</i> | 97 |
| 5.3.7 Proteção UV | 98 |
| 5.3.8 Antagonismo | 100 |
| 6. CONCLUSÕES | 103 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 106 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| ANEXOS | 129 |
| ANEXO A – Planejamento de experimentos para otimização do tamanho de partícula das micropartículas | 129 |
| ANEXO B – Planejamento de experimentos para estudo das emulsões precursoras das micropartículas | 133 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Ilustração esquemática dos dois tipos básicos de micropartículas: a) microcápsula: material de interesse centralizado na micropartícula e material de parede recobrindo-o, e b) microesfera: material de interesse disperso na matriz composta pelo material de parede. ... | 25 |
| Figura 2 – Estrutura e conformação em cadeia dos ácidos a) β -D-manurônico (M) e b) α -L-gulurônico (G), e os três possíveis tipos de ligação entre eles, e suas respectivas ligações glicosídicas: c) MM por β -1,4, d) GG por α -1,4 e e) MG por β -1,4 | 29 |
| Figura 3 – Ilustração da interação do alginato com o íon cálcio sugerida pelo modelo <i>Egg-box</i> | 30 |
| Figura 4 – Ilustração esquemática da microencapsulação pelo método de emulsificação, e estruturas propostas, separada pelas etapas de a) preparação da emulsão e b) formação das micropartículas. | 33 |
| Figura 5 – Evolução do número de trabalhos acadêmicos e tecnológicos (artigos e patentes) publicados sobre encapsulação de agentes microbiológicos de controle desde 1983 até 2020 extraídos das bases <i>Web of Science Core Collection</i> e <i>Derwent Innovations Index</i> | 42 |
| Figura 6 – Tipos de metodologias para abordagem de estudo de sistemas experimentais: a) metodologia “Uma Variável Por Vez” onde é mostrado a variação da variável X quando Y é constante, e da variável Y quando X é constante; b) metodologia de Planejamento de Experimentos ou Design of Experiments, onde os experimentos são realizados em pontos planejados estatisticamente. O gradiente de cores representa a resposta de cada experimento, sendo a cor vermelha a melhor resposta e a cor azul a pior resposta. | 47 |
| Figura 7 – Planejamento de experimentos fatorial 2^3 : a) tabela com a matriz gerada pelas variáveis X, Y e Z variando-se o nível em -1 e +1 e d) representação esquemática da matriz em cubo onde cada vértice é um experimento planejado. | 48 |
| Figura 8 – Representação esquemática dos experimentos gerados pelo planejamento experimental fatorial 2^2 em um quadrado onde cada vértice é um experimento do planejamento. | 51 |
| Figura 9 – Ilustração esquemática do processo de contagem de células viáveis. | 60 |
| Figura 10 – Ilustração esquemática das etapas do processo de microencapsulação por emulsificação do microrganismo <i>B. amyloquefaciens</i> | 61 |
| Figura 11 – Foto do reator utilizado para a microencapsulação do microrganismo <i>B. amyloliquefaciens</i> pelo método de emulsificação..... | 62 |
| Figura 12 – Esquematização do ensaio de antagonismo. | 65 |
| Figura 13 – Gráficos de superfície de contorno mostrando o efeito dos parâmetros (velocidade de agitação e concentração de alginato) no diâmetro das gotas: a) 1% SP20, b) 3% SP20, c) 5% SP20, d) 1% TW20, e) 3% TW20, f) 5% TW20, g) 1% SPTW20, h) 3% SPTW20 e i) 5% SPTW20. | 70 |
| Figura 14 – Gráficos de superfície de contorno mostrando o efeito dos parâmetros (velocidade de agitação e concentração de alginato) no diâmetro das gotas: a) 1% SP80, b) 3% SP80, c) 5% SP80, d) 1% TW80, e) 3% TW80, f) 5% TW80, g) 1% SPTW80, h) 3% SPTW80 e i) 5% SPTW80. | 71 |
| Figura 15 – Foto mostrando a aparência a olho nu das micropartículas decantadas em uma solução de cloreto de sódio. | 73 |
| Figura 16 – Gráficos de contorno mostrando o efeito da concentração de alginato (A) e velocidade de agitação (C) sobre diâmetro das micropartículas separadas pelo tipo de surfactante (D) e sua concentração (B): a) 1% SP20, b) 3% SP20, c) 5% SP20, d) 1% TW20, e) 3% TW20, f) 5% TW20, g) 1% 1: 1 SPTW20, h) 3% 1: 1 SPTW20, i) 5% 1: 1 SPTW20. . | 75 |
| Figura 17 – Gráficos de superfície de contorno mostrando o efeito da concentração de alginato (A) e da velocidade de agitação (C) no diâmetro das micropartículas separados pelo | |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| tipo de surfactante (D) e sua concentração (B): a) 1% SP80, b) 3% SP80, c) 5% SP80, d) 1% TW80, e) 3% TW80, f) 5% TW80, g) 1% 1: 1 SPTW80, h) 3% 1: 1 SPTW80, i) 5% 1: 1 SPTW80. | 77 |
| Figura 18 – Gráfico de perturbação mostrando os efeitos dos fatores no diâmetro das micropartículas separados por tipo de surfactante: a) SP20, b) TW20, c) SPTW20, d) SP80, e) TW80 e f) SPTW80..... | 78 |
| Figura 19 – Fotografias das soluções de a) 2,0%, b) 3,5% e c) 5,0% m/v de alginato de sódio. | 80 |
| Figura 20 – Viscosidade dinâmica (cP) das soluções de 2,0%, 3,5% e 5,0% de alginato de sódio a 25°C. | 81 |
| Figura 21 – Espectro de infravermelho de uma amostra de alginato de sódio e das amostras F1 e F3. | 84 |
| Figura 22 – Análise termogravimétrica e análise térmica diferencial das amostras de alginato de sódio e alginato de cálcio. | 86 |
| Figura 23 – Microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de alginato com a) aspecto superficial liso e b) rugoso, bem como imagens da estrutura interna de c) uma microcápsula e d) uma microesfera. | 87 |
| Figura 24 – Curva de crescimento celular da bactéria <i>B. amyloliquefaciens</i> em meio Caldo Nutriente em função da densidade óptica (600 nm) ao longo de 3600 minutos de incubação a 37°C. Os pontos cheios representam pontos medidos e os pontos vazios representam pontos estimados. | 89 |
| Figura 25 – Placas de Petri após diluição seriada das formulações de micropartículas de alginato contendo <i>B. amyloliquefaciens</i> | 90 |
| Figura 26 – Microscopia eletrônica de varredura de micropartículas de alginato contendo <i>B. amyloliquefaciens</i> e ampliação. As setas brancas indicam a localização de duas bactérias da espécie. | 94 |
| Figura 27 – Curva da liberação sustentada do microrganismo <i>B. amyloliquefaciens</i> das amostras F1, F2, F3 e F4..... | 95 |
| Figura 28 – Ilustração esquemática e descrição matemática do Efeito “Burst”..... | 96 |
| Figura 29 – Viabilidade do microrganismo (%) <i>B. amyloliquefaciens</i> nas amostras F1, F2, F3 e F4 armazenadas a 25°C ao longo de 30 dias. | 97 |
| Figura 30 – Concentração (UFC/g) do microrganismo <i>B. amyloliquefaciens</i> nas amostras F1, F2, F3 e F4 armazenadas a 25°C ao longo de 30 dias. | 99 |
| Figura 31 – Fotografias das placas de Petri contendo os fungos a) <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e b) <i>Rhizoctonia solani</i> | 101 |
| Figura 32 – Fotografias dos ensaios de antagonismo contra os fitopatógenos <i>Rhizoctonia solani</i> : a) F2, b) F4, e <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> : c) F2, d) F4. Os controles positivos são e) F2 e f) F4. | 102 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Quadro 1 – Produtos biológicos a base de <i>B. amyloliquefaciens</i> registrados no Brasil e seus respectivos titulares do registro. | 36 |
| Quadro 2 – Metabólitos secundários produzidos por <i>B. amyloliquefaciens</i> | 38 |
| Quadro 3 – Exemplos de estudos mais recentes (2016-2021) sobre microencapsulação de agentes microbiológicos de controle. | 43 |
| Quadro 4 – Parâmetros de processo avaliados na otimização da microencapsulação por emulsificação utilizando planejamento de experimentos fatorial 3 ² | 56 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – Tamanho de gota médio e desvio padrão obtidos por análise de microscopia óptica, onde foi considerado o D_{90} | 66 |
| Tabela 2 – ANOVA para o modelo proposto pelo <i>software Design-Expert</i> da influência de 4 parâmetros sob o tamanho de partícula na fase de emulsificação..... | 67 |
| Tabela 3 – Valores das equações do modelo produzido associados a cada parâmetro (A, B, C e interações) separados por tipo de surfactante. | 69 |
| Tabela 4 – Resultados de ANOVA para o diâmetro das micropartículas obtidos a partir de experimentos RSM. | 73 |
| Tabela 5 – Equação modelo para o diâmetro das micropartículas para cada surfactante em termos de variáveis numéricas, A, B e C. | 74 |
| Tabela 6 – Faixa de tamanho do diâmetro das micropartículas para cada variável, mostrando os tamanhos máximo e mínimo das partículas e a variável mais significativa para cada tipo de surfactante | 79 |
| Tabela 7 – Formulações escolhidas do planejamento experimental realizado para a microencapsulação da bactéria <i>B. amyloliquefaciens</i> | 82 |
| Tabela 8 – Densidade aparente das micropartículas de alginato de cálcio obtidas.. | 83 |
| Tabela 9 – Concentração em UFC/ de <i>B. amyloliquefaciens</i> em 4 formulações de micropartículas de alginato de cálcio produzidas pelo método de emulsificação..... | 91 |
| Tabela 10 – Concentração em UFC/g e eficiência de encapsulação (%) de <i>B. amyloliquefaciens</i> em micropartículas de alginato produzidas pelo método de emulsificação..... | 92 |

1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da população global nas últimas décadas, a produção de alimentos tornou-se uma preocupação global que pode afetar diretamente a qualidade de vida das pessoas e do meio ambiente (ALCANTARA, 2020). A agricultura é uma atividade praticada pela humanidade há mais de dez mil anos, mas seu uso intensivo iniciou-se na década de 1960, em um fenômeno conhecido por Revolução Verde. Nesta época, houve um salto de produtividade que trouxe um grande desenvolvimento tecnológico para a agricultura, migrando a atividade de subsistência para uma agricultura industrializada, que se utiliza de tecnologias como melhoramento genético, máquinas e equipamentos, fertilizantes e defensivos agrícolas (SALOMÃO; FERRO; RUAS, 2019).

Junto ao grande desenvolvimento das técnicas agrícolas, também vieram os efeitos negativos provenientes do seu uso excessivo, como perda da estrutura dos solos por compactação ou erosão, desperdício de água, contaminação de lençóis freáticos com defensivos agrícolas, seleção de espécies resistentes, entre outros (OGINO, 2018). Dentre as muitas tecnologias utilizadas para aumentar e otimizar a produção agrícola, destacam-se os defensivos, também chamados de agrotóxicos, pesticidas ou agentes de controle químico

A utilização de defensivos tornou-se motivo de preocupação global devido a toxicidade dessas substâncias, que apesar de trazerem uma contribuição positiva para o controle de fitopatógenos e pragas, podem ter efeitos adversos à saúde humana. Na revisão feita por Kass e colaboradores (2020), por exemplo, é mostrado que o uso de 7 defensivos (dentre eles os fungicidas vinclozolin e hexaclorobenzeno) está associado a proliferação celular desenfreada, expressão e sinalização do receptor de esteroides, aumento da transformação celular maligna e desenvolvimento do tumor e angiogênese. Mais recentemente, Kwon *et al.* (2021) mostraram que o fungicida flutriafol pode estar relacionado a doenças no fígado. Além dos exemplos citados, muitas outras pesquisas mostraram alguma relação entre o uso de agrotóxicos e a exposição humana a estas substâncias. Devido a isso, agências reguladoras do mundo inteiro estão reavaliando a liberação de muitos produtos, como o é caso dos herbicidas paraquate e glifosato, e do fungicida clorotalonil (CARRINGTON, 2019; HAKIM, 2016; TROMPIZ; DE LA HAMAIDE, 2019).

Em alternativa aos métodos tradicionais de controle de pragas, o controle biológico surgiu como uma solução viável e eficaz, por ser considerado seguro para a saúde humana e o meio ambiente (HEYDARI; PESSARAKLI, 2010). Este método de controle baseia-se no conceito ecológico de relações interespecíficas desarmônicas, onde uma espécie pode interagir de forma negativa em relação a outra, seja pelo parasitismo, amensalismo ou até mesmo predação, agindo como inimigas naturais para as pragas e fitopatógenos agrícolas. O uso de agentes biológicos de controle tem como vantagens não deixar resíduos nos alimentos, ser inofensivos ao meio ambiente e à saúde humana, bem como oferecem especificidade ao alvo. Esse controle pode ser realizado por organismos invertebrados, principalmente insetos, ácaros e nematoides, ou microrganismos antagonistas a doenças de plantas causadas por vírus, fungos, bactérias, nematoides e protozoários (LE HESRAN *et al.*, 2019). Em específico, a aplicação de microrganismos como vírus, bactérias e fungos, como agentes de biocontrole tem se tornado mais relevante por compartilharem semelhanças com as formulações químicas. Esses organismos, na forma pura ou em um produto formulado, são normalmente conhecidos como agentes microbiológicos de controle (AMC) (HALFELD-VIEIRA *et al.*, 2016).

Os microrganismos começaram a ser investigados como potenciais fontes de controle de patógenos a partir de 1923 com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming. As primeiras tentativas quanto à aplicação de microrganismos em substituição aos agentes de controle químico são atribuídas as investigações de Carl Hartley (1921), que estudou a utilização de fungos saprofíticos (que se alimentam de matéria orgânica em decomposição) na supressão ao tombamento de mudas de pinheiro (*Pinus ssp.*) causada pelo fungo *Pythium debaryanum* (LAMICHHANE *et al.*, 2017). Desde então, o uso de microrganismos para o controle de doenças de plantas se desenvolveu como uma nova área no mercado global de controle fitossanitário, ocupando 10% deste mercado, com estimativa de alcançar o valor 11 bilhões até 2025 segundo relatório da consultoria DunhamTrimmer (MAPA, 2020). A bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* é um importante agente microbiológico utilizada no campo no controle de muitos patógenos, como os fungos estudados neste trabalho, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*, causadores das doenças conhecidas como mofo branco e podridão-radicular, mas também os microrganismos *Meloidogyne incognita*

(nematóide-das-galhas), *Pratylenchus brachyurus* (Nematóide das Lesões), *Colletotrichum lindemuthianum* (antracnose), entre outros.

Segundo Vemmer e Patel (2013), um dos grandes desafios na utilização comercial de formulações contendo microrganismos é o tempo de prateleira destes produtos e a sobrevivência dos microrganismos em campo. Usualmente, os AMCs podem ser preparados em formulações sólidas (pós ou grânulos) ou líquidas. Formulações líquidas, onde o inóculo fica suspenso em água ou óleo, não oferecem um tempo de prateleira tão longo quanto as formulações sólidas, mas são mais simples de preparar e aplicar (BASHAN *et al.*, 2014). As formulações sólidas costumam ser mais utilizadas na aplicação no solo e fornecem uma liberação mais controlada em relação as formulações líquidas. De maneira geral, formulações líquidas possuem tempo de prateleira de 3 a 6 meses (KOLOMBET *et al.*, 2008), e formulações sólidas de 6 a 12 meses (MACIAG *et al.*, 2020).

Uma das estratégias apontadas para o aumento da viabilidade de microrganismos adicionados ao meio ambiente é desenvolvimento de sistemas de proteção e liberação sustentada, utilizando-se de técnicas de microencapsulação (VEMMER; PATEL, 2013). A microencapsulação é uma técnica que permite a incorporação de um ativo sensível em uma partícula, preservando o material encapsulado ao meio externo, a fim de reduzir as interações com fatores ambientais. Alguns trabalhos já demonstraram que a microencapsulação pode aumentar o tempo de prateleira dos microrganismos, como no trabalho de Ma *et al.* (2015) que obteve uma sobrevivência de 87,53% para uma formulação contendo cápsulas e 47,06% para uma formulação em pó molhável após 540 dias de armazenamento da bactéria *Bacillus subtilis*. Dentre os muitos materiais utilizados para microencapsulação, os polímeros biodegradáveis têm se destacado por, assim como os AMCs, serem ambientalmente amigáveis e seguros para uso humano, contribuindo para uma formulação mais sustentável.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Microencapsulação

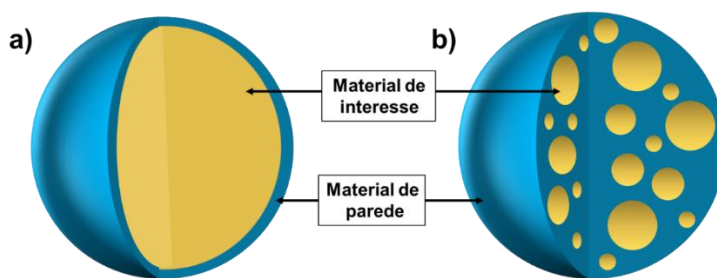
A microencapsulação pode ser definida como um processo físico-químico ou mecânico de incorporação de um agente ativo em um material apropriado, também

chamado de material de parede, a fim de produzir partículas que podem variar de milímetros a nanômetros (FRAKOLAKI *et al.*, 2020). É uma tecnologia que começou seu desenvolvimento nos Estados Unidos da América (EUA) há aproximadamente 150 anos com a primeira patente sobre a técnica de encapsulação por *spray-drying* como um meio de preservação de leite (PERCY, 1872; PIÑÓN-BALDERRAMA *et al.*, 2020). Desde então a técnica foi estendida para a incorporação de diversos ativos, tais como flavorizantes, medicamentos, enzimas, probióticos, vitaminas, entre outros.

Existem muitos objetivos para a microencapsulação, como a proteção de componentes sensíveis a fatores ambientais (água, oxigênio, luz), aumentar o tempo de validade, mascarar sabores e odores desagradáveis, prevenir o contato do ingrediente ativo com outras substâncias, assim como para melhorar formulações transformando líquidos em ingredientes sólidos, limitando o contato humano com uma substância tóxica ou organismo vivo, e incorporando atributos de liberação sustentada nas formulações (BAH; BILAL; WANG, 2020).

Em termos estruturais, as micropartículas podem ser divididas em dois grupos básicos a depender da maneira como o material encapsulado está distribuído no sistema. Em partículas conhecidas como microcápsulas, o material de interesse está concentrado no centro da micropartícula enquanto o material de parede está recobrindo-o. Outra possibilidade é de o material de interesse estar disperso em uma matriz formada pelo material encapsulante em uma estrutura chamada de microesfera (LENGYEL *et al.*, 2019). A figura 1 apresenta uma ilustração esquemática dessas duas estruturas.

Figura 1 – Ilustração esquemática dos dois tipos básicos de micropartículas: a) microcápsula: material de interesse centralizado na micropartícula e material de parede recobrindo-o, e b) microesfera: material de interesse disperso na matriz composta pelo material de parede.



Fonte: Elaborado pela autora.

O material da parede é a barreira entre o meio externo e o agente ativo, a sua função compreende a proteção do material do núcleo da umidade, luz, diminuição da exposição ao oxigênio, e também pode controlar a saída da substância ativa, característica essa chamada de liberação sustentada. Os mecanismos de liberação do material ativo encapsulado variam de acordo com a natureza do material encapsulante, sendo que normalmente ocorrem por: variação de temperatura e de pH, mudança da solubilidade do meio, biodegradação do material de parede, difusão, ruptura mecânica, permeabilidade seletiva da parede, e gradiente de concentração (FEKI *et al.*, 2020).

Uma grande variedade de materiais de parede tem sido utilizada para a microencapsulação. A escolha do material depende de muitos fatores como o método de microencapsulação escolhido, a compatibilidade com o agente ativo e a finalidade das micropartículas. Para a Medicina, por exemplo, o material de parede está finamente associado ao caminho por onde a partícula irá percorrer até chegar ao ponto alvo que o ingrediente ativo precisa ter ação. Microcápsulas contendo probióticos necessitam ser resistentes ao suco gástrico do estômago e oferecer proteção aos microrganismos até que as partículas cheguem ao trato intestinal (THANGRONGTHONG *et al.*, 2020). Em situações como a prescrição dos fármacos enalapril e saxagliptina, utilizados para o tratamento de hipertensão e diabetes, respectivamente, a microencapsulação em lipoesferas de cera de carnaúba diminuem ou até mesmo anulam os efeitos colaterais como náusea, vômito, diarreia, e dor no estômago (MAHEEN *et al.*, 2020).

Na agricultura, a microencapsulação tem sido utilizada em diversos propósitos. No trabalho de Cesari *et al.* (2020) microcápsulas de policaprolactona (PCL) contendo ácido cítrico e naringina foram empregadas como potencializadoras da interação entre rizobactérias e a rizosfera das plantas. Os autores justificam seu trabalho na necessidade do estabelecimento da simbiose entre as rizobactérias promotoras de crescimento e as raízes, dado que o ácido cítrico foi reportado como um dos agentes químicos-atratores para rizobactérias e como solubilizador de fósforo inorgânico, e o flavonoide naringina como indutor de genes que promovem o aparecimento de nódulos.

Muitos trabalhos exploraram a encapsulação de pesticidas. Huang *et al.* (2020) propuseram a utilização de microcápsulas feitas de cera de abelha para a liberação

sustentada do inseticida tiametoxam utilizado no controle de amplo espectro de insetos. Suraphan *et al.* (2020) empregaram o poli(ácido láctico) (PLA) na microencapsulação avermectina e cloranthraniliprol no controle de uma espécie de traça (*Plutella xylostella*). Nanofibrilas de celulose foram utilizadas no trabalho de Xiao *et al.* (2021) como material de parede para a produção de micropartículas carregadas de clorpirifós, um agroquímico organofosforado usado na agricultura para controlar principalmente insetos das ordens Coleoptera, Diptera, Homoptera e Lepidoptera. Apesar destes estudos irem de encontro com a atual demanda por soluções mais amigáveis ao meio ambiente para o controle de pragas, a existência deles ainda é justificada pelos autores pelo fato de estarem propondo sistemas que necessitam de um número de aplicações reduzido e terem um tempo de liberação mais prolongado.

Como uma alternativa ao controle de pragas por pesticidas, alguns trabalhos propuseram a microencapsulação de agentes microbiológicos. No trabalho desenvolvido por Qiu *et al.* (2019) conídios de *Metarhizium anisopliae*, um fungo utilizado no controle de insetos, foi encapsulado em uma matriz de gelatina e goma arábica. Lopes *et al.* (2020) exploraram a microencapsulação do fungo *Trichoderma asperellum* em micropartículas de alginato de cálcio como uma alternativa para aumentar a viabilidade das células. O sistema apresentado por Joshi *et al.* (2020) propôs um sistema híbrido que simultaneamente contivesse a bactéria *Bacillus thuringiensis*, utilizada como biopesticida, e o fertilizante NPK (nitrogênio, fósforo e potássio) em micropartículas de alginato.

Existem muitos materiais formadores de paredes ou matrizes que podem ser usados na microencapsulação de ativos. No entanto, apenas um número limitado é adequado para aplicações em alimentos, medicamentos, cosméticos e de maneira mais geral, somente poucos materiais são permitidos quando o uso depende de biocompatibilidade com o corpo humano ou com células de outras espécies (MISHRA, 2015). Dentre os materiais permitidos, os polímeros se destacam. Os polímeros sintéticos PLA, poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), e PCL tem sido utilizados na microencapsulação de medicamentos, cosméticos e corantes (ASTUTI; RAHMA; BUDIANTO, 2020; NANDY *et al.*, 2020; VATANKHAH; HAMED; RAMEZANI, 2020). No entanto, uma das principais desvantagens no uso destes polímeros é a necessidade de solubilização em solventes que são tóxicos para células vivas, como diclorometano e clorofórmio.

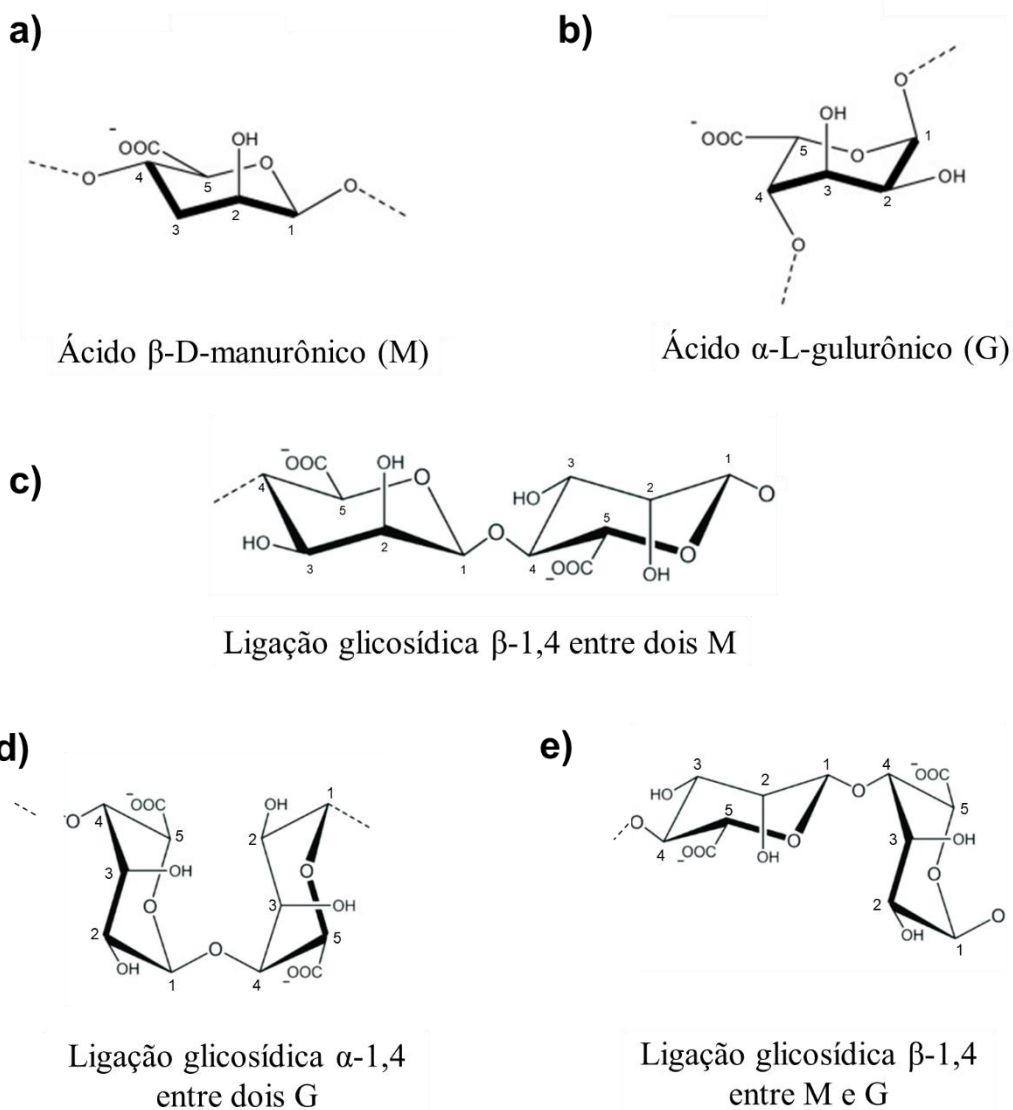
Os polímeros naturais reúnem características que tornam a sua utilização muito difundida em metodologias biocompatíveis de microencapsulação, como atoxicidade, baixo custo e grande disponibilidade, além de serem biodegradáveis (CARVALHO; ESTEVINHO; SANTOS, 2016). Vários tipos de polímeros naturais têm sido empregados na produção de micropartículas, como os polissacarídeos (amidos, alginato, carragenina, goma arábica, etc.), lipídios (ceras vegetais, ácido esteárico, etc.), e proteínas (albuminas, gelatina, caseína, etc.) (CORRÊA-FILHO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019), destacando-se os polissacarídeos como a classe de polímeros naturais mais difundida (MISHRA, 2015).

Polímeros naturais como alginato, colágeno, gelatina, agarose, e quitosana tem sido amplamente investigados na microencapsulação de células (UYEN *et al.*, 2020). Entretanto, o alginato é o material mais comum para a microencapsulação devido à sua permeabilidade, biocompatibilidade e capacidade de realizar a reticulação iônica (KANG *et al.*, 2020), tendo já sido reportado em alguns estudos de microencapsulação de agentes biológicos de controle como em Krell *et al.* (2018), Petraitytė e Šipailienė (2019), e Pour *et al.* (2019).

2.1.1 Alginato

O alginato é um polímero natural da classe dos polissacarídeos, presente na parede celular das algas marrons, como *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum*, e de algumas bactérias do gênero *Azotobacter* e *Pseudomonas* (CATTELAN *et al.*, 2020). Nas algas marrons, está presente na parede celular sob a forma de sais, principalmente de Na, Ca e Mg. Sua função biológica é principalmente estrutural, dando às algas resistência mecânica e flexibilidade (PETEIRO, 2018). A cadeia polimérica do alginato é constituída pelos ácidos β -D-manurônico (M) e α -L-gulurônico (G) unidos por uma ligação glicosídica 1-4, arranjados em blocos homopoliméricos de cada ácido, e blocos heteropoliméricos como mostrado na figura 2 (VARAPRASAD *et al.*, 2020).

Figura 2 – Estrutura e conformação em cadeia dos ácidos a) β -D-manurônico (M) e b) e α -L-gulurônico (G), e os três possíveis tipos de ligação entre eles, e suas respectivas ligações glicosídicas: c) MM por β -1,4, d) GG por α -1,4 e e) MG por β -1,4.



Fonte: Adaptado de Hassan (2020) e Arlov e Skjåk-Bræk (2017).

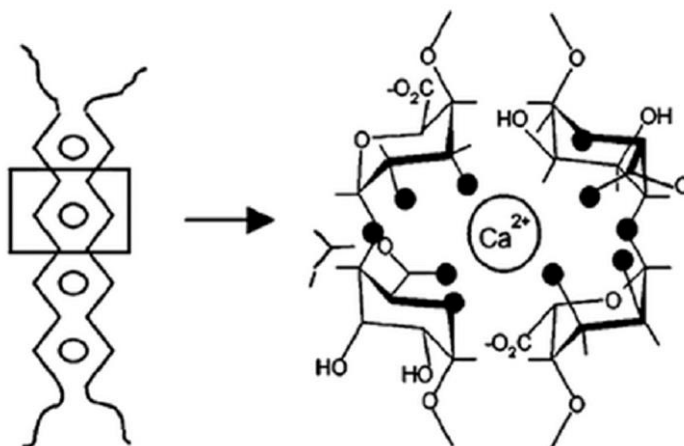
Este polímero tem sido usado para encapsular uma variedade de agentes ativos, como medicamentos, cosméticos, fertilizantes e pesticidas. A microencapsulação com o alginato ocorre pelo processo de reticulação da sua cadeia com íons divalentes como o Ca^{2+} , Ba^{2+} ou Sr^{2+} (UYEN *et al.*, 2019), mas também pode reticular com íons como Fe^{3+} como mostrado pelo trabalho de Bai *et al.* (2020), e íons Al^{3+} segundo Ray *et al.* (2011).

O processo de reticulação do alginato (gelificação iônica ou *cross-linking* iônico), como explicado por Zhang *et al.* (2020), ocorre pela troca iônica do íon sódio

por um íon divalente ou trivalente, que em sequência interage eletrostaticamente com as carboxilas desprotonadas do alginato, transformando o alginato em um gel. Apesar do íon Ca^{2+} ser o mais utilizado para a reticulação do alginato aparecendo na quase totalidade dos trabalhos de microencapsulação, o alginato tem capacidade de reticulação com vários íons metálicos, como Ba^{2+} e Sr^{2+} . No entanto, a sua capacidade de reticulação não é a mesma para todos eles, aumentando à medida que o raio iônico também aumenta, na ordem $\text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$ (HASSAN, 2020), chegando a não interação com o íon Mg^{2+} (BROWNING *et al.*, 2021).

O modelo que explica o processo de reticulação do alginato é conhecido por *Egg-box model*, ou modelo de Caixa de Ovos e foi descrito pela primeira vez por Grant *et al.* (1973). Estes autores sugeriram que este processo começa pela formação de um monocomplexo entre uma macromolécula de alginato e um íon divalente, seguido por um dímero de caixa de ovo, formado pela união de outra macromolécula. A figura 3 traz uma ilustração do modelo *Egg-box*.

Figura 3 – Ilustração da interação do alginato com o íon cálcio sugerida pelo modelo *Egg-box*.



Fonte: Adaptado de Fu *et al.* (2011).

Os géis de alginato são estáveis em uma ampla faixa de pH e insolúvel em muitos solventes como a água, etanol, clorofórmio, e outros solventes orgânicos, porém são solúveis na presença de fortes ligantes de coordenação, como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e citrato de sódio (DELANEY *et al.*, 2010). Dessa forma, cápsulas de alginato podem ser utilizadas para proteger substâncias da acidez do meio em que serão utilizadas, fazendo com que permita a liberação subsequente no ambiente básico. Devido as suas características, este biopolímero é o mais usado

e investigado no encapsulamento, pois forma facilmente matrizes em torno das bactérias (RAMDHAN *et al.*, 2020).

2.1.2 Microencapsulação pelo método de emulsificação

O alginato pode ser usado em muitos métodos de microencapsulação, tais como emulsificação (BAUDRON; GURIKOV; SMIRNOVA, 2019), coacervação (BASTOS *et al.*, 2020), *spray-drying* (SUN; CAMERON; BAI, 2020), leite fluidizado (AKGÜN; ERKEY, 2019) e gotejamento (VALLEJO-CASTILLO *et al.*, 2020). Esses métodos diferem-se em muitas características de processo que refletem diretamente as propriedades do produto final. Uma das propriedades mais observadas na microencapsulação é o tamanho de partícula.

Para a agricultura, o tamanho das micropartículas é um importante fator que afeta a aplicação em campo por impactar no tratamento de sementes, no controle da liberação do agente ativo, na cobertura de spray foliares nas superfícies das plantas e no tamanho de partícula adequado para utilização de bicos de pulverização (BERNINGER *et al.*, 2016). De acordo com Berninger *et al.* (2016), para essas aplicações o tamanho adequado deve permanecer entre 20 e 200 micrômetros de diâmetro. Entretanto, a depender do método de microencapsulação, o diâmetro pode variar entre alguns milímetros a micrômetros, com alguns estudos na última década em nanoencapsulação (HAN *et al.*, 2020; PAQUES *et al.*, 2014).

A microencapsulação por emulsificação, ou gelificação iônica interna, tem esse nome por produzir partículas a partir de uma emulsão água-em-óleo. Este método, é apontado como uma alternativa na produção de micropartículas entre 10 µm e 1000 µm, sendo possível o controle das variáveis de processo para obtenção de distribuições de tamanho de partícula estreitas e controláveis, mas para isso, requer um controle de processo adequado (HOLKEM *et al.*, 2016). Uma das grandes vantagens de sua utilização é a não necessidade de equipamentos especializados, conferindo ao método baixo custo de produção.

Na emulsificação, as micropartículas de alginato são formadas pela produção de gotículas de alginato em uma emulsão de água em óleo sob agitação ou força de cisalhamento (BAUDRON; GURIKOV; SMIRNOVA, 2019). A emulsão então é vertida em uma solução de cloreto de cálcio e um solvente sob agitação para a formação das

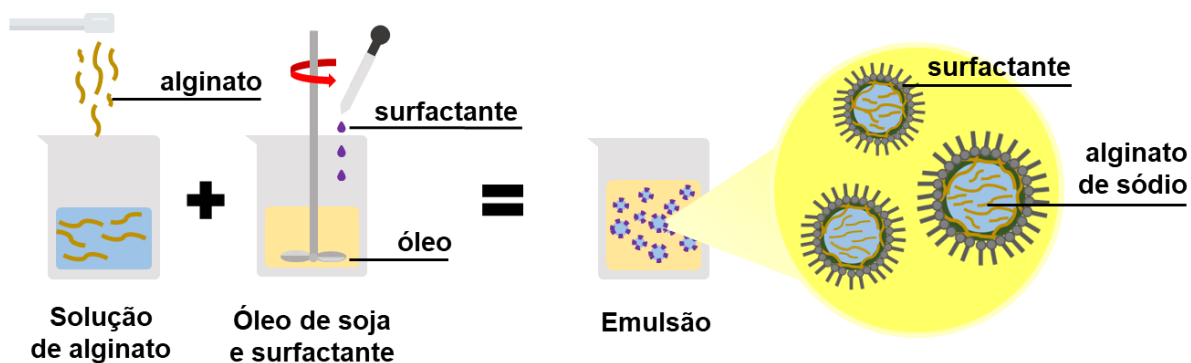
micropartículas. A solução na qual a emulsão é vertida chama-se solução gelificante, por ser a responsável por provocar um gatilho para início da reticulação nas gotículas de alginato.

Para cada sistema de formação de géis, um gatilho específico deve ser adaptado ao material de parede e ao agente ativo. De maneira geral, os gatilhos de gelificação podem ser classificados em três grupos diferentes: (i) gatilhos físicos (tempo, temperatura, irradiação), (ii) gatilhos químicos solúveis em óleo e (iii) gatilhos químicos insolúveis em óleo. Para o alginato de sódio, as soluções encontradas para a formação de micropartículas no método de microencapsulação por emulsificação são os gatilhos ii e iii (BAUDRON; GURIKOV; SMIRNOVA, 2019). No gatilho ii, o alginato pode ser gelificado dispersando-se carbonato de cálcio (CaCO_3) na solução de alginato, que é posteriormente dissolvido pela adição de um ácido, como ácido acético, adicionado juntamente com uma fase oleosa. Durante a agitação, o ácido (solúvel no óleo) migra para dentro das gotículas de alginato onde solubiliza o CaCO_3 causando a formação das micropartículas. No gatilho iii, método utilizado neste trabalho, a formação das cápsulas dá-se pela difusão de Ca^{2+} (imiscível em óleo), presente em uma solução de água e etanol, para a solução de alginato.

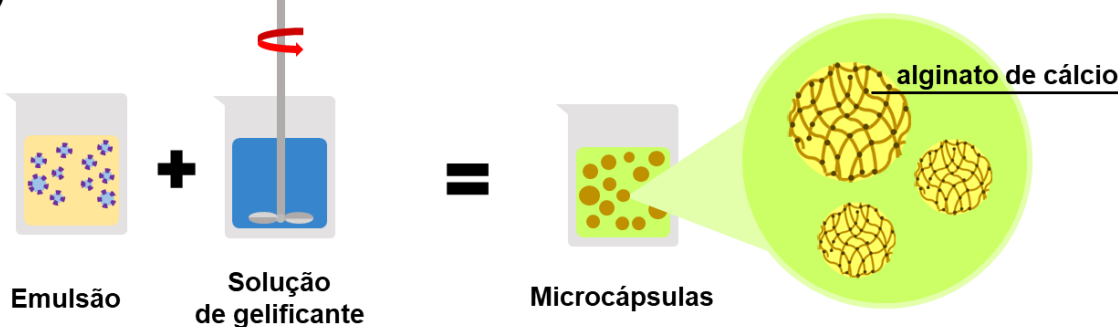
Como as micropartículas resultam da gelificação da emulsão, a microencapsulação pelo método de emulsificação (figura 4) pode ser dividida em duas etapas principais: a formação das emulsões e a constituição das micropartículas (BAUDRON; GURIKOV; SMIRNOVA, 2019). O entendimento das variáveis de processo nas duas etapas torna-se essencial para o controle do tamanho de partícula final das micropartículas. Fatores como tempo e velocidade de agitação, concentração de alginato, tipo e concentração de surfactante devem ser investigados, sendo apontados por Uyen *et al.* (2020), Baudron *et al.* (2019), e Ching *et al.* (2017), como fundamentais para o controle da microencapsulação.

Figura 4 – Ilustração esquemática da microencapsulação pelo método de emulsificação, e estruturas propostas, separada pelas etapas de a) preparação da emulsão e b) formação das micropartículas.

a)



b)



Fonte: Elaborado pela autora.

2.2 Controle biológico

Estima-se que as pragas agrícolas causem de 10 a 15% de perda na produção agrícola mundial (SAWICKA; EGBUNA, 2020). Pragas ou pestes são qualquer espécie considerada indesejável para o desenvolvimento agrícola e que causem prejuízos econômicos. Em ambientes agrícolas, quando populações de plantas (ervas daninhas), animais ou fitopatógenos aumentam em níveis economicamente inaceitáveis, atingem o status de praga (EMBRAPA, 2020). Várias estratégias têm sido empregadas na redução e controle destes danos, sendo a principal delas o uso de pesticidas químicos. A aplicação destes compostos sintéticos tem sido questionada por diversos problemas, como a dependência de condições climáticas adequadas, desperdício e acúmulo de resíduos agroquímicos no solo, perigo à saúde humana e desenvolvimento de resistência pelas pragas (SINGH *et al.*, 2020). Segundo Srivastava *et al.* (2020), já foram documentadas mais de 440 espécies de pragas que

desenvolveram resistência a um ou mais pesticidas. Além disso, muitos organismos não-alvo, que muitas vezes são benignos para o meio ambiente, são afetados pela aplicação de pesticidas.

Como alternativa ao controle químico, o controle biológico vem sendo apontado como uma opção ambientalmente amigável apresentando uma série de vantagens em comparação com o controle químico (EMBRAPA, 2020), tendo como principal benefício deste método a segurança no uso dos produtos biológicos, tornando possível a produção de alimentos com menor impacto ambiental e menos danosa à saúde dos agricultores e consumidores. Conceitualmente, o controle biológico é definido como uma forma de manejo de pragas que utiliza um tipo de organismo, também chamado de inimigo natural, para reduzir populações da espécie considerada praga (BAKER; GREEN; LOKER, 2020), atuando de tal forma que sempre uma população é regulada por outra população, ou seja, um ser vivo é sempre explorado por outro ser vivo, assim mantendo o equilíbrio da natureza.

No Brasil, o primeiro produto biológico para o controle de doenças de plantas foi à base de *Trichoderma viride* empregado no controle de *Phytophthora cactorum* em maçãs lançado em 1987 pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Clima Temperado (POZZA *et al.*, 2019). Desde então, o mercado global de defensivos químicos apresentou uma queda de 6% na produção em 2018, e o mercado do controle biológico foi 17% maior que o alcançado em 2017. No Brasil, o mercado de produtos biológicos movimentou quase R\$ 528 milhões no ano de 2018 e a expectativa para 2020, é que o setor fature no mundo US\$ 5 bilhões e que em 2025 chegue a US\$ 11 bilhões (MAPA, 2020).

2.2.1 Controle microbiológico

Devido as facilidades de manipulação e produção em meios de cultura, os microrganismos têm sido os inimigos naturais mais utilizados em produção comercial em larga escala (HALFELD-VIEIRA *et al.*, 2016). A aplicação de microrganismos como vírus, bactérias e fungos, tem se mostrado eficientes à redução de efeitos danosos causados por pragas e fitopatógenos, sendo reconhecida por 76% dos agricultores em 2018 como eficientes (MAPA, 2020).

Os agentes microbiológicos de controle (AMCs), segundo a legislação brasileira (INC Nº 3/2006) “são considerados os microrganismos vivos de ocorrência natural, bem como aqueles resultantes de técnicas que impliquem na introdução natural de material hereditário, excetuando-se os organismos cujo material genético (ADN/ARN) tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética (OGM)” (BRASIL, 2006), e portanto não são considerados AMCs formulações contendo metabólitos secundários dos mesmos.

Os AMCs atuam por meio de uma variedade de modos de ação resultando de interações diretas ou indiretas entre os microrganismos benéficos e os fitopatógenos (EMBRAPA, 2020). Os mecanismos de biocontrole podem atuar indiretamente induzindo resistência em plantas ou pela suplementação da matéria orgânica no solo para aumentar a atividade antagonista contra o patógeno, como também podem atuar diretamente por meio de competição de nutrientes ou outros mecanismos que controlem as condições de crescimento do patógeno, ou agindo por meio do hiperparasitismo e da antibiose interferindo diretamente no patógeno (KÖHL; KOLNAAR; RAVENSBERG, 2019).

Entre os microrganismos de controle biológico, o gênero *Bacillus* têm recebido grande atenção sendo, provavelmente, os biopesticidas mais explorados na proteção de plantas (ZHAO *et al.*, 2014). Este gênero também é o maior detentor de registros de produtos biológicos no Brasil, chegando a 48% dos produtos registrados (POZZA *et al.*, 2019). O sucesso na utilização do gênero *Bacillus* deu-se também pelas características robustas para a sua produção, como o crescimento em uma ampla faixa de temperatura, colonização em diversos ambientes, utilização de diversos compostos como fonte de energia, capacidade de competição, produção de estruturas de resistência (endósporos), além da capacidade de produzirem diversos compostos com atividade antimicrobiana (DORIGHELLO, 2017).

2.2.2 *Bacillus amyloliquefaciens*

Dentre as espécies do gênero *Bacillus*, a espécie *Bacillus amyloliquefaciens* tem sido empregada na agricultura como agente microbiológico de controle de doenças em muitas formulações comerciais. No Brasil, atualmente existem 23 formulações de produtos à base de *B. amyloliquefaciens* registrados no sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) disponibilizado pelo MAPA como mostrado no

quadro 1. Os produtos registrados estão disponíveis nas formulações do tipo suspensão concentrada (SC), suspensão concentrada para tratamento de sementes (FS), grânulos dispersíveis em água (WG) e pó molhável (WP).

Quadro 1 – Produtos biológicos a base de *B. amyloliquefaciens* registrados no Brasil e seus respectivos titulares do registro.

| Marca comercial | Titular do registro | Alvo controlado |
|------------------------|----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Aveo EZ | Sumitomo | <i>Meloidogyne incognita</i> <i>Pratylenchus brachyurus</i> |
| Bacilomax | Biovalens | <i>Meloidogyne incognita</i> <i>Pratylenchus brachyurus</i> |
| BF20.001** | Ballagro | <i>Meloidogyne incognita</i> |
| Boneville | Koppert | <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> |
| Chevelle | Koppert | <i>Meloidogyne incognita</i> <i>Pratylenchus brachyurus</i> <i>Meloidogyne javanica</i> |
| Duravel | Basf S.A. | <i>Meloidogyne incognita</i> <i>Pratylenchus brachyurus</i> <i>Meloidogyne javanica</i> |
| Eco-Shot | Iharabras | <i>Botrytis squamosa</i> <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> <i>Phyllosticta citricarpa</i> <i>Cryptosporiopsis perennans</i> <i>Pythium ultimum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Botrytis cinerea</i> |
| Faciens Protection | Simbiose | <i>Uncinula necator</i> <i>Botrytis cinerea</i> <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Cryptosporiopsis perennans</i> <i>Sphaeroteca fuliginea</i> <i>Erysiphe polygoni</i> <i>Alternaria solani</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Phyllosticta citricarpa</i> |
| Lumialza | Sumitomo | <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Pratylenchus brachyurus</i> |
| Nemacontrol | Simbiose | <i>Meloidogyne incognita</i> <i>Pratylenchus brachyurus</i> |
| Nemacontrol Super | Simbiose | <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Pratylenchus brachyurus</i> |
| Nema-Guard | Biovalens | <i>Meloidogyne incognita</i> <i>Pratylenchus brachyurus</i> |
| No-Nema | Biovalens | <i>Meloidogyne incognita</i> |
| Pardella** | Ballagro | <i>Fusarium verticillioides</i> <i>Meloidogyne incognita</i> <i>Pratylenchus brachyurus</i> <i>Meloidogyne javanica</i> <i>Heterodera glycines</i> |

| | | |
|-------------|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PFC-Control | Simbiose | <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> |
| Quartz SC | Lallemand | <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Pratylenchus brachyurus</i> |
| Shocker* | Agrivalle | <i>Botrytis cinerea</i> |
| Shocker-A* | Agrivalle | <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> |
| Shocker-B* | Agrivalle | <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> |
| Tanus** | Biota Innovations | <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> |
| Trunemco | Sumitomo | <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Rhizoctonia solani</i> |
| Twixx | Agrivalle | <i>Rotylenchulus reniformis</i> <i>Pratylenchus brachyurus</i> <i>Meloidogyne javanica</i> <i>Meloidogyne incognita</i> |
| Veraneio | Koppert | <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> |

*Produto formulado também com *Trichoderma harzianum*.

**Produto formulado também com *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma asperellum*.

Fonte: Extraído do sistema AGROFIT em 29/09/2020.

A espécie *B. amyloliquefaciens* é um tipo de bactéria aeróbia, gram-positiva, com formato de bastonete medindo de 1,8 a 3,0 µm de comprimento, produtora de endósporos, associada muitas vezes a espécie *Bacillus subtilis* (SANTOS, 2018; XIE *et al.*, 2018). Encontrada comumente em solos próximos as raízes de plantas, recebeu esse nome devido produção da enzima α -amilase, que atua ao acaso ao longo da cadeia de amilose e amilopectina hidrolisando as ligações α -1,4 e liberando maltoligossacarídeos (CARVALHO, 2007). Historicamente, a espécie *B. amyloliquefaciens* foi proposta pela primeira vez no trabalho de Fukumoto (1943), mas só foi reconhecida como uma nova espécie na publicação de Priest *et al.* (1987). Este reconhecimento tardio de *B. amyloliquefaciens* como uma nova espécie ocorreu devido a semelhança com a espécie *B. subtilis*, que quando comparadas pelos métodos clássicos de coloração não era possível fazer distinção. Priest e colaboradores (1987) reuniram evidências genéticas, análises numéricas de fenótipos, análises de cromatografia gás-líquido e espectrometria de massas para apresentar a espécie como nova no artigo intitulado "*Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov. nom. rev".

Com relação ao controle biológico, a bactéria *B. amyloliquefaciens* produz muitos metabólitos secundários com capacidade de supressão de doenças que foram demonstrados pela literatura como responsáveis pela antibiose, como o composto iturina A e fengicina. No trabalho de Ji *et al.* (2013) foi demonstrado que o composto iturina A e fengicina produzido pela estirpe CNU114001 podem inibir o crescimento de 12 patógenos de plantas sendo eles *Alternaria panax*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum orbiculare*, *Corynespora cassicola*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Stemphlium lycopersici*, *Pyricularia grisea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum orbiculare*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum* e *Pyricularia oryzae*. Os autores além de testarem a inibição contra os 12 patógenos, também avaliaram a inibição para diferentes concentrações do extrato de metabólitos da *B. amyloliquefaciens*, mostrando que a concentração mais baixa de 50 ppm foi suficiente para inibir o crescimento dos fungos *A. panax*, *B. cinerea*, *P. grisea* e *S. sclerotium*, e que em 200 ppm, 8 patógenos restantes eram totalmente controlados.

Em outro trabalho, os autores Li *et al.* (2014) conseguiram associar a contribuição de cada substância no controle de alguns fungos. Utilizando a estirpe SQR9, foi demonstrado que a fengicina foi o principal contribuidor na inibição de *Verticillium dahliae* kleb, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, e *Phytophthora parasítica*, e a surfactina no controle de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, e *Fusarium solani*. Muitos outros trabalhos debruçaram-se no estudo, identificação de novos compostos e controle de patógenos pela *B. amyloliquefaciens*, estão apresentados no quadro 2.

Quadro 2 – Metabólitos secundários produzidos por *B. amyloliquefaciens*.

| Metabólito | Efeito contra o alvo | Referência |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Ciclo(d-Pro-I-Leu) | <i>Meloidogyne incognita</i> | Jamal <i>et al.</i> , 2017 |
| Iturina A | <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Alternaria citri</i> , <i>Botryosphaeria</i> sp., <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Fusicoccum aromaticum</i> , <i>Lasioidiplodia theobromae</i> , <i>Penicillium crustosum</i> , <i>Phomopsis persea</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> | Arrebola; Jacobs; Korsten, 2010; Wu <i>et al.</i> , 2014; Yu <i>et al.</i> , 2002 |
| Amilociclicina | <i>Staphylococcus aureus</i> | Kurata <i>et al.</i> , 2019; Scholz <i>et al.</i> , 2014 |

| | | |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Surfactina | Virus, <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Myzus persicae</i> <i>Fusarium solani</i> , | Koumoutsis <i>et al.</i> , 2004; Li <i>et al.</i> , 2014; Yun <i>et al.</i> , 2013 |
| Bacilomicina D | <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium graminearum</i> | Gu <i>et al.</i> , 2017; Koumoutsis <i>et al.</i> , 2004 |
| Fengicina | <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Phytophthora parasitica</i> | Koumoutsis <i>et al.</i> , 2004; Li <i>et al.</i> , 2014; Zhang <i>et al.</i> , 2018b |
| Bacilobactina | <i>Verticillium dahliae</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> | Li <i>et al.</i> , 2014 |
| Macrolactina | <i>Fusarium oxysporum</i> | Schneider <i>et al.</i> , 2007 |
| Bacilaene | <i>Fusarium oxysporum</i> | Chen <i>et al.</i> , 2006 |
| Difidicina | <i>Fusarium oxysporum</i> | Chen <i>et al.</i> , 2006 |
| Bacilisina | <i>E. amylovora</i> | Chen <i>et al.</i> , 2009 |
| Plantazolicina | <i>Meloidogyne incognita</i> e <i>Caenorhabditis elegans</i> | Jamal <i>et al.</i> , 2017; Liu <i>et al.</i> , 2013 |
| Amilociclicina | Ainda não relacionado | Ait Barka <i>et al.</i> , 2015 |
| Acetoin; 2,3-butandiol | Promotora de crescimento e indutora de resistência sistêmica | Wu <i>et al.</i> , 2018 |
| Mersacidina | Ainda não relacionado | Altena <i>et al.</i> , 2000 |

Fonte: Adaptado de Keswani *et al.* (2020).

No que diz respeito aos nematoides, Jamal *et al.* (2017) mostraram que a bactéria *B. amyloliquefaciens* tem atividade contra a espécie *Meloidogyne incognita* por meio do dipeptídeo ciclo(d-Pro-I-Leu) assim como o composto plantazolicina no controle de *Caenorhabditis elegans*, no estudo de Liu *et al.* (2013). Além do seu emprego como fungicida e nematicida, recentemente a cepa MBI 600® comercializada pela BASF SE. por meio do produto Duravel®, foi utilizada no estudo de Beris *et al.* (2018) como um virucida. O estudo mostrou que a aplicação da cepa contra os vírus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) e *Potato virus Y* (PVY) mostrou-se eficiente, reduzindo em 80% a presença do TSWV e atrasando a infestação do PVY, por meio da indução de resistência sistêmica em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) pela produção de ácido salicílico. Neste trabalho, a bactéria *B. amyloliquefaciens* será avaliada quanto a sua atividade antifúngica contra os fungos *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

2.2.3 Microencapsulação de microrganismos na agricultura

Apesar do uso de AMCs no controle de patógenos no campo ser bastante promissora por serem seguros à saúde humana e ao meio ambiente, sua utilização traz grandes desafios. Diferentemente dos produtos químicos, os AMCs são

organismos vivos que perdem viabilidade ao longo do tempo e que quando aplicados em campo também precisam de um período de adaptação ao novo habitat para começarem a atuar como biocontroladores do patógeno alvo. Por esses motivos, para serem usados comercialmente os AMCs precisam ser preparados em formulações que aumentam a viabilidade do inóculo por muitos meses e que oferecem proteção quando aplicados.

Usualmente, os AMCs podem ser preparados em formulações sólidas (pós ou grânulos) ou líquidas. Formulações líquidas, onde o inóculo fica suspenso em água ou óleo, não oferecem um tempo de prateleira tão longo quanto as formulações sólidas, mas são mais simples de preparar e aplicar (BASHAN *et al.*, 2014). As formulações sólidas costumam ser mais utilizadas na aplicação no solo e fornecem uma liberação mais controlada em relação as formulações líquidas. De maneira geral, formulações líquidas possuem tempo de prateleira de 3 a 6 meses (KOLOMBET *et al.*, 2008), e formulações sólidas de 6 a 12 meses (MACIAG *et al.*, 2020).

Os AMCs são preparados para uso comercial com as mesmas formulações que são utilizadas para a preparação dos defensivos agrícolas químicos, sendo principalmente: suspensão concentrada (SC), suspensão concentrada para tratamento de sementes (FS), grânulos dispersíveis em água (WG) e pó molhável (WP), mas não só (essas são as formulações mais registradas no Brasil). Na formulação SC, partículas do ingrediente ativo são suspensas em um líquido, geralmente água. Para manter as partículas suspensas na formulação, geralmente adiciona-se um espessante ao líquido ou reduz-se o tamanho de partícula do ativo, que para o caso dos AMCs é inviável. As formulações FW são muito similares a SC com a diferença que a ela é adicionado aditivos para adesão à superfície das sementes e materiais corantes para indicar que foram tratadas com o produto. As formulações WP e WG são sólidas (pó e grânulos, respectivamente) durante a estocagem e para aplicação em campo são dispersas em água e pulverizadas. Para rápida dispersão dessas formulações no solvente são adicionadas substâncias que auxiliam no desaglutinamento do ingrediente ativo (CUSH, 2020). Apesar das formulações sólidas oferecerem um maior tempo de prateleira aos microrganismos, elas carregam algumas desvantagens. Formulações sólidas são mais suscetíveis a contaminação, necessitam de concentrações maiores de inóculo para alcançarem o mesmo efeito das formulações líquidas em campo, pela formulação ser seca, os

microrganismos demoram mais para começarem a atuar por necessitarem primeiro de hidratação (geralmente permanecem como esporos nesse período), e se necessitarem de liofilização tornam-se ainda dispendiosas etc. (JOHN *et al.*, 2011; MIENDA; IDI; UMAR, 2011; SREENIVASA RAO *et al.*, 2015). Logo, a escolha de uma formulação adequada para o inóculo é essencial para uma boa performance e estabilidade dos microrganismos.

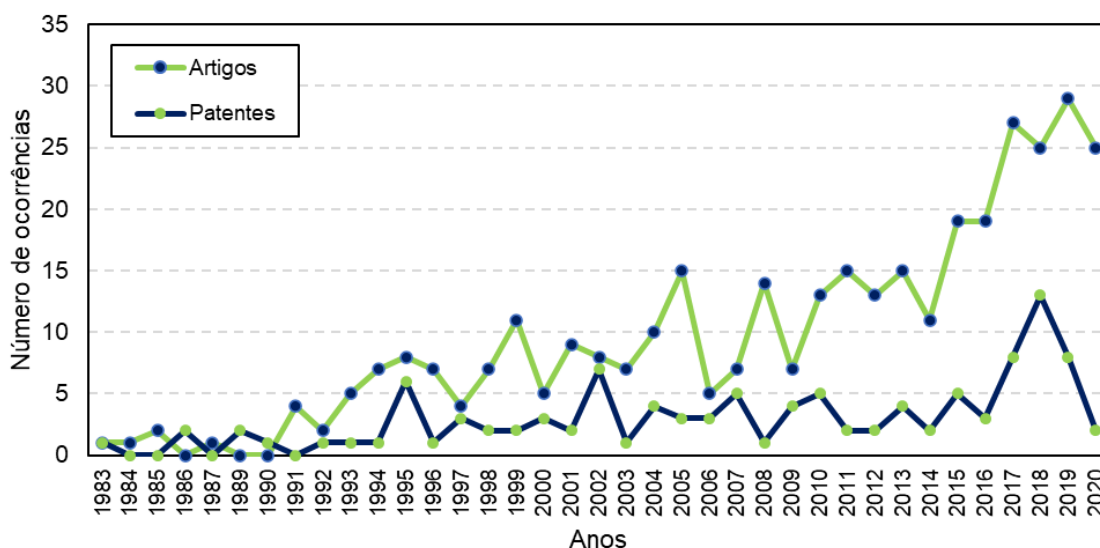
Uma das estratégias apontadas para o aumento da viabilidade de microrganismos adicionados ao meio ambiente é o desenvolvimento de sistemas de proteção e liberação sustentada, utilizando-se de técnicas de microencapsulação (VEMMER; PATEL, 2013). A microencapsulação é uma técnica que permite a incorporação de um ativo sensível em uma partícula, preservando o material encapsulado do meio externo a fim de reduzir as interações com fatores ambientais. Alguns trabalhos já demonstraram que a microencapsulação pode aumentar o tempo de prateleira dos microrganismos, como o trabalho de Ma *et al.* (2015) que obteve uma sobrevivência de 87,53% para uma formulação contendo cápsulas e 47,06% para uma formulação WP após 540 dias de armazenamento da bactéria *Bacillus subtilis*. Dentre os muitos materiais utilizados para microencapsulação, os polímeros biodegradáveis têm se destacado por, assim como os AMCs, serem ambientalmente amigáveis e seguros para uso humano, contribuindo para uma formulação mais sustentável.

O trabalho mais antigo envolvendo a imobilização de um microrganismo em uma matriz com aplicação agrícola é um estudo de Dommergues e colaboradores em 1979. Neste artigo, os autores propuseram o aprisionamento do inoculante *Rhizobium japonicum*, uma bactéria fixadora de nitrogênio, em uma matriz de poliacrilamida como alternativa a formulação com turfa. Apesar de não utilizarem a técnica de microencapsulação, os objetivos principais da tecnologia estavam presentes, como a utilização de uma matriz para proteção de um microrganismo e a sua liberação prolongada no meio, faltando apenas o fator do tamanho micrométrico da partícula. Em um estudo de 1982, Jung e Dommergues, propuseram o aprisionamento do mesmo inoculante em matrizes de alginato apresentando pela primeira vez cápsulas de alginato de cálcio de 2 a 3 mm de diâmetro.

Apenas na investigação de Walker e Connick Jr. (1983) foi apresentado, pela primeira vez, o encapsulamento de um AMCs numa matriz de alginato de cálcio e

argila. Os autores utilizaram o método de gotejamento para aprisionar separadamente cepas de 5 fungos biocontroladores de ervas-daninhas, sendo eles *Alternaria cassiae*, *Alternaria macrospora*, *Fusarium lateritium*, *Colletotricum malvarum* e *Phyllosticta* sp. Os autores avaliaram a viabilidade dos conídios após exposição à radiação ultravioleta, mostrando que a formulação foi eficiente em proteger os microrganismos preservando de 90 a 100% dos conídios. Na avaliação do tempo de prateleira, foi reportado que os fungos encapsulados permaneceram viáveis até 8 meses de armazenamento quando guardados sob refrigeração a 4 °C. Desde a primeira publicação muitos trabalhos acadêmicos e patentes foram publicadas, a figura 5 apresenta uma evolução do número de ocorrências de ambos os tipos de documentos sobre encapsulação de AMCs desde 1983. A figura 5 mostra o crescente interesse pelo estudo de sistemas que envolvam a microencapsulação de microrganismos para o controle de patógenos, bem como a sua importância para o desenvolvimento de inovações tecnológicas que se refletiu no crescente número de patentes publicadas no mesmo período.

Figura 5 – Evolução do número de trabalhos acadêmicos e tecnológicos (artigos e patentes) publicados sobre encapsulação de agentes microbiológicos de controle desde 1983 até 2020 extraídos das bases *Web of Science Core Collection* e *Derwent Innovations Index*.



Fonte: *Web of Science Core Collection* (2020) e *Derwent Innovations Index* (2020).
 Lógica de pesquisa utilizada no Web of Science: TOPIC: ((biological NEAR/0 control) OR (microbial NEAR/0 biological NEAR/0 control) OR (microbial NEAR/0 pesticide) OR (microbial NEAR/0 control)) AND TOPIC: ((entrap* OR immobili* OR encapsulation* OR microencap* OR bead* OR microsphere* OR microcap* OR microbead*)). Lógica de busca utilizada no Derwent: IP= (A01N-063/00 AND A01N-025/28).

2.3 Estado da arte

Os estudos mais recentes (2016-2021) sobre microencapsulação de AMCs abrangem muitos tipos de matrizes, microrganismos e métodos de microencapsulação. O quadro 3 traz um panorama destes trabalhos separados por AMC, tipo de matriz e tamanho de partícula. Como pode ser verificado, a maior parte dos estudos desenvolvidos no período são de microencapsulação de AMCs em partículas de alginato de cálcio de 2 a 5 mm de diâmetro, preparadas por gotejamento, com acréscimo de um aditivo para modificar propriedades da partícula.

Um desses trabalhos é o estudo de Zhang *et al.* (2016) que investigaram a proteção UV e a liberação sustentada da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) presente em cápsulas de alginato de cálcio (2 a 3 mm) aditivadas com melanina. A bactéria Bt é um importante AMC com função inseticida contra mais de 3000 espécies de insetos, mas como todas as bactérias, suscetível a morte quando exposta à radiação UV. Para propor uma formulação que protegesse os microrganismos, os autores utilizaram metodologia de gotejamento para a produção das cápsulas e RSM para análise dos resultados. Foi reportado que a melhor formulação para obtenção de cápsulas com proteção UV dentro dos parâmetros estudados foi a composição 0,78% de alginato de sódio, 4,52% de CaCl_2 , 3,0% de bactéria, 0,015% de melanina e 0,2% do conservante benzoato de sódio. Com essa composição, os pesquisadores conseguiram aumentar a virulência da formulação encapsulada em aproximadamente 2400 vezes e prolongar a sobrevivência do Bt exposto à radiação UV.

Quadro 3 – Exemplos de estudos mais recentes (2016-2021) sobre microencapsulação de agentes microbiológicos de controle.

| Agente microbiológico de controle | Matriz | Tamanho de partícula | Referência |
|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| <i>Bacillus thuringiensis</i> | Alginato de cálcio Melanina | 2-3 mm | Zhang <i>et al.</i> (2016) |
| <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> | Alginato de cálcio Glicerol | 4-5 mm | Kim <i>et al.</i> (2021) |
| <i>Trichoderma asperellum</i> | Alginato de cálcio | 1,5 a 2,5mm | Lopes <i>et al.</i> (2020) |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Metarhizium brunneum</i> | Alginato de cálcio Amido cristalino | 1 mm | Humbert <i>et al.</i> (2017) |
| <i>Metarhizium brunneum</i> | Alginato de cálcio Amido cristalino de amido e batata Carboximetilcelulose | 2,5 mm (úmidas) 1,1 mm (secas) | Przyklenk <i>et al.</i> (2017) |

| | | | |
|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|--------------|---------------------------------------|
| <i>Bacillus thuringiensis</i> | Alginato de cálcio Gelatina | Indisponível | Naghavi, Marzban Sohrab (2016) |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | Alginato de cálcio Gelatina Nanotubos de carbono Nanopartículas de Si | 150 µm | Pour <i>et al.</i> (2019) |
| <i>Streptomyces fulvissimus</i> | Goma gelana e quitosana | 150 µm | Saberi-Riseh e Moradi-Pour (2021) |
| <i>Metarhizium brunneum</i> | Alginato de cálcio Amido de milho | Indisponível | Krell <i>et al.</i> (2018b) |
| <i>Metarhizium brunneum</i> | Parafina, água e nanopartículas de sílica- NH ₂ | 1-30 µm | Yaakov <i>et al.</i> (2018) |
| <i>Metarhizium brunneum</i> | Nanopartículas de TiO ₂ - NH ₂ | 2-8 µm | Amar Feldbaum <i>et al.</i> (2021) |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> | Folhas de grafeno Azeite | Indisponível | Maghsoudi e Jalali (2017) |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> | Nanopartículas de ZnO | 20 nm | Malaikozhundan <i>et al.</i> (2017) |
| <i>Bacillus cereus</i> | Nanopartículas de ZnO | 21 a 35 nm | Ahmed <i>et al.</i> (2021) |

Fonte: Elaborado pela autora.

Kim *et al.* (2021) estudaram a microencapsulação do nematelminto *Heterorhabditis bacteriophora* em partículas de alginato de cálcio (4 a 5 mm) produzidas por gotejamento. O estudo tinha como objetivo resolver o problema da pouca ou nenhuma liberação dos AMCs aprisionados em partículas puramente de alginato de cálcio, e aumentar o tempo de prateleira da formulação. Para isso, foi proposta a aditivação da formulação com glicerol para melhorar tanto a porosidade da parede das partículas quanto para deixar os nematelmintos em estado de quiescência. Os resultados obtidos mostraram que a utilização de *H. bacteriophora* em partículas foi tão eficaz quanto a formulação comercial e que o tempo de prateleira desta nova formulação chegou a pelo menos 6 meses (tempo de controle do estudo).

Poucos trabalhos que utilizaram uma metodologia similar a utilizada neste foram encontrados. Um deles é o estudo de Naghavi *et al.* (2016) que microencapsularam a bactéria Bt em uma matriz de alginato de cálcio e gelatina por método de emulsificação. O óleo escolhido por esses autores foi o óleo de milho, o surfactante SpanTM 80 e a velocidade de rotação 2000 rpm. O objetivo do estudo é semelhante aos estudos anteriores, proteger os microrganismos da radiação UV. Os autores conseguiram mostrar que para os microrganismos microencapsulados a viabilidade foi muito superior à dos esporos livres após exposição à radiação UVB e UVC, 86% e 90%, contra 40 e 50%, respectivamente.

O estudo de Pour *et al.* (2019) traz a microencapsulação da bactéria *Pseudomonas fluorescens*, um biofungicida com ação contra a podridão-seca, causada pelo fungo *Fusarium solani*. Os pesquisadores propuseram uma formulação de alginato de cálcio e gelatina aditivada com nanotubos de carbono, como um meio para acelerar a germinação das sementes e o crescimento da planta, e nanopartículas (NP) de silício, utilizado para aumentar a resistência à patógenos da planta. A metodologia utilizada, muito similar a deste trabalho, proporcionou a obtenção de partículas de tamanho médio de 150 μm . Também foi mostrado que a formulação contendo as NP levou a um maior tempo de prateleira, maior eficácia contra o patógeno, e um maior tamanho médio das raízes da planta estudada.

O estudo dos pesquisadores Saberi-Riseh e Moradi-Pour (2021) propôs a microencapsulação da bactéria *Streptomyces fulvissimus*, pelo método de spray-drying, para o controle do Mal-do-pé do arroz causada pelo fungo *Gaeumannomyces graminis*. Nesse trabalho, o material empregue como matriz foi a quitosana e a goma gelana com NP de óxido de zinco como aditivo. O tamanho de partícula produzido foi da ordem de 150 μm . Os autores mostraram que a formulação de micropartículas alcançou o maior controle do patógeno, chegando a 90% de eficiência e que as plantas tratadas apresentaram maior massa das raízes (úmidas e secas).

Outra abordagem recentemente utilizada na microencapsulação de AMCs é a encapsulamento de célula única (*single cell encapsulation*), método no qual cada microrganismo é encapsulado individualmente em uma partícula. No trabalho de Yaakov *et al.* (2018) o fungo *Metarhizium brunneum* foi encapsulado individualmente pelo método da emulsão Pickering, utilizando água como fase contínua e parafina como fase dispersa. Como estabilizante da emulsão, foram utilizadas NP de sílica funcionalizadas com NH_2 . Esse método é bastante útil para produzir formulações com alta cobertura foliar onde o tamanho das partículas é dependente do comprimento da célula. Os resultados obtidos mostraram que a alta cobertura da formulação proposta levou a uma maior mortalidade da lagarta do algodão (*Spodoptera littoralis*) em comparação com o grupo controle.

Em um trabalho mais recente, Feldbaum *et al.* (2021) propôs a microencapsulação do fungo *M. brunneum* no mesmo sistema utilizado por Yaakov *et al.* (2018), com a diferença que esses autores utilizaram NP de TiO_2 funcionalizadas com amina como para melhorar a eficiência da formulação quanto a proteção à

radiação UV. Os resultados mostraram que a exposição dos conídios encapsulados à luz UV não alterou suas taxas de germinação, no entanto, para os conídios desprotegidos houve uma diminuição de viabilidade.

Por último, é válido citar os trabalhos de Maghsoudi e Jalali (2017) e Ahmed *et al.* (2021). Maghsoudi e Jalali (2017), apesar de não encapsularem o AMC em uma matriz polimérica, apresentaram uma nova formulação com proteção UV para *B. thuringiensis* baseada em azeite de oliva e óxido de grafeno. Os resultados mostraram que a combinação de óxido de grafeno e azeite gerou a maior viabilidade do microrganismo, de 50,62% após 96 horas de exposição à radiação UV, enquanto a viabilidade para os esporos livres, para formulação só com azeite de oliva e para a formulação com apenas óxido de grafeno, foi de 32,54%, 37,19% e 45,20%, respectivamente. Já o trabalho de Ahmed *et al.* (2021) apresenta a biossíntese de NPs de óxido de zinco pelo microrganismo *Bacillus cereus* como uma proposta de formulação com tempo de prateleira longo, atóxica, ambientalmente amigável e escalável em comparação com NPs fabricadas pelos métodos químicos e físicos. Os autores mostraram que as NPs de óxido de zinco apresentaram uma atividade antibacteriana significativa de 50 µg.mL⁻¹ contra os patógenos *Burkholderia glumae* e *Burkholderia gladioli*, gerando uma zona de inibição de 2,83 cm e 2,18 cm, respectivamente.

É importante destacar que após uma busca extensa pela literatura acadêmica disponível, não foi encontrado nenhum trabalho de microencapsulação que utilizasse a bactéria *B. amyloliquefaciens* como biofungicida e utilizasse o método de emulsificação para a fabricação de micropartículas de alginato de cálcio, sendo este trabalho o primeiro.

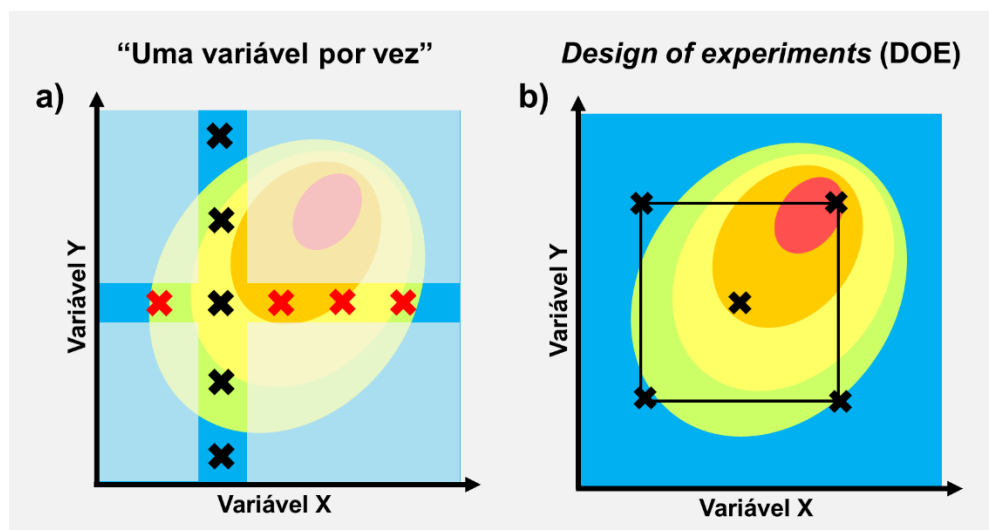
2.4 Planejamento de experimentos

Tradicionalmente, a metodologia escolhida por pesquisadores para estudo de sistemas experimentais é a metodologia “Uma Variável Por Vez”, em inglês “*One Variable At Time*” (OVAT) ou “*One Factor At a Time*” (OFAT) (BOWDEN; PICHLER; MAURER, 2019; MONTGOMERY, 2017). O método “Uma Variável Por Vez” consiste

na seleção de um ponto de partida para cada fator¹ investigado e na variação sucessiva de cada um ao longo de um intervalo com os outros fatores mantidos constantes. Como pode ser visto na ilustração apresentada na figura 6a, o fator Y foi escolhido como o primeiro fator a ser trabalhado nesse estudo hipotético enquanto a variável X foi mantida no mesmo nível. Após a realização dos cinco experimentos (marcados com “x” preto na figura 6a), foram feitos mais experimentos no fator X (marcados com um “x” vermelho) na altura em que o Y foi encontrado como ótimo.

Segundo Neto e colaboradores (2010), a abordagem “Uma Variável Por Vez” pode funcionar para alguns casos, por exemplo, quando se quer provar que a variação de um parâmetro tem efeito sobre um sistema. No entanto para outros tipos de estudos pode demonstrar-se insuficiente quando deseja-se encontrar a melhor configuração de um processo já que que não considera qualquer interação entre os fatores (MONTGOMERY, 2017).

Figura 6 – Tipos de metodologias para abordagem de estudo de sistemas experimentais: a) metodologia “Uma Variável Por Vez” onde é mostrado a variação da variável X quando Y é constante, e da variável Y quando X é constante; b) metodologia de Planejamento de Experimentos ou Design of Experiments, onde os experimentos são realizados em pontos planejados estatisticamente. O gradiente de cores representa a resposta de cada experimento, sendo a cor vermelha a melhor resposta e a cor azul a pior resposta.

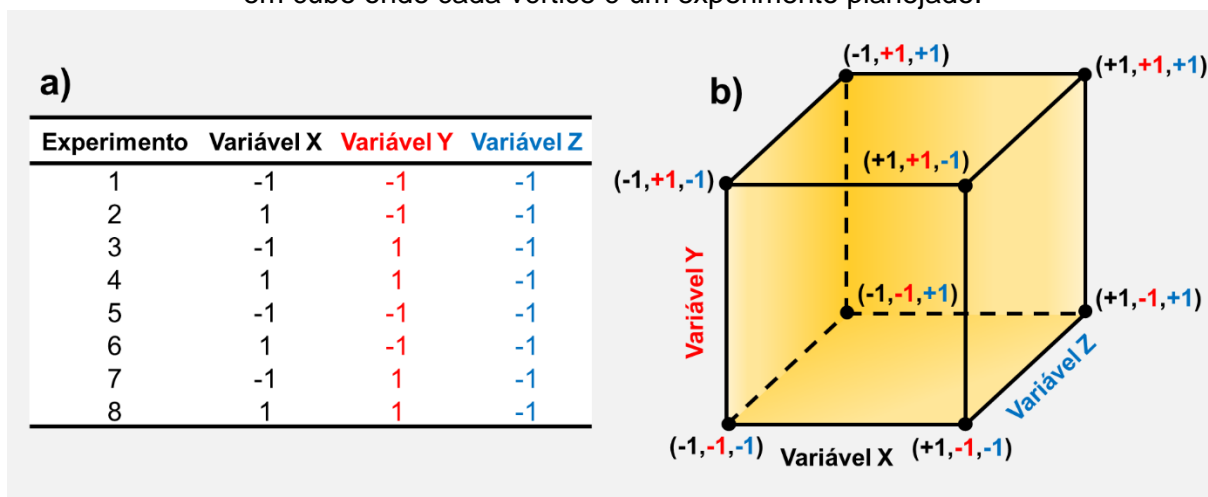


Fonte: Adaptado de Bowden, Pichler e Maurer (2019).

¹ Fator ou variável é são características que são medidas, controladas ou manipuladas em um estudo.

Uma alternativa a esse método é o Planejamento de Experimentos ou *Design of Experiments* (DOE), uma estratégia experimental na qual os fatores são variados juntos, em vez de um de cada vez, criando experimentos em regiões estratégicas (Figura 6b) para uma análise estatística e matemática dos resultados (SHOJAEI *et al.*, 2020). Existem muitos métodos de planejamento experimental que foram concebidos de forma a otimizar a quantidade de informação obtida a partir do mínimo número possível de dados. O mais simples deles é o planejamento fatorial 2^k , onde k é o número de fatores avaliados, e existem 2 níveis de variação do planejamento (VILELA, 2020). Neste desenho experimental são investigados os efeitos individuais de cada fator e as interações entre os fatores (MONTGOMERY, 2017). O processo experimental dessa técnica consiste em realizar experimentos com cada uma das combinações geradas por uma matriz formada pelos níveis de cada variável para em seguida determinar os efeitos de cada uma dessas variáveis e suas interações. Para um estudo experimental com 3 fatores, o número de experimentos a ser realizado é 8 ($2^3=8$). A matriz de teste bem como a representação cúbica dos experimentos é apresentada na figura 7.

Figura 7 – Planejamento de experimentos fatorial 2^3 : a) tabela com a matriz gerada pelas variáveis X, Y e Z variando-se o nível em -1 e +1 e d) representação esquemática da matriz em cubo onde cada vértice é um experimento planejado.



Fonte: Elaborado pela autora.

Dentre os métodos para planejamento de experimentos, a metodologia de Superfície de Resposta (RSM) desenvolvida por Box e Wilson (1951) destaca-se por usar uma perspectiva gráfica dos resultados obtidos (MYERS; MONTGOMERY; ANDERSON-COOK, 2016).

2.4.1 Metodologia de Superfície de Resposta (RSM)

A metodologia de Superfície de Resposta (*Response Surface Methodology* - RSM, em inglês) é uma metodologia amplamente utilizada nos campos da biologia e química, bem como na indústria de alimentos e outras áreas. A RSM é um dos métodos de Planejamento de Experimentos, diferenciando-se por utilizar muitas variáveis para encontrar as condições ótimas de um dado sistema (BOX; WILSON, 1951; YUSRI *et al.*, 2018; ZHU *et al.*, 2019). É constituída por um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas que são usadas para o desenvolvimento e otimização de parâmetros de processos (KUMARI; GUPTA, 2019). Uma das maiores vantagens da utilização da RSM é a redução do número de experimentos a ser realizado, tendo como consequência a redução de custos e tempo (SHOJAEI *et al.*, 2020).

A descrição da superfície de resposta é gerada por uma equação polinomial linear ou quadrática descrita por:

$$y = f(\xi_1, \xi_2, \dots, \xi_k) + \varepsilon \quad \text{Equação 1}$$

onde y é a resposta obtida pela realização dos experimentos, $\xi_1, \xi_2, \dots, \xi_k$ são as variáveis controláveis do sistema e ε é um termo que representa outras fontes de variabilidade não contabilizadas em f , como erros de medição e outras fontes de variação inerentes ao processo, efeito de outra variável desconhecida (YUSRI *et al.*, 2018).

Dentro da RSM existem técnicas específicas que utilizam diferentes tipos de abordagens estatísticas a depender dos fatores planejados no experimento, como a técnica de Experimento de Composto Central (*Central Composite Design* – CCD, em inglês), Planejamento Box-Behnken (*Box-Behnken Design* – BBD, em inglês), Matriz Doehlert e Planejamentos Ótimos (*Optimal Design*, em inglês) (MONTGOMERY, 2017; ZHOU *et al.*, 2019).

2.4.2 Planejamento Ótimo-I (*I-Optimal Design*)

Técnicas de RSM padrão como CCD e BBD possuem limitações a variáveis qualitativas e podem incluir experimentos em regiões que não são viáveis por

questões de segurança, concentrações ou velocidades inatingíveis, quantidade de produto inviável economicamente etc. (OZDEMIR, 2020). Nestas condições, técnicas de Planejamento Ótimo (*Optimal Design*, em inglês) tornam-se mais apropriadas.

Os Planejamentos Ótimos são uma alternativa de abordagem estatística baseada em princípios que acomodam uma variedade de restrições, como restrições de tamanho da amostra ou combinações de tratamento não permitidas (por exemplo, certas combinações de níveis de fatores podem inviável ou indesejável) (MONTGOMERY, 2017). Os critérios de otimização desse tipo de Planejamento são caracterizados por letras do alfabeto e, como resultado, são frequentemente chamados de critérios de otimização alfabética (MYERS; MONTGOMERY; ANDERSON-COOK, 2016). Dentre eles, o Planejamento Ótimo-I é um importante design de otimização de planejamento de experimentos que utiliza o critério variância integrada. Este critério de otimização busca planejamentos que minimizem a previsão da variância média sobre a região experimental (GOOS; JONES; SYAFITRI, 2016). O objetivo em minimizar a variância média do modelo de regressão linear do planejamento experimental é aumentar a precisão do modelo, diminuindo a dispersão entre os resultados obtidos do planejamento.

Segundo Montgomery (2017), em planejamentos fatoriais do tipo 2^k , os coeficientes de regressão têm a mesma variância devido ao seguinte desenvolvimento algébrico. Utilizando como exemplo um estudo com dois fatores (1 e 2), o modelo de regressão gerado a partir desses 4 experimentos é expresso a partir da equação 2.

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \varepsilon \quad \text{Equação 2}$$

onde y é a resposta, x_1 e x_2 são os efeitos principais e $x_1 x_2$ é o efeito da dupla-interação, todos codificados na escala de -1 a +1, e os β 's são os parâmetros que serão determinados após a realização dos experimentos. A figura 8 é uma representação geométrica de onde estão localizados os experimentos de um planejamento 2^2 em um quadrado, onde os vértices são os experimentos, e em paralelo as arestas estão os níveis (-1, +1) das variáveis X e Y .

Cada experimento gerado pelo fatorial 2^2 é descrito pelas equações 3, 4, 5 e 6:

$$a = \beta_0 + \beta_1(-1) + \beta_2(-1) + \beta_{12}(-1)(-1) + \varepsilon_1 \quad \text{Equação 3}$$

$$b = \beta_0 + \beta_1(+1) + \beta_2(-1) + \beta_{12}(+1)(-1) + \varepsilon_2 \quad \text{Equação 4}$$

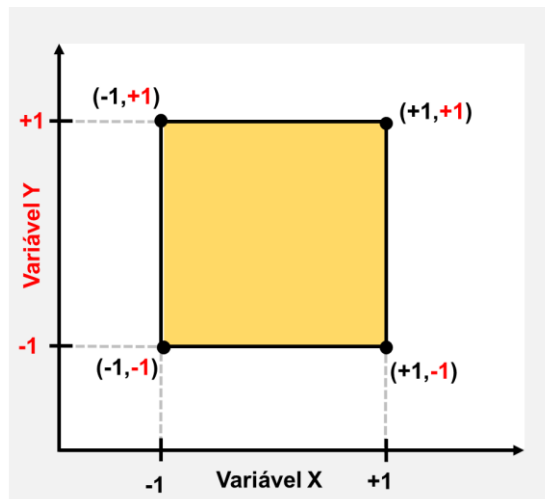
$$c = \beta_0 + \beta_1(-1) + \beta_2(+1) + \beta_{12}(-1)(+1) + \varepsilon_3 \quad \text{Equação 5}$$

$$d = \beta_0 + \beta_1(+1) + \beta_2(+1) + \beta_{12}(+1)(+1) + \varepsilon_4 \quad \text{Equação 6}$$

Essas equações podem ser escritas de forma matricial:

$$y = X\beta + \varepsilon, \text{ onde } y = \begin{bmatrix} a \\ b \\ c \\ d \end{bmatrix} \text{ e } X = \begin{bmatrix} +1 & -1 & -1 & +1 \\ +1 & +1 & -1 & -1 \\ +1 & -1 & +1 & -1 \\ +1 & +1 & +1 & +1 \end{bmatrix}, \beta = \begin{bmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \\ \beta_2 \\ \beta_{12} \end{bmatrix}, \text{ e } \varepsilon = \begin{bmatrix} \varepsilon_1 \\ \varepsilon_2 \\ \varepsilon_3 \\ \varepsilon_4 \end{bmatrix} \quad \text{Equação 7}$$

Figura 8 – Representação esquemática dos experimentos gerados pelo planejamento experimental fatorial 2^2 em um quadrado onde cada vértice é um experimento do planejamento.



Fonte: Elaborado pela autora.

O método dos mínimos quadrados pode então ser utilizado para fazer uma estimativa dos parâmetros β 's que minimizam a soma dos quadrados dos erros ε_i . Os parâmetros β estimados são descritos como:

$$\hat{\beta} = (X'X)^{-1}X'y \quad \text{Equação 8}$$

onde ' denota a matriz transposta, $(X'X)^{-1}$ a matriz inversa de $X'X$. Para um planejamento 2^2 as operações com as matrizes $X'X$ e $X'y$ tem como resultado o que se segue:

$$X'X = \begin{bmatrix} 4 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 4 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 4 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 4 \end{bmatrix} \text{ e } X'y = \begin{bmatrix} +a & +b & +c & +d \\ -a & +b & -c & +d \\ -a & -b & +c & +d \\ +a & -b & -c & +d \end{bmatrix} \quad \text{Equação 9}$$

A resolução da equação 9 dá-se pela multiplicação das duas resoluções acima, resultando em:

$$\hat{\beta} = \begin{bmatrix} \frac{+a+b+c+d}{4} \\ \frac{-a+b-c+d}{4} \\ \frac{-a-b+c+d}{4} \\ \frac{+a-b-c+d}{4} \end{bmatrix} \quad \text{Equação 10}$$

A variância de qualquer modelo de regressão pode então ser encontrada pela equação 11.

$$V(\hat{\beta}) = \sigma^2 \times \text{elemento diagonal da matriz } (X'X)^{-1} \quad \text{Equação 11}$$

$$= \frac{\sigma^2}{4}$$

Esta resolução implicou no desenvolvimento tanto do planejamento D-Ótimo e I-Ótimo, enquanto o design D-Ótimo utiliza a maximização da determinante de $X'X$ para minimizar a variância, o design I-Ótimo utiliza a integral da variância na região:

$$I = \frac{1}{A} \int_{-1}^1 \int_{-1}^1 V[\hat{y}(x_1, x_2)] dx_1 dx_2 \quad \text{Equação 12}$$

onde I é o critério da variância integrada e A é a área do espaço experimental.

Este planejamento é usado, principalmente, quando o objetivo experimental é fazer previsões precisas da resposta, em vez de obter estimativas precisas dos parâmetros do modelo (SMUCKER; KRZYWINSKI; ALTMAN, 2018). Junto com o planejamento Ótimo-D, o Ótimo-I são os dois tipos de planejamento experimental

otimizado mais utilizados (MONTGOMERY, 2017). Esse tipo de planejamento é facilmente por muitos softwares disponíveis comercialmente, como Design-Expert®, JMP® etc. e o é mais recomendado para encontrar uma superfície de resposta (LAWSON, 2014).

Neste trabalho, optou-se por utilizar uma metodologia para o planejamento de experimentos por ter como objetivo a produção de partículas de alginato de cálcio pulverizáveis, que para tanto não poderiam ser maiores que 150 µm, que é o tamanho máximo recomendado para essa aplicação. Somado a isso, a metodologia escolhida para a microencapsulação é, como já explicado, propensa a grandes variações de tamanho de partícula senão bem ajustada com parâmetros controláveis.

Isto posto, diante do aumento vertiginoso da população global nas últimas décadas, da crescente demanda pela produção de alimentos e a busca por tecnologias de controle de pragas no campo mais sustentáveis, este trabalho propõe-se ao desenvolvimento de micropartículas de alginato de cálcio como meio de proteção e liberação do microrganismo *B. amyloliquefaciens* pelo método emulsificação utilizando o Planejamento de Experimentos como uma ferramenta para otimização do tamanho de partícula.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é investigar a microencapsulação do microrganismo *B. amyloliquefaciens* em uma matriz de alginato de cálcio e otimizar o processo de microencapsulação por emulsificação para que o tamanho de partícula das micropartículas seja inferior a 150 µm.

Os objetivos específicos são:

- i. Otimizar o tamanho das micropartículas produzidas pela microencapsulação por emulsificação variando os parâmetros do processo;
- ii. Realizar a microencapsulação do microrganismo *B. amyloliquefaciens* em uma matriz de alginato de cálcio utilizando o método de emulsificação;
- iii. Avaliar a concentração de microrganismos nas micropartículas após microencapsulação;

- iv. Avaliar a eficiência da microencapsulação quanto a sobrevivência do microrganismo ao processo;
- v. Caracterizar a estrutura da micropartícula pelas técnicas de difração a laser, FTIR, TGA e MEV;
- vi. Estudar a liberação sustentada *in vitro* dos microrganismos nas micropartículas;
- vii. Avaliar tempo de sobrevivência dos microrganismos encapsulados;
- viii. Avaliar proteção ultravioleta das partículas sobre os microrganismos;
- ix. Avaliar efeito antagonista dos microrganismos encapsulados em relação aos fungos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Para a microencapsulação foi utilizado alginato de sódio P.A. como material das partículas, cloreto de cálcio P.A. e etanol 99,5% para a produção da solução gelificante. No preparo das emulsões, foram utilizados óleo de soja da marca Concórdia (Archer Daniels Midland Company, EUA) e os surfactantes SpanTM 20, SpanTM 80, TweenTM 20 e TweenTM 80 doados pela empresa Croda do Brasil Ltda. O citrato de sódio P.A. foi utilizado para a solubilização do alginato de cálcio na metodologia de contagem de UFC/g das micropartículas. Cloreto de sódio P.A. foi utilizado na solução salina. Todos os reagentes acima sem especificação de marca foram adquiridos da Casa Americana de Artigos para Laboratório (Brasil).

Para cultivo, manutenção e análise das contagens da cultura de *B. amyloliquefaciens* foi utilizado o meio de cultivo líquido Caldo Nutriente e meio sólido Ágar Nutriente, ambos da Kasvi Importação e Distribuição de Produtos para Laboratórios Ltda. (Brasil). Todas as soluções foram feitas utilizando água destilada.

4.2 Obtenção das micropartículas pelo método de microencapsulação por emulsificação

As micropartículas foram produzidas pelo método de emulsificação adaptado de Rodrigues *et al.* (2006). Em um frasco de vidro, foi adicionado 15 mL da solução de alginato, 30 mL de óleo de soja e uma quantidade de surfactante. A emulsificação

foi realizada por 10 minutos com velocidade de rotação constante em agitador mecânico (713D, Fisatom Equipamentos Científicos Ltda., Brasil). Em seguida, as emulsões foram vertidas em 70 mL de solução gelificante (CaCl_2 0,6 M dissolvido em 37,5 mL de água destilada, 37,5 mL de etanol e 1,0 mL de ácido acético), e mantidas sob agitação por 10 minutos. Ainda sob agitação, foi vertido 150 mL de solução 0,05 M de CaCl_2 à mistura para precipitação das micropartículas. As micropartículas foram recuperadas por decantação. As concentrações da solução de alginato e de surfactante, bem como o tipo de surfactante e a velocidade de agitação do processo foram variados de acordo com planejamento de experimentos detalhado no item 4.3.1.

O processo de microencapsulação do microrganismo está detalhado no item 4.5.4.

4.3 Planejamento de experimentos

4.3.1 Otimização do processo de microencapsulação por emulsificação

Um dos objetivos do presente trabalho foi produzir micropartículas de alginato de cálcio para aplicação em campo por pulverização. Para isso, fez-se necessário adaptação da metodologia de Rodrigues (2006) para que fosse possível atingir tamanhos de partículas compatíveis com os equipamentos comumente utilizados na agricultura.

Levando em consideração a literatura a respeito da influência das variáveis envolvidas no processo de microencapsulação por emulsificação (CHING; BANSAL; BHANDARI, 2017; UYEN *et al.*, 2020), os parâmetros 'concentração de alginato', 'concentração de surfactante', 'velocidade de agitação', e 'tipo de surfactante' foram selecionados como os possíveis influentes no processo.

As concentrações escolhidas para a solução de alginato foram 3,5 e 5,0% m/v, para os surfactantes 1, 3 e 5% m/v (em relação a fase oleosa), e as velocidades de agitações selecionadas foram 500, 1000 e 1500 rpm. Os surfactantes utilizados no desenvolvimento do trabalho foram SpanTM 20, TweenTM 20, SpanTM 80 e TweenTM 80. Com o objetivo de entender as potenciais sinergias entre eles, também foi proposto a utilização das misturas 1:1 de SpanTM 20 e TweenTM 20, e SpanTM 80 e TweenTM 80.

Foi elaborado um planejamento de experimentos fatorial 3^2 com 108 experimentos (Anexo A) visando analisar os efeitos dos 4 parâmetros (concentração

de alginato, concentração de surfactante, velocidade de agitação, e tipo de surfactante) sob o parâmetro de resposta diâmetro da partícula. Para isto, o *software Design-Expert®* foi empregado como ferramenta para planejamento e análise estatística dos resultados. As variáveis e seus respectivos níveis são mostrados no quadro 4.

Quadro 4 – Parâmetros de processo avaliados na otimização da microencapsulação por emulsificação utilizando planejamento de experimentos fatorial 3².

| Parâmetros | Níveis | | |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----------|
| A: concentração de alginato | - | 3,5 (-1) | 5,0 (+1) |
| B: concentração de surfactante | 1,0 (-1) | 3,0 (0) | 5,0 (+1) |
| C: velocidade de agitação | 500 (-1) | 1000 (0) | 1500 (+1) |
| D: tipo de surfactante | Span TM 20, Tween TM 20, Span TM 80, Tween TM 80, mistura 1:1 Span TM 20 e Tween TM 20 e mistura 1:1 Span TM 80 e Tween TM 80 | | |

Fonte: Elaborado pela autora.

Com a intenção de simplificar a escrita, os nomes dos surfactantes foram encurtados para SP20 (SpanTM 20), SP80 (SpanTM 80), TW20 (TweenTM 20), TW80 (TweenTM 80), SPTW20 (mistura 1:1 SpanTM 20 e TweenTM 20, e SPTW80 (mistura 1:1 SpanTM 80 e TweenTM 80).

4.3.2 Estudo das emulsões no processo de microencapsulação

Considerando que as micropartículas obtidas pelo processo de emulsificação são formadas a partir de emulsões precursoras, foi elaborado um planejamento de experimentos adicional com o objetivo de avaliar a influência dos quatro parâmetros descritos no item 4.3.1 na fase da formação de emulsão (figura 10D). Para isso, 42 experimentos (Anexo B) propostos pelo *software Design-Expert®*, onde para cada experimento foi avaliado o tamanho de partícula na fase de emulsificação (tamanho de gota) e após formação das micropartículas (tamanho de partícula). Na fase de emulsificação, após agitação de 10 minutos da solução de alginato, óleo de soja e surfactante, uma alíquota da mistura foi disposta em uma lâmina para análise em microscópio óptico (AXIO Scope.A1, ZEISS Microscopy GmbH, Alemanha) do tamanho de gota segundo metodologia adaptada de Igathinathane *et al.* (2008). As

microscopias de todos os experimentos foram analisadas no *software ImageJ*, onde o diâmetro de mil gotas foi medido e seus valores expressos em termos de D_{90} . O tamanho de partículas das partículas foi avaliado segundo metodologia descrita no item 4.4.3.

4.4 Caracterizações físico-químicas das micropartículas

4.4.1 Determinação da viscosidade das soluções de alginato de sódio

As viscosidades das soluções de alginato de sódio foram determinadas em um viscosímetro rotativo (DV-I Prime, Brookfield, EUA) em concordância com a ISO 3219:1993. Durante as medições, a temperatura foi mantida a 25 °C. As medidas foram feitas em triplicatas.

4.4.2 Determinação da densidade das micropartículas

A densidade foi medida usando o método do picnômetro de acordo com a ISO 1675:1985. As medidas foram feitas em triplicatas. O cálculo da densidade foi calculado a partir da seguinte equação:

$$d = \frac{m(\text{picnômetro} + \text{microcápsulas}) - m_{\text{picnômetro}}}{(m(\text{picnômetro} + \text{H}_2\text{O}) + m(\text{picnômetro} + \text{microcápsulas}) - (m(\text{picnômetro}) + m(\text{picnômetro} + \text{H}_2\text{O} + \text{microcápsulas})))} \quad \text{Equação 13}$$

4.4.3 Análise de distribuição de tamanho de partícula

O tamanho de partícula das micropartículas foi avaliado pela técnica de difratometria de laser utilizando o equipamento BetterSize S3 Plus (Bettersize Instruments Ltd., China). Para a medição, as micropartículas foram dispersas em uma célula de amostra com água destilada até atingir um obscurecimento de 15% a 20%. Os dados de difração a laser obtidos foram expressos utilizando o valor D_{90} , que representa o diâmetro de corte da curva de distribuição acumulada em 90% das partículas totais da amostra.

4.4.4 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier foi conduzida utilizando-se um acessório Frontier 94.942 (PerkinElmer, EUA) na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} com 32 escaneamentos e uma resolução de 4 cm^{-1} com acessório atenuado de refletância total (ATR) equipado com diamante. A análise foi realizada para a identificação dos grupos funcionais presentes nas estruturas químicas do alginato de sódio e alginato de cálcio.

4.4.5 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica analisou o comportamento de perda de massa das amostras em função de um aumento progressivo de temperatura utilizando-se o instrumento STA 6000 (PerkinElmer, EUA). Para isso, as amostras foram aquecidas de 20 a 600 °C com uma taxa de aquecimento constante de 20 °C/min sob fluxo de nitrogênio. Todos os gráficos foram processados utilizando o *software* OriginPro 2009.

4.5 Microencapsulação do microrganismo

Para microencapsulação, foi utilizada uma cepa de *B. amyloliquefaciens* BS01 fornecida pela empresa Agrivalle Brasil Indústria e Comércio de Produtos Agrícolas Ltda.

4.5.1 Manutenção e cultivo da cultura

Em uma cabine de Fluxo Laminar (sem modelo, TROX do Brasil Ltda., Brasil), uma alçada da cultura fornecida, mantida em placa de Petri com Ágar Nutriente, foi inoculada em outra placa de Petri de meio idêntico, e mantida em incubadora BOD (SL-200, Solab Equipamentos para Laboratórios Eireli, Brasil) a 37°C por 24 horas para crescimento das colônias. Após esse período, a cultura foi mantida sob refrigeração a 4°C (RE31, Electrolux do Brasil S.A., Brasil).

O cultivo líquido de *B. amyloliquefaciens* foi realizado utilizando-se uma alçada da cultura mantida em placa de Petri com Ágar Nutriente e inoculando-se em frasco

erlenmeyer de 250 mL de capacidade contendo 100 mL de meio Caldo Nutriente. O cultivo foi realizado em incubadora shaker (SL-223, Solab Equipamentos para Laboratórios Eireli, Brasil) por 48 horas, 37°C e 120 rpm.

4.5.2 Curva de crescimento celular

O crescimento celular de *B. amyloliquefaciens* foi avaliado com o objetivo de identificar as fases de desenvolvimento do microrganismo, de forma a serem obtidas células na fase estacionária de cultivo para serem utilizadas nos ensaios de microencapsulação. O cultivo líquido foi realizado seguindo o método descrito no item 4.5.1. A curva de crescimento celular foi realizada segundo metodologia adaptada de Mcfarland (1907). O método consiste em medir a quantidade de luz que atravessa a amostra por meio da leitura da absorbância em um espectrofotômetro de UV-Vis (GTA-96, Global Trade Technology, Brasil). A leitura da densidade óptica (DO) é realizada no comprimento de onda de 600 nm, onde a densidade celular é considerada proporcional a turbidez do meio, que por consequência, é proporcional também ao número de células. As amostras foram retiradas ao longo de 60 horas com objetivo de avaliar a concentração de células até a fase de declínio celular.

4.5.3 Contagem de células viáveis

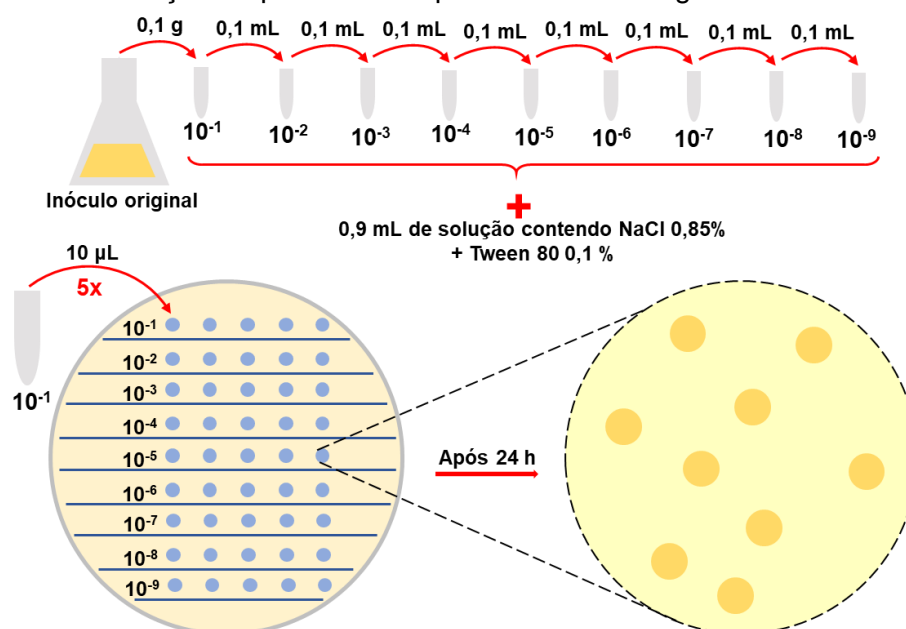
O número de células viáveis foi determinado por meio da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de caldo ou de micropartículas. Para tal foram realizadas diluições decimais seriadas em solução salina estéril 0,85% contendo também 0,1% de TW80. Uma massa de aproximadamente de 0,1 g da amostra foi pesada em um microtubo de 1 mL utilizando uma balança semi-analítica (AW220, Marte Científica & Instrumentação Industrial Ltda., Brasil) e uma espátula estéril. Após isso, 0,9 mL de uma solução salina foi adicionada ao microtubo e seu conteúdo homogeneizado com auxílio de um agitador de tubos tipo Vortex (sem modelo, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Brasil). O procedimento seguiu-se com a diluição serial e decimal do tubo inicial até que o processo chegasse a diluição de 10^{-9} . A inoculação foi baseada no método *spread-plate* adaptado para microgota (STRAHSBURGER *et al.*, 2016), onde 10 µL de cada uma das diluições foi depositada

em uma placa de Petri contendo ágar nutriente em cinco vezes (figura 11). Após 24 horas, a leitura do número de UFC foi realizada, e o cálculo da concentração foi obtido a partir da seguinte equação:

$$C = \frac{\bar{n} \times FD \times 10^2}{m_{real}} \quad \text{Equação 14}$$

onde C é a concentração da amostra em UFG/g, \bar{n} é a média de unidades formadoras de colônia da quintuplicata, FD é o fator de diluição onde se leu a média, 10^2 é a conversão de micrograma para grama, e m_{real} é a massa que amostra que foi pesada.

Figura 9 – Ilustração esquemática do processo de contagem de células viáveis.



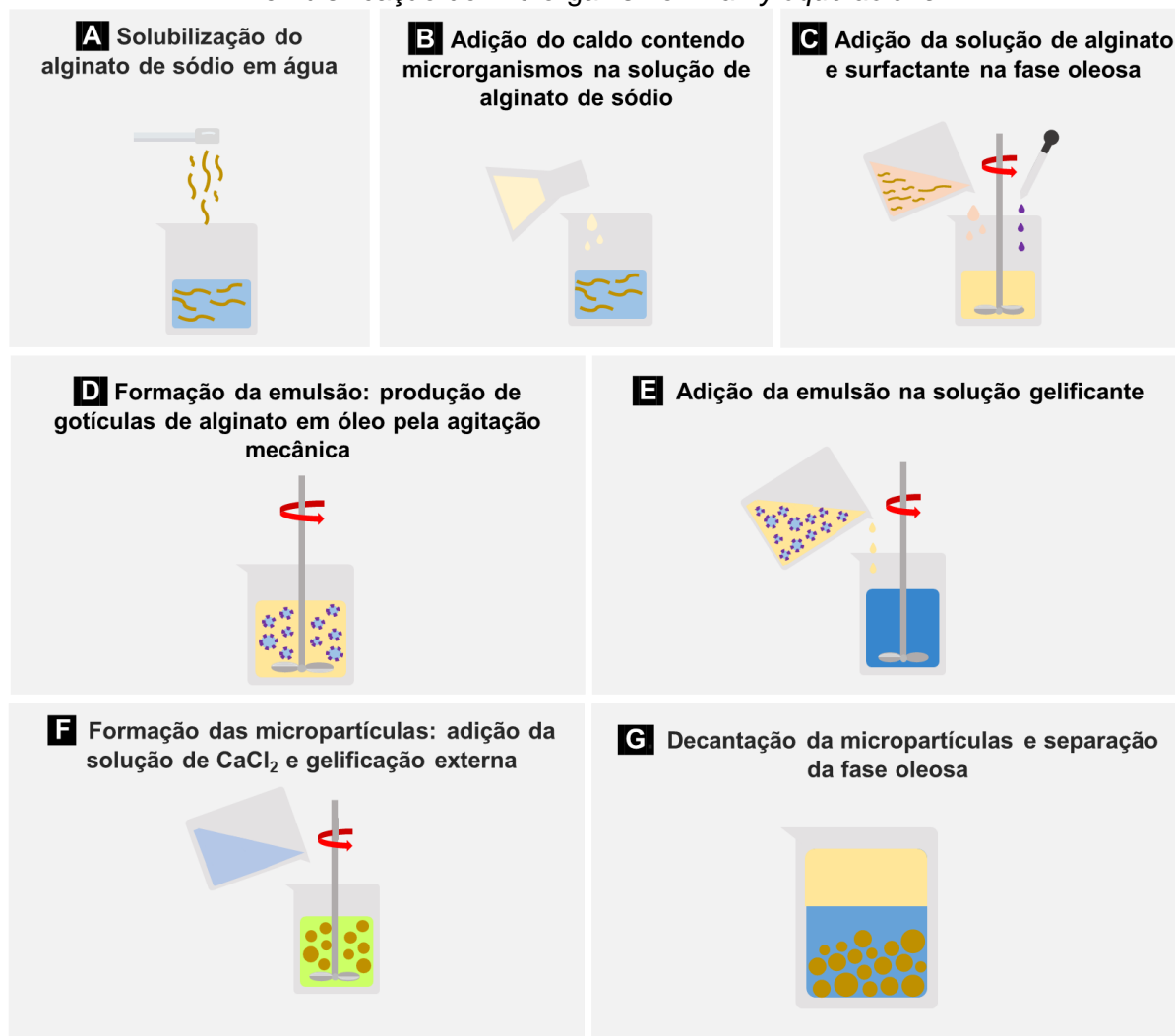
Fonte: Elaborado pela autora.

4.5.4 Processo de microencapsulação dos microrganismos

O processo de microencapsulação da *B. amyloliquefaciens* foi realizado segundo metodologia apresentada no item 4.2 com algumas modificações. O processo está ilustrado na figura 10. Inicialmente, as células foram cultivadas em meio líquido de acordo com item 4.5.1 por 48 horas, tempo necessário para atingir a fase estacionária. A microencapsulação foi executada em ambiente estéril utilizando-se um frasco de vidro com tampa (figura 11). Um orifício de 1,2 cm de diâmetro foi aberto no centro da tampa para passar a haste do agitador mecânico. O frasco foi esterilizado

juntamente com a haste de agitação em uma autoclave vertical (CS-18, Prismatec Indústria e Comércio Eireli, Brasil) por 15 minutos, 121 °C, 1,1 kg/cm².

Figura 10 – Ilustração esquemática das etapas do processo de microencapsulação por emulsificação do microrganismo *B. amyloquefaciens*.



Fonte: Elaborado pela autora.

As soluções de alginato (3,5% m/v e 5,0% m/v) foram preparadas dissolvendo o alginato de sódio em água destilada e, após completa solubilização, aquecidas em banho-maria (Q334M-18, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., Brasil) até 80°C para eliminação de microrganismos estranhos. A solução de CaCl_2 0,5 M, bem como todos os utensílios utilizados foram esterilizados em autoclave.

Após arrefecimento dos materiais, adicionou-se ao frasco 15 mL de alginato de sódio, 30 mL de óleo de soja, 1% (0,3 g) de SP20 e 10 mL do caldo nutriente contendo *B. amyloliquefaciens*. A adição dos reagentes foi feita próxima a uma chama de uma

lamparina para minimizar possíveis contaminações. A emulsificação foi realizada por 10 minutos com agitação constante de 1500 rpm. Em seguida, as emulsões foram misturadas com 70 mL de solução gelificante. À mistura resultante foi adicionado 150 mL de uma solução 0,05 M de CaCl_2 para precipitação das micropartículas. As partículas foram recuperadas por decantação e armazenadas em um frasco de vidro estéril contendo solução salina 0,85% m/v.

A escolha do surfactante, bem como sua concentração e a velocidade de agitação foram escolhidos com base nos resultados obtidos na etapa de otimização do tamanho de partícula. A variação da concentração de alginato em 3,5% e 5,0% foi mantida porque nesta etapa (microencapsulação dos microrganismos) foi avaliado a proteção ultravioleta da partícula de alginato sobre as bactérias, que tínhamos por hipótese poder variar a depender da concentração de alginato de sódio inicial.

Figura 11 – Foto do reator utilizado para a microencapsulação do microrganismo *B. amyloliquefaciens* pelo método de emulsificação.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.5.5 Contagem de células viáveis nas micropartículas

A contagem de células viáveis nas micropartículas foi realizada pesando-se aproximadamente 0,1 g de micropartículas e solubilizando em 0,9 g de uma solução de citrato de sódio 0,1 M por tempo suficiente para que ocorra completa solubilização

das micropartículas utilizando um agitador de tubos tipo vórtex. Após isso, a diluição seriada e a inoculação em placa seguiram-se como no método descrito no item 4.5.3.

4.5.6 Eficiência de encapsulação

As concentrações de células viáveis das amostras que passaram pelo processo de microencapsulação foram avaliadas quanto à eficiência de encapsulação (EE), que mede a perda de viabilidade das células após o processo. A equação que exprime essa avaliação segue:

$$EE = \frac{\text{Concentração de microrganismos após microencapsulação}}{\text{Concentração de microrganismos no caldo}} \times 100\% \quad \text{Equação 15}$$

4.5.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A microestrutura e a morfologia de duas amostras de alginato de cálcio (com e sem microrganismos) foram analisadas pelo Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). As partículas foram separadas da solução salina, onde foram enviadas, pelo processo de centrifugação refrigerada a 4°C e 7000 rpm por 10 minutos. Em sequência, foi acrescido água Milli-Q® às amostras. Uma alíquota de 1 mL da solução contendo as partículas de alginato de cálcio foi retirada e, acrescido a ela 1 mL de paraformaldeído. Após descanso de um dia, as amostras foram desidratadas em solução de etanol, trocando-se a solução por três vezes. As amostras foram depositadas sobre um substrato de Si monocristalino para execução do ponto crítico físico (CPD) (BAT-TEC CPD 030, Micro Surface Engr. Inc., EUA). Para uma visualização da estrutura interna das micropartículas, uma porção das amostras foram submersas em nitrogênio líquido por 15 segundos para indução de fratura nas micropartículas. Todas as amostras foram submetidas ao procedimento de deposição de um filme fino de ouro de 15 nm em uma evaporadora (BAL-TEC SCD 050, Micro Surface Engr. Inc., EUA). Após tratamentos, as amostras foram submetidas a análise de microscopia de varredura (INSPECT F50, Thermo Fisher Scientific, EUA) com detector de elétrons secundários para operação em alto vácuo (EDT), com distância de trabalho de 10 mm e tensão de feixe em 5 kV.

4.5.8 Liberação sustentada de *B. amyloliquefaciens* encapsulado *in vitro*

A avaliação da liberação sustentada do microrganismo *B. amyloliquefaciens* presente nas micropartículas foi realizada em erlenmeyers estéreis contendo solução salina 0,85% m/v e uma massa conhecida de micropartículas para cada amostra. Os frascos mantidos em uma incubadora *shaker* a 37 °C, rotação de 120 rpm por 40 horas. Nos intervalos de 0h, 1h, 2h, 4h, 8h e 40h retirou-se uma alíquota de 100 µL de cada sistema para realizar a contagem de UFC/g de acordo com a metodologia descrita no item 4.5.5. Como branco, foi utilizado micropartículas sem microrganismos. Os ensaios foram feitos em duplicata e expressos cumulativamente.

4.5.9 Estabilidade das micropartículas contendo *B. amyloliquefaciens*

A extensão do prazo de validade de produtos é um objetivo amplamente difundido tanto para a crescente demanda de produtos prontamente disponíveis quanto para aumentar sua sustentabilidade econômica e ambiental em toda a cadeia de abastecimento (GOTOR-VILA *et al.*, 2019).

Para avaliar a viabilidade do *B. amyloliquefaciens* livre e encapsulado foi realizado ensaio de estabilidade. O ensaio consistiu na avaliação da concentração UFC/g em amostras armazenadas a 25°C por um mês. A contagem de UFC/g foi realizada de acordo com a metodologia descrita no item 4.5.5. Para o branco, fez-se avaliação da contagem UFC/g do caldo nutriente contendo microrganismos. Os ensaios foram feitos em duplicata.

4.5.10 Proteção ultravioleta das micropartículas contendo *B. amyloliquefaciens*

A determinação da proteção UV das micropartículas foi feita por meio da contagem de microrganismos livres e presentes nas micropartículas após exposição à luz UV. Para tanto, adicionou-se aproximadamente 0,1 g de cada amostra em uma placa de Petri estéril e amostras independentes foram expostas à radiação UVB (280 a 320 nm) e UVC (100 a 280 nm) a aproximadamente 10 cm de distância. As amostras foram mantidas em exposição por 30 minutos e 60 minutos. Para o branco, fez-se o

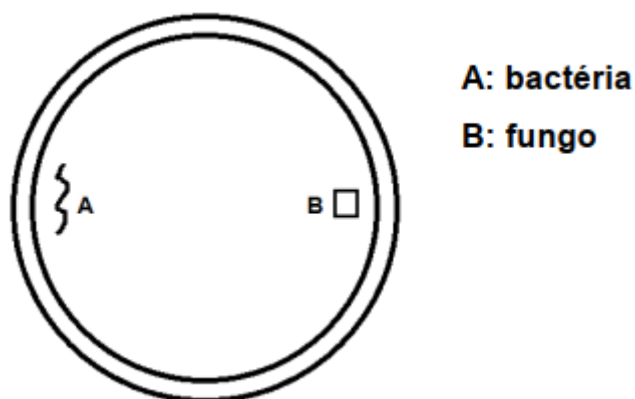
mesmo para a mesma massa de caldo contendo o microrganismo. Os ensaios foram feitos em duplicata.

4.5.11 Avaliação do antagonismo das micropartículas contendo *B. amyloliquefaciens*

A avaliação do antagonismo das micropartículas contendo a bactéria *B. amyloliquefaciens* foi realizado em relação ao controle dos fungos *R. solani* e *S. sclerotiorum* de acordo com metodologia adaptada da empresa Agrivalle (2020). Em uma placa de Petri contendo o meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), inoculou-se um disco micelial do fungo e do lado oposto colocou-se uma ponta de espátula das amostras F2 e F4 (figura 12).

Como controle positivo, utilizou-se uma ponta de espátula das amostras F2 e F4. Após inoculação, as placas de Petri foram colocadas em estufa incubadora BOD a 28 °C. A evolução do crescimento do fitopatógeno e do *B. amyloliquefaciens* foi observada por um período de 7 dias.

Figura 12 – Esquematização do ensaio de *antagonismo*.



Fonte: Adaptado de Agrivalle (2020).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Micropartículas de alginato de cálcio foram preparadas pela técnica de microencapsulação por emulsificação por ser um método de fácil aplicação tecnológica, baixo custo e escalável industrialmente. Pelo método resultar em micropartículas com uma grande distribuição de tamanho (10 µm a 1000 µm), foi

necessário um planejado controle de processo para atingir uma faixa de tamanho adequada. Neste trabalho, buscou-se encontrar o melhor ajuste dos parâmetros estudados com o objetivo de alcançar tamanhos de partícula menores que 150 μm , que apresentam uma maior facilidade de dispersão em formulações, tamanho adequado para pulverização, e grande área superficial facilitando, assim, o contato com o local onde o ativo deve atuar.

Foi estudado também a microencapsulação do microrganismo *B. amyloliquefaciens* utilizando variações do processo que atingiram os menores tamanho de partícula, bem como avaliado a morfologia das micropartículas, a eficiência de encapsulação, concentração final de microrganismos nas micropartículas, tempo de prateleira, proteção UV que as micropartículas ofereceram ao microrganismo, bem como a atividade antifúngica da formulação particulada em relação a microrganismo não encapsulado.

5.1 Planejamento de experimentos

5.1.1 Estudo das emulsões no processo de microencapsulação

O tamanho de gotas das 42 emulsões obtidas pelo planejamento de experimentos descrito no item 4.3.2 está apresentado na tabela 1. É possível observar uma grande flutuação nos valores obtidos, com a maioria dos tamanhos de partícula (72%) observada entre 25 a 75 μm .

Tabela 1 – Tamanho de gota médio e desvio padrão obtidos por análise de microscopia óptica, onde foi considerado o D_{90} .

| Experimento | Diâmetro (μm) | Experimento | Diâmetro (μm) | Experimento | Diâmetro (μm) |
|-------------|----------------------------|-------------|----------------------------|-------------|----------------------------|
| 1 | 28 \pm 15 | 15 | 46 \pm 22 | 29 | 47 \pm 36 |
| 2 | 40 \pm 23 | 16 | 34 \pm 19 | 30 | 68 \pm 37 |
| 3 | 42 \pm 18 | 17 | 59 \pm 23 | 31 | 86 \pm 36 |
| 4 | 30 \pm 19 | 18 | 37 \pm 18 | 32 | 65 \pm 29 |
| 5 | 38 \pm 19 | 19 | 164 \pm 87 | 33 | 60 \pm 23 |
| 6 | 15 \pm 22 | 20 | 19 \pm 9 | 34 | 79 \pm 32 |
| 7 | 16 \pm 20 | 21 | 53 \pm 22 | 35 | 83 \pm 38 |
| 8 | 27 \pm 17 | 22 | 56 \pm 29 | 36 | 57 \pm 27 |
| 9 | 28 \pm 16 | 23 | 78 \pm 29 | 37 | 41 \pm 22 |

| | | | | | |
|----|---------|----|---------|----|---------|
| 10 | 38 ± 21 | 24 | 84 ± 43 | 38 | 51 ± 27 |
| 11 | 14 ± 10 | 25 | 75 ± 39 | 39 | 94 ± 42 |
| 12 | 70 ± 36 | 26 | 33 ± 17 | 40 | 96 ± 45 |
| 13 | 65 ± 27 | 27 | 64 ± 40 | 41 | 12 ± 6 |
| 14 | 65 ± 37 | 28 | 66 ± 33 | 42 | 90 ± 36 |

Fonte: Elaborado pela autora.

Para uma avaliação mais profunda dos resultados obtidos e para compreender a influência dos parâmetros sob o tamanho das gotas nas emulsões, uma análise de regressão múltipla foi aplicada utilizando o *software Design-Expert®*. A equação que melhor se ajustou ao sistema foi obtida pelo processo de interação de dois fatores (2FI) apresentando coeficiente de correlação (R^2) de 0,87, valor-F de 3,96 e valor-p de 0,0038, mostrando que o modelo obtido foi estatisticamente significativo. Um resumo da Análise de Variância (ANOVA) é apresentado na tabela 2.

Tabela 2 – ANOVA para o modelo proposto pelo software Design-Expert da influência de 4 parâmetros sob o tamanho de partícula na fase de emulsificação.

| Fonte | Soma dos quadrados | GL | Quadrado médio | valor-F | valor-p |
|---------------------------------|--------------------|----|----------------|---------|---------|
| Modelo | 31075,26 | 26 | 1195,20 | 3,96 | 0,0038 |
| Concentração de alginato - A | 0,01 | 1 | 0,01 | 0,00 | 0,9949 |
| Concentração de surfactante - B | 146,36 | 1 | 146,36 | 0,48 | 0,4970 |
| Velocidade de agitação - C | 612,08 | 1 | 612,08 | 2,03 | 0,1751 |
| Tipo de surfactante - D | 8375,65 | 5 | 1675,13 | 5,54 | 0,0043 |
| AB | 706,74 | 1 | 706,74 | 2,34 | 0,1469 |
| AC | 1805,62 | 1 | 1805,62 | 5,98 | 0,0273 |
| AD | 7401,01 | 5 | 1480,20 | 4,90 | 0,0074 |
| BC | 6119,38 | 1 | 6119,38 | 20,26 | 0,0004 |
| BD | 2844,68 | 5 | 568,94 | 1,88 | 0,1572 |
| CD | 910,01 | 5 | 182,00 | 0,60 | 0,6991 |
| Resíduo | 4531,48 | 15 | 302,10 | - | - |
| Falta de ajuste | 4220,22 | 10 | 422,02 | 6,78 | 0,0238 |

GL: graus de liberdade.

Fonte: Elaborado pela autora.

A partir dos resultados de ANOVA, observa-se que a variável D, assim como as interações de AC, AD, BC, foram significativas na determinação do tamanho de gota (valor-p <0,05). Três parâmetros já são conhecidos pela literatura como importantes na microencapsulação pelo método de emulsificação, os parâmetros A, B e C (MOFIDI; AGHAI-MOGHADAM; SARBOLOUKI, 2000; ONG *et al.*, 2015;

RODRIGUES *et al.*, 2006). No entanto, não foi encontrado na literatura trabalhos que considerassem o ajuste dos parâmetros na fase de emulsificação como um aspecto importante no método de microencapsulação por emulsificação, avaliando apenas o tamanho de partícula para as partículas formadas. O resultado observado na ANOVA para esta fase mostra que a variável mais crítica ao processo é o tipo de surfactante (D). Os surfactantes desempenham uma função essencial no processo de emulsificação e são frequentemente usados como uma ferramenta para reduzir o tamanho de gota e estabilizar emulsões (BAUDRON; GURIKOV; SMIRNOVA, 2019). Como as emulsões não são sistemas espontaneamente estáveis e possuem tendência a se desfazerem, os surfactantes, também chamados de emulsificantes neste caso, podem ser utilizados para estabilizar estes sistemas aumentando sua estabilidade cinética (ZHANG *et al.*, 2018a). Ao adsorver na interface água-óleo, os surfactantes diminuem a tensão interfacial entre as duas fases, diminuindo a pressão coesiva de Laplace (BAUDRON; GURIKOV; SMIRNOVA, 2019).

Os surfactantes não-iônicos (utilizados neste trabalho), podem ser classificados em termos de balanço hidrofílico-lipofílico (HLB). O valor de HLB de um emulsificante é o grau de hidrofobicidade ou lipofilicidade do surfactante (ONG *et al.*, 2015). Historicamente, os emulsificantes são divididos entre os surfactantes com valores de HLB entre 8 e 15, que são adequados para a produção de emulsões óleo em água (O/A), e os que possuem valor de HLB entre 3 e 6, utilizados em emulsões água em óleo (A/O) (GRIFFIN, 1949). O uso de agentes tensoativos com diferentes valores de HLB e estrutura química pode fornecer uma boa gama para seleção de uma molécula que auxilie o sistema a atingir o menor diâmetro das gotas das emulsões. Devido a isso, os surfactantes que foram escolhidos neste trabalho têm uma ampla faixa de valores de HLB: SP20 (HLB = 8,6), TW20 (HLB = 16,7), SP80 (HLB = 4,3) e TW80 (HLB = 15) (FOO *et al.*, 2020). Além disso, as misturas dos emulsificantes apresentam valores de HLB intermediário, SPTW20 (HLB = 12,6) e SPTW80 (HLB = 9,6) (NOLLET *et al.*, 2019).

Como foi observado que o tipo de surfactante impacta diretamente no tamanho de gota, a equação que modela o sistema foi expressa para cada surfactante em termos das demais variáveis (tabela 3).

O modelo apresentado na tabela 3 está expresso em termos de valores reais, onde cada parâmetro possui uma unidade específica associada à unidade utilizada

durante a formulação. Com base nisso, o resultado do modelo sugeriu que os sistemas que utilizaram o SP20 e SP80 apresentaram os valores mais promissores, indicados por seus valores de linha de base mais baixos entre os surfactantes avaliados. O surfactante SP20 é um monolaurato de sorbitano e SP80, um monooleato de sorbitano. Eles foram escolhidos precisamente porque são as moléculas precursoras de seus pares TW20 e TW80. Enquanto os Spans têm cadeias mais curtas (346 Da para SP20 e 429 Da para SP80), os Tweens, suas versões etoxiladas, possuem cadeias que podem chegar a 1227 Da e 1310 Da, para TW20 e TW80, respectivamente. Os menores diâmetros de gotas observados para SP20 e SP80 podem ser atribuídos à melhor interação superficial entre as gotas da solução de alginato e o óleo de soja, uma vez que a massa molar mais baixa e o pequeno comprimento da cadeia carbônica dos Spans são favorecidos em sistemas lipofílicos.

Tabela 3 – Valores das equações do modelo produzido associados a cada parâmetro (A, B, C e interações) separados por tipo de surfactante.

| Termos do modelo | Surfactante | | | | | |
|------------------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | SP20 | TW20 | SPTW20 | SP80 | TW80 | SPTW80 |
| Linha de base | -2,54 | 57,18 | 38,50 | -53,90 | 102,00 | 85,72 |
| A | 25,59 | 35,92 | 20,21 | 40,66 | 3,02 | 23,72 |
| B | -5,79 | -21,99 | -5,43 | -11,29 | -10,98 | -14,90 |
| C | -0,02 | -0,03 | -0,01 | 0,00 | -0,02 | -0,04 |
| AB | -2,64 | -2,64 | -2,64 | -2,64 | -2,64 | -2,64 |
| AC | -0,02 | -0,02 | -0,02 | -0,02 | -0,02 | -0,02 |
| BC | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |

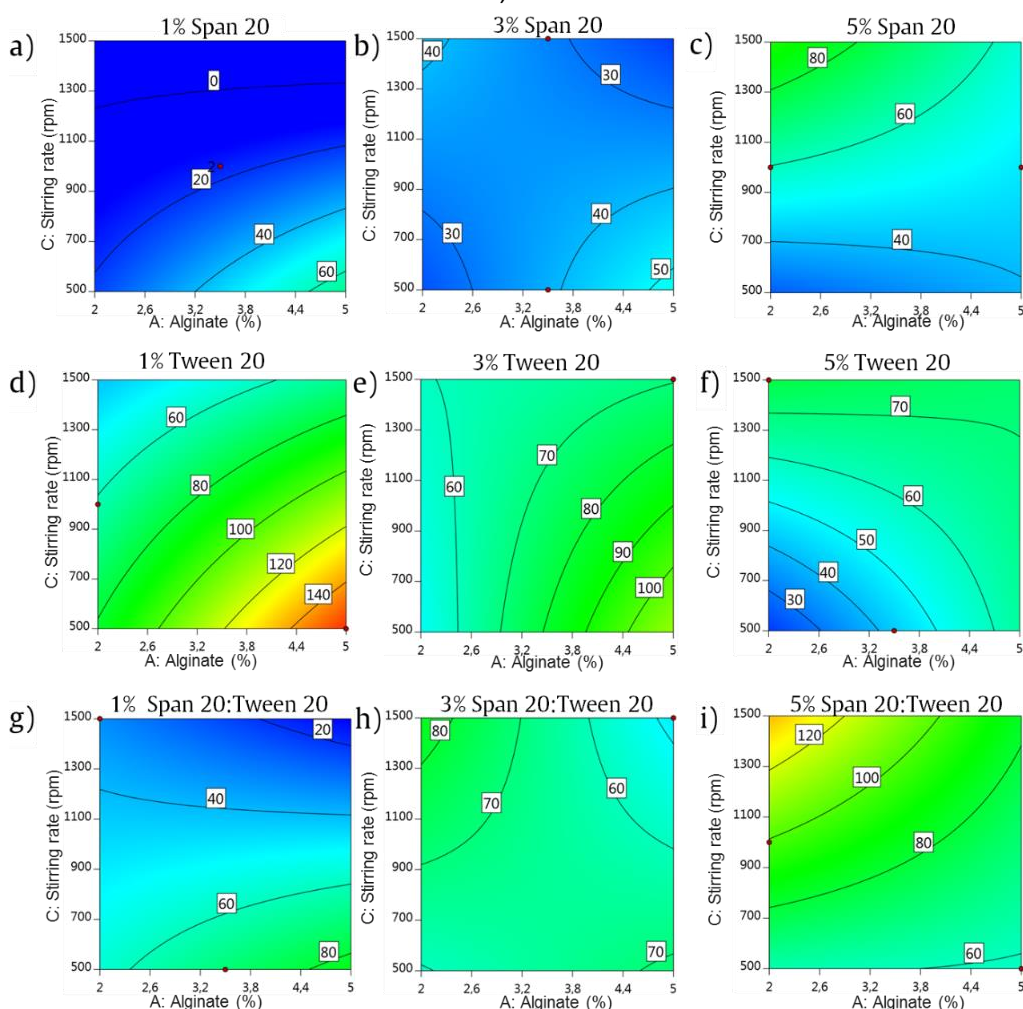
Fonte: Elaborado pela autora.

A influência dos parâmetros concentração de alginato e velocidade de agitação sob o tamanho de gota foi ainda elucidada usando gráficos de superfície contorno apresentados na Figura 13, para os sistemas que usaram SP20 e TW20, e na Figura 14, para os sistemas que usaram SP80 e TW80.

Os gráficos de contorno relacionados ao SP20 (fig. 13 (a-c)) indicaram que o diâmetro de gota foi mais influenciado pelas variáveis A e C para concentração de 1%, enquanto conforme observado na figura 13b e 13c (3 e 5% de SP20, respectivamente) estas variáveis tiveram menor influência. O sistema SP20 a 1% foi o que apresentou os menores tamanhos de gota, o que é explicado pela sua baixa massa molar em relação aos outros emulsionantes, e a sua estrutura química. Para o TW20 (fig. 13 (d-

f), os menores tamanhos de gotas foram observados a 5% de concentração do surfactante, mostrando uma tendência oposta ao do SP20. Enquanto para o SP20 a 1%, menores concentrações de alginato e maior velocidade de agitação promoveram tamanhos de gota menores, para TW20 a 5%, essa tendência foi invertida, ou seja, maiores concentrações de alginato e menores velocidades de agitação promoveram os menores diâmetros. Para os sistemas SPTW20, não foi possível observar uma tendência bem definida, no entanto a concentração de surfactante que apresentou as menores gotas foi a de 1% em 1500 rpm.

Figura 13 – Gráficos de superfície de contorno mostrando o efeito dos parâmetros (velocidade de agitação e concentração de alginato) no diâmetro das gotas: a) 1% SP20, b) 3% SP20, c) 5% SP20, d) 1% TW20, e) 3% TW20, f) 5% TW20, g) 1% SPTW20, h) 3% SPTW20 e i) 5% SPTW20.

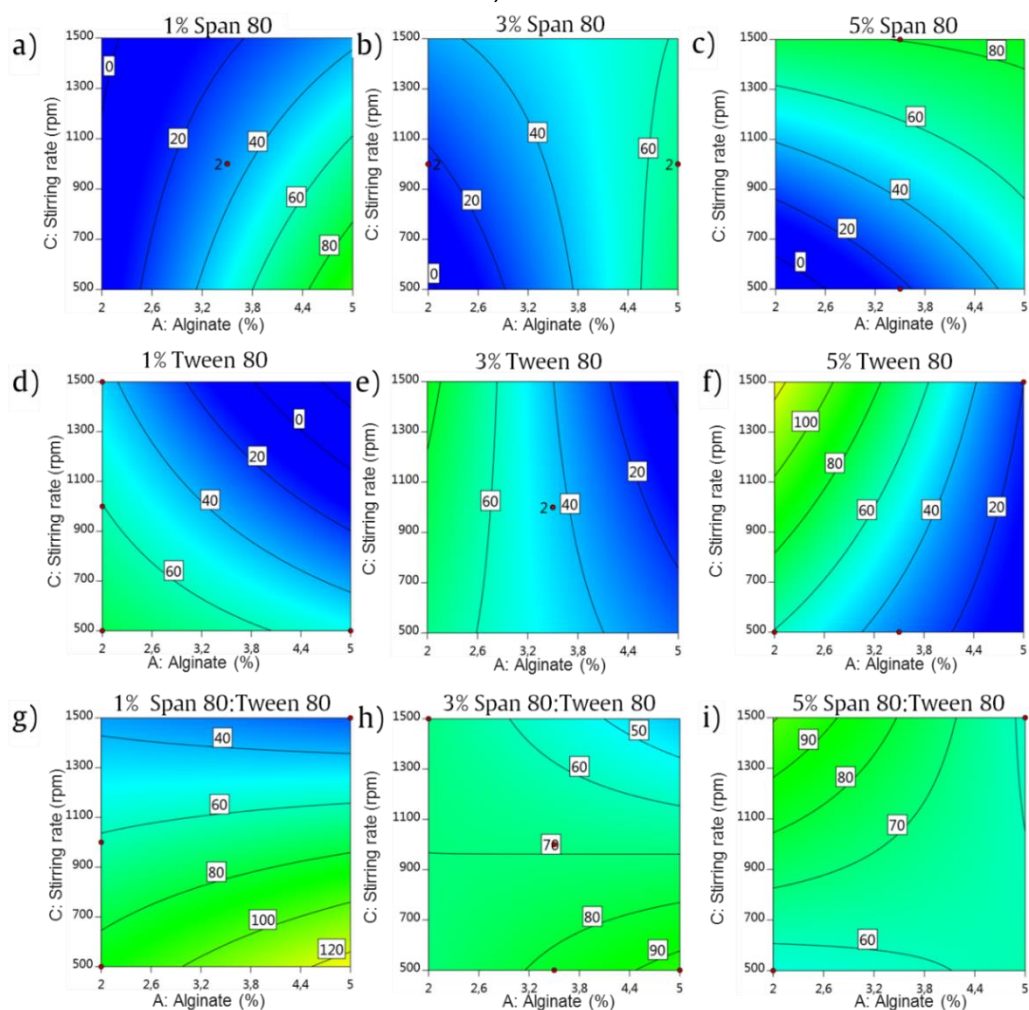


Fonte: Elaborado pela autora.

Ao avaliar os gráficos de contorno da figura 14, pode-se observar que para SP80 a 1 e 5% (fig. 14a e fig. 14c) e TW80 a 1% (fig. 14d), um menor tamanho de

gota pode ser alcançado. No entanto, da mesma forma do que foi observado para os sistemas usando SP20 e TW20, não houve uma tendência global para cada tipo de surfactante, mostrando uma variação de comportamento para cada surfactante e sua concentração. Embora algumas condições possam ser estabelecidas como mais indicadas em uma determinada concentração de surfactante, é importante destacar que avaliando a forma geral presente em cada superfície de resposta para cada concentração, nota-se que cada um apresenta uma tendência diferente na contribuição das variáveis A e C. Esta observação explica o porquê a resposta obtida no teste de ANOVA indicou que a variável mais importante está associada ao tipo de surfactante, já que dependendo da escolha do tipo de surfactante na formulação, a contribuição de cada parâmetro não seguiu um padrão.

Figura 14 – Gráficos de superfície de contorno mostrando o efeito dos parâmetros (velocidade de agitação e concentração de alginato) no diâmetro das gotas: a) 1% SP80, b) 3% SP80, c) 5% SP80, d) 1% TW80, e) 3% TW80, f) 5% TW80, g) 1% SPTW80, h) 3% SPTW80 e i) 5% SPTW80.



Fonte: Elaborado pela autora.

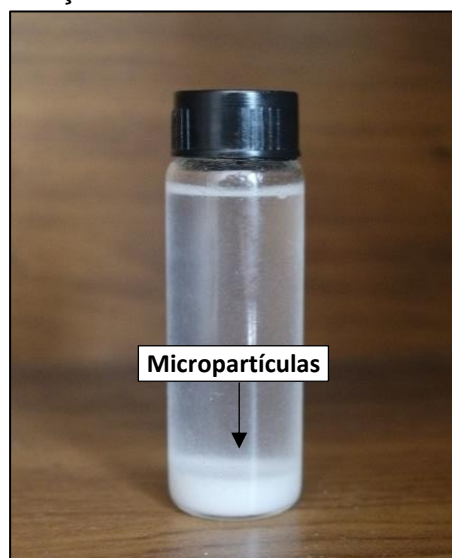
Chuah *et al.* (2009) estudaram a microencapsulação por emulsificação usando uma metodologia adaptada. Em seu trabalho, as emulsões de alginato foram produzidas com iso-octano como fase contínua e SpanTM 85 (HLB = 1,8), sendo observado tamanhos de gota com distribuição muito estreita, variando em tamanho médio de 18 a 22 μm de diâmetro. Os autores também mostraram que, ao variar a concentração da solução de alginato de 0,1 a 3%, as gotas diminuíram de tamanho, o que é uma tendência semelhante a alguns sistemas deste trabalho. No estudo de Picone e Cunha (2013) foi investigado o TW20 e TW80 em associação com quitosana, um polissacarídeo catiônico. Embora os dois surfactantes sejam de cadeia longa e de alta massa molar, os autores mostraram que houve diferenças na associação entre quitosana-surfactante, mostrando que o comprimento da cadeia do TW20 foi mais adequado à composição do sistema. Segundo eles, a interação quitosana-surfactante pode se interagir por ligação de hidrogênio entre os grupos hidroxila e carbonila do éster de sorbitano e os grupos hidroxila e carboxila da quitosana. Interações semelhantes são esperadas para complexos de alginato-TW20.

É importante destacar que nenhum trabalho encontrado avaliou a contribuição desses parâmetros durante a formação da emulsão no desenvolvimento de micropartículas de alginato de cálcio. Os resultados obtidos aqui indicam que a otimização desta etapa da microencapsulação deve ser avaliada cuidadosamente antes da formação das micropartículas.

5.1.2 Estudo da otimização do processo de microencapsulação

Seguindo-se a formação das micropartículas, a adição da solução gelificante sobre as emulsões promove a reticulação da estrutura do alginato, levando à formação das micropartículas, conforme descrito por Pereda *et. al* (2019). Ji e colaboradores (2019) obtiveram micropartículas de alginato com tamanhos variando entre 150 e 190 μm , enquanto no trabalho de Wu *et al.* (2018) foi observado micropartículas entre 200 e 400 μm , o que mostra que a metodologia aplicada neste trabalho está de acordo com observações da literatura. A figura 15 apresenta uma imagem de um frasco de penicilina contendo as micropartículas decantadas ao fundo.

Figura 15 – Foto mostrando a aparência a olho nu das micropartículas decantadas em uma solução de cloreto de sódio.



Fonte: elaborado pela autora.

A análise de regressão múltipla foi aplicada para avaliação da contribuição de cada parâmetro citado anteriormente (A, B, C e D) no diâmetro das micropartículas. Foi aplicada uma interação de dois fatores, obtendo-se um modelo estatisticamente significativo (valor-p < 0,05) com R^2 de 0,73. A tabela 4 apresenta um sumário da análise de variância, na qual se observa que as variáveis A, C e D, assim como as interações de AB, AD, BD, DC, foram significativas para o diâmetro das partículas.

Tabela 4 – Resultados de ANOVA para o diâmetro das micropartículas obtidos a partir de experimentos RSM.

| Fonte | Soma dos quadrados | GL | Quadrado médio | valor-F | valor-p |
|---------------------------------|--------------------|-----|----------------|---------|----------|
| Modelo | 753103,11 | 26 | 28965,50 | 13,70 | 3,48E-26 |
| Concentração de alginato - A | 107384,25 | 1 | 107384,25 | 50,77 | 6,06E-11 |
| Concentração de surfactante - B | 4795,24 | 1 | 4795,24 | 2,27 | 1,35E-01 |
| Velocidade de agitação - C | 229666,09 | 1 | 229666,09 | 108,59 | 6,36E-19 |
| Tipo de surfactante - D | 293220,47 | 5 | 58644,09 | 27,73 | 4,09E-19 |
| AB | 18741,17 | 1 | 18741,17 | 8,86 | 3,47E-03 |
| AC | 5366,33 | 1 | 5366,33 | 2,54 | 1,14E-01 |
| AD | 34506,73 | 5 | 6901,35 | 3,26 | 8,24E-03 |
| BC | 6787,58 | 1 | 6787,58 | 3,21 | 7,55E-02 |
| BD | 44752,04 | 5 | 8950,41 | 4,23 | 1,34E-03 |
| CD | 25982,89 | 5 | 5196,58 | 2,46 | 3,65E-02 |
| Resíduo | 279181,17 | 132 | 2115,01 | - | - |
| Falta de ajuste | 266110,96 | 130 | 2047,01 | 0,31 | 9,56E-01 |

GL: graus de liberdade.

Fonte: Elaborado pela autora.

O modelo de regressão, apresentado na tabela 5, produziu 6 equações a partir do diâmetro das micropartículas descritos em função dos parâmetros A, B e C e das interações (tabela 5).

Tabela 5 – Equação modelo para o diâmetro das micropartículas para cada surfactante em termos de variáveis numéricas, A, B e C.

| Termos do modelo | Surfactante | | | | | |
|------------------|-------------|-------|--------|--------|--------|--------|
| | SP20 | TW20 | SPTW20 | SP80 | TW80 | SPTW80 |
| Linha de base | 85,95 | 92,85 | 118,64 | 141,37 | 139,39 | 250,81 |
| A | 39,14 | 61,44 | 50,93 | 58,56 | 54,68 | 27,24 |
| B | 11,01 | 26,29 | -2,31 | -0,07 | 0,64 | -1,03 |
| C | 0,08 | -0,14 | -0,09 | -0,07 | -0,04 | -0,06 |
| AB | -5,38 | -5,38 | -5,38 | -5,38 | -5,38 | -5,38 |
| AC | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 | -0,01 |
| BC | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 |

Fonte: Elaborado pela autora.

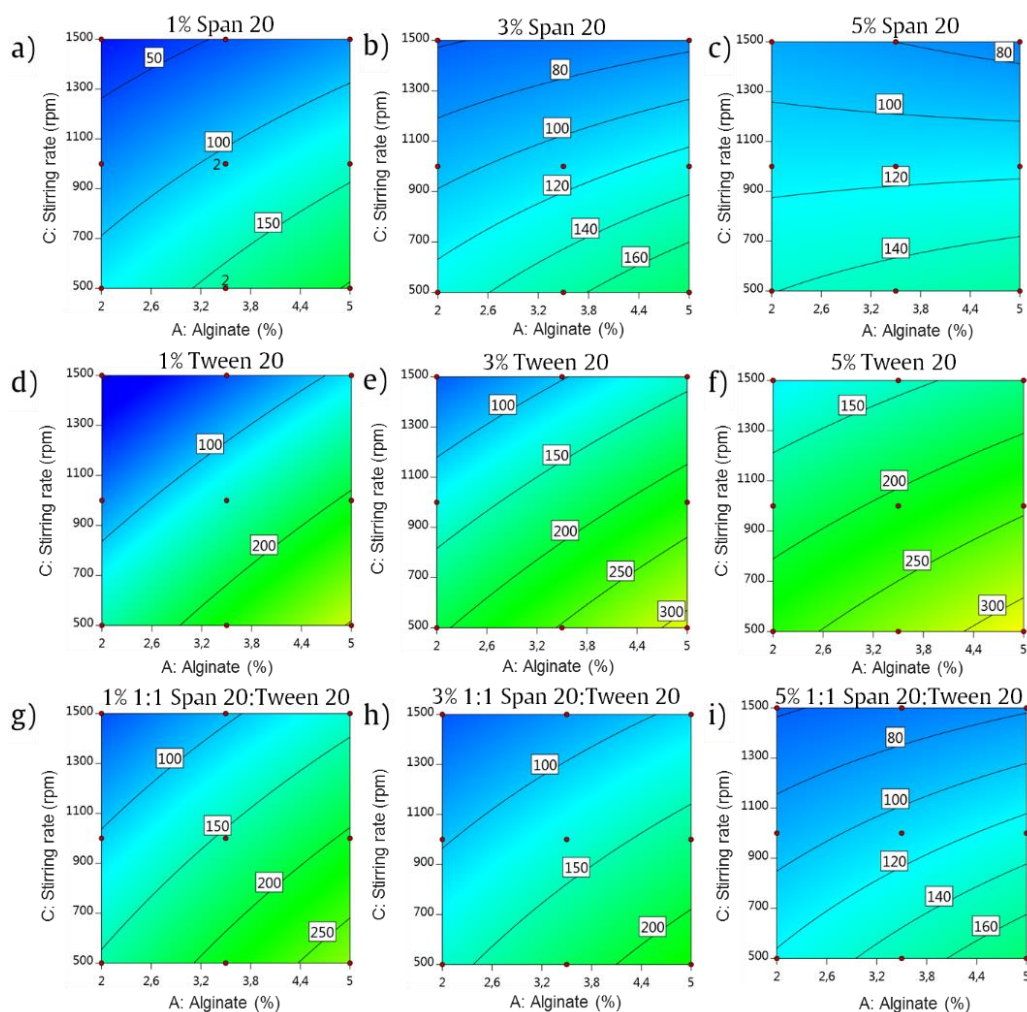
Avaliando-se os termos das equações foi possível verificar que a linha de base para a mistura SPTW80 (250,81) apresenta um valor significativamente superior aos outros sistemas, tornando-o inadequado para formulação de partículas menores que 150 μm . Por outro lado, os sistemas que utilizaram SP20 e TW20 apresentaram os valores de linha de base mais baixos, sendo os sistemas mais promissores. Os surfactantes SPTW20, SP80 e TW80 apresentaram um valor intermediário de linha de base. Ao observar-se os valores de todos os parâmetros, os sistemas que utilizaram SP20 se destacaram, pois, neste sistema as variáveis A, B e C apresentaram os menores valores, indicando um menor impacto no diâmetro das partículas. O SPTW20 também se mostrou adequado, apresentando um valor para o fator B negativo, podendo causar uma diminuição do diâmetro das partículas.

Embora o surfactante SP80 seja relevante na diminuição do tamanho de gotas na fase de emulsificação, o mesmo desempenho não é observado para as micropartículas, o que para o SP se mantém. Isto pode ser explicado pelo valor médio do HLB do SP20. Dentre os surfactantes utilizados neste trabalho, o SP80 é o menos hidrofílico, apresentando um HLB de 4,3. Enquanto na fase de emulsificação, o sistema era composto majoritariamente pela fase oleosa, favorecendo a presença de surfactantes com baixo HLB (como SP80 e SP20), na fase da microencapsulação a fase dispersa passou a ser principalmente água e etanol, solventes polares que interagem pouco com moléculas apolares ou que tenham grande parte de sua

estrutura apolar. Isso também pode ser observado para o par TW20 e TW80. Em ambos os casos, têm-se moléculas com cadeia carbônica muito maior do que o par Span, gerando uma pequena contribuição para a redução da tensão superficial do sistema.

A fim de avaliar a influência da concentração de alginato de sódio e da velocidade de agitação, os gráficos de superfície de contorno para todos os sistemas usando SP20 e TW20 são apresentados na figura 16, e os gráficos correspondentes aos sistemas usando SP80 e TW80 são apresentados na figura 17.

Figura 16 – Gráficos de contorno mostrando o efeito da concentração de alginato (A) e velocidade de agitação (C) sobre diâmetro das micropartículas separadas pelo tipo de surfactante (D) e sua concentração (B): a) 1% SP20, b) 3% SP20, c) 5% SP20, d) 1% TW20, e) 3% TW20, f) 5% TW20, g) 1% 1: 1 SPTW20, h) 3% 1: 1 SPTW20, i) 5% 1: 1 SPTW20.



Fonte: Elaborado pela autora.

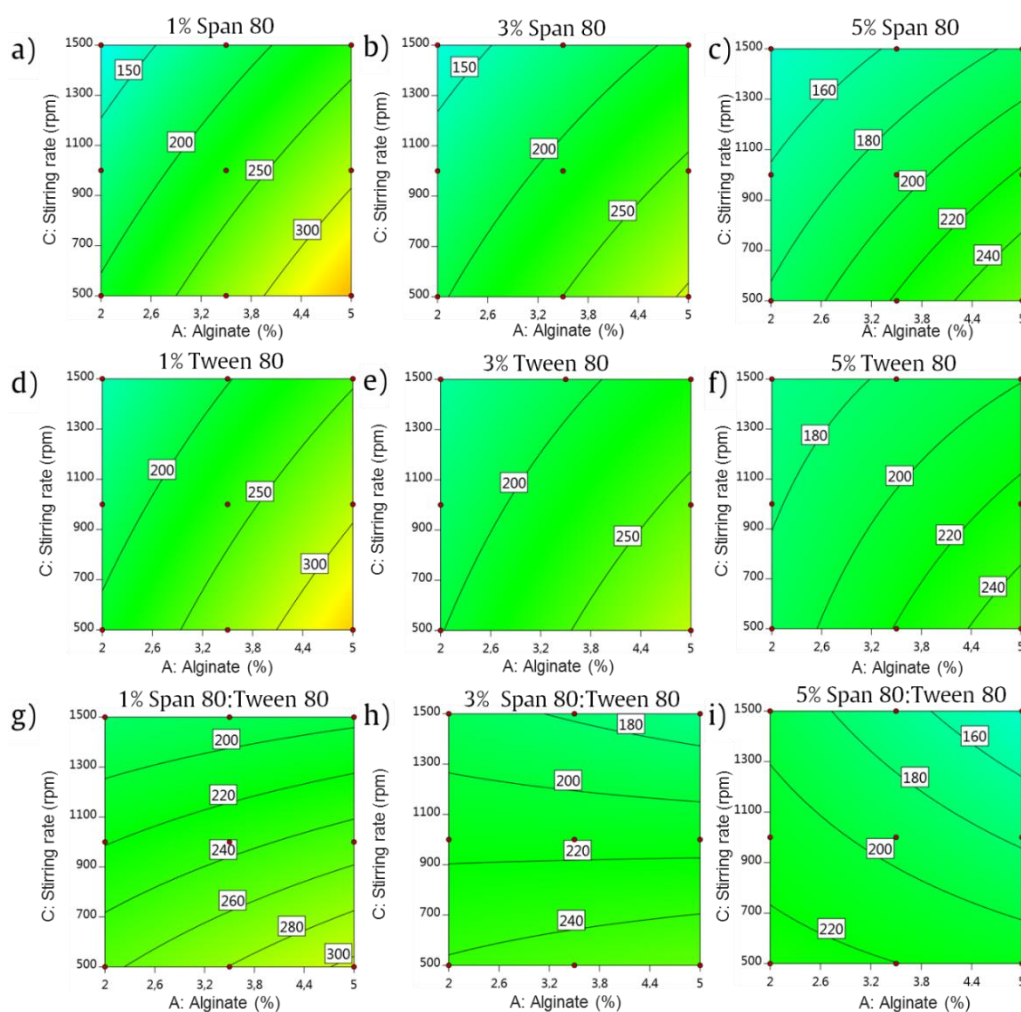
De acordo com os gráficos de contorno apresentados na figura 16 para todas as formulações, micropartículas de tamanho maior foram formadas com maior concentração de alginato. Isso pode ser explicado que o aumento da concentração de alginato de sódio impacta a viscosidade da solução e a resistência do líquido contra a dispersão causada pela agitação durante a emulsificação e microencapsulação, que aumenta a tensão interfacial entre as gotas de alginato e a fase oleosa, e são consistentes com as observações de Rodrigues et al. (2006) e Silva et al. (2006). Além disso, observa-se que o aumento da velocidade de agitação produziu micropartículas menores, o que também é relatado nos trabalhos de Lemos et al. (2017), Rosas-Flores et al. (2013) e Shukla et al. (2014). A agitação é responsável por quebrar a tensão interfacial, e quanto maior a agitação, mais energia é empregada neste processo, permitindo assim uma melhor dispersão do sistema.

Uma tendência semelhante é observada na figura 17 para os sistemas que empregaram SP80 e TW80, no entanto, o sistema TWSP80 apresentou uma inversão no efeito da concentração de alginato, onde concentrações maiores promoveram micropartículas menores a 3% e 5% (fig. 17h e fig. 17i), e pouco ou nenhum efeito para o 1% (fig. 17g). Isso pode ter sido alcançado pelo efeito sinérgico promovido pelos dois surfactantes, uma vez que apresentam um valor de HLB intermediário, permitindo uma boa estabilização da micropartícula mesmo em concentrações mais elevadas de alginato. É importante destacar que ao contrário do observado durante a fase de emulsificação, o formato geral das superfícies observada para nos gráficos de contorno é semelhante dentro de um mesmo surfactante, o que sustenta a ideia de que além do tipo de surfactante, as variáveis A e C também impactam proporcionalmente nestes sistemas, isto é, em geral, em concentrações mais baixas de alginato e velocidades de agitação mais altas, micropartículas com tamanhos menores podem ser obtidas.

No trabalho de Ahmed et al. (2013), que estudaram micropartículas de alginato carregadas com diclofenaco de sódio produzidas pelo método de emulsificação, notou-se que a velocidade de agitação foi o fator mais importante para o controle de tamanho. Rodrigues et al., 2006 relataram uma diminuição no tamanho das micropartículas de alginato quando a taxa de agitação foi aumentada usando SP80 em concentrações de 0,2 a 2,0%. Eles também encontraram uma diminuição no tamanho das partículas com o aumento da quantidade de surfactante. Em outro

trabalho com o mesmo surfactante, Ahmed *et al.* (2013) estudaram a incorporação de diclofenaco de sódio em micropartículas de alginato pelo método de emulsificação e a distribuição do tamanho das partículas. Eles encontraram uma diminuição no tamanho das partículas quando a taxa de agitação e a concentração de surfactante aumentaram. De maneira geral, o que se pode concluir de todos os experimentos referentes à taxa de agitação é que o aumento da taxa de agitação geralmente resulta na diminuição do tamanho das micropartículas, pois produz gotas de emulsão menores por meio de maiores forças de cisalhamento e aumento da turbulência.

Figura 17 – Gráficos de superfície de contorno mostrando o efeito da concentração de alginato (A) e da velocidade de agitação (C) no diâmetro das micropartículas separados pelo tipo de surfactante (D) e sua concentração (B): a) 1% SP80, b) 3% SP80, c) 5% SP80, d) 1% TW80, e) 3% TW80, f) 5% TW80, g) 1% 1: 1 SPTW80, h) 3% 1: 1 SPTW80, i) 5% 1: 1 SPTW80.

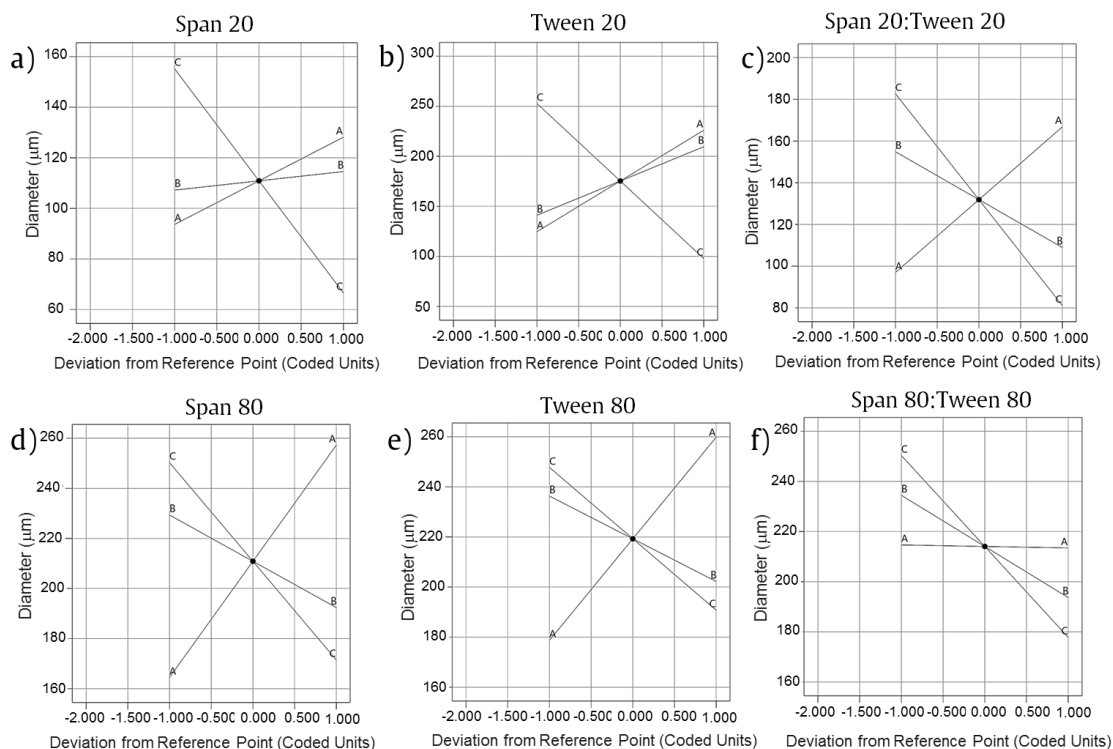


Fonte: Elaborado pela autora.

Alguns trabalhos indicam que um aumento na concentração do surfactante reduziu o tamanho das gotas, consequentemente, menores tamanhos e distribuição de tamanhos das micropartículas foram formados. Porém, existe uma concentração acima da qual esse efeito reduziu sua importância durante a formação das micropartículas, e geralmente está acima de concentrações de aproximadamente 1%, conforme indicado por Rodrigues *et al.* (2006). Essa observação é corroborada pelo modelo ANOVA que indicou que a concentração de surfactante (variável B) apresentou menor influência nos sistemas formulados, uma vez que aplicamos concentrações superiores a 1%.

Para complementar essas avaliações, investigamos a contribuição individual de cada variável por meio de um gráfico de perturbação, que indica o alcance e a influência (aumento ou diminuição) de cada variável no tamanho das micropartículas. O gráfico é apresentado na figura 18 e os dados de interpretação são mostrados na tabela 6.

Figura 18 – Gráfico de perturbação mostrando os efeitos dos fatores no diâmetro das micropartículas separados por tipo de surfactante: a) SP20, b) TW20, c) SPTW20, d) SP80, e) TW80 e f) SPTW80.



Fonte: Elaborado pela autora.

Da figura 18 é observado que para os sistemas individuais aplicando SP20 ou TW20, fig. 18a e fig. 18b, a variável C foi a mais influente (inclinação maior), e o aumento dela promoveu tamanhos menores de micropartículas, enquanto as variáveis A e B induziu um aumento do tamanho das micropartículas. A mistura de SPTW20 induziu um sistema mais instável, em que ambas as variáveis A e C impactaram consideravelmente no tamanho das micropartículas. Para os sistemas que usam SP80 ou TW80, fig. 18d e fig. 18e, a variável mais influente se tornou a concentração de alginato, mas com a influência considerável da taxa de agitação (variável C). Curiosamente, para a mistura de SPTW80, a variável A tornou-se muito estável, o que permite o uso de maior concentração de alginato, o que está de acordo com os gráficos de contorno observados anteriormente.

A tabela 6 mostra a influência de cada variável do nível mais baixo para o mais alto, utilizada neste estudo, enquanto as demais variáveis foram mantidas no valor médio. A partir desses resultados é possível observar que os menores tamanhos de micropartículas foram obtidos nos sistemas utilizando SP20 ou TW20 e sua mistura, em que foram atingidos valores de aproximadamente 60 a 90 μm , enquanto os sistemas utilizando SP80 e TW80 apresentaram os menores valores em 170 μm .

Tabela 6 – Faixa de tamanho do diâmetro das micropartículas para cada variável, mostrando os tamanhos máximo e mínimo das partículas e a variável mais significativa para cada tipo de surfactante.

| Surfactante | Faixa de tamanho para cada variável (µm) | | | | | | Variável Mais Significativa |
|-------------|------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----------------------------|
| | A | | B | | C | | |
| | -1 | 1 | -1 | 1 | -1 | 1 | |
| SP20 | 93 | 128 | 107 | 114 | 155 | 65 | C |
| TW20 | 124 | 225 | 141 | 209 | 252 | 97 | C |
| TWSP20 | 96 | 166 | 154 | 108 | 182 | 81 | ** |
| SP80 | 163 | 257 | 229 | 192 | 250 | 171 | A |
| TW80 | 178 | 260 | 235 | 203 | 250 | 190 | A |
| TWSP80 | 214 | 213 | 234 | 193 | 250 | 177 | C |

** indicam que não é possível estabelecer a variável mais significativa, uma vez que todas as variáveis apresentam uma ampla gama.

Fonte: Elaborado pela autora.

Esses resultados mostram a influência do tipo de surfactante, ao mesmo tempo em que destacam como outras variáveis podem ser controladas para obter partículas menores. Essas observações podem ser expandidas em outros sistemas e mostram

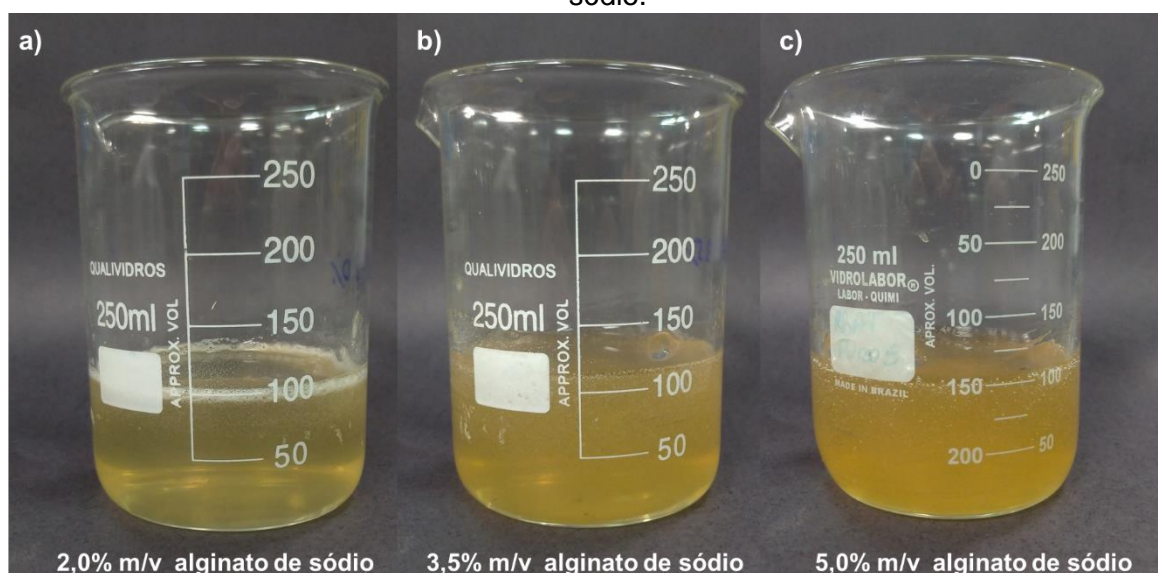
como a metodologia DOE pode ser explorada a fim de otimizar (tanto para aumentar ou diminuir o objetivo) e estabelecer a faixa ideal durante a formulação de partículas.

5.2 Caracterização físico-química das micropartículas

5.2.1 Determinação da viscosidade das soluções de alginato

Segundo Jeoh *et al.* (2021), a viscosidade das soluções de alginato no processo de microencapsulação é um dos fatores que afetam diretamente o tamanho das partículas produzidas, em uma relação diretamente proporcional entre aumento da viscosidade e tamanho de partícula. No trabalho de Lin (2012) também foi mostrado que o aumento da viscosidade da solução altera a morfologia das microcápsulas, que no caso desses autores que utilizaram o método de microencapsulação por atomização foi alterada de um formato chamado por eles de “medusa” para os formatos “hemácias” ou “gotas”. Em vista disso, foi realizado um ensaio para determinação da viscosidade das soluções utilizadas neste trabalho (figura 19). As viscosidades das soluções de 2,0%, 3,5% e 5,0% m/v de alginato de sódio estão apresentadas na figura 20.

Figura 19 – Fotografias das soluções de a) 2,0%, b) 3,5% e c) 5,0% m/v de alginato de sódio.



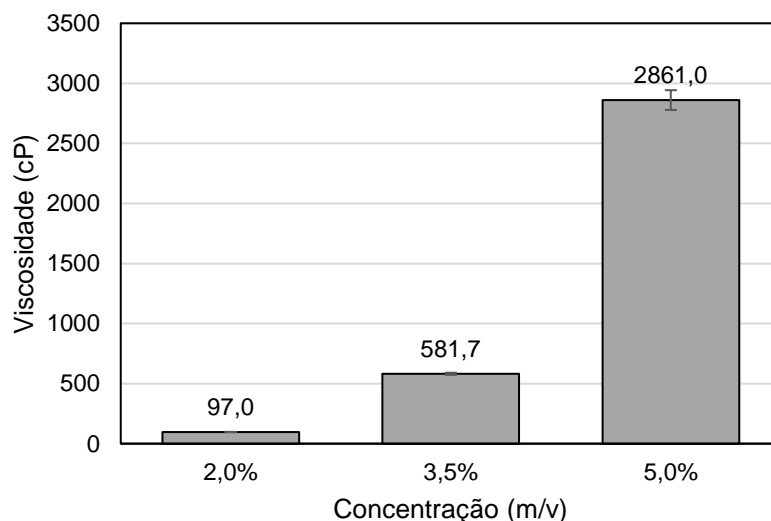
Fonte: Elaborado pela autora.

Os resultados encontrados foram de $97,0 \pm 1,3$ cP, $581,7 \pm 9,0$ cP e $2861,0 \pm 82,3$ cP para as soluções de 2,0%, 3,5% e 5,0% de alginato de sódio,

respectivamente. Os valores obtidos estão diferentes dos encontrados no trabalho de Becker e colaboradores (2001), que encontrou viscosidade de $56,0 \pm 2,1$ cP e $275,0 \pm 7,1$ cP e para as concentrações de 2,0 m/v e 3,5%, respectivamente. Segundo os autores, é comum que soluções de alginato apresentem diferença na viscosidade para a mesma concentração do biopolímero. Isto porque a depender da proporção entre os monômeros M e G na cadeia carbônica, a viscosidade pode aumentar ou diminuir. Em um estudo mais recente, Jiao *et al.* (2019) demonstraram que para a razão M/G de 4,79, em que M e G estão presentes na proporção 82,7% e 17,3%, a viscosidade é maior do que para a razão 3,97 (79,9% de M e 20,1% de G).

O alginato é um polímero de origem natural que a depender da fonte que foi extraído apresenta diferentes propriedades físicas e químicas devido a presença dos três tipos de blocos, a saber GG, MM e MG. De maneira geral, alginatos com alta proporção de blocos M têm uma viscosidade maior, enquanto aqueles com uma maior proporção de blocos G têm maior capacidade de gelificação (RASHEDY *et al.*, 2021).

Figura 20 – Viscosidade dinâmica (cP) das soluções de 2,0%, 3,5% e 5,0% de alginato de sódio a 25°C.



Fonte: Elaborado pela autora.

As técnicas de caracterização mais utilizadas na identificação da razão M/G de alginatos são FTIR e ressonância magnética nuclear de prótons (RMN H^1). Neste trabalho não foi avaliado a razão M/G do alginato utilizado. No entanto, segundo trabalho de Lee *et al.* (2006), o conhecimento da viscosidade da solução de alginato

utilizada na microencapsulação é fato relevante já que possui relação diretamente proporcional ao tamanho de partícula produzida.

5.2.2 Determinação da densidade aparente

Após estudo da otimização do processo realizado no item 5.1.2 quatro formulações foram escolhidas como as mais promissoras para a microencapsulação da bactéria *B. amyloliquefaciens*. As quatro formulações escolhidas, os parâmetros de processo correspondentes, bem como uma nomenclatura para cada uma delas estão apresentadas na tabela 7.

Tabela 7 – Formulações escolhidas do planejamento experimental realizado para a microencapsulação da bactéria *B. amyloliquefaciens*.

| Nomenclatura | Concentração de alginato (m/v) | Velocidade de agitação (rpm) | Tipo de surfactante | Concentração de surfactante (m/v) |
|--------------|--------------------------------|------------------------------|---------------------|-----------------------------------|
| F1 | 3,5 % | 1000 | SP20 | 1,0 % |
| F2 | 3,5 % | 1500 | SP20 | 1,0 % |
| F3 | 5,0 % | 1000 | SP20 | 1,0 % |
| F4 | 5,0 % | 1500 | SP20 | 1,0 % |

Fonte: elaborado pela autora

Em formulações de produtos agrícolas, uma importante característica a ser considerada é a densidade. Produtos para aplicação na forma não diluída (ex.: pós) são de difícil aplicação pela dificuldade de manuseio e considerados por alguns autores como menos efetivos em termos de controle de patógenos (BURGES, 2012). Usualmente, prefere-se suspender o ingrediente ativo em um líquido, como água ou um tipo de óleo, e fazer a aplicação por pulverização. Como esses produtos precisam ter uma boa eficiência em campo e estabilidade quando armazenados, são acrescentados, além da fase contínua, outros aditivos que ajudam a estender o tempo de prateleira (ex.: conservantes), melhorar a espalhabilidade no alvo (ex.: surfactantes) e aditivos que modifiquem a reologia da suspensão para manter as partículas suspensas por mais tempo. Dito isto, o conhecimento da densidade das micropartículas é essencial para produzir uma formulação adequada. A densidade das micropartículas das amostras F1, F2, F3 e F4 estão apresentadas na tabela 8.

Tabela 8 – Densidade aparente das micropartículas de alginato de cálcio obtidas

| Amostra | Densidade (g/cm³) |
|----------------|-------------------------------------|
| F1 | 1,1037 ± 0,0005 |
| F2 | 1,1029 ± 0,0005 |
| F3 | 1,1580 ± 0,0005 |
| F4 | 1,1566 ± 0,0005 |

Fonte: elaborado pela autora

Poucos trabalhos de microencapsulação utilizando alginato como material de parede propuseram-se a realizar a densidade das partículas sintetizadas. Dos poucos encontrados, apenas um utilizou uma metodologia semelhante a este trabalho. No trabalho de Mofidi *et al.* (2000), micropartículas de alginato de cálcio foram preparadas pelo método de emulsificação apresentaram uma densidade muito semelhante às encontradas neste trabalho, de 1,007 g/cm³. Os autores não informaram a concentração da solução de alginato de sódio utilizada no ensaio, no entanto, o artigo informa que foi utilizado concentrações na faixa de 2 a 4 % m/v. Resultado semelhante foi encontrado no trabalho de Juárez-Trujillo e colaboradores (2020), que utilizaram a técnica coacervação complexa para produzir micropartículas de alginato com densidade de 1,028, 1,020, 1,067 g/cm³ a depender do método de secagem (liofilização, estufa e *spray-drying*, respectivamente).

Gholamian *et al.* (2021) investigaram a encapsulação de óleo de cominho em cápsulas de alginato de cálcio produzidas pelo método de extrusão. Assim como os autores anteriores, estes realizaram o estudo da encapsulação em uma faixa de concentração de alginato de sódio (1 a 3% m/v), e não reportaram a concentração que utilizaram para fazer o ensaio de densidade. A densidade obtida por eles foi de 0,74 g/cm³, semelhante ao valor reportado por Benavides *et al.* (2016), 0,76 g/cm³, que utilizaram mesmo método e óleo de tomilho.

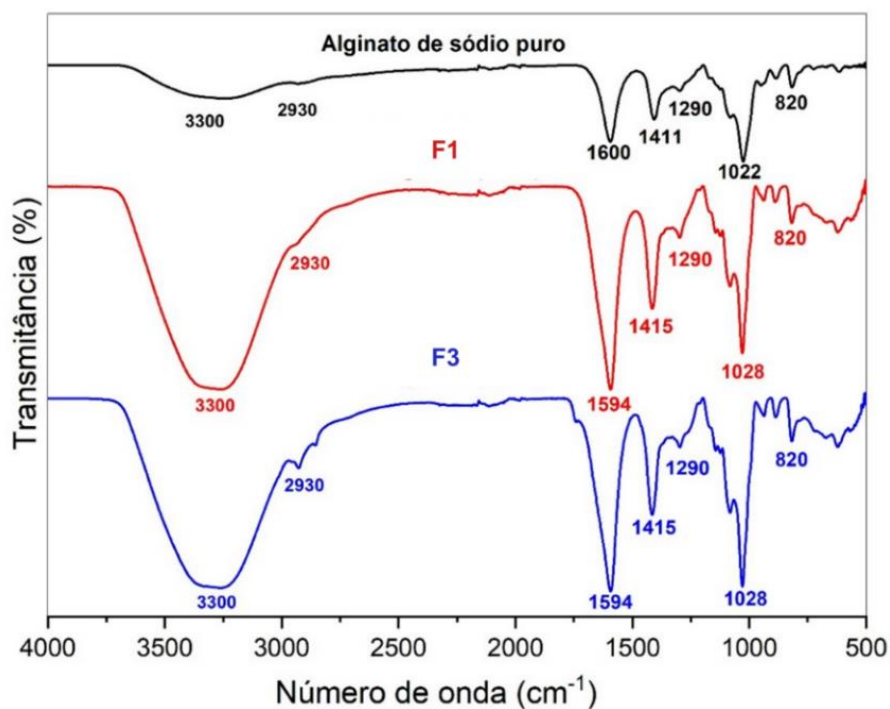
5.2.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Com objetivo de obter-se informação de mudanças em grupos funcionais da estrutura química do alginato de sódio para alginato de cálcio, buscando evidência da complexação do alginato com o íon cálcio, a espectroscopia de absorção no

infravermelho foi empregada. O espectro de infravermelho do alginato de sódio e das amostras F1 e F3 estão apresentados na figura 21.

Analisando o espectro do alginato de sódio puro, nota-se uma banda larga entre 3600–3100 cm^{-1} referente ao estiramento das hidroxilas –OH presentes na cadeia polimérica do alginato devido as ligações de hidrogênio inter e intramoleculares (DA SILVA FERNANDES *et al.*, 2018; ESSIFI *et al.*, 2020). Os picos presentes em 1600 cm^{-1} e 1411 cm^{-1} correspondem, respectivamente, as deformações axiais simétricas e assimétricas dos grupos –COO⁻, indicando a presença do grupo ácido carboxílico na estrutura do alginato. Os dois picos correspondem ao mesmo grupo funcional, o íon carboxilato, que segundo Silverstein *et al.* (2005) são gerados devido a força de ligação de C=O e C–O ser semelhante. De maneira geral, os ombros presentes na região de 2930 cm^{-1} são relacionados a presença do estiramento C–H, enquanto que os picos 1022 cm^{-1} e 1028 cm^{-1} referem-se a ligação C–O–C presente no anel piranosídico (ABDELLATIF *et al.*, 2020)

Figura 21 – Espectro de infravermelho de uma amostra de alginato de sódio e das amostras F1 e F3.



Fonte: Elaborado pela autora.

Como também constatado pelo autor Essifi *et al.* (2020), ao analisar os espectros das micropartículas de alginato de cálcio é possível notar que nenhum novo nível vibracional apareceu, no entanto diferenças entre os espectros surgiram para

um grupo funcional. As vibrações referentes ao grupo carboxilato que interage diretamente com o Ca^{2+} , foram levemente modificadas para outros números de onda. Em um estudo desenvolvido por Hua *et al.* (2010), foi mostrado que a reticulação do polímero com os íons Ca^{2+} provoca mudanças nos picos referentes ao íon carboxilato para número de onda ligeiramente diferentes do polímero sódico. No trabalho desses autores, o grupamento aniônico $-\text{COO}^-$ foi observado em 1621 cm^{-1} e 1414 cm^{-1} para o material não reticulado, e quando reticulado com íons Ca^{2+} teve os picos deslocados para 1603 cm^{-1} e 1420 cm^{-1} . Comportamentos similares foram obtidos neste trabalho, onde foi possível observar que o pico em 1600 cm^{-1} presente no alginato de sódio deslocou-se para 1594 cm^{-1} para o alginato de cálcio, e o pico em 1411 cm^{-1} deslocou-se para 1415 cm^{-1} . Segundo Abdellatif *et al.* (2020), a substituição do íon Ca^{2+} pelo íon Na^+ resulta em uma mudança na massa atômica e na densidade de carga ao redor do grupo carboxílico, causando deslocamentos nas vibrações assimétricas para um número de onda inferior ou superior, bem como também podendo afetar a intensidade dos picos como apresentado por Wong *et al.* (2002).

Não houve grande distinção entre as amostras F1 e F3 nos espectros de infravermelho, que apresentaram como diferente apenas a intensidade do pico em 2930 cm^{-1} para a amostra de F3 referente a ligações C-H alifáticas. O aumento da intensidade deste pico pode estar associado ao aumento da disponibilidade das do grupo C-H e C terciários presentes na amostra com maior concentração do polímero.

5.2.4 Análise termogravimétrica

Com o objetivo de obter-se informação da evidência da complexação do alginato de sódio com o íon cálcio a análise termogravimétrica foi empregue em uma amostra de alginato de sódio em pó e em uma amostra de micropartículas de alginato de cálcio (F3). A figura 22 apresenta as características térmicas obtidas por TGA das amostras de alginato antes e depois da reticulação. A análise termogravimétrica do alginato de sódio apresentou dois eventos principais de perda de massa. O primeiro evento, caracterizado pela perda de 13,5% de água da amostra, iniciou-se, aproximadamente, em 40°C terminando em 134°C . O segundo evento, disposto no intervalo de 222°C a 300°C , apresentou a maior perda de massa da amostra, 35,0%, e é atribuído à degradação da amostra pela decomposição da cadeia carbônica e, consequente formação de Na_2CO_3 . Na curva de DTG, este evento é mostrado no pico

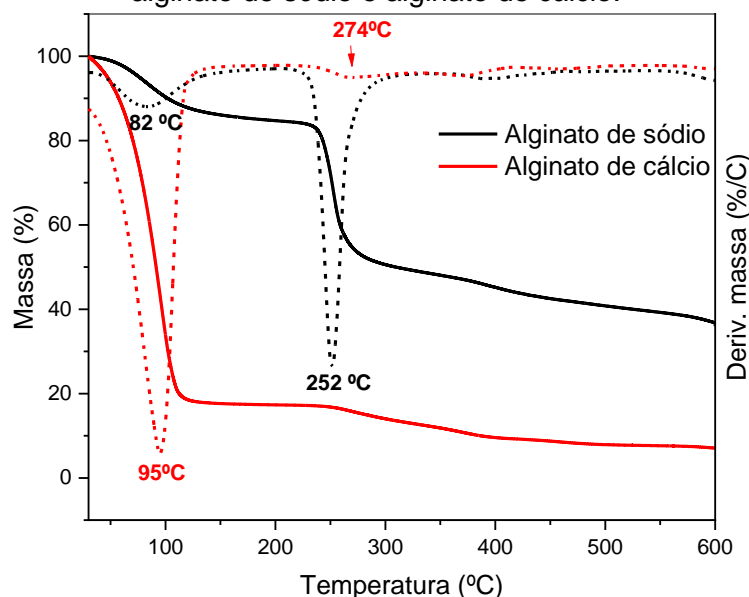
em 252°C, resultado semelhante ao encontrado no trabalho de Kawasaki (2017), que observou o evento em 256°C, e no trabalho de Liu *et al.* (2019), em 285°C.

No trabalho de Fernandes (2016), além dos eventos observados neste trabalho, também foi reportado um terceiro evento entre 600 a 700°C, correspondente a decomposição do Na_2CO_3 (Equações 16 e 17). Apesar deste evento não ter sido avaliado devido a análise ter terminado em 600°C, a partir de 570°C é possível observar o início de um ponto de inflexão.



Para a amostra de alginato de cálcio, o primeiro evento térmico ocorreu na faixa de 34 a 171°C, associado a desidratação da amostra correspondente a aproximadamente 83% de umidade. Na curva de Termogravimetria Derivada (DTG), este evento foi evidenciado no pico em 95°C. O segundo evento térmico ocorreu no intervalo de 200°C a 300°C, correspondente a decomposição da cadeia polimérica e a formação de CaCO_3 . Assim como para o alginato de sódio, um terceiro evento é esperado entre 600 e 700°C correspondente a decomposição do CaCO_3 (FERNANDES, 2016), no entanto, como a análise realizada neste presente trabalho ocorreu até 600°C, não foi possível observar este evento.

Figura 22 – Análise termogravimétrica e análise térmica diferencial das amostras de alginato de sódio e alginato de cálcio.



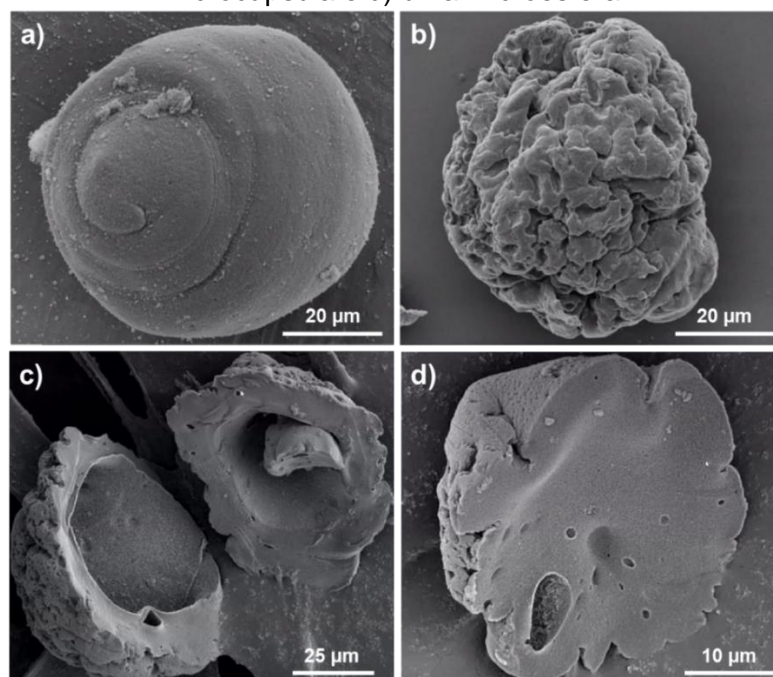
Fonte: Elaborado pela autora.

5.2.5 Análise morfológica

A morfologia superficial e interna das micropartículas de alginato de cálcio foi estudada por meio da MEV. As imagens de MEV mostradas na figura 23 são relativas à amostra F3. Observando-se as figuras 23a e 23b, nota-se que as micropartículas apresentam considerável esfericidade, apesar de terem sido produzidas por um método de microencapsulação de elevada turbulência. Além disso, nota-se que em uma mesma amostra foram formadas micropartículas com morfologia distinta, algumas exibindo exterior liso, como na fig. 20a, ou rugoso, fig. 20b.

As partículas produzidas na microencapsulação podem ser classificadas de acordo com seu tamanho e morfologia (MISHRA, 2015). Partículas de diâmetro nanométrico são denominadas nanocápsulas ou nanopartículas, assim como partículas de diâmetro micrométrico são denominadas microcápsulas ou microesferas (LENGYEL *et al.*, 2019). A morfologia interna das partículas determina a sua classificação como cápsulas (estrutura em que o material de parede está disposto como uma casca, chamada de *core-shell* em inglês) ou esferas (estrutura interna em que o material de parede está distribuído por todo sistema, chamada de *matrix* em inglês).

Figura 23 – Microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de alginato com a) aspecto superficial liso e b) rugoso, bem como imagens da estrutura interna de c) uma microcápsula e d) uma microesfera.



Fonte: Elaborado pela autora.

As partículas produzidas neste trabalho apresentam-se tanto como microcápsulas, figura 20c, como microesferas, 20d. Este resultado também foi encontrado por Ahmed *et al.* (2013) que utilizaram a microencapsulação por emulsificação para a liberação de medicamento diclofenaco de sódio. Alipour e colaboradores (2010) empregaram uma metodologia similar que continha como material de parede uma mistura de alginato de sódio e hidroxipropilmetilcelulose. A metodologia proposta também contou com a utilização de iso-octano como fase oleosa e TweenTM 85 e SpanTM 85 como surfactantes. A morfologia das partículas obtida por eles apresentou-se como formas achatadas e não-esféricas. No trabalho de Lupo *et al.* (2014), as micropartículas de alginato foram empregadas na proteção de polifenóis presentes em um extrato de coco e sua morfologia caracterizou-se como esférica e maciça.

5.3 Estudo das micropartículas contendo *B. amyloliquefaciens*

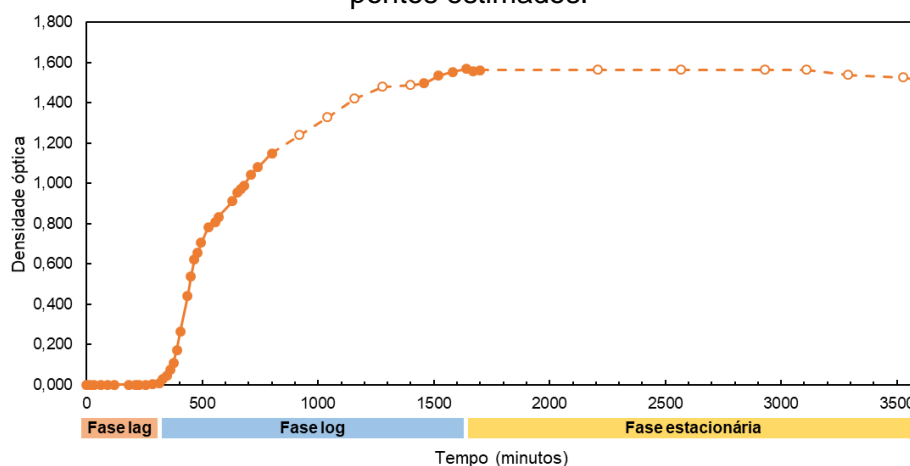
5.3.1 Curva de crescimento celular

A avaliação do crescimento microbiano pela medida de DO é umas das técnicas mais comuns da microbiologia para a investigação de crescimento celular de microrganismos. Nesta técnica, assume-se que a DO é proporcional ao número de células, ou seja, a concentração da amostra (STEVENSON *et al.*, 2016). Para a microencapsulação do microrganismo *B. amyloliquefaciens*, primeiramente foi realizado um ensaio de crescimento celular bacteriano em meio Caldo Nutriente com o objetivo de obter-se conhecimento quando às fases de desenvolvimento da bactéria estudada. Para isso, o meio de cultivo inoculado foi mantido durante todo experimento em uma incubadora com agitação orbital a 37°C e 120 rpm, e a cada intervalo de tempo, uma alíquota do caldo foi retirada e, sua absorbância medida no comprimento de onda de 600 nm. A curva de crescimento celular mostrando o comportamento de *B. amyloliquefaciens* ao longo de 60 horas (3600 minutos) está apresentada na figura 24.

Analizando o perfil da curva observa-se que a fase de latência, ou fase lag, durou aproximadamente 5 horas, tempo também encontrado por Kim *et al.* (2017), que no seu trabalho verificou um período de latência de 6 horas para a cepa de *B. amyloliquefaciens* AK-0 cultivada em cinco meios, sendo eles: Caldo Nutriente, Caldo

Soja Trypticaseína (Tryptic Soy Broth - TSB), Meio Infusão de Cérebro e Coração (Brain Heart Infusion - BHI) e Meio M9.

Figura 24 – Curva de crescimento celular da bactéria *B. amyloliquefaciens* em meio Caldo Nutriente em função da densidade óptica (600 nm) ao longo de 3600 minutos de incubação a 37°C. Os pontos cheios representam pontos medidos e os pontos vazios representam pontos estimados.



Fonte: Elaborado pela autora.

A figura 24 também mostra que a bactéria *B. amyloliquefaciens* atingiu o máximo de seu crescimento em 1,57 após 27,5 horas de incubação. Os pesquisadores Lee, Cheng e Liu (2017) ao empregarem o meio de cultura LB (Luria Bertani) para o cultivo da cepa *B. amyloliquefaciens* ATCC 23350, verificaram seu ponto máximo de DO em 1,68 após 24 horas de incubação. Estes autores acompanharam o crescimento por até 48 horas, e reportaram o início da fase de declínio na trigésima sexta hora de cultivo. Neste trabalho, esta fase não foi verificada até 60 horas de acompanhamento. No trabalho de Lv *et al.* (2020), o início da fase estacionária da estirpe C-1 foi obtido após 48 horas na DO de 2,25. O cultivo foi realizado a 30°C e 200 rpm em um meio de composição formulado (12,4 g/L de triptona, 20 g/L de glicose, 5 g/L de NaCl, 1,5 g/L de $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 0,04 g/L de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 1,7 g/L de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, e 1,2 g/L de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, pH 7,2).

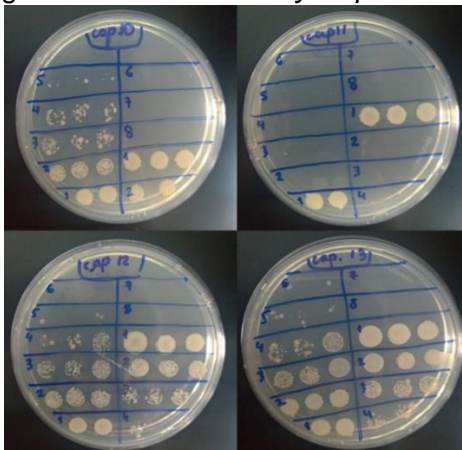
O conhecimento do ciclo de crescimento de *B. amyloliquefaciens* foi avaliado com o objetivo de identificar a fase estacionária do microrganismo, de forma a serem obtidas células nesta etapa de desenvolvimento para serem utilizadas nos ensaios de microencapsulação. Na fase estacionária, a população do microrganismo chega ao máximo e, em decorrência da limitação de nutrientes, começa a esporular (MADIGAN *et al.*, 2016; MOCHIZUKI *et al.*, 2012). Endósporos são células altamente

diferenciadas que atuam como estruturas de sobrevivência e permitem ao organismo resistir a condições adversas, como presença de radiação, carência nutricional e extremos de temperaturas (MADIGAN *et al.*, 2016). Endósporos de *B. amyloliquefaciens* foram reportados como capazes de sobreviver até pelo menos 100°C (MARGOSCH *et al.*, 2006). Desta forma, após 27,5 horas de cultivo de *B. amyloliquefaciens*, o microrganismo encontra-se na fase estacionária e estimulado a estar na sua estrutura dormente, agregando a formulação das micropartículas um sistema de preservação natural.

5.3.2 Contagem de células viáveis nas micropartículas

A manutenção da viabilidade celular também é um fator importante para a seleção do processo microencapsulação. Durante o processo de microencapsulação por emulsificação, alguns fatores podem causar morte celular dos microrganismos, como o uso do ácido acético, surfactantes, cisalhamento da agitação mecânica (SONG *et al.*, 2013). As formulações escolhidas a microencapsulação do microrganismo foram as que obtiveram melhor performance quanto ao tamanho de partícula (F2 e F4). No entanto, com objetivo de comparação, as formulações F1 e F3 que são produzidas a 1000 rpm, também foram testadas para avaliação da mortalidade dos microrganismos em uma rotação mais branda. A viabilidade do microrganismo *B. amyloliquefaciens* foi determinada por meio de contagens realizadas imediatamente após o preparo das amostras. A figura 25 apresenta um exemplo das placas de Petri após incubação de 24 horas das bactérias encapsuladas.

Figura 25 – Placas de Petri após diluição seriada das formulações de micropartículas de alginato contendo *B. amyloliquefaciens*.



Fonte: elaborado pela autora.

Os resultados da contagem UFC/g das amostras F1, F2, F3 e F4 estão mostrados na tabela 9.

Tabela 9 – Concentração em UFC/g de *B. amyloliquefaciens* em 4 formulações de micropartículas de alginato de cálcio produzidas pelo método de emulsificação.

| Formulação | Concentração média (UFC/g) |
|------------|----------------------------|
| F1 | $2,14 \times 10^9$ |
| F2 | $2,32 \times 10^8$ |
| F3 | $2,01 \times 10^8$ |
| F4 | $2,73 \times 10^8$ |

Fonte: elaborado pela autora.

Ao comparar-se os resultados obtidos com as concentrações dos produtos comerciais registrados no MAPA, como os pós-molháveis Duravel® da BASF, Veraneio® da Koppert e Shocker® da Agrivalle, nota-se que as formulações de micropartículas deste trabalho têm, em média, 19,5% UFC/g a menos em comparação com os produtos Duravel® e Veraneio®, que possuem concentração registrada de $5,0 \times 10^{10}$ e $1,0 \times 10^{10}$ UFC/g, respectivamente. No entanto, em comparação ao produto Shocker®, as amostras F1-4 estão, em média, com concentração 23,0% maior.

Em trabalhos da literatura, como o de García-Gutiérrez e colaboradores (2011), foi encontrado a concentração de $8,7 \times 10^7$ UFC/mL de *B. thuringiensis* para formulação de microcápsulas de alginato produzidas pelo mesmo método deste trabalho. No entanto, se consideramos que a densidade das partículas é aproximadamente 1 g/cm³, podemos estimar que as micropartículas deste trabalho carregam 14,28% a mais de bactérias que as microcápsulas dos autores.

No trabalho de Martin *et al.* (2013), a concentração obtida de *Lactobacillus fermentum* foi de $4,90 \times 10^6$ UFC/g para uma amostra de micropartículas contendo apenas alginato como material de parede, e $2,75 \times 10^9$ UFC/g para uma formulação de alginato e amido de milho. Os autores atribuíram a maior concentração de microrganismos para a amostra com amido a uma melhor proteção oferecida por esse material durante a microencapsulação. Segundo eles, o amido favorece a formação da rede polimérica das micropartículas, protegendo o microrganismo do contato com o ácido acético, aumentando assim a concentração deles. No presente trabalho não foram utilizados aditivos para aumentar a concentração de bactérias nas

micropartículas, no entanto, pode ser uma boa estratégia para aumentar em cerca de $8,62 \pm 0,5\%$ a concentração das mesmas.

5.3.3 Eficiência de encapsulação

A escolha de um processo e formulação adequados para o escalonamento industrial leva em consideração muitos fatores, como custo de matérias-primas, facilidade de escalonamento da produção, disponibilidade de maquinário, entre outros. Um fator essencial a ser considerado é o rendimento do processo, que neste trabalho está diretamente relacionado a EE, ou seja, a avaliação da perda dos microrganismos após a microencapsulação.

Para isso, foi empregue o teste de EE, que consiste em comparar-se a concentração de microrganismos antes e depois do processo. A tabela 10 apresenta os resultados para as quatro formulações estudadas. O teste de ANOVA mostrou que não há diferença significativa na EE a depender da formulação utilizada, já que o valor-F obtido (0,01) é menor que o $F_{\text{crítico}}$ (3,86) e o valor- $p > 0,05$ (valor- $p = 0,9982$). Esse é um resultado bastante interessante porque demonstra que é possível variar a velocidade de agitação de 1000 a 1500 rpm, vice-versa, para a produção de micropartículas sem a desvantagem da perda de microrganismos. Também é possível observar que a EE foi maior que 90% para as quatro amostras, mostrando mais uma vez que não houve correlação positiva ou negativa entre a velocidade de agitação e a EE.

Tabela 10 – Concentração em UFC/g e eficiência de encapsulação (%) de *B. amyloliquefaciens* em micropartículas de alginato produzidas pelo método de emulsificação.

| Formulação | EE (%) |
|------------|------------------|
| F1 | $92,0 \pm 5,0$ a |
| F2 | $90,4 \pm 7,7$ a |
| F3 | $92,0 \pm 7,8$ a |
| F4 | $93,8 \pm 4,6$ a |

Fonte: elaborado pela autora.

Estudos feitos por diversos autores utilizam o alginato como matriz na microencapsulação de microrganismos utilizados na agricultura, no entanto, a maioria deles pela técnica de extrusão (ROHMAN *et al.*, 2020). O alginato é considerado um bom agente de microencapsulação uma vez que apresenta alta eficiência de

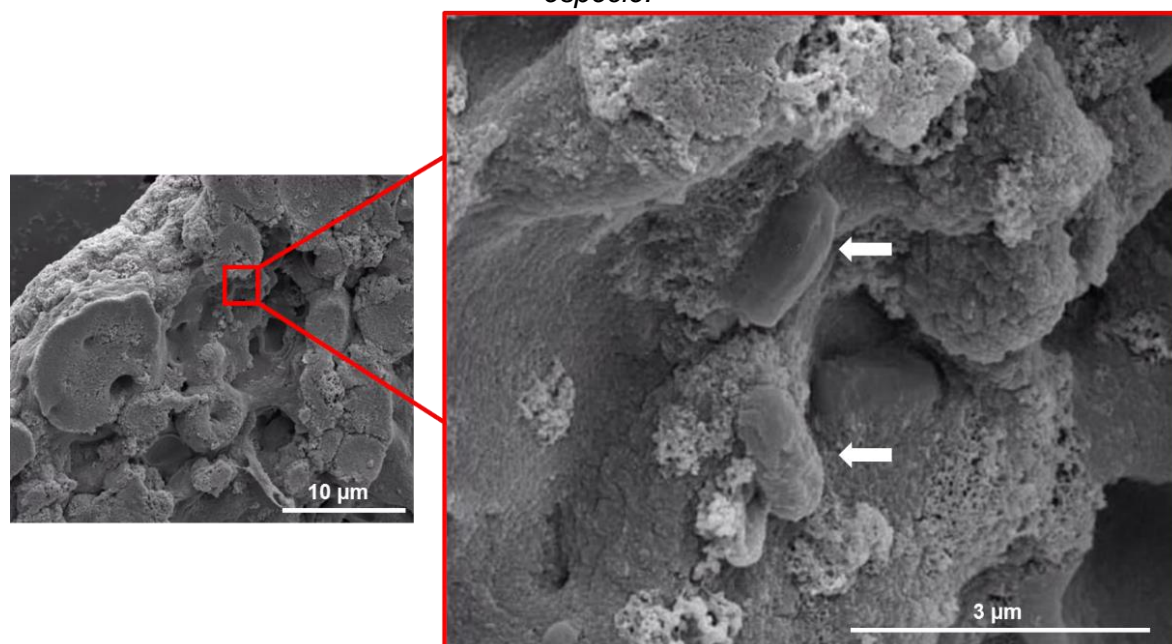
microencapsulação quando aplicado a células (LUO *et al.*, 2019). Isto deve-se a sua compatibilidade com sistemas vivos, sua biodegradabilidade e sua baixa toxicidade. Além desses fatores, os métodos de preparação de partículas com alginato geralmente apresentam um processo conduzido a temperatura ambiente, utilizando quantidades mínimas de reagentes químicos agressivos as células (CESARI *et al.*, 2020a). No entanto, apesar da alta eficiência alcançada no presente trabalho, no estudo realizado por Rohman *et al.* (2020), a EE da bactéria *Rhodopseudomonas palustris* KTSSR54 em matriz de alginato foi de apenas 50,56%, ainda que as cápsulas tenham sido preparadas pelo método de extrusão, uma metodologia mais branda que a utilizada neste trabalho. De acordo com os autores, sua baixa eficiência pode ser explicada pelo vazamento das células durante o *cross-linking* que dificultou o aprisionamento do microrganismo.

No trabalho de García-Gutiérrez *et al.* (2011), que utilizou a metodologia de emulsificação, foi encontrado uma EE de 89% para a bactéria *Bacillus thuringiensis var. kurstaki HD-1*, valor muito próximo a deste trabalho. Os autores atribuíram a perda de 11% de microrganismos as etapas de lavagem e recuperação das micropartículas. Cet *et al.* (2007), que estudaram micropartículas de alginato carregadas com albumina de soro bovino (BSA), relataram EE de 37%. Tian e colaboradores (2015), ao encapsular a bactéria *Lactobacillus plantarum*, obtiveram EE de 58,4% para uma amostra produzida por um método similar ao deste trabalho e, 75,6% para uma variação da metodologia, empregando a gelificação externa por CaCO_3 . Este trabalho estudou a microencapsulação por emulsificação utilizando duas fontes de íons Ca^{2+} para o *cross-linking*, CaCl_2 , utilizado neste trabalho, e CaCO_3 . Os autores atribuíram a maior EE obtida pelo processo que utilizou CaCO_3 ao fato de não precisar de altas forças de cisalhamento para a produção das partículas. No entanto, mesmo que a metodologia com CaCO_3 tenha produzido microcápsulas com EE maior, em contrapartida essas microcápsulas foram 31,6% maiores que as partículas produzidas pela metodologia que utiliza CaCl_2 , evidenciando que esta é a melhor opção para este trabalho.

5.3.4 Análise morfológica das micropartículas contendo *B. amyloliquefaciens*

Com o objetivo de verificar a presença e a localização do microrganismo nas micropartículas, a análise de MEV foi empregue. A figura 26 apresenta uma imagem e ampliação da amostra F3.

Figura 26 – Microscopia eletrônica de varredura de micropartículas de alginato contendo *B. amyloliquefaciens* e ampliação. As setas brancas indicam a localização de duas bactérias da espécie.



Fonte: Elaborado pela autora.

Ao observar a figura 26, nota-se duas estruturas em forma de bastonetes destacadas por setas brancas. O formato de bastonete é a forma característica de todas as bactérias do gênero *Bacillus*. Outro ponto importante a ser notado é o tamanho das estruturas, de aproximadamente 1 µm de comprimento e 0,5 µm de largura, que correspondem ao tamanho do *B. amyloliquefaciens* caracterizado por Lee e Kim (2012), concluindo-se assim que a microencapsulação da bactéria *B. amyloliquefaciens* foi efetiva.

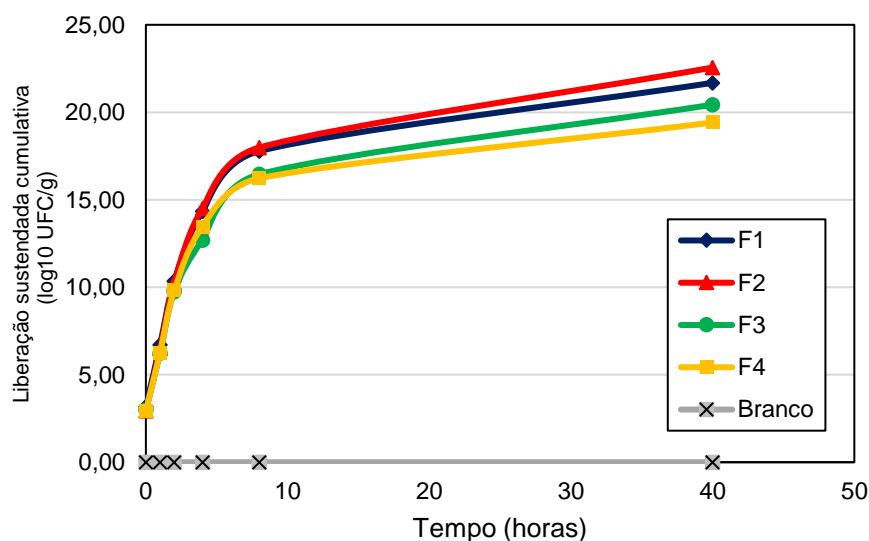
Um outra questão que estava em aberto neste trabalho era a localização dos microrganismos nas micropartículas que, como pode ser visto na figura 26, foram encontrados na região interna das partículas. Existe pouca literatura disponível que tenha realizado microscopias da estrutura das micropartículas contendo microrganismos. Dos dois trabalhos encontrados apenas um utilizou o método de microencapsulação por emulsificação. No estudo de García-Gutiérrez *et al.* (2011), os

autores encontraram esporos de *B. thuringiensis* tanto na região externa quanto na interna das micropartículas. No trabalho de Wiwattanapatapee *et al.* (2013), que produziu partículas por injeção em um equipamento de aerografia, também foi observado microrganismos fora e dentro das partículas. Esse resultado também pode ser esperado para as micropartículas do presente trabalho que, apesar de não ter sido possível obter imagens do *B. amyloliquefaciens* na região externa, é muito provável que o resultado seja o mesmo.

5.3.5 Liberação sustentada *in vitro*

A liberação das células presentes nas micropartículas é fundamental para que ocorra a propagação das bactérias quando realizada a aplicação final (LI *et al.*, 2017). Apesar de ser esperado que para algumas aplicações as micropartículas sejam expostas à fatores bióticos e abióticos que possam favorecer a degradação da matriz e a liberação dos microrganismos, o conhecimento do perfil de liberação das micropartículas sem exposição é um importante fator a ser considerado (PANICHIKKAL *et al.*, 2021). Dessa forma, o teste de liberação sustentada foi realizado em solução salina para avaliar a liberação da bactéria através da matriz de alginato de cálcio ao longo do 40 horas. Os resultados estão apresentados na figura 27.

Figura 27 – Curva da liberação sustentada do microrganismo *B. amyloliquefaciens* das amostras F1, F2, F3 e F4.

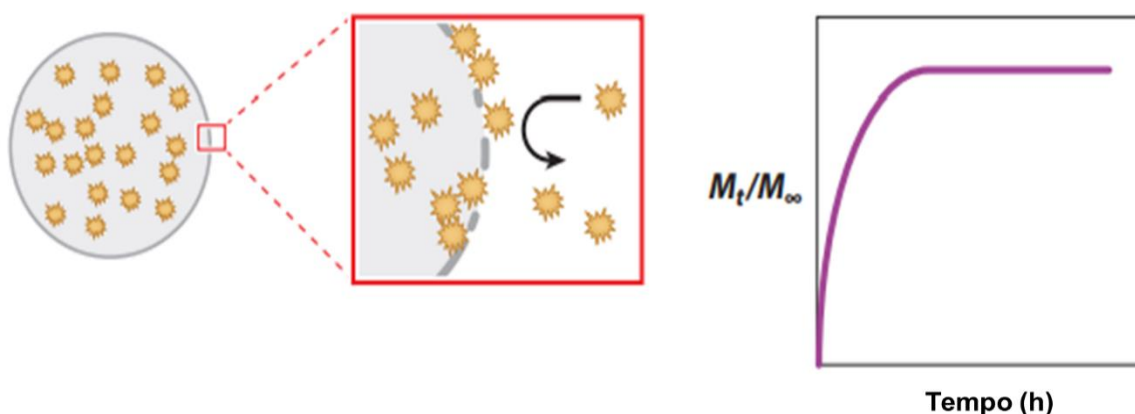


Fonte: Elaborado pela autora.

Em geral, o comportamento das amostras F1-4 seguiu o perfil de liberação de uma cinética de ordem zero no intervalo da oitava e quadragésima hora do ensaio, e antes desse período apresentou uma rápida liberação dos microrganismos nas primeiras 8 horas.

Um dos objetivos centrais da microencapsulação é a liberação sustentada de ativos, que significa que os compostos ou microrganismos serão liberados de forma constante por um período desejado de tempo. Em outras áreas como a farmacêutica a rápida liberação de um ingrediente ativo como ocorrido na figura 27 nas primeiras oito horas pode levar a sintomas indesejáveis de medicamentos em um efeito conhecido como Efeito “Burst” (figura 28). Esse efeito é definido como uma liberação incontrolada do material do núcleo na fase inicial de aplicação da formulação que, após rápida liberação alcança um *plateau* (PARK *et al.*, 2014). Existem muitas razões para o aparecimento deste efeito em sistemas de micropartículas. De acordo com Flores e Kong (2017) duas das razões mais comuns é o acúmulo de microrganismos que não foram microencapsulados na parte de fora da partícula e a tendência que alguns compostos têm de ficarem adsorvidos na interface da parede da micropartícula e o meio exterior.

Figura 28 – Ilustração esquemática e descrição matemática do Efeito “Burst”.



Fonte: Adaptado de Flores e Kong (2017).

O comportamento obtido no presente trabalho para a liberação do microrganismo *B. amyloliquefaciens* é muito semelhante ao encontrado por Meftah Kadmiri *et al.* (2020). No trabalho desses autores, as bactérias *Pseudomonas putida* e *Azospirillum brasilense* foram aprisionadas por gotejamento em cápsulas de alginato

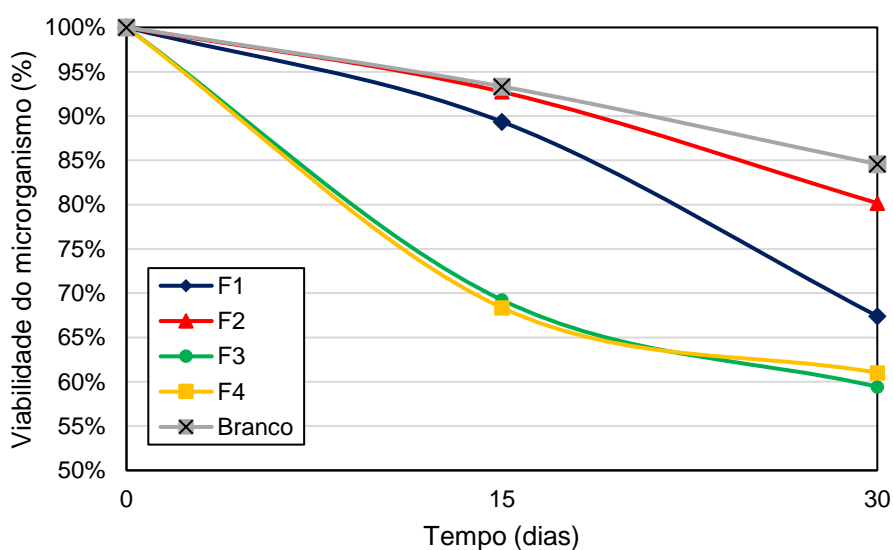
e montmorilonita. O ensaio de liberação das bactérias apresentou nos primeiros 3 dias do experimento o efeito “Burst”, e após esse período uma liberação constante até o trigésimo e último dia do teste.

Tu *et al.* (2015) encapsularam o AMC *B. subtilis* em micropartículas de alginato e gelatina produzidas por emulsificação. Apesar da metodologia do ensaio de liberação ter sido diferente da utilizada neste trabalho (os autores realizaram a liberação sem agitação da solução salina), eles também obtiveram o efeito “Burst” nos primeiros dias de ensaio e depois uma estabilização da liberação. No entanto, como esses autores acompanharam a liberação por 60 dias, também conseguiram observar uma queda da concentração dos microrganismos liberados após 40 dias de ensaio.

5.3.6 Viabilidade do microrganismo nas micropartículas

A fim de obter-se um bom desempenho da formulação durante a aplicação final, é fundamental conhecer a perda da viabilidade após a microencapsulação e o tempo que a concentração obtida é mantida (ROHMAN *et al.*, 2020). O teste de estabilidade de *B. amyloliquefaciens* em caldo (branco) e microencapsulado nas amostras F1, F2, F3 e F4 está apresentado na figura 29.

Figura 29 – Viabilidade do microrganismo (%) *B. amyloliquefaciens* nas amostras F1, F2, F3 e F4 armazenadas a 25°C ao longo de 30 dias.



Fonte: Elaborado pela autora.

Após 30 dias de armazenamento em temperatura ambiente, o branco apresentou o menor decaimento, de 15% de viabilidade (concentração final $7,28 \times 10^3$ UFC/g de caldo). As amostras encapsuladas perderam em média 33% de viabilidade, apresentando concentração final de $3,09 \times 10^4$ UFC/g, $1,32 \times 10^5$ UFC/g, $1,02 \times 10^4$ UFC/g e $9,77 \times 10^3$ UFC/g, para as amostras F1, F2, F3 e F4, respectivamente.

No relatório de registro do produto Serifel® (produto biológico à base da bactéria *B. amyloliquefaciens*) da BASF na agência sanitária francesa ANSES, foi reportado que após 12 semanas de armazenamento do produto a 35°C, a concentração de células viáveis já se encontrava abaixo do valor mínimo certificado de $5,5 \times 10^{10}$ UFC/g (BASF FRANCE SAS, 2019), no entanto não foi reportado o valor encontrado.

No trabalho de Martin *et al.* (2013), a concentração da bactéria *L. fermentum* em micropartículas de alginato e amido manteve-se alta e constante nos 45 dias de ensaio para amostras armazenadas em 4°C e -20°C, mas para a amostra mantida a 25°C houve um decaimento de 100% após 15 dias de ensaio, mostrando que os resultados obtidos no presente trabalho são bastante promissores. Tu *et al.* (2015) analisaram a viabilidade de *B. subtilis* durante 120 dias em microcápsulas de alginato contendo diferentes concentração de gelatina. Os autores reportaram perdas de 30% de viabilidade das amostras após 30 dias de armazenamento a 25°C, e mostraram que não houve diferença significativa sobrevivência dos microrganismos para amostras com gelatina e sem gelatina.

Entre as formulações testadas, a amostra F2 apresentou a menor perda de viabilidade, 20% ao longo de 30 dias, perda muito similar ao branco, mostrando-se a mais promissora para seguir com os ensaios de proteção UV e atividade antifúngica.

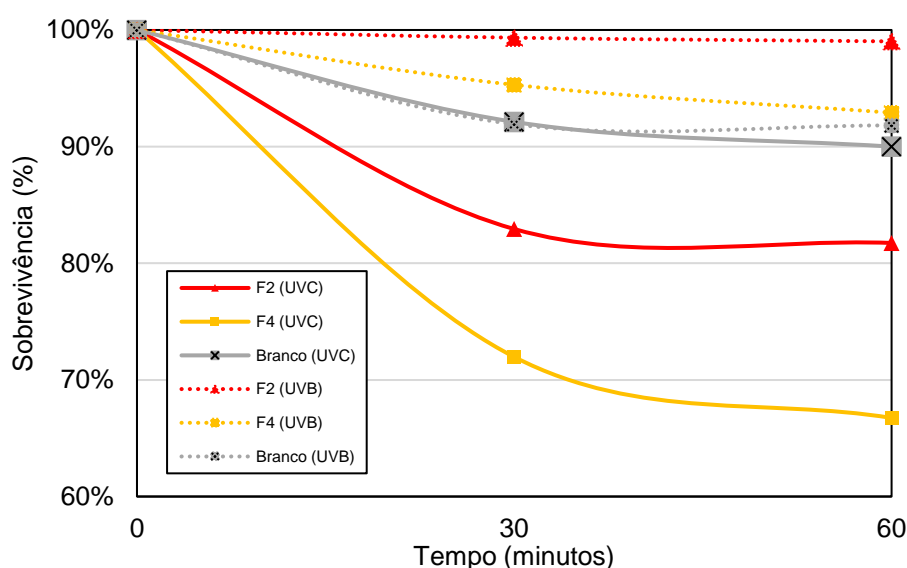
5.3.7 Proteção UV

Uma das principais restrições à adoção mais ampla de AMCs é sua suscetibilidade a radiação ultravioleta, principalmente no intervalo 290 a 400 nm. Estima-se que para os bacilovírus, a meia-vida após aplicação em campo seja de 2 a 10 dias, e em regiões tropicais caia para apenas 8 horas (WILSON *et al.*, 2020). Não foi encontrado nenhum trabalho que tenha estudado o tempo de meia-vida da bactéria *B. amyloliquefaciens* após aplicação em campo. No entanto, segundo o autor Setlow

(2001) que estudou a resistência do gênero *Bacillus* à radiação UV, as espécies do gênero por serem formadoras de endósporos têm resistência de 5 a 50 vezes maior que espécies de outros gêneros, o que resulta em um intervalo de 40 horas a 400 horas em regiões tropicais.

Neste contexto, o teste de proteção UV tem sua importância devido a sensibilidade à radiação UV que intrinsicamente os microrganismos possuem (ACHEAMPONG *et al.*, 2020), por romperem as ligações do DNA e modificarem seu metabolismo e reprodução, até a morte celular (MONDARDO, 2015). Dito isso, as amostras F2 e F4 foram escolhidas por apresentarem como diferença a concentração da solução de alginato de sódio que as produziu, que por hipótese podia gerar uma proteção diferente para cada amostra. A figura 30 apresenta a sobrevivência do *B. amyloliquefaciens* nas amostras F2 e F4 após exposição à radiação UVB e UVC por 30 e 60 minutos.

Figura 30 – Sobrevivência (%) do microrganismo *B. amyloliquefaciens* nas amostras F1, F2, F3 e F4 armazenadas a 25°C ao longo de 30 dias.



Fonte: Elaborado pela autora.

De acordo com a figura 30, pode-se verificar que as amostras F2 e F4 quando expostas à radiação UVB por 60 minutos apresentaram uma perda de viabilidade menor do que quando expostas a radiação UVC, 18% e 33%, e 1% e 7%, respectivamente. Também é importante notar que as amostras F2 e F4 expostas à UVB apresentaram sobrevivência superior ao branco, mostrando que as partículas foram eficientes para proteger os microrganismos neste comprimento de onda. Para

as amostras expostas à radiação UVC, a perda de viabilidade foi superior para as formulações de micropartículas, no qual o branco apresentou perda similar ao branco UVB. Ao comparar-se as amostras F2 e F4, verificou-se que não houve correlação positiva entre concentração de alginato e proteção UV, resultando na amostra F2 como a melhor formulação para proteção UVB e UVC.

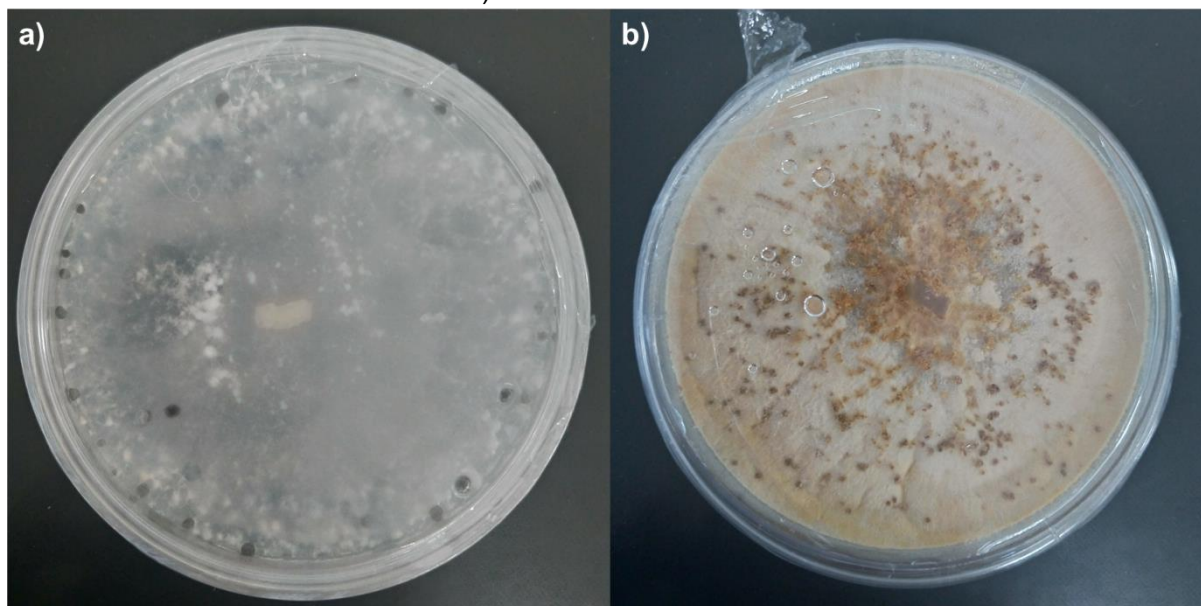
A literatura acadêmica sobre microencapsulação que realizou teste de proteção UV é mais abrangente do que para os outros testes deste trabalho. Na verdade, muitos trabalhos têm como seu objetivo principal o desenvolvimento de formulações para melhorar a proteção UV de micropartículas, como o trabalho de Zhang *et al.* (2016). Neste artigo, os autores utilizaram melanina como um protetor UV em micropartículas de alginato de cálcio, mostrando que a adição de 0,015% da proteína na formulação resulta em uma atividade inseticida maior do que para as amostras que não continham o pigmento.

No trabalho de García-Gutierrez *et al.* (2011), micropartículas de alginato de cálcio produzidas por emulsificação apresentaram viabilidade de 60% para o AMC *B. thuringiensis* após 168 horas de exposição a radiação UVB, mostrando que formulações apenas de alginato de cálcio também podem oferecer uma proteção prolongada a determinados comprimentos de onda. No ensaio de exposição à radiação UVC, os autores mantiveram os microrganismos livres e as amostras de microcápsulas expostas por 20 min. Diferente do que foi encontrado neste trabalho, a amostra com microrganismos livres perdeu completamente a viabilidade após 10 min de exposição, e as amostras de micropartículas mantiveram viabilidade de 80% após o período do teste.

5.3.8 Antagonismo

Para que a utilização de microrganismos na agricultura seja eficiente, além de favorecer a sobrevivência dos microrganismos durante o armazenamento e aplicação em campo, a formulação utilizada deve contribuir para um controle consistente do alvo desejado (LUO *et al.*, 2019). Dessa forma, avaliou-se a atividade antifúngica do caldo contendo *B. amyloliquefaciens* e das amostras F2 e F4 no controle dos fungos *S. sclerotiorum* (figura 31a) e *R. solani* (figura 31b).

Figura 31 – Fotografias das placas de Petri contendo os fungos a) *Sclerotinia sclerotiorum* e b) *Rhizoctonia solani*.



Fonte: Elaborado pela autora.

A figura 32 apresenta as imagens finais das placas de Petri do ensaio de antagonismo após 7 dias de incubação em estufa a 28°C. Os resultados do teste de antagonismo para o fitopatógeno *R. solani* indicam que o crescimento do fungo foi afetado pela presença do AMC presente nas amostras F2 (fig. 32a) e F4 (fig. 32b), inibindo completamente o crescimento do fungo para ambas as formulações. O fungo *S. sclerotiorum* também teve seu crescimento inibido pela presença das amostras F2 e F4 (fig. 32d e fig. 32e, respectivamente), não havendo diferença entre elas.

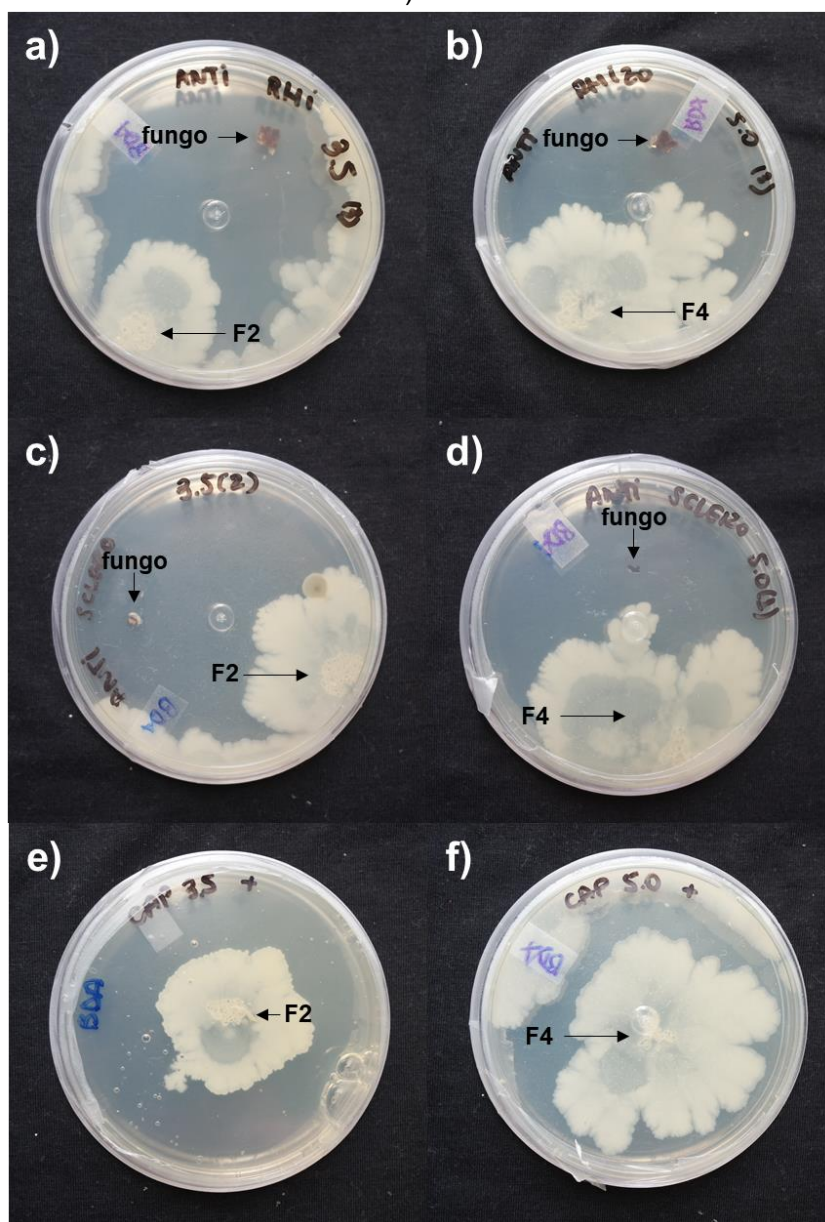
O teste de antagonismo baseia-se na interação do microrganismo patógeno com o AMC, que pode criar condições desfavoráveis ao desenvolvimento destes através da produção de metabolitos tóxicos, sendo esta forma de interação também conhecida como antibiose (GABARDO *et al.*, 2020). A produção de metabólitos pode resultar na completa lise e dissolução da estrutura celular do fitopatógeno e independe do contato físico entre os microrganismos. Segundo Bettiol *et al.* (1995), grande parte dos microrganismos envolvidos em controle biológico atua através de antibiose.

O microrganismo escolhido neste trabalho como AMC, o *B. amyloliquefaciens*, é conhecidamente utilizado como biofungicida por inibir a presença de muitos fungos. Na inibição do fungo *Colletotrichum lagenarium*, causador da antracnose, a espécie *B. amyloliquefaciens* atua na produção da proteína α -1,3-glucanase (IL KIM; CHUNG, 2004). Para os fungos utilizados neste trabalho, os autores Yu *et al.* (2002) reportaram

a produção do composto iturina A na inibição de *R. solani* e os autores Abdullah *et al.* (2008) apontaram a enzima quitinase como a responsável pelo controle de *S. sclerotiorum*.

Não foi encontrado nenhum trabalho na literatura que estudasse a microencapsulação da bactéria *B. amyloliquefaciens* em micropartículas de alginato ou nenhum outro material, não sendo possível a comparação dos resultados obtidos e evidenciando o ineditismo deste trabalho.

Figura 32 – Fotografias dos ensaios de antagonismo contra os fitopatógenos *Rhizoctonia solani*: a) F2, b) F4, e *Sclerotinia sclerotiorum*: c) F2, d) F4. Os controles positivos são e) F2 e f) F4.



Fonte: Elaborado pela autora.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que foi possível produzir micropartículas de alginato de cálcio contendo o microrganismo *Bacillus amyloliquefaciens* capazes de inibir o crescimento dos fitopatógenos *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, e que estão em um tamanho adequado para pulverização em campo. As micropartículas foram produzidas pelo método de emulsificação e seu tamanho de partícula otimizado por um planejamento de experimentos que indicou as formulações F1, F2, F3 e F4 como as mais promissoras para seguir com a microencapsulação do agente microbiológico de controle *Bacillus amyloliquefaciens* por serem formulações com tamanho de partícula menor que 150 μm .

A partir do planejamento de experimentos também foi mostrado que o surfactante SpanTM 20 permitiu a formação das menores partículas, entre 47 e 94 μm de diâmetro, e por meio das superfícies de resposta foi mostrado que menores concentrações da solução de alginato de sódio e maiores velocidades de agitação promovem menores tamanhos de partícula ao final do processo. No planejamento experimental realizado para estudar a relação entre o tamanho de partículas das gotas de alginato em óleo na fase de emulsificação verificou-se que o parâmetro 'tipo de surfactante' foi o mais significativo estatisticamente nesta etapa, bem como os parâmetros 'concentração de alginato', 'concentração de surfactante', 'velocidade de agitação' e 'tipo de surfactante' foram relevantes estatisticamente na fase de produção das micropartículas.

A microencapsulação do microrganismo *Bacillus amyloliquefaciens* foi realizada em quatro diferentes formulações F1, F2, F3 e F4. As amostras F1 e F2 foram produzidas a partir dos parâmetros: 3,5% m/v de alginato de sódio e 1% m/v de SP20 com a diferença que para o primeiro foi usada a velocidade de agitação de 1000 rpm e o segundo de 1500 rpm. A mesma lógica aplica-se as amostras F3 e F4 com a distinção que para essas formulações a solução de alginato utilizada foi de 5,0% m/v. A contagem de células viáveis das quatro amostras resultou em valores 20% menores quando comparado aos produtos comerciais Duravel[®] e Veraneio[®], mas 23% maiores em comparação ao produto Shocker[®], o que mostra que a utilização das formulações desenvolvidas neste trabalho pode substituir algumas formulações comerciais. A eficiência de encapsulação obtida para as quatro amostras foi superior a 90% e se

mostraram estatisticamente idênticas, o que se concluiu que não há diferença na utilização da velocidade de agitação de 1000 rpm e 1500 rpm para a sobrevivência dos microrganismos. Essa é uma conclusão muito importante quando se pensa em escalonamento de processos. Normalmente quando se há uma transferência de um processo de bancada para a escala fabril faz-se necessário aumentar a intensidade dos parâmetros encontrados em escala laboratorial afim de alcançar os mesmos resultados. Portanto, caso seja necessário utilizar a maior velocidade de agitação (1500 rpm) para a produção de micropartículas, os resultados indicam que não haverá problema no que tange ao rendimento do processo.

Ao investigar-se a morfologia das micropartículas por microscopia eletrônica de varredura observou-se que o processo gerou dois tipos de micropartículas, microesferas e microcápsulas, e que os microrganismos estão presentes na parte interna nas partículas. Também foi mostrado que provavelmente as bactérias estão presentes na parte exterior das micropartículas pelo efeito “Burst” encontrado no ensaio de liberação sustentada. Neste ensaio também se verificou que a liberação dos microrganismos ao longo de 40 horas manteve-se com aumento constante para as quatro amostras, o que se concluiu que os microrganismos conseguem ser liberados das partículas sem a necessidade de deterioração do material da parede, e que não há diferença em se utilizar a concentração de 3,5% m/v e 5,0 m/v para aumentar ou diminuir a saída das células de dentro das micropartículas.

As amostras F1, F2, F3 e F4 quando mantidas por 30 dias em temperatura ambiente apresentaram perda na viabilidade do microrganismo de, em média, 18% quando descontado o valor do branco. Essa é uma perda em conformidade aos valores encontrados na literatura que mostrou também que para manter a viabilidade de uma espécie muito semelhante ao *Bacillus amyloliquefaciens* foi necessário manter as micropartículas acondicionadas nas temperaturas de 4°C e -20°C. O teste de estabilidade também mostrou que a amostra F2 obteve a menor perda de viabilidade aos 30 dias, de 15%, sendo essa amostra escolhida para seguir para o teste de proteção UV.

O ensaio de proteção UV foi realizado em duas faixas de comprimentos de onda relacionadas à radiação UVB e UVC, e as amostras F2 e F4 foram avaliadas quanto a proteção a essas radiações. O teste mostrou que as micropartículas foram eficientes na proteção dos microrganismos para a faixa de radiação UVB, no entanto,

para a faixa UVC houve uma perda significativa de viabilidade após 60 minutos de exposição. Entre as amostras F2 e F4 houve diferença na proteção dada aos microrganismos, sendo a amostra F2 a que mostrou maior proteção para ambas as faixas de radiação.

O último teste avaliou o potencial antagônico das formulações F2 e F4 contra os fungos patogênicos *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*. O teste mostrou que as duas formulações foram capazes de inibir o crescimento dos fungos, concluindo-se assim que as formulações desenvolvidas neste trabalho são eficientes para o controle de fitopatógenos no campo, oferecendo proteção a radiação UVB superior aos microrganismos livres e liberação sustentada dos mesmos.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectiva futura, sugere-se:

- Seguir com a amostra F2 na busca por proteção UVC superior aos microrganismos livres. A adição de TiO_2 tem sido apontado na literatura como uma alternativa para aumentar a proteção UV de micropartículas (JALALI; MAGHSOUDI; NOROOZIAN, 2020);
- A realização de teste de estabilidade da amostra F2 por doze meses em temperatura ambiente e 4°C;
- Execução de bioensaio em casa-de-vegetação da amostra F2 a ser testada em culturas afetadas pelos fungos *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELLATIF, Ahmed A. H. et al. Cetuximab Conjugated with Octreotide and Entrapped Calcium Alginate-beads for Targeting Somatostatin Receptors. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 4736, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-61605-y.
- ABDULLAH, Mansour T.; ALI, Nida Y.; SULEMAN, Patrice. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, [S. l.], v. 27, n. 10, p. 1354–1359, 2008. DOI: 10.1016/J.CROPRO.2008.05.007.
- ACHEAMPONG, M. A.; HILL, M. P.; MOORE, S. D.; COOMBES, C. A. UV sensitivity of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates under investigation as potential biological control agents in South African citrus orchards. **Fungal Biology**, [S. l.], v. 124, n. 5, p. 304–310, 2020. DOI: 10.1016/J.FUNBIO.2019.08.009.
- AGRIVALLE. **Teste de Antagonismo entre bactérias e fungos fitopatogênicos**. Salto.
- AHMED, Mahmoud M.; EL-RASOUL, Saleh Abd; AUDA, Sayed H.; IBRAHIM, Mohamed A. Emulsification/internal gelation as a method for preparation of diclofenac sodium-sodium alginate microparticles. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 61–69, 2013. DOI: 10.1016/j.jsps.2011.08.004.
- AHMED, Temoor et al. Bioinspired Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles from a Native *Bacillus cereus* Strain RNT6: Characterization and Antibacterial Activity against Rice Panicle Blight Pathogens *Burkholderia glumae* and *B. gladioli*. **Nanomaterials** **2021**, Vol. 11, Page 884, [S. l.], v. 11, n. 4, p. 884, 2021. DOI: 10.3390/NANO11040884. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-4991/11/4/884/htm>. Acesso em: 25 ago. 2021.
- AIT BARKA, Essaid; QIN, Sheng; SANCHEZ, Lisa; BORRIS, Rainer; CHOWDHURY, Soumitra Paul; HARTMANN, Anton; GAO, Xuwen. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. [S. l.], 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00780. Disponível em: www.frontiersin.org.
- AKGÜN, Işık Sena; ERKEY, Can. Investigation of hydrodynamic behavior of alginate aerogel particles in a laboratory scale-wurster fluidized bed. **Molecules**, [S. l.], v. 24, n. 16, 2019. DOI: 10.3390/molecules24162915. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6721213/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3521213/). Acesso em: 23 out. 2020.
- ALCANTARA, Isabela Romanha. **Fatores de produção, agricultura e desenvolvimento econômico regional no Brasil**. 2020. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, [S. l.], 2020.
- ALIPOUR, Shohreh; MONTASERI, Hashem; TAFAGHODI, Mohsen. Preparation and characterization of biodegradable paclitaxel loaded alginate microparticles for pulmonary delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 81, n. 2, p. 521–529, 2010. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.07.050.
- ALTENA, Karsten; GUDER, André; CRAMER, Claudia; BIERBAUM, Gabriele.

Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster. **Applied and environmental microbiology**, [S. l.], v. 66, n. 6, p. 2565–2571, 2000.

ARLOV, Øystein; SKJÅK-BRÆK, Gudmund. Sulfated Alginates as Heparin Analogues: A Review of Chemical and Functional Properties. **Molecules** **2017**, Vol. **22**, Page **778**, [S. l.], v. 22, n. 5, p. 778, 2017. DOI: 10.3390/MOLECULES22050778. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/22/5/778/htm>. Acesso em: 15 ago. 2021.

ARREBOLA, E.; JACOBS, R.; KORSTEN, L. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 108, n. 2, p. 386–395, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04438.x. Disponível em: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2672.2009.04438.x>. Acesso em: 30 out. 2020.

ASTUTI, Suci Hepy; RAHMA, Wanda Amelia; BUDIANTO, Emil. Biodegradable Microcapsules from D,L-PLA/PCL as Controlled Nifedipine Drug Delivery Carrier. **Macromolecular Symposia**, [S. l.], v. 391, n. 1, p. 1900132, 2020. DOI: 10.1002/masy.201900132. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/masy.201900132>. Acesso em: 21 out. 2020.

BAH, Mohamed Gibril; BILAL, Hafiz Muhammad; WANG, Jingtao. **Fabrication and application of complex microcapsules: A review** *Soft Matter* Royal Society of Chemistry, , 2020. DOI: 10.1039/c9sm01634a. Disponível em: <https://pubs-rsc-org.ez42.periodicos.capes.gov.br/en/content/articlehtml/2020/sm/c9sm01634a>. Acesso em: 17 out. 2020.

BAI, Yu; ZHAO, Yun; LI, Yang; XU, Jiachao; FU, Xiaoting; GAO, Xin; MAO, Xiangzhao; LI, Zhaoyong. UV-shielding alginate films crosslinked with Fe³⁺ containing EDTA. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 239, p. 115480, 2020. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115480.

BAKER, Brian P.; GREEN, Thomas A.; LOKER, Ali J. **Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems** *Biological Control* Academic Press Inc., , 2020. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2019.104095.

BASHAN, Yoav; DE-BASHAN, Luz E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, Juan Pablo. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). **Plant and Soil**, [S. l.], v. 378, n. 1–2, p. 1–33, 2014. DOI: 10.1007/s11104-013-1956-x.

BASTOS, Livia Pinto Heckert; DOS SANTOS, Carlos Henrique Corrêa; DE CARVALHO, Mario Geraldo; GARCIA-ROJAS, Edwin Elard. Encapsulation of the black pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil by lactoferrin-sodium alginate complex coacervates: Structural characterization and simulated gastrointestinal conditions. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 316, p. 126345, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126345>. Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814620301990>.

BAUDRON, Victor; GURIKOV, Pavel; SMIRNOVA, Irina. A continuous approach to the emulsion gelation method for the production of aerogel micro-particle. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S. l.], v. 566, n. December 2018, p. 58–69, 2019. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2018.12.055. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.12.055>.

BECKER, Timothy A.; KIPKE, Daryl R.; BRANDON, Tedd. Calcium alginate gel: a biocompatible and mechanically stable polymer for endovascular embolization. **Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials**, [S. l.], v. 54, n. 1, p. 76–86, 2001.

BENAVIDES, Sergio; CORTÉS, Pablo; PARADA, Javier; FRANCO, Wendy. Development of alginate microspheres containing thyme essential oil using ionic gelation. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 204, p. 77–83, 2016. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.02.104. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.104>.

BERIS, Despoina; THEOLOGIDIS, Ioannis; SKANDALIS, Nicholas; VASSILAKOS, Nikon. *Bacillus amyloliquefaciens* strain MBI600 induces salicylic acid dependent resistance in tomato plants against Tomato spotted wilt virus and Potato virus y. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 2020, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-28677-3. Disponível em: www.nature.com/scientificreports/. Acesso em: 3 nov. 2020.

BERNINGER, Teresa; MITTER, Birgit; PREININGER, Claudia; BERNINGER, Teresa; MITTER, Birgit; PREININGER, Claudia. The smaller , the better ? The size effect of alginate beads carrying plant growth-promoting bacteria for seed coating growth-promoting bacteria for seed coating. [S. l.], v. 2048, n. January, 2016. DOI: 10.3109/02652048.2015.1134690.

BETTIOL, W.; GHINI, R.; BERGANIN, A. F.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos**, 1995.

BOWDEN, Gregory D.; PICHLER, Bernd J.; MAURER, Andreas. A Design of Experiments (DoE) Approach Accelerates the Optimization of Copper-Mediated 18F-Fluorination Reactions of Arylstannanes. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-47846-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47846-6>. Acesso em: 7 jul. 2020.

BOX, G. E. P.; WILSON, K. B. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. **Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 1–38, 1951. DOI: 10.1111/j.2517-6161.1951.tb00067.x. Disponível em: <https://rss.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.2517-6161.1951.tb00067.x>. Acesso em: 10 jul. 2020.

BRASIL. Instrução Normativa Conjunta n. 3 de 10 de março de 2006Brasil, 2006. p. 11.

BROWNING, Kathryn Louise; STOCKER, Isabella N.; GUTFREUND, Philipp; CLARKE, Stuart Matthew. The effect of alginate composition on adsorption to calcium carbonate surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 581, p. 682–689, 2021. DOI: 10.1016/j.jcis.2020.07.088.

CARRINGTON, Damian. EU bans UK's most-used pesticide over health and environment fears. **The Guardian**, [S. l.], 2019. Disponível em: <https://www.theguardian.com/environment/2019/mar/29/eu-bans-widely-used-pesticide-over-safety-concerns>. Acesso em: 18 jul. 2021.

CARVALHO, I. T.; ESTEVINHO, B. N.; SANTOS, L. **Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal healthcare products - A review** **International Journal of Cosmetic Science** Blackwell Publishing Ltd, , 2016. DOI: 10.1111/ics.12232. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ics.12232>. Acesso em: 21 out. 2020.

CARVALHO, R. V. **Produção e caracterização de α -amilase por *Bacillus* sp SMIA-2 termofílico utilizando proteínas do soro de leite, e algumas aplicações da enzima**. 2007. UENF, [S. l.], 2007.

CATTELAN, Giada; GUERRERO GERBOLÉS, Amparo; FORESTI, Ruben; PRAMSTALLER, Peter P.; ROSSINI, Alessandra; MIRAGOLI, Michele; CAFFARRA MALVEZZI, Cristina. **Alginate Formulations: Current Developments in the Race for Hydrogel-Based Cardiac Regeneration** **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology** Frontiers Media S.A., , 2020. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00414. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34814441/>. Acesso em: 22 out. 2020.

CESARI, Adriana B.; PAULUCCI, Natalia S.; YSLAS, Edith I.; DARDANELLI, Marta Susana. Immobilization of Bradyrhizobium and Azospirillum in alginate matrix for long time of storage maintains cell viability and interaction with peanut. **Applied Microbiology and Biotechnology** 2020 **104:23**, [S. l.], v. 104, n. 23, p. 10145–10164, 2020. a. DOI: 10.1007/S00253-020-10910-7. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-020-10910-7>. Acesso em: 22 ago. 2021.

CESARI, Adriana; LOUREIRO, Mónica V.; VALE, Mário; YSLAS, E. Inés; DARDANELLI, Marta; MARQUES, Ana C. Polycaprolactone microcapsules containing citric acid and naringin for plant growth and sustainable agriculture: physico-chemical properties and release behavior. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 703, p. 135548, 2020. b. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.135548.

CET, M.; VURAL, M.; CAPAN, L.; HINCAL, Atilla A. Preparation and Characterization of BSA-Loaded Alginate Microspheres. **Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], 2007.

CHEN, Xiao-Hua et al. Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. **Journal of bacteriology**, [S. l.], v. 188, n. 11, p. 4024–4036, 2006.

CHEN, Xiao-Hua; KOUMOUTSI, Alexandra; SCHOLZ, Romy; BORRIS, Rainer. More than anticipated—production of antibiotics and other secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**, [S. l.], v. 16, n. 1–2, p. 14–24, 2009.

CHING, Su Hung; BANSAL, Nidhi; BHANDARI, Bhesh. Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [S. l.], v. 57, n. 6, p. 1133–1152, 2017. DOI: 10.1080/10408398.2014.965773.

CHUAH, Ai Mey; KUROIWA, Takashi; KOBAYASHI, Isao; ZHANG, Xian; NAKAJIMA, Mitsutoshi. Preparation of uniformly sized alginate microspheres using the novel combined methods of microchannel emulsification and external gelation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S. l.], v. 351, n. 1–3, p. 9–17, 2009. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2009.09.005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092777570900538X>. Acesso em: 18 set. 2020.

CORRÊA-FILHO, Luiz; MOLDÃO-MARTINS, Margarida; ALVES, Vitor. Advances in the Application of Microcapsules as Carriers of Functional Compounds for Food Products. **Applied Sciences**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 571, 2019. DOI: 10.3390/app9030571. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2076-3417/9/3/571>. Acesso em: 22 out. 2020.

CUSH, Randy. **Back to basics: A review of pesticide formulation types**, 2020. DA SILVA FERNANDES, Renan; DE MOURA, Márcia Regina; GLENN, Greg M.; AOUADA, Fauze Ahmad. Thermal, microstructural, and spectroscopic analysis of Ca²⁺ alginate/clay nanocomposite hydrogel beads. **Journal of Molecular Liquids**, [S. l.], v. 265, p. 327–336, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.06.005>.

DELANEY, Joseph T.; LIBERSKI, Albert R.; PERELAER, Jolke; SCHUBERT, Ulrich S. Reactive inkjet printing of calcium alginate hydrogel porogens - A new strategy to open-pore structured matrices with controlled geometry. **Soft Matter**, [S. l.], v. 6, n. 5, p. 866–869, 2010. DOI: 10.1039/b922888h. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2010/sm/b922888h>. Acesso em: 9 fev. 2021.

DOMMERGUES, Y. R.; DIEM, Hoang G.; DIVIES, C. Polyacrylamide-Entrapped *Rhizobium* as an Inoculant for Legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 37, n. 4, p. 779 LP – 781, 1979. Disponível em: <http://aem.asm.org/content/37/4/779.abstract>.

DORIGHELLO, Dalton Vinicio. Versatilidade de *Bacillus* spp. no controle biológico de doenças de plantas e na promoção de crescimento de soja. [S. l.], 2017.

EMBRAPA. **Controle Biológico de Pragas da Agricultura**. [s.l.] : EMBRAPA, 2020.

ESSIFI, Kamal; LAKRAT, Mohammed; BERRAAOUAN, Doha; FAUCONNIER, Marie-Laure; EL BACHIRI, Ali; TAHANI, Abdesselam. Optimization of gallic acid encapsulation in calcium alginate microbeads using Box-Behnken Experimental

Design. **Polymer Bulletin**, [S. l.], 2020. DOI: 10.1007/s00289-020-03397-9.

FEKI, Amal; HAMDY, Marwa; JABALLI, Imen; ZGHAL, Slim; NASRI, Moncef; BEN AMARA, Ibtissem. Conception and characterization of a multi-sensitive composite chitosan-red marine alga-polysaccharide hydrogels for insulin controlled-release. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 236, p. 116046, 2020. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116046.

FELDBAUM, Reut Amar et al. Single cell encapsulation in a Pickering emulsion stabilized by TiO₂ nanoparticles provides protection against UV radiation for a biopesticide. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [S. l.], v. 206, p. 111958, 2021. DOI: 10.1016/J.COLSURFB.2021.111958.

FERNANDES, Renan da Silva. Síntese e caracterização de hidrogéis nanoestruturados contendo nanoargila e zeólita com potencialidade de aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos. [S. l.], 2016.

FLORES, Floirendo P.; KONG, Fanbin. In Vitro Release Kinetics of Microencapsulated Materials and the Effect of the Food Matrix. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-food-030216-025720>, [S. l.], v. 8, p. 237–259, 2017. DOI: 10.1146/ANNUREV-FOOD-030216-025720. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-food-030216-025720>. Acesso em: 11 set. 2021.

FOO, Khor Siak; BAVOH, Cornelius Borecho; LAL, Bhajan; MOHD SHARIFF, Azmi. Rheology Impact of Various Hydrophilic-Hydrophobic Balance (HLB) Index Non-Ionic Surfactants on Cyclopentane Hydrates. **Molecules**, [S. l.], v. 25, n. 16, p. 3725, 2020. DOI: 10.3390/molecules25163725. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/16/3725>. Acesso em: 8 set. 2020.

FRAKOLAKI, Georgia; GIANNOU, Virginia; KEKOS, Dimitrios; TZIA, Constantina. **A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* Taylor and Francis Inc., , 2020. DOI: 10.1080/10408398.2020.1761773. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2020.1761773>. Acesso em: 17 out. 2020.

FU, Shao; THACKER, Ankur; SPERGER, Diana M.; BONI, Riccardo L.; BUCKNER, Ira S.; VELANKAR, Sachin; MUNSON, Eric J.; BLOCK, Lawrence H. Relevance of rheological properties of sodium alginate in solution to calcium alginate gel properties. **AAPS PharmSciTech**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 453–460, 2011. DOI: 10.1208/s12249-011-9587-0. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1208/s12249-011-9587-0>. Acesso em: 23 out. 2020.

FUKUMOTO, J. Studies on the production of bacterial amylase. I. Isolation of bacteria secreting potent amylases and their distribution. **Nippon Nogeikagaku Kaishi**, [S. l.], v. 19, p. 487–503, 1943.

GABARDO, Gislaine; DALLA PRIA, Maristella; PRESTES, André Manosso Correa; DA SILVA, Henrique Luis. *Trichoderma asperellum* e *Bacillus subtilis* como

antagonistas no crescimento de fungos fitopatogênicos in vitro. **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 6, n. 8, p. 55870–55885, 2020.

GARCÍA-GUTIÉRREZ, Karina; POGGY-VARALDO, Héctor M.; ESPARZA-GARCÍA, Fernando; IBARRA-RENDÓN, Jorge; BARRERA-CORTÉS, Josefina. Small microcapsules of crystal proteins and spores of *Bacillus thuringiensis* by an emulsification/internal gelation method. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, [S. l.], v. 34, n. 6, p. 701–708, 2011. DOI: 10.1007/s00449-011-0519-x.

GHOLAMIAN, Setareh; NOURANI, Moloud; BAKHSHI, Nafiseh. Formation and characterization of calcium alginate hydrogel beads filled with cumin seeds essential oil. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 338, p. 128143, 2021. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128143.

GOOS, Peter; JONES, Bradley; SYAFITRI, Utami. **I-Optimal Design of Mixture Experiments** *Journal of the American Statistical Association* American Statistical Association, , 2016. DOI: 10.1080/01621459.2015.1136632. Disponível em: <https://amstat.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01621459.2015.1136632>. Acesso em: 13 jul. 2020.

GOTOR-VILA, A.; USALL, J.; TORRES, R.; SOLSONA, C.; TEIXIDÓ, N. Enhanced shelf-life of the formulated biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 combining diverse packaging strategies and storage conditions. **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 290, p. 205–213, 2019. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.013.

GRANT, Gregor T.; MORRIS, Edwin R.; REES, David A.; SMITH, Peter J. C.; THOM, David. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. **FEBS Letters**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 195–198, 1973. DOI: 10.1016/0014-5793(73)80770-7.

GRIFFIN, W. C. Classification of Surface-Active Agents by “HLB”. **The Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, [S. l.], v. 1, p. 311–326, 1949.

GU, Qin et al. Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic interaction with the plantpathogenic fungus *Fusarium graminearum*. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 83, n. 19, p. 1075–1092, 2017. DOI: 10.1128/AEM.01075-17. Disponível em: <http://aem.asm.org/>. Acesso em: 30 out. 2020.

HAKIM, Danny. This Pesticide Is Prohibited in Britain. Why Is It Still Being Exported? - The New York Times. **The New York Times**, [S. l.], p. 1, 2016. Disponível em: <https://www.nytimes.com/2016/12/20/business/paraquat-weed-killer-pesticide.html>. Acesso em: 14 ago. 2020.

HALFELD-VIEIRA, Bernardo De Almeida; MARINHO-PRADO, Jeanne Scardini; NECHET, Kátia de Lima; MORANDI, Marcelo Augusto Boechat; BETTIOL, Wagner. **Defensivos Agrícolas Naturais: Uso e Perspectivas**. [s.l.: s.n.].

HAN, Yu; XU, Xiaofei; LIU, Fengxia; WEI, Wei; LIU, Zhijun. Study of the theory of

microbubble bursting to obtain bio-inspired alginate nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S. l.], v. 591, p. 124494, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.124494>. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775720300868>.

HASSAN, Refat M. Prospective and comparative new technique for evaluation the affinity of alginate for binding the alkaline-earth metal ions during formation the coordination biopolymer hydrogel complexes. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 165, p. 1022–1028, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.155.

HEYDARI, Asghar; PESSARAKLI, Mohammad. A Review on Biological Control of Fungal Plant Pathogens Using Microbial Antagonists. **Journal of Biological Sciences**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 273–290, 2010.

HOLKEM, Augusto Tasch; RADDATZ, Greice Carine; NUNES, Graciele Lorenzoni; CICHOSKI, Alexandre José; JACOB-LOPES, Eduardo; FERREIRA GROSSO, Carlos Raimundo; DE MENEZES, Cristiano Ragagnin. Development and characterization of alginate microcapsules containing Bifidobacterium BB-12 produced by emulsification/internal gelation followed by freeze drying. **LWT - Food Science and Technology**, [S. l.], v. 71, p. 302–308, 2016. DOI: 10.1016/J.LWT.2016.04.012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643816301967>. Acesso em: 16 abr. 2020.

HUA, Shuibo; MA, Haizhen; LI, Xun; YANG, Huixia; WANG, Aiqin. pH-sensitive sodium alginate/poly(vinyl alcohol) hydrogel beads prepared by combined Ca²⁺ crosslinking and freeze-thawing cycles for controlled release of diclofenac sodium. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 46, n. 5, p. 517–523, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.03.004>.

HUANG, Yanmin et al. Release-controlled microcapsules of thiamethoxam encapsulated in beeswax and their application in field. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, [S. l.], v. 55, n. 4, p. 342–354, 2020. DOI: 10.1080/03601234.2019.1697588. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03601234.2019.1697588>. Acesso em: 20 out. 2020.

HUMBERT, Pascal; PRZYKLENK, Michael; VEMMER, Marina; SCHUMANN, Mario; VIDAL, Stefan; PATEL, Anant V. Technical scale production of encapsulated *Saccharomyces cerevisiae* and *Metarhizium brunneum* attractive to wireworms. <http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2017.1380164>, [S. l.], v. 27, n. 9, p. 1049–1070, 2017. DOI: 10.1080/09583157.2017.1380164. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09583157.2017.1380164>. Acesso em: 22 ago. 2021.

IGATHINATHANE, C.; PORDESIMO, L. O.; COLUMBUS, E. P.; BATCHELOR, W. D.; METHUKU, S. R. Shape identification and particles size distribution from basic shape parameters using ImageJ. **Computers and Electronics in Agriculture**, [S. l.], v. 63,

n. 2, p. 168–182, 2008. DOI: 10.1016/j.compag.2008.02.007. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168169908000793>. Acesso em: 7 maio. 2020.

IL KIM, Pyoung; CHUNG, Ki-Chul. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. **FEMS Microbiology Letters**, [S. l.], v. 234, n. 1, p. 177–183, 2004. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2004.tb09530.x. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09530.x>.

JALALI, Elham; MAGHSOUDI, Shahab; NOROOZIAN, Ebrahim. A novel method for biosynthesis of different polymorphs of TiO₂ nanoparticles as a protector for *Bacillus thuringiensis* from Ultra Violet. **Scientific Reports** **2020 10:1**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020. DOI: 10.1038/s41598-019-57407-6. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-57407-6>. Acesso em: 19 set. 2021.

JAMAL, Qaiser; CHO, Jeong-Yong; MOON, Jae-Hak; MUNIR, Shahzad; ANEES, Muhammad; KIM, Kil Yong. Identification for the First Time of Cyclo(d-Pro-l-Leu) Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* Y1 as a Nematocide for Control of *Meloidogyne incognita*. **Molecules**, [S. l.], v. 22, n. 11, p. 1839, 2017. DOI: 10.3390/molecules22111839. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1420-3049/22/11/1839>. Acesso em: 30 out. 2020.

JEON, Tina; WONG, Dana E.; STROBEL, Scott A.; HUDNALL, Kevin; PEREIRA, Nadia R.; WILLIAMS, Kyle A.; ARBAUGH, Benjamin M.; CUNNIFFE, Julia C.; SCHER, Herbert B. How alginate properties influence in situ internal gelation in crosslinked alginate microcapsules (CLAMs) formed by spray drying. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 16, n. 2, p. e0247171, 2021. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0247171. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0247171>. Acesso em: 5 set. 2021.

Ji, Rui; WU, Jiahui; ZHANG, Junliang; WANG, Tao; ZHANG, Xudong; SHAO, Lei; CHEN, Daijie; WANG, Jian. Extending viability of bifidobacterium longum in chitosan-coated alginate microcapsules using emulsification and internal gelation encapsulation technology. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 10, n. JUN, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01389. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6609881/?report=abstract](https://pmc/articles/PMC6609881/?report=abstract). Acesso em: 18 set. 2020.

Ji, Seung Hyun; PAUL, Narayan Chandra; DENG, Jian Xin; KIM, Young Sook; YUN, Bong Sik; YU, Seung Hun. Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases. **Mycobiology**, [S. l.], v. 41, n. 4, p. 234–242, 2013. DOI: 10.5941/MYCO.2013.41.4.234. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3905128/?report=abstract](https://pmc/articles/PMC3905128/?report=abstract). Acesso em: 3 nov. 2020.

JIAO, Wenxiao; CHEN, Wenxue; MEI, Yuqi; YUN, Yonghuan; WANG, Boqiang; ZHONG, Qiuping; CHEN, Haiming; CHEN, Weijun. Effects of molecular weight and guluronic acid/mannuronic acid ratio on the rheological behavior and stabilizing property of sodium alginate. **Molecules**, [S. l.], v. 24, n. 23, p. 4374, 2019.

JOHN, Rojan P.; TYAGI, R. D.; BRAR, S. K.; SURAMPALLI, R. Y.; PRÉVOST,

Danielle. Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. **Critical Reviews in Biotechnology**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 211–226, 2011. DOI: 10.3109/07388551.2010.513327.

JOSHI, Prutha P.; VAN CLEAVE, Ashleigh; HELD, David W.; HOWE, Julie A.; AUAD, Maria L. Preparation of slow release encapsulated insecticide and fertilizer based on superabsorbent polysaccharide microbeads. **Journal of Applied Polymer Science**, [S. l.], v. 137, n. 39, p. 49177, 2020. DOI: 10.1002/app.49177. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/app.49177>. Acesso em: 20 out. 2020.

JUÁREZ-TRUJILLO, Naida; JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ, Maribel; FRANCO-ROBLES, Elena; BERISTAIN-GUEVARA, Cesar I.; CHACÓN-LÓPEZ, Martina A.; ORTIZ-BASURTO, Rosa I. Effect of three-stage encapsulation on survival of emulsified *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* during processing, storage and simulated gastrointestinal tests. **LWT**, [S. l.], p. 110468, 2020. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.110468.

JUNG, G.; MUGNIER, J.; DIEM, H. G.; DOMMERGUES, Y. R. Polymer-entrapped rhizobium as an inoculant for legumes. **Plant and Soil**, [S. l.], v. 65, n. 2, p. 219–231, 1982. DOI: 10.1007/BF02374652. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02374652>. Acesso em: 3 nov. 2020.

KANG, Sung-Min; LEE, Ji-Hoon; HUH, Yun Suk; TAKAYAMA, Shuichi. Alginate Microencapsulation for Three-Dimensional In Vitro Cell Culture. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, [S. l.], 2020. DOI: 10.1021/acsbiomaterials.0c00457. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c00457>. Acesso em: 22 out. 2020.

KASS, Laura; GOMEZ, Ayelen L.; ALTAMIRANO, Gabriela A. Relationship between agrochemical compounds and mammary gland development and breast cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [S. l.], v. 508, p. 110789, 2020. DOI: 10.1016/J.MCE.2020.110789.

KAWASAKI, Iuki. **Hidrogéis de alginato utilizados no tratamento de águas residuárias contendo corante verde malaquita**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, , 2017.

KESWANI, Chetan; SINGH, Harikesh B.; GARCÍA-ESTRADA, Carlos; CARADUS, John; HE, Ya Wen; MEZAACHE-AICHOOR, Samia; GLARE, Travis R.; BORRISS, Rainer; SANSINENEA, Estibaliz. **Antimicrobial secondary metabolites from agriculturally important bacteria as next-generation pesticides** *Applied Microbiology and Biotechnology* Springer, , 2020. DOI: 10.1007/s00253-019-10300-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10300-8>. Acesso em: 30 out. 2020.

KIM, Jinwon; HILTPOLD, Ivan; JAFFUEL, Geoffrey; SBAITI, Ilham; HIBBARD, Bruce E.; TURLINGS, Ted C. J. Calcium-alginate beads as a formulation for the application of entomopathogenic nematodes to control rootworms. **Journal of Pest Science** 2021 **94:4**, [S. l.], v. 94, n. 4, p. 1197–1208, 2021. DOI: 10.1007/S10340-021-01349-4. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10340-021-01349-4>. Acesso em: 22 ago. 2021.

KÖHL, Jürgen; KOLNAAR, Rogier; RAVENSBERG, Willem J. Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. **Frontiers in Plant Science**, [S. l.], v. 10, p. 845, 2019. DOI: 10.3389/fpls.2019.00845. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2019.00845/full>. Acesso em: 28 out. 2020.

KOLOBET, L. V.; ZHIGLETSOVA, S. K.; KOSAREVA, N. I.; BYSTROVA, E. V.; DERBYSHEV, V. V.; KRASNOVA, S. P.; SCHISLER, D. Development of an extended shelf-life, liquid formulation of the biofungicide *Trichoderma asperellum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 123–131, 2008. DOI: 10.1007/s11274-007-9449-9. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-007-9449-9>. Acesso em: 8 fev. 2021.

KOUMOUTSI, Alexandra; CHEN, Xiao-Hua; HENNE, Anke; LIESEGANG, Heiko; HITZEROTH, Gabriele; FRANKE, Peter; VATER, Joachim; BORRIS, Rainer. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. **Journal of bacteriology**, [S. l.], v. 186, n. 4, p. 1084–1096, 2004.

KRELL, Vivien; JAKOBS-SCHOENWANDT, Desirée; PERSICKE, Marcus; PATEL, Anant V. Endogenous arabitol and mannitol improve shelf life of encapsulated *Metarhizium brunneum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 34, n. 8, p. 108, 2018. a. DOI: 10.1007/s11274-018-2492-x. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2492-x>. Acesso em: 22 out. 2020.

KRELL, Vivien; JAKOBS-SCHOENWANDT, Desirée; VIDAL, Stefan; PATEL, Anant V. Encapsulation of *Metarhizium brunneum* enhances endophytism in tomato plants. **Biological Control**, [S. l.], v. 116, p. 62–73, 2018. b. DOI: 10.1016/J.BIOCONTROL.2017.05.004.

KUMARI, Minashree; GUPTA, Sunil Kumar. Response surface methodological (RSM) approach for optimizing the removal of trihalomethanes (THMs) and its precursor's by surfactant modified magnetic nano-adsorbents (sMNP) - An endeavor to diminish probable cancer risk. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-54902-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54902-8>. Acesso em: 8 jul. 2020.

KURATA, Atsushi; YAMAGUCHI, Taishi; KIRA, Masaaki; KISHIMOTO, Noriaki. Characterization and heterologous expression of an antimicrobial peptide from *Bacillus amyloliquefaciens* CMW1. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 886–893, 2019. DOI: 10.1080/13102818.2019.1627246. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13102818.2019.1627246>. Acesso em: 30 out. 2020.

KWON, Hyuk-Cheol; SOHN, Hyejin; KIM, Do-Hyun; JEONG, Chang-Hee; KIM, Dong-Wook; HAN, Sung-Gu. **Effects of Flutriafol Fungicide on the Lipid Accumulation in Human Liver Cells and Rat Liver Foods**, 2021. DOI: 10.3390/foods10061346.

LAMICHHANE, Jay Ram; DÜRR, Carolyne; SCHWANCK, André A.; ROBIN, Marie

Hélène; SARTHOU, Jean Pierre; CELLIER, Vincent; MESSÉAN, Antoine; AUBERTOT, Jean Noël. **Integrated management of damping-off diseases. A review***Agronomy for Sustainable Development* Springer-Verlag France, , 2017. DOI: 10.1007/s13593-017-0417-y. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13593-017-0417-y>. Acesso em: 14 ago. 2020.

LAWSON, John. **Design and Analysis of Experiments with R**. Provo: CRC Press, 2014. v. 115

LE HESRAN, Sophie; RAS, Erica; WAJNBERG, Eric; BEUKEBOOM, Leo W. Next generation biological control – an introduction. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, [S. l.], v. 167, n. 7, p. eea.12805, 2019. DOI: 10.1111/eea.12805. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/eea.12805>. Acesso em: 13 ago. 2020.

LEE, An; CHENG, Kuan-Chen; LIU, Je-Ruei. Isolation and characterization of a *Bacillus amyloliquefaciens* strain with zearalenone removal ability and its probiotic potential. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 12, n. 8, p. e0182220, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0182220. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0182220>. Acesso em: 9 dez. 2020.

LEE, Huey Ying; CHAN, Lai Wah; DOLZHENKO, Anton V; HENG, Paul Wan Sia. Influence of viscosity and uronic acid composition of alginates on the properties of alginate films and microspheres produced by emulsification. **Journal of microencapsulation**, [S. l.], v. 23, n. 8, p. 912–927, 2006.

LEE, Hwang-A.; KIM, Jeong. Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* Strains with Antifungal Activities from Meju. **Preventive nutrition and food science**, [S. l.], v. 17, p. 64–70, 2012. DOI: 10.3746/pnf.2012.17.1.064.

LENGYEL, Miléna; KÁLLAI-SZABÓ, Nikolett; ANTAL, Vince; LAKI, András József; ANTAL, István. **Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery***Scientia Pharmaceutica* MDPI AG, , 2019. DOI: 10.3390/scipharm87030020. Disponível em: www.mdpi.com/journal/scipharm. Acesso em: 4 jun. 2021.

LI, Bing; LI, Qing; XU, Zhihui; ZHANG, Nan; SHEN, Qirong; ZHANG, Ruifu. Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 5, n. NOV, p. 636, 2014. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00636. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00636/abstract>. Acesso em: 30 out. 2020.

LI, Xuan; WU, Zhansheng; HE, Yanhui; YE, Bang-Ce; WANG, Jun. Preparation and characterization of monodisperse microcapsules with alginate and bentonite via external gelation technique encapsulating *Pseudomonas putida* Rs-198. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, [S. l.], v. 28, n. 14, p. 1556–1571, 2017. DOI: 10.1080/09205063.2017.1335075. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09205063.2017.1335075>.

LIN, Tien-Chu. Investigation on formation and hardening process of microcapsules under excitation. In: INTERNATIONAL JOURNAL OF MODERN PHYSICS: CONFERENCE SERIES 2012, **Anais** [...]. : World Scientific, 2012. p. 262–269.

LIU, Xing; HUO, Jun-Li; LI, Ting-Ting; PENG, Hao-Kai; LIN, Jia-Horng; LOU, Ching-Wen. Investigation of the Shear Thickening Fluid Encapsulation in an Orifice Coagulation Bath. **Polymers**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 519, 2019. DOI: 10.3390/polym11030519. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30960503>.

LIU, Zhongzhong; BUDIHARJO, Anto; WANG, Pengfei; SHI, Hui; FANG, Juan; BORRISS, Rainer; ZHANG, Keqin; HUANG, Xiaowei. The highly modified microcin peptide plantazolicin is associated with nematocidal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 97, n. 23, p. 10081–10090, 2013. DOI: 10.1007/s00253-013-5247-5. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-013-5247-5>. Acesso em: 3 nov. 2020.

LOPES, Allyson Rodrigo de Oliveira; LOCATELLI, Gabriel Olivo; BARBOSA, Raquel de Melo; LOBO JUNIOR, Murillo; MOURA MASCARIN, Gabriel; LAMENHA LUNA FINKLER, Christine. Preparation, characterisation and cell viability of encapsulated *Trichoderma asperellum* in alginate beads. **Journal of Microencapsulation**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 270–282, 2020. DOI: 10.1080/02652048.2020.1729884. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652048.2020.1729884>. Acesso em: 20 out. 2020.

LUO, Wenjian; LIU, Lidong; QI, Gaofu; YANG, Fan; SHI, Xuanjie; ZHAO, Xiuyun. Embedding *Bacillus velezensis* NH-1 in microcapsules for biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt. **Applied and environmental microbiology**, [S. l.], v. 85, n. 9, p. e03128-18, 2019.

LUPO, Bryshila; MAESTRO, Alicia; PORRAS, Montserrat; GUTIÉRREZ, José M.; GONZÁLEZ, Carmen. Preparation of alginate microspheres by emulsification/internal gelation to encapsulate cocoa polyphenols. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 38, p. 56–65, 2014. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2013.11.003.

LV, Jia; DA, Rong; CHENG, Yue; TUO, Xiaohong; WEI, Jie; JIANG, Kaichong; MONISAYO, Adediji Omolade; HAN, Bei. Mechanism of Antibacterial Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* C-1 Lipopeptide toward Anaerobic *Clostridium difficile*. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2020, 2020. DOI: 10.1155/2020/3104613.

MA, Xin; WANG, Xiaobing; CHENG, Juan; NIE, Xin; YU, Xuexin; ZHAO, Yongtian; WANG, Wei. Microencapsulation of *Bacillus subtilis* B99-2 and its biocontrol efficiency against *Rhizoctonia solani* in tomato. **Biological Control**, [S. l.], v. 90, p. 34–41, 2015. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2015.05.013.

MACIAG, Tomasz; KRZYZANOWSKA, Dorota M.; JAFRA, Sylwia; SIWINSKA, Joanna; CZAJKOWSKI, Robert. The Great Five—an artificial bacterial consortium with antagonistic activity towards *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp.: formulation, shelf life, and the ability to prevent soft rot of potato in storage. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 104, n. 10, p. 4547–4561, 2020. DOI: 10.1007/s00253-020-10550-x. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10550-x>. Acesso em: 8

fev. 2021.

MADIGAN, Michael T.; MARTINKO, John M.; BENDER, Kelly S.; BUCKLEY, Daniel H.; STAHL, David A. **Microbiologia de Brock**. 14^a Edição ed. [s.l.] : Artmed Editora, 2016.

MAGHSOUDI, Shahab; JALALI, Elham. Noble UV protective agent for *Bacillus thuringiensis* based on a combination of graphene oxide and olive oil. **Scientific Reports** **2017 7:1**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1–6, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-11080-9. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-11080-9>. Acesso em: 22 ago. 2021.

MAHEEN, Safirah; RASUL, Akhtar; HANIF, Muhammad; KHAN, Hafeez Ullah. Lipospheres for Simultaneous Controlled Release and Improved Pharmacokinetic Profiles of Saxagliptin-Enalapril: Formulation, Optimization, and Comparative In Vitro-In Vivo Evaluation. **AAPS PharmSciTech**, [S. l.], v. 21, n. 5, p. 1–16, 2020. DOI: 10.1208/s12249-020-01733-w. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1208/s12249-020-01733-w>. Acesso em: 18 out. 2020.

MALAIKOZHUNDAN, Balasubramanian; VASEEHARAN, Baskaralingam; VIJAYAKUMAR, Sekar; THANGARAJ, Merlin P. *Bacillus thuringiensis* coated zinc oxide nanoparticle and its biopesticidal effects on the pulse beetle, *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [S. l.], v. 174, p. 306–314, 2017. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2017.08.014.

MAPA. **Mercado de biodefensivos cresce mais de 70% no Brasil em um ano — Português (Brasil)**. 2020. Disponível em: <https://maissoja.com.br/mercado-de-biodefensivos-cresce-mais-de-70-no-brasil-em-um-ano/>. Acesso em: 18 jul. 2021.

MARGOSCH, Dirk; EHRMANN, Matthias A.; BUCKOW, Roman; HEINZ, Volker; VOGEL, Rudi F.; GÄNZLE, Michael G. High-pressure-mediated survival of *Clostridium botulinum* and *Bacillus amyloliquefaciens* endospores at high temperature. **Applied and environmental microbiology**, [S. l.], v. 72, n. 5, p. 3476–3481, 2006.

MARTIN, M. J.; LARA-VILLOSLADA, F.; RUIZ, M. A.; MORALES, M. E. Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated *Lactobacillus fermentum* CECT5716. **LWT - Food Science and Technology**, [S. l.], v. 53, n. 2, p. 480–486, 2013. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.03.019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002364381300114X>. Acesso em: 15 dez. 2020.

MCFARLAND, Joseph. Nephelometer: an instrument for media used for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. **J Am Med Assoc**, [S. l.], v. 49, p. 1176–1178, 1907.

MEFTAH KADMIRI, Issam; EL MERNISSI, Najib; AZAROUAL, Salah Eddine; MEKHZOU, Mohamed El Mehdi; QAISS, Abou El Kacem; BOUHFID, Rachid. Bioformulation of Microbial Fertilizer Based on Clay and Alginate Encapsulation. **Current Microbiology** **2020 78:1**, [S. l.], v. 78, n. 1, p. 86–94, 2020. DOI:

10.1007/S00284-020-02262-2. Disponível em:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-020-02262-2>. Acesso em: 11 set. 2021.

MIENDA, Bashir Sajo; IDI, Ahmad; UMAR, Abdulhamid. Microbiological Features of Solid State Fermentation and its Applications - An overview. **Research in Biotechnology**, [S. l.], v. 2, n. 6, p. 21–26, 2011. Disponível em:
<https://www.researchgate.net/publication/236177189>. Acesso em: 16 ago. 2021.

MISHRA, Munmaya. **Handbook of Encapsulation and Controlled Release**. [s.l.] : CRC Press, 2015. DOI: 10.1201/b19038.

MOCHIZUKI, Mai; YAMAMOTO, Shoko; AOKI, Yoshinao; SUZUKI, Shunji. Isolation and characterisation of *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 as a biological control agent for anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Biocontrol Science and Technology**, [S. l.], v. 22, n. 6, p. 697–709, 2012. DOI: 10.1080/09583157.2012.679644. Disponível em:
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09583157.2012.679644>. Acesso em: 9 dez. 2020.

MOFIDI, N.; AGHAI-MOGHADAM, M.; SARBOLOUKI, M. N. Mass preparation and characterization of alginate microspheres. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 35, n. 9, p. 885–888, 2000. DOI: 10.1016/S0032-9592(99)00149-1.

MONDARDO, Andrei Antonio. Estudo dos efeitos da luz ultravioleta para redução microbiológica em amido de mandioca. [S. l.], 2015.

MONTGOMERY, Douglas C. **Design and analysis of experiments**. Ninth Edit ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2017.

MYERS, Raymond H.; MONTGOMERY, Douglas C.; ANDERSON-COOK, Christine M. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments**. [s.l.] : John Wiley & Sons, 2016.

NAGHAVI, Samaneh; MARZBAN, Rasoul; SOHRAB, Imani. Stability of *Bacillus thuringiensis* and NPV Microencapsulated Formulation under Sunlight. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, [S. l.], v. 7, 2016.

NANDY, Aditi; LEE, Eliza; MANDAL, Abhyuday; SAREMI, Raha; SHARMA, Suraj. Microencapsulation of retinyl palmitate by melt dispersion for cosmetic application. **Journal of Microencapsulation**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 205–219, 2020. DOI: 10.1080/02652048.2020.1720029. Disponível em:
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652048.2020.1720029>. Acesso em: 21 out. 2020.

NOLLET, M.; BOULGHOBRA, H.; CALLIGARO, E.; RODIER, J. -D. An efficient method to determine the Hydrophile-Lipophile Balance of surfactants using the phase inversion temperature deviation of C₁₂E₈ / n-octane/water emulsions. **International Journal of Cosmetic Science**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 99–108, 2019. DOI: 10.1111/ics.12516. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ics.12516>. Acesso em: 8 set. 2020.

OGINO, Cristiane Mitie. **Fertilizantes minerais : análise da dinâmica na economia agrícola do Centro-Oeste brasileiro**. 2018. Universidade de São Paulo, [S. l.], 2018.

ONG, Wan-Ding; TEY, Beng-Ti; QUEK, Siew Young; TANG, Siah-Ying; CHAN, Eng-Seng. Alginate-Based Emulsion Template Containing High Oil Loading Stabilized by Nonionic Surfactants. **Journal of Food Science**, [S. l.], v. 80, n. 1, p. E93–E100, 2015. DOI: 10.1111/1750-3841.12729. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/1750-3841.12729>. Acesso em: 11 ago. 2020.

OZDEMIR, Akin. An I-optimal experimental design-embedded nonlinear lexicographic goal programming model for optimization of controllable design factors. **Engineering Optimization**, [S. l.], p. 1–16, 2020. DOI: 10.1080/0305215X.2020.1732365. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/0305215X.2020.1732365>.

PANICHIKKAL, Jishma; PRATHAP, Gopika; NAIR, Remakanthan Appukuttan; KRISHNANKUTTY, Radhakrishnan Edayileveetil. Evaluation of plant probiotic performance of *Pseudomonas* sp. encapsulated in alginate supplemented with salicylic acid and zinc oxide nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 166, p. 138–143, 2021. DOI: 10.1016/J.IJBIOMAC.2020.10.110.

PAQUES, Jerome P.; VAN DER LINDEN, Erik; VAN RIJN, Cees J. M.; SAGIS, Leonard M. C. Preparation methods of alginate nanoparticles. **Advances in Colloid and Interface Science**, [S. l.], v. 209, p. 163–171, 2014. DOI: 10.1016/j.cis.2014.03.009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2014.03.009>.

PARK, Kyung Min; SUNG, Ho; CHOI, Seung Jun; CHOI, Young Jin; CHANG, Pahn-Shick. Double-layered microparticles with enzyme-triggered release for the targeted delivery of water-soluble bioactive compounds to small intestine. **Food chemistry**, [S. l.], v. 161, p. 53–59, 2014.

PERCY, Samuel R. **Improvement in drying and concentrating liquid substances by atomizing**, 125406, 1872.

PEREDA, Mariana; PONCELET, Denis; RENARD, Denis. Characterization of Core-Shell Alginate Capsules. **Food Biophysics**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 467–478, 2019. DOI: 10.1007/s11483-019-09595-x.

PETEIRO, César. Alginate Production from Marine Macroalgae, with Emphasis on Kelp Farming. In: [s.l.] : Springer, Singapore, 2018. p. 27–66. DOI: 10.1007/978-981-10-6910-9_2. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-10-6910-9_2. Acesso em: 12 fev. 2021.

PETRAITYTĖ, Sigita; ŠIPAILIENĖ, Aušra. Enhancing encapsulation efficiency of alginate capsules containing lactic acid bacteria by using different divalent cross-linkers sources. **Lwt**, [S. l.], v. 110, p. 307–315, 2019. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.01.065. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.01.065>.

PICONE, Carolina Siqueira Franco; CUNHA, Rosiane Lopes. Formation of nano and microstructures by polysorbate-chitosan association. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [S. l.], v. 418, p. 29–38, 2013. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2012.11.019.

PIÑÓN-BALDERRAMA, Claudia I.; LEYVA-PORRAS, César; TERÁN-FIGUEROA, Yolanda; ESPINOSA-SOLÍS, Vicente; ÁLVAREZ-SALAS, Claudia; SAAVEDRA-LEOS, María Z. Encapsulation of active ingredients in food industry by spray-drying and nano spray-drying technologies. **Processes**, [S. l.], v. 8, n. 8, p. 889, 2020. DOI: 10.3390/PR8080889. Disponível em: www.mdpi.com/journal/processes. Acesso em: 17 out. 2020.

POUR, Mojde Moradi; SABERI-RISEH, Roohallah; MOHAMMADINEJAD, Reza; HOSSEINI, Ahmad. Investigating the formulation of alginate- gelatin encapsulated *Pseudomonas fluorescens* (VUPF5 and T17-4 strains) for controlling *Fusarium solani* on potato. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 133, p. 603–613, 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.04.071.

POZZA, Edson Ampélio et al. (ORG.). **XIX International Symposium on Plant Disease Management Plant Health in Tropical Agribusiness**. Lavras: UFLA, 2019.

PRIEST, F. G.; GOODFELLOW, M.; SHUTE, L. A.; BERKELEY, R. C. W. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 69–71, 1987. DOI: 10.1099/00207713-37-1-69. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-37-1-69>. Acesso em: 29 out. 2020.

PRZYKLENK, Michael; VEMMER, Marina; HANITZSCH, Miriam; PATEL, Anant. A bioencapsulation and drying method increases shelf life and efficacy of *Metarhizium brunneum* conidia. [http://dx.doi.org/10.1080/02652048.2017.1354941](https://dx.doi.org/10.1080/02652048.2017.1354941), [S. l.], v. 34, n. 5, p. 498–512, 2017. DOI: 10.1080/02652048.2017.1354941. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02652048.2017.1354941>. Acesso em: 22 ago. 2021.

QIU, Hua Long; FOX, Eduardo G. P.; QIN, Chang Sheng; ZHAO, Dan Yang; YANG, Hua; XU, Jin Zhu. Microcapsuled entomopathogenic fungus against fire ants, *Solenopsis invicta*. **Biological Control**, [S. l.], v. 134, p. 141–149, 2019. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2019.03.018.

RAMDHAN, Tezar; CHING, Su Hung; PRAKASH, Sangeeta; BHANDARI, Bhesh. **Physical and mechanical properties of alginate based composite gels** *Trends in Food Science and Technology* Elsevier Ltd, , 2020. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.10.002. RASHEDY, Sarah H.; ABD EL HAFEZ, Mohamed S. M.; DAR, Mahmoud A.; COTAS, João; PEREIRA, Leonel. Evaluation and Characterization of Alginate Extracted from Brown Seaweed Collected in the Red Sea. **Applied Sciences**, [S. l.], v. 11, n. 14, p. 6290, 2021.

RAY, Rajat; MAITY, Siddhartha; MANDAL, Sanchita; CHATTERJEE, Tapan Kumar; SA, Biswanath. Studies on the release of ibuprofen from Al³⁺ ion cross-linked

homopolymeric and interpenetrating network hydrogel beads of carboxymethyl xanthan and sodium alginate. **Advances in Polymer Technology**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 1–11, 2011. DOI: 10.1002/adv.20199. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/adv.20199>. Acesso em: 22 out. 2020.

RODRIGUES, A. P.; HIRSCH, Daniela; FIGUEIREDO, H. C. P.; LOGATO, P. V. R.; MORAES, Â. M. Production and characterisation of alginate microparticles incorporating *Aeromonas hydrophila* designed for fish oral vaccination. **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 41, n. 3, p. 638–643, 2006. DOI: 10.1016/j.procbio.2005.08.010.

ROHMAN, Saefur; KAEWTATIP, Kaewta; KANTACHOTE, Duangporn; TANTIRUNGKIJ, Manee. Encapsulation of *Rhodopseudomonas palustris* KTSSR54 using beads from alginate/starch blends. **Journal of Applied Polymer Science**, [S. l.], n. August, p. 1–9, 2020. DOI: 10.1002/app.50084.

SABERI-RISEH, Roohallah; MORADI-POUR, Mojde. A novel encapsulation of *Streptomyces fulvissimus* Uts22 by spray drying and its biocontrol efficiency against *Gaeumannomyces graminis*, the causal agent of take-all disease in wheat. **Pest Management Science**, [S. l.], 2021. DOI: 10.1002/PS.6469. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ps.6469>. Acesso em: 22 ago. 2021.

SALOMÃO, Pedro Emílio Amador; FERRO, Antônio Max Souza; RUAS, Wilson Ferreira. Herbicidas no Brasil: uma breve revisão. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 1–22, 2019. DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004.

SANTOS, Jônatas Barros Dos. **Seleção de estirpes de *Bacillus* spp. tóxicas a *Meloidogyne* spp. e promotoras de crescimento vegetal**. 2018. Unb, [S. l.], 2018. SAWICKA, Barbara; EGBUNA, Chukwuebuka. Pests of Agricultural Crops and Control Measures. In: **Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control**. [s.l.] : Elsevier, 2020. p. 1–16. DOI: 10.1016/b978-0-12-819304-4.00001-4.

SCHNEIDER, Kathrin; CHEN, Xiao-Hua; VATER, Joachim; FRANKE, Peter; NICHOLSON, Graeme; BORRISS, Rainer; SÜSSMUTH, Roderich D. Macrolactin is the polyketide biosynthesis product of the *pkS2* cluster of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Journal of natural products**, [S. l.], v. 70, n. 9, p. 1417–1423, 2007. SCHOLZ, Romy et al. Amylocyclicin, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 196, n. 10, p. 1842–1852, 2014.

SETLOW, Peter. Resistance of spores of *Bacillus* species to ultraviolet light. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, [S. l.], v. 38, n. 2–3, p. 97–104, 2001. DOI: 10.1002/EM.1058. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/em.1058>. Acesso em: 29 ago. 2021.

SHOJAEI, Saeed; ARDAKANI, Mohammad Ali Hakimzadeh; SODAEZADEH, Hamid; JAFARI, Mohammad; AFZALI, Seyed fakhreddin. Simultaneous optimization of parameters influencing organic mulch test using response surface methodology. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-63047-

y. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-63047-y>. Acesso em: 8 jul. 2020.

SILVERSTEIN, R. M.; SILVERSTEIN, R. M. S.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J.; (FIRM), Knovel. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. [s.l.] : Wiley, 2005.

SINGH, Amrita; DHIMAN, Nitesh; KAR, Aditya Kumar; SINGH, Divya; PUROHIT, Mahaveer Prasad; GHOSH, Debabrata; PATNAIK, Satyakam. **Advances in controlled release pesticide formulations: Prospects to safer integrated pest management and sustainable agriculture** *Journal of Hazardous Materials* Elsevier B.V., , 2020. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2019.121525.

SMUCKER, Byran; KRZYWINSKI, Martin; ALTMAN, Naomi. **Optimal experimental design** *Nature Methods* Nature Publishing Group, , 2018. DOI: 10.1038/s41592-018-0083-2.

SONG, Huiyi; YU, Weiting; GAO, Meng; LIU, Xiudong; MA, Xiaojun. Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 96, n. 1, p. 181–189, 2013. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.03.068.

SREENIVASA RAO, Mahendrakar; UMAMAHESWARI, Rajappa; KUMAR CHAKRAVARTHY, Akshay; NUTHANA GRACE, Gummala; KAMALNATH, Manoharan; PRABU, Pandi. A frontier area of research on liquid biopesticides: the way forward for sustainable agriculture in India. **COMMENTARY CURRENT SCIENCE**, [S. l.], v. 108, n. 9, 2015. Disponível em: <http://cibrc.nic.in/>. Acesso em: 16 ago. 2021.

SRIVASTAVA, Prabhat Kumar; SINGH, Vijay Pratap; SINGH, Anita; SINGH, Samiksha; PRASAD, Sheo Mohan; TRIPATHI, Durgesh Kumar; CHAUHAN, Devendra Kumar. **Pesticides in Crop Production**. [s.l.] : Wiley Online Library, 2020.

STEVENSON, Keiran; MCVEY, Alexander F.; CLARK, Ivan B. N.; SWAIN, Peter S.; PILIZOTA, Teuta. General calibration of microbial growth in microplate readers. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 1–7, 2016. DOI: 10.1038/srep38828. Disponível em: www.nature.com/scientificreports. Acesso em: 9 dez. 2020.

STRAHSBURGER, Erwin; RETAMALES, Patricio; ESTRADA, Juan; SEEGER, Michael. Método de la microgota: Usado con agar cromogénico es un procedimiento útil para el monitoreo sanitario en acuicultura. **Latin American Journal of Aquatic Research**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 742–749, 2016. DOI: 10.3856/vol44-issue4-fulltext-9. Disponível em: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-560X2016000400009&lng=es&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 9 nov. 2020.

SUN, Xiuxiu; CAMERON, Randall G.; BAI, Jinhe. Effect of spray-drying temperature on physicochemical, antioxidant and antimicrobial properties of pectin/sodium alginate microencapsulated carvacrol. **Food Hydrocolloids**, [S. l.], v. 100, p. 105420, 2020. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2019.105420.

SURAPHAN, Nuntanit; FAN, Linfeng; LIU, Baoxia; WU, Decheng. Co-delivery of

chlorantraniliprole and avermectin with a polylactide microcapsule formulation. **RSC Advances**, [S. l.], v. 10, n. 43, p. 25418–25425, 2020. DOI: 10.1039/d0ra03825c. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2020/ra/d0ra03825c>. Acesso em: 20 out. 2020.

THANGRONGTHONG, Suppasin; PUTTARAT, Narathip; LADDA, Boonyarut; ITTHISOPONKUL, Teerarat; PINKET, Wichchunee; KASEMWONG, Kittiwut; TAWEECHOTIPATR, Malai. Microencapsulation of probiotic *Lactobacillus brevis* ST-69 producing GABA using alginate supplemented with nanocrystalline starch. **Food Science and Biotechnology**, [S. l.], v. 29, n. 11, p. 1475–1482, 2020. DOI: 10.1007/s10068-020-00812-9. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s10068-020-00812-9>. Acesso em: 18 out. 2020.

TIAN, Wenjing; SONG, Jiaojiao; WANG, Yali; YUE, Linfang; WANG, Junguo; DAN, Tong; MENGHE, Bilige; ZHANG, Heping. Effect of different calcium salts and methods for triggering gelation on the characteristics of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* LIP-1. **RSC Advances**, [S. l.], v. 5, n. 90, p. 73352–73362, 2015. DOI: 10.1039/c5ra13354h. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2015/ra/c5ra13354h>. Acesso em: 15 dez. 2020.

TROMPIZ, Gus; DE LA HAMAIDE, Sybille. French regulator says to ban some glyphosate-based products. **Reuters**, Paris, 2019. Disponível em: <https://news.trust.org/item/20191209120646-dv8gg>. Acesso em: 14 ago. 2020.

TU, Liang; HE, Yanhui; YANG, Hongbing; WU, Zhansheng; YI, Lijuan. Preparation and characterization of alginate–gelatin microencapsulated *Bacillus subtilis* SL-13 by emulsification/internal gelation. <http://dx.doi.org/10.1080/09205063.2015.1056075>, [S. l.], v. 26, n. 12, p. 735–749, 2015. DOI: 10.1080/09205063.2015.1056075. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09205063.2015.1056075>. Acesso em: 11 set. 2021.

UYEN, Nguyen Thi Thanh; HAMID, Zuratul Ain Abdul; TRAM, Nguyen Xuan Thanh; AHMAD, Nurazreena. **Fabrication of alginate microspheres for drug delivery: A review** *International Journal of Biological Macromolecules* Elsevier B.V., , 2019. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.233.

UYEN, Nguyen Thi Thanh; HAMID, Zuratul Ain Abdul; TRAM, Nguyen Xuan Thanh; AHMAD, Nurazreena. Fabrication of alginate microspheres for drug delivery: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 153, p. 1035–1046, 2020. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.233. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.233>.

VALLEJO-CASTILLO, Vladimir; RODRÍGUEZ-STOUVENEL, Aida; MARTÍNEZ, Ronny; BERNAL, Claudia. Development of alginate-pectin microcapsules by the extrusion for encapsulation and controlled release of polyphenols from papaya (*Carica papaya* L.). **Journal of Food Biochemistry**, [S. l.], v. 44, n. 9, 2020. DOI: 10.1111/jfbc.13331. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfbc.13331>. Acesso em: 23 out. 2020.

VARAPRASAD, Kokkarachedu; JAYARAMUDU, Tippabattini; KANIKIREDDY, Vimala; TORO, Claudio; SADIKU, Emmanuel Rotimi. **Alginate-based composite materials for wound dressing application: A mini review** *Carbohydrate Polymers* Elsevier Ltd, , 2020. DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116025.

VATANKHAH, Elham; HAMED, Sepideh; RAMEZANI, Omid. Surfactant-assisted incorporation of rosmarinic acid into electrosprayed poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles with potential for cosmetic and pharmaceutical applications. **Polymer Testing**, [S. l.], v. 81, p. 106180, 2020. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2019.106180.

VEMMER, Marina; PATEL, Anant V. Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. **Biological Control**, [S. l.], v. 67, n. 3, p. 380–389, 2013. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2013.09.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.003>.

VILELA, Vitor. **Planejamento de experimento computacional e aprendizagem estatística aplicados em simulação euleriana refinada da colisão gota-partícula**. 2020. Universidade Federal de Uberlândia, [S. l.], 2020.

WALKER, H. Lynn; CONNICK JR, William J. Sodium alginate for production and formulation of mycoherbicides. **Weed science**, [S. l.], p. 333–338, 1983.

WILSON, Kenneth; GRZYWACZ, David; CURCIC, Igor; SCOATES, Freya; HARPER, Karen; RICE, Annabel; PAUL, Nigel; DILLON, Aoife. A novel formulation technology for baculoviruses protects biopesticide from degradation by ultraviolet radiation. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-70293-7. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-70293-7>. Acesso em: 22 ago. 2021.

WIWATTANAPATAPEE, R.; CHUMTHONG, A.; PENGNOO, A.; KANJANAMANEESATHIAN, M. Preparation and evaluation of *Bacillus megaterium*-alginate microcapsules for control of rice sheath blight disease. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 29, n. 8, p. 1487–1497, 2013. DOI: 10.1007/s11274-013-1314-4. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-013-1314-4>. Acesso em: 18 fev. 2021.

WONG, Tin Wui; CHAN, Lai Wah; KHO, Shyan Bin; SIA HENG, Paul Wan. Design of controlled-release solid dosage forms of alginate and chitosan using microwave. **Journal of Controlled Release**, [S. l.], v. 84, n. 3, p. 99–114, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(02\)00237-7](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00237-7).

WU, Liming; LI, Xi; MA, Liumin; BORRIS, Rainer; WU, Zhen; GAO, Xuwen. Acetoin and 2, 3-butanediol from *Bacillus amyloliquefaciens* induce stomatal closure in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana benthamiana*. **Journal of Experimental Botany**, [S. l.], v. 69, n. 22, p. 5625–5635, 2018.

WU, Yuncheng; YUAN, Jun; RAZA, Waseem; SHEN, Qirong; HUANG, Qiwei. Biocontrol traits and antagonistic potential of *Bacillus amyloliquefaciens* strain NJZJSB3 against *Sclerotinia sclerotiorum*, a causal agent of canola stem rot. **Journal**

of microbiology and biotechnology, [S. l.], v. 24, n. 10, p. 1327–1336, 2014. DOI: 10.4014/jmb.1402.02061. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24861342/>. Acesso em: 30 out. 2020.

XIAO, Douxin; LIANG, Wenlong; XIE, Zhengang; CHENG, Jingli; DU, Yongjun; ZHAO, Jinhao. A temperature-responsive release cellulose-based microcapsule loaded with chlorpyrifos for sustainable pest control. **Journal of Hazardous Materials**, [S. l.], v. 403, p. 123654, 2021. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.123654.

XIE, Long; LEHVÄVIRTA, Susanna; TIMONEN, Sari; KASURINEN, Jutta; NIEMIKAPEE, Juhamatti; VALKONEN, Jari P. T. Species-specific synergistic effects of two plant growth—promoting microbes on green roof plant biomass and photosynthetic efficiency. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 13, n. 12, p. e0209432, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0209432. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0209432>. Acesso em: 29 out. 2020.

YAAKOV, Noga; ANANTH MANI, Karthik; FELFBAUM, Reut; LAHAT, Magen; DA COSTA, Noam; BELAUSOV, Eduard; MENT, Dana; MECHREZ, Guy. Single Cell Encapsulation via Pickering Emulsion for Biopesticide Applications. **ACS Omega**, [S. l.], v. 3, n. 10, p. 14294–14301, 2018. DOI: 10.1021/acsomega.8b02225.

YU, G. Y.; SINCLAIR, J. B.; HARTMAN, G. L.; BERTAGNOLLI, B. L. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. **Soil Biology and Biochemistry**, [S. l.], v. 34, n. 7, p. 955–963, 2002. DOI: 10.1016/S0038-0717(02)00027-5.

YUN, Dong Cheon; YANG, Si Young; KIM, Young Cheol; KIM, In Seon; KIM, Yong Hwan. Identification of surfactin as an aphicidal metabolite produced by *Bacillus amyloliquefaciens* G1. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, [S. l.], v. 56, n. 6, p. 751–753, 2013.

YUSRI, I. M.; ABDUL MAJEED, A. P. P.; MAMAT, R.; GHAZALI, M. F.; AWAD, Omar I.; AZMI, W. H. **A review on the application of response surface method and artificial neural network in engine performance and exhaust emissions characteristics in alternative fuel** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Elsevier Ltd, , 2018. DOI: 10.1016/j.rser.2018.03.095.

ZHANG, Hao et al. Development of poly (lactic acid) microspheres and their potential application in Pickering emulsions stabilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 108, p. 105–111, 2018. a. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.079.

ZHANG, Lingling; ZHANG, Xiaojuan; ZHANG, Yi; WU, Songqin; GELBIČ, Ivan; XU, Lei; GUAN, Xiong. A new formulation of *Bacillus thuringiensis*: UV protection and sustained release mosquito larvae studies. **Scientific Reports** 2016 **6**:1, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 1–8, 2016. DOI: 10.1038/srep39425. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep39425>. Acesso em: 22 ago. 2021.

ZHANG, Qing Xia; ZHANG, Ying; HE, Ling Ling; JI, Zhao Lin; TONG, Yun Hui. Identification of a small antimycotic peptide produced by *Bacillus amyloliquefaciens*

6256. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 150, p. 78–82, 2018. b. DOI: 10.1016/j.pestbp.2018.07.006.

ZHANG, Xiaolin; WANG, Lanlan; WENG, Lin; DENG, Bingyao. Strontium ion substituted alginate-based hydrogel fibers and its coordination binding model. **Journal of Applied Polymer Science**, [S. l.], v. 137, n. 16, p. 48571, 2020. DOI: 10.1002/app.48571. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/app.48571>. Acesso em: 23 out. 2020.

ZHAO, Pengchao; QUAN, Chunshan; WANG, Yingguo; WANG, Jianhua; FAN, Shengdi. *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*. **Journal of Basic Microbiology**, [S. l.], v. 54, n. 5, p. 448–456, 2014. DOI: 10.1002/jobm.201200414.

ZHOU, Runjuan; ZHANG, Ming; ZHOU, Jinhong; WANG, Jinpeng. Optimization of biochar preparation from the stem of *Eichhornia crassipes* using response surface methodology on adsorption of Cd²⁺. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–17, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-54105-1. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54105-1>. Acesso em: 10 jul. 2020.

ZHU, Yingpeng; YU, Jiangliu; JIAO, Chunyan; TONG, Jinfeng; ZHANG, Lei; CHANG, Yan; SUN, Weina; JIN, Qing; CAI, Yongping. **Optimization of quercetin extraction method in *Dendrobium officinale* by response surface methodology** *Heliyon* Elsevier Ltd, , 2019. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e02374.

ANEXOS

ANEXO A – Planejamento de experimentos para otimização do tamanho de partícula das micropartículas

| Experi mentos | Parâmetro 1 | Parâmetro 2 | Parâmetro 3 | Parâmetro 4 |
|------------------|------------------------------|---------------------------------|----------------------------|---------------------|
| | Concentração de alginato (%) | Concentração de surfactante (%) | Velocidade de agitação (%) | Tipo de surfactante |
| 1 | 3,5 | 3 | 1500 | TWSP20 |
| 2 | 3,5 | 1 | 1500 | SP20 |
| 3 | 3,5 | 3 | 1000 | SP20 |
| 4 | 5 | 1 | 1500 | SP20 |
| 5 | 5 | 3 | 1500 | SP20 |
| 6 | 3,5 | 1 | 1500 | TW20 |
| 7 | 5 | 5 | 1500 | TWSP20 |
| 8 | 5 | 1 | 1000 | TW20 |
| 9 | 3,5 | 5 | 1500 | SP20 |
| 10 | 5 | 5 | 1000 | SP20 |
| 11 | 3,5 | 1 | 1500 | TWSP20 |
| 12 | 3,5 | 3 | 500 | SP20 |
| 13 | 3,5 | 3 | 1500 | TW20 |
| 14 | 3,5 | 1 | 1000 | SP20 |
| 15 | 3,5 | 1 | 1000 | SP20 |
| 16 | 5 | 5 | 1000 | TWSP20 |
| 17 | 3,5 | 1 | 1000 | TW20 |
| 18 | 5 | 3 | 1000 | SP20 |
| 19 | 3,5 | 5 | 1500 | TWSP20 |
| 20 | 5 | 5 | 500 | SP20 |
| 21 | 3,5 | 5 | 1000 | TWSP20 |
| 22 | 5 | 5 | 1500 | SP20 |
| 23 | 3,5 | 5 | 1000 | SP20 |
| 24 | 3,5 | 1 | 500 | TW20 |
| 25 | 5 | 3 | 1000 | TWSP20 |
| 26 | 5 | 3 | 1500 | TWSP20 |
| 27 | 5 | 1 | 1500 | TW20 |
| 28 | 5 | 3 | 1500 | TW20 |
| 29 | 3,5 | 3 | 500 | TWSP20 |
| 30 | 3,5 | 1 | 1000 | TWSP20 |
| 31 | 5 | 1 | 1500 | TWSP20 |
| 32 | 3,5 | 5 | 1000 | TW20 |
| 33 | 3,5 | 3 | 1000 | TWSP20 |
| 34 | 3,5 | 5 | 1500 | TW20 |
| 35 | 3,5 | 3 | 1500 | TW80 |
| 36 | 5 | 5 | 1500 | TW20 |

| | | | | |
|----|-----|---|------|--------|
| 37 | 3,5 | 5 | 500 | TWSP20 |
| 38 | 3,5 | 5 | 500 | TWSP80 |
| 39 | 5 | 5 | 1500 | TWSP80 |
| 40 | 3,5 | 5 | 1500 | TWSP80 |
| 41 | 5 | 3 | 1500 | TWSP80 |
| 42 | 5 | 5 | 500 | TWSP80 |
| 43 | 3,5 | 1 | 1500 | TW80 |
| 44 | 3,5 | 1 | 1000 | TWSP80 |
| 45 | 3,5 | 1 | 500 | TWSP20 |
| 46 | 5 | 5 | 500 | TWSP20 |
| 47 | 3,5 | 5 | 1000 | TWSP80 |
| 48 | 5 | 1 | 1000 | SP20 |
| 49 | 3,5 | 3 | 500 | TWSP80 |
| 50 | 3,5 | 3 | 1500 | TWSP80 |
| 51 | 5 | 3 | 1000 | TWSP80 |
| 52 | 5 | 1 | 500 | SP20 |
| 53 | 5 | 1 | 1500 | TWSP80 |
| 54 | 5 | 3 | 500 | TWSP20 |
| 55 | 5 | 3 | 500 | SP20 |
| 56 | 5 | 5 | 1000 | TWSP80 |
| 57 | 5 | 1 | 1000 | TWSP20 |
| 58 | 3,5 | 1 | 1500 | TWSP80 |
| 59 | 3,5 | 1 | 500 | SP20 |
| 60 | 3,5 | 3 | 1000 | TWSP80 |
| 61 | 3,5 | 5 | 500 | SP20 |
| 62 | 5 | 3 | 1000 | TW20 |
| 63 | 5 | 3 | 500 | TWSP80 |
| 64 | 3,5 | 5 | 1500 | TW80 |
| 65 | 3,5 | 5 | 500 | TW80 |
| 66 | 3,5 | 1 | 1000 | TW80 |
| 67 | 5 | 5 | 1000 | TW20 |
| 68 | 3,5 | 1 | 500 | TWSP80 |
| 69 | 5 | 1 | 1500 | TW80 |
| 70 | 5 | 1 | 500 | TW80 |
| 71 | 3,5 | 3 | 500 | TW20 |
| 72 | 3,5 | 5 | 500 | TW20 |
| 73 | 5 | 1 | 1000 | TWSP80 |
| 74 | 5 | 1 | 500 | TWSP80 |
| 75 | 5 | 5 | 500 | TW20 |
| 76 | 5 | 1 | 1000 | TW80 |
| 77 | 5 | 1 | 500 | TWSP20 |
| 78 | 5 | 1 | 500 | TW20 |
| 79 | 3,5 | 1 | 500 | TW80 |
| 80 | 5 | 3 | 500 | TW20 |

| | | | | |
|-----|-----|---|------|--------|
| 81 | 3,5 | 1 | 500 | SP20 |
| 82 | 3,5 | 1 | 500 | SP80 |
| 83 | 3,5 | 1 | 1000 | SP80 |
| 84 | 3,5 | 1 | 1500 | SP80 |
| 85 | 3,5 | 3 | 500 | SP80 |
| 86 | 3,5 | 3 | 1000 | SP80 |
| 87 | 3,5 | 3 | 1500 | SP80 |
| 88 | 3,5 | 5 | 500 | SP80 |
| 89 | 3,5 | 5 | 1000 | SP80 |
| 90 | 3,5 | 5 | 1500 | SP80 |
| 91 | 5 | 1 | 500 | SP80 |
| 92 | 5 | 1 | 1000 | SP80 |
| 93 | 5 | 1 | 1500 | SP80 |
| 94 | 5 | 3 | 500 | SP80 |
| 95 | 5 | 3 | 1000 | SP80 |
| 96 | 5 | 3 | 1500 | SP80 |
| 97 | 5 | 5 | 500 | SP80 |
| 98 | 5 | 5 | 1000 | SP80 |
| 99 | 5 | 5 | 1500 | SP80 |
| 100 | 2 | 1 | 500 | TW80 |
| 101 | 2 | 1 | 1000 | TW80 |
| 102 | 2 | 1 | 1500 | TW80 |
| 103 | 2 | 3 | 500 | TW80 |
| 104 | 2 | 3 | 1000 | TW80 |
| 105 | 2 | 3 | 1500 | TW80 |
| 106 | 2 | 5 | 500 | TW80 |
| 107 | 2 | 5 | 1000 | TW80 |
| 108 | 2 | 5 | 1500 | TW80 |
| 109 | 2 | 1 | 500 | TWSP80 |
| 110 | 2 | 1 | 1000 | TWSP80 |
| 111 | 2 | 1 | 1500 | TWSP80 |
| 112 | 2 | 3 | 500 | TWSP80 |
| 113 | 2 | 3 | 1000 | TWSP80 |
| 114 | 2 | 3 | 1500 | TWSP80 |
| 115 | 2 | 5 | 500 | TWSP80 |
| 116 | 2 | 5 | 1000 | TWSP80 |
| 117 | 2 | 5 | 1500 | TWSP80 |
| 118 | 2 | 1 | 500 | SP80 |
| 119 | 2 | 1 | 1000 | SP80 |
| 120 | 2 | 1 | 1500 | SP80 |
| 121 | 2 | 3 | 500 | SP80 |
| 122 | 2 | 3 | 1000 | SP80 |
| 123 | 2 | 3 | 1500 | SP80 |
| 124 | 2 | 5 | 500 | SP80 |

| | | | | |
|-----|---|---|------|--------|
| 125 | 2 | 5 | 1000 | SP80 |
| 126 | 2 | 5 | 1500 | SP80 |
| 127 | 5 | 3 | 500 | TW80 |
| 128 | 5 | 3 | 1000 | TW80 |
| 129 | 5 | 3 | 1500 | TW80 |
| 130 | 5 | 5 | 500 | TW80 |
| 131 | 5 | 5 | 1000 | TW80 |
| 132 | 5 | 5 | 1500 | TW80 |
| 133 | 2 | 1 | 500 | SP20 |
| 134 | 2 | 1 | 1000 | SP20 |
| 135 | 2 | 1 | 1500 | SP20 |
| 136 | 2 | 3 | 500 | SP20 |
| 137 | 2 | 3 | 1000 | SP20 |
| 138 | 2 | 3 | 1500 | SP20 |
| 139 | 2 | 5 | 500 | SP20 |
| 140 | 2 | 5 | 1000 | SP20 |
| 141 | 2 | 5 | 1500 | SP20 |
| 142 | 2 | 1 | 500 | TW20 |
| 143 | 2 | 1 | 1000 | TW20 |
| 144 | 2 | 1 | 1500 | TW20 |
| 145 | 2 | 3 | 500 | TW20 |
| 146 | 2 | 3 | 1000 | TW20 |
| 147 | 2 | 3 | 1500 | TW20 |
| 148 | 2 | 5 | 500 | TW20 |
| 149 | 2 | 5 | 1000 | TW20 |
| 150 | 2 | 5 | 1500 | TW20 |
| 151 | 2 | 1 | 500 | TWSP20 |
| 152 | 2 | 1 | 1000 | TWSP20 |
| 153 | 2 | 1 | 1500 | TWSP20 |
| 154 | 2 | 3 | 500 | TWSP20 |
| 155 | 2 | 3 | 1000 | TWSP20 |
| 156 | 2 | 3 | 1500 | TWSP20 |
| 157 | 2 | 5 | 500 | TWSP20 |
| 158 | 2 | 5 | 1000 | TWSP20 |
| 159 | 2 | 5 | 1500 | TWSP20 |

**ANEXO B – Planejamento de experimentos para estudo das emulsões
precursoras das micropartículas**

| Experim entos | Parâmetro 1 | Parâmetro 2 | Parâmetro 3 | Parâmetro 4 |
|------------------|---------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|------------------------|
| | Concentração de alginato (%) | Concentração de surfactante (%) | Velocidade de agitação (%) | Tipo de surfactante |
| 1 | 3,5 | 3 | 1000 | TW80 |
| 2 | 3,5 | 3 | 500 | SP20 |
| 3 | 5 | 3 | 1500 | SPTW20 |
| 4 | 5 | 5 | 1500 | TW80 |
| 5 | 3,5 | 5 | 500 | SP80 |
| 6 | 2 | 3 | 1000 | SP80 |
| 7 | 3,5 | 5 | 500 | TW80 |
| 8 | 5 | 1 | 1500 | SPTW80 |
| 9 | 3,5 | 1 | 1000 | SP80 |
| 10 | 3,5 | 5 | 500 | TW20 |
| 11 | 2 | 3 | 1000 | SP80 |
| 12 | 5 | 3 | 1000 | SP80 |
| 13 | 5 | 3 | 1500 | TW20 |
| 14 | 3,5 | 1 | 500 | SPTW20 |
| 15 | 3,5 | 1 | 1000 | SP80 |
| 16 | 3,5 | 3 | 1500 | SP20 |
| 17 | 2 | 5 | 1000 | SP20 |
| 18 | 2 | 1 | 1000 | TW80 |
| 19 | 5 | 1 | 500 | TW20 |
| 20 | 3,5 | 1 | 1000 | SP20 |
| 21 | 2 | 3 | 1500 | SPTW80 |
| 22 | 5 | 3 | 1000 | SP80 |
| 23 | 2 | 1 | 500 | SPTW80 |
| 24 | 2 | 5 | 1500 | TW20 |
| 25 | 3,5 | 3 | 500 | SPTW80 |
| 26 | 3,5 | 3 | 1000 | TW80 |
| 27 | 5 | 1 | 500 | TW80 |
| 28 | 5 | 5 | 500 | SPTW20 |
| 29 | 5 | 5 | 1000 | SP20 |
| 30 | 5 | 5 | 1500 | SPTW80 |
| 31 | 2 | 1 | 500 | TW80 |
| 32 | 2 | 5 | 500 | SPTW80 |
| 33 | 2 | 1 | 1500 | TW80 |
| 34 | 2 | 5 | 500 | TW80 |
| 35 | 3,5 | 5 | 1500 | SP80 |
| 36 | 2 | 1 | 1000 | TW20 |

| | | | | |
|-----------|-----|-----|------|--------|
| 37 | 2 | 1 | 1500 | SPTW20 |
| 38 | 3,5 | 3 | 1000 | SPTW80 |
| 39 | 2.0 | 5.0 | 1000 | SPTW20 |
| 40 | 5.0 | 3.0 | 500 | SPTW80 |
| 41 | 3.5 | 1.0 | 1000 | SP20 |
| 42 | 2.0 | 1.0 | 1000 | SPTW80 |