



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Ilha Solteira

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS**  
**MATERIAIS**

**Desenvolvimento de Esferas Híbridas Biodegradáveis**  
**Visando a Liberação de Zinco e de Bactérias**  
**Promotoras do Crescimento de Plantas**

Débora Ribeiro Antunes

Ilha Solteira – SP

Novembro/2024



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Ilha Solteira

## **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS**

### **Desenvolvimento de Esferas Híbridas Biodegradáveis Visando a Liberação de Zinco e de Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas.**

Débora Ribeiro Antunes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais do Departamento de Física e Química da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Engenharia, Câmpus Ilha Solteira, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciência dos Materiais.

Área de concentração: Química de Materiais

Orientador: Prof. Dr. *Renato Grillo*

Ilha Solteira - SP

Novembro/2024

FICHA CATALOGRÁFICA  
Desenvolvida pela Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação

A636d Antunes, Débora Ribeiro.  
Desenvolvimento de esferas híbridas biodegradáveis visando a liberação de zinco e de bactérias promotoras do crescimento de plantas / Débora Ribeiro Antunes. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2024  
153 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Química dos Materiais , 2024

Orientador: Renato Grillo  
Inclui bibliografia

1. Esferas de hidrogéis. 2. Polissacarídeos. 3. Liberação controlada. 4. Nanopartículas. 5. Microrganismos.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: DESENVOLVIMENTO DE ESFERAS HÍBRIDAS BIODEGRADÁVEIS VISANDO A LIBERAÇÃO DE ZINCO E DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS

AUTORA: DÉBORA RIBEIRO ANTUNES

ORIENTADOR: RENATO GRILLO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciência dos Materiais, área: Química dos Materiais pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. RENATO GRILLO (Participação Presencial)

Departamento de Física e Química / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - UNIGOVBR

Documento assinado digitalmente

MARCELO CARVALHO MINHOTO TEIXEIRA FILHO  
Data: 11/11/2024 16:47:50-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. MARCELO CARVALHO MINHOTO TEIXEIRA FILHO (Participação Presencial)

Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos / Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira

Documento assinado digitalmente

HELOIZA FERREIRA ALVES DO PRADO  
Data: 12/11/2024 15:33:57-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. HELOIZA FERREIRA ALVES DO PRADO (Participação Virtual)

Departamento de Biologia Geral e Aplicada / Instituto de Biociências - UNESP - Rio Claro

govbr



JAVIER ERNESTO PITTI CABALLERO  
Cédula: 4-735-1573

Prof. Dr. JAVIER ERNESTO PITTI CABALLERO (Participação Virtual)

Estación Experimental Cerro Punta, Chiriquí / Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá - IDIAP

Profª Drª. MARÍA EUGENIA TAVERNA (Participação Virtual)

Departamento de Ingeniería Química / Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química - INTEC



Maria Eugenia  
Taverna  
DNI 32221210

Ilha Solteira, 08 de novembro de 2024

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me permitir alcançar este momento tão importante na vida e, junto a este momento, ter me presenteado com a minha filha Luana, que me oferece um amor incondicional. Sua presença foi fundamental para me dar força e motivação ao longo de toda a jornada de pesquisa.

Aos meus familiares, agradeço por toda a paciência e apoio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Renato Grillo, pela orientação, conhecimentos transmitidos e principalmente paciência.

Ao Laboratório de NanoQuímica Ambiental (LNA), pela ajuda e pelo compartilhamento de conhecimentos.

Ao corpo docente e funcionários do Departamento de Física e Química da UNESP Campus de Ilha Solteira.

Ao Prof. Dr. Michel Brienzo do Instituto de Pesquisa em Bioenergia - Câmpus de Rio Claro - IPBEN-Unesp por fornecer o polissacarídeo xilana.

À instituição de pesquisa Embrapa, em especial à Profa. Dra. Mariângela Hungria (Embrapa Soja), por ceder as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense*.

À Profa. Dra. Heloiza F.A. do Prado do Departamento de Biologia Geral e Aplicada - Instituto de Biociências pela importante ajuda nos ensaios microbiológicos.

Ao Prof. Dr. Marcelo Minhoto do Laboratório de nutrição de plantas da FEIS-UNESP e todos os seus estudantes do grupo (em especial ao Guilherme) pelo auxílio nos experimentos em casa de vegetação.

Ao Prof. Dr Alex Otávio Sanches pelas análises térmicas e medidas de DRX.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida. Além disso, este trabalho recebeu apoio da FAPESP (#2019/20124-2, #2022/03219-2, #2023/00541-3) e CNPq (10846/2022-6). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## Resumo

A agricultura continua enfrentando problemas antigos, como a necessidade de aumentar a produção de alimento, mudanças climáticas, uso indiscriminado de agroquímicos, escassez de água e entre outros. As esferas de hidrogéis têm sido consideradas como uma grande aliada para o setor agrícola, sendo capaz de encapsular ingredientes ativos e proporcionar liberação controlada ao longo do tempo. O uso de polissacarídeos que possuem boa biocompatibilidade e biodegradabilidade para desenvolver novos esferas que não agridem o ambiente, está em ascensão. Atrelado a isso, tem-se o desenvolvimento de sistemas híbridos, que consiste na mescla de dois ou mais compostos, que lhe conferem inúmeras propriedades em um único sistema. Esta nova abordagem tem sido amplamente explorada nos últimos anos em diversos setores, sendo ainda pouco explorado na agricultura. Entre alguns dos problemas enfrentados pela agricultura mundialmente está a deficiência de zinco, que é o micronutriente que possui o maior déficit entre culturas mundiais, sendo necessário na ativação de enzimas em processos metabólicos da planta e essencial para a síntese de clorofila. Neste sentido, nanomateriais engenheirados a base de zinco, vem sendo desenvolvido para suprir déficit nutricionais, e com o potencial de liberar Zn de maneira controlada, reduzindo as perdas por lixiviação. Além disso, o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal como *Azospirillum brasilense* tem sido frequentemente combinado ao zinco, devido a sua capacidade de proporcionar maior absorção de zinco pela planta. No entanto, a disponibilidade das bactérias é influenciada por diversos fatores abióticos do ambiente. Neste contexto, objetivou-se sintetizar nanopartículas de óxido de zinco (ZnONPs) pelo método de nanoprecipitação e, em seguida, preparar esferas híbridas por gelificação iônica compostas por hidrogéis de polissacarídeos, como alginato de sódio e xilana, para a liberação de ZnONPs e bactéria fixadora de nitrogênio *A. brasilense* e avaliar o seu comportamento em solo e plantas. As análises físico-químicas das ZnONPs indicaram uma morfologia esférica, distribuição de tamanho de 334 nm e tamanho médio de cristalito de ~ 19,8 nm por DRX. As análises biológicas demonstraram um ótimo crescimento das bactérias e boa compatibilidade de *Azospirillum brasilense* no meio de preparo das esferas. Assim, sistemas híbridos de liberação foram preparados e apresentaram morfologia esférica e distribuição de tamanho de ~ 3 mm, além de presença de ZnONPs e *A. brasilense*. Espectroscopia de espalhamento de raios X (EDS) confirmou

a existência Zn distribuídas intrinsecamente nas esferas com picos de energia na faixa de 8,65 keV para Zn. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) indicaram interações entre polímeros e ZnONPs. As análises térmicas de DSC demonstraram mudanças com a mescla de materiais (alginato e xilana) para cada sistema estudado. Também foi avaliado o efeito deste sistema de esferas de hidrogel em plantas de milho cultivadas em casa de vegetação. Análises biométricas, nutrição de plantas e fertilidade do solo revelaram pouca diferença de teor de Zn nos diferentes tratamentos. Ensaio de liberação demonstraram que ZnONPs e bactérias co-encapsuladas nas esferas podem liberar íons de zinco e bactérias de forma lenta e simultânea. A cinética de liberação revelou ser governada por diferentes mecanismos, sendo o de transporte anômalo para o íon Zn e de transporte super caso-II para *A. brasilense*. Portanto, nosso sistema se mostra promissor abrindo novas discussões e perspectivas para o desenvolvimento de sistemas híbridos com potencial para alterar a biodisponibilidade do zinco no solo contribuindo para uma melhor absorção de micronutrientes, promovendo o melhoramento e o crescimento de plantas.

**Palavras chaves:** Esferas de hidrogéis, Polissacarídeos, Liberação controlada, Nanopartículas, microrganismos, *Azospirillum brasilense*.

## ABSTRACT

Agriculture continues to face longstanding issues, such as the need to increase food production, climate change, indiscriminate use of agrochemicals, water scarcity, among others. Hydrogel spheres have been considered a great ally for the agricultural sector, as they can encapsulate active ingredients and provide controlled release over time. The use of polysaccharides that have good biocompatibility and biodegradability to develop new spheres that are environmentally friendly is on the rise. Alongside this, we have the development of hybrid systems, which consist of the combination of two or more compounds, giving them numerous properties within a single system. This new approach has been extensively explored in recent years across various sectors, but it is still underexplored in agriculture. Among the problems faced by agriculture worldwide is zinc deficiency, which is the micronutrient with the greatest deficit across global crops. Zinc is necessary for the activation of enzymes in the plant's metabolic processes and is essential for chlorophyll synthesis. In this context, engineered nanomaterials based on zinc have been developed to address nutritional deficiencies and have the potential to release Zn in a controlled manner, reducing losses due to leaching. Furthermore, the use of the plant growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* has often been combined with zinc due to its ability to enhance zinc absorption by the plant. However, the availability of these bacteria is influenced by various abiotic environmental factors. In this context, the objective of this thesis is to synthesize zinc oxide nanoparticles (ZnONPs) using the precipitation method and then prepare hybrid spheres through ionic gelation composed of polysaccharide hydrogels, such as sodium alginate and xylan, for the release of ZnONPs and the nitrogen-fixing bacteria *A. brasilense*. The behavior of these materials in soil and plants will be evaluated. The physicochemical analyses of the ZnONPs indicated a spherical morphology, a size distribution of 334 nm, and an average crystallite size of approximately 19.8 nm as determined by X-ray diffraction (XRD). Biological analyses demonstrated excellent growth of the bacteria and good compatibility of *Azospirillum brasilense* in the medium used for preparing the spheres. Thus, hybrid release systems were prepared, showing a spherical morphology and a size distribution of approximately ~3 μm, as well as the presence of ZnONPs and *A. brasilense*. Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) confirmed the intrinsic distribution of Zn within the

spheres, with energy peaks in the range of 8.65 keV for Zn. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) indicated interactions between polymers and ZnONPs. Thermal analysis by differential scanning calorimetry (DSC) showed changes with the mixing of materials (alginates and xylan) for each studied system. The effect of this hydrogel sphere system was also evaluated on maize plants grown in a greenhouse. Biometric analyses, plant nutrition, and soil fertility revealed little difference in Zn content across the different treatments. Release tests demonstrated that the co-encapsulated ZnONPs and bacteria in the spheres could release zinc ions and bacteria slowly and simultaneously. The release kinetics revealed that different mechanisms govern the process, with anomalous transport for the Zn ion and super case-II transport for *A. brasilense*. Therefore, our system shows promise, opening new discussions and perspectives for developing systems with the potential to alter zinc bioavailability in the soil, contributing to better micronutrient absorption and promoting plant growth and improvement.

**Keywords:** Hydrogel spheres, Polysaccharides, Controlled release, Nanoparticles, Microorganisms, *Azospirillum brasilense*.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<i>A. brasilense</i>	<i>Azospirillum brasilense</i>
<b>SA</b>	Alginato de sódio
<b>BPCP</b>	Bactérias promotoras do crescimento de Plantas
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de cálcio
<b>Chl-T</b>	Clorofila total
<b>EDS</b>	Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X
<b>DLS</b>	Espalhamento de luz dinâmico
<b>DRX</b>	Difração de Raios-X
<b>DSC</b>	Calorimetria exploratória diferencial
<b>FTIR</b>	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
<b>IA</b>	Ingrediente ativo
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>ME</b>	Microscópio estereoscópio
<b>MO</b>	Microscopia óptica
<b>ODS</b>	Objetivos de desenvolvimento sustentável
<b>ZnONPs</b>	Nanopartículas de óxido de Zinco
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	Sulfato de zinco
<b>Xil</b>	Xilana
<b>UV-VIS</b>	Espectroscopia de absorção no Ultravioleta/Visível
<b>Zn</b>	Zinco

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	12
CAPÍTULO I- Esferas de hidrogel sustentáveis à base de polissacarídeos para liberação controlada de insumos agrícola .....	14
CAPÍTULO II - Otimização das esferas de hidrogel .....	36
CAPÍTULO III - Alginato e alginato/xilana: preparação, caracterização, estudo da degradação das esferas, liberação e efeito em plantas .....	64
CAPÍTULO IV - Discussão .....	117
CONCLUSÃO .....	122
IMPACTO E RELEVÂNCIA CIENTÍFICO-SOCIAL .....	122
REFERÊNCIAS .....	125

## INTRODUÇÃO GERAL

Para atender à crescente demanda por alimentos, estima-se que será necessário utilizar aproximadamente 40% das terras do mundo para a produção agrícola [1]. Além disso, a agricultura convencional ainda predomina e depende de grandes quantidades de insumos, como fertilizantes e pesticidas, o que contribui para a contaminação do solo [2], dos recursos hídricos [3] e perda da biodiversidade [4]. No entanto, nos últimos anos, mudanças significativas das práticas agrícolas convencionais têm ocorrido, para reduzir os danos causados ao meio ambiente. As esferas de hidrogéis têm atraído atenção considerável, como transportadores para a liberação controlada de insumos agrícolas [5] e até mesmo compostos voláteis [6] devido a sua capacidade de proteger os ativos contra fatores abióticos do meio, além de apresentar alta biocompatibilidade e biodegradabilidade no ambiente.

A nanotecnologia também tem contribuído para uma agricultura mais sustentável [7-9], produzindo nanomateriais em escala nanométrica, aumentando a eficiência de fertilizantes e pesticidas [8, 10, 11], reduzindo a quantidade de aplicação [12], e reduzindo lixiviação destes ingredientes ativos [13, 14]. O zinco é um dos micronutrientes mais deficientes nas culturas agrícolas em nível mundial, resultando em baixos rendimentos das colheitas [15]. Um estudo realizado por Ahmad e seus colaboradores (2024) investigou os efeitos sinérgicos de ZnONPs e fósforo no crescimento, rendimento e absorção de nutrientes na cultura de milho, e seus resultados revelaram que a aplicação foliar de ZnONPs melhorou significativamente todos os parâmetros analisados, incluindo a emergência de sementes e o comprimento das espigas, que foram superiores em comparação ao tratamento controle [16]. Entretanto, as ZnONPs além de transportar micronutrientes para plantas, quando associadas a microrganismos, como bactérias fixadoras de nitrogênio, por exemplo, podem aumentar a absorção de Zn favorecendo o crescimento e desenvolvimento das plantas através de interações sinérgicas [17].

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (**BPCP**), como *Azospirillum brasilense*, podem aumentar a capacidade de fixação de nitrogênio e a produção de hormônio nos vegetais, melhorando o desenvolvimento das folhas e raízes [18]. No entanto, sua biodisponibilidade no meio pode ser reduzida quando em contato com fatores abióticos extremos, como temperaturas elevadas, pH inadequado, salinidade excessiva e falta de umidade, os quais podem afetar negativamente a sobrevivência e a atividade das

bactérias. Mediante as mudanças climáticas, é cada vez mais urgente investigar sistemas biodegradáveis que possam proteger as bactérias e assegurar sua eficácia no campo.

Diante do exposto, a presente Tese tem como objetivo principal desenvolver (preparar e caracterizar) um novo sistema de esferas de hidrogel híbrido, compostos por alginato ou pela combinação de alginato e xilana, que contenham nanopartículas de óxido de zinco (ZnONPs) e bactérias da espécie *Azospirillum brasilense*, com o intuito de promover a liberação simultânea de micronutrientes e microrganismos para a agricultura. Arelado a isso, foi investigado a cinética de liberação dos nutrientes e das bactérias, bem como avaliou-se o desenvolvimento das plantas de milho, por meio de estudos em casa de vegetação. Desta forma, o nosso estudo se encaixa nos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) de número 2, estabelecida pela ONU com o propósito de alcançar Fome Zero e Agricultura sustentável [19]. A Tese foi estruturada em capítulos, cada um correspondendo a uma etapa do cronograma do projeto. Esta introdução contextualiza a temática do estudo e como parte dela temos o primeiro capítulo que apresenta uma revisão bibliográfica do uso dos diferentes tipos de esferas de hidrogéis constituídas por polissacarídeos com potencial de encapsular moléculas, NPs e microrganismos para posterior liberação no campo. O segundo capítulo descreve o preparo e a caracterização dos diferentes tipos de esferas, síntese de NPs e o cultivo da bactéria *A. brasilense*. O terceiro capítulo apresenta o estudo da degradação das esferas de hidrogel em meio aquoso, a cinética de liberação de bactérias e nutrientes, e o impacto do sistema no solo, avaliando sua degradação e efeitos na cultura do milho. O quarto capítulo trata-se da discussão dos resultados obtidos. Por fim, é apresentada a conclusão da Tese e perspectivas futuras.

# CAPÍTULO I

## POLYSACCHARIDE-BASED SUSTAINABLE HYDROGEL SPHERES FOR CONTROLLED RELEASE OF AGRICULTURAL INPUTS

## ESFERAS DE HIDROGEL SUSTENTÁVEIS À BASE DE POLISSACARÍDEOS PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE INSUMOS AGRÍCOLAS

Artigo publicado em International Journal of Biological Macromolecules

Débora R. Antunes , Mariana M.L.H. Forini , Erica R. Biscalchim , Pedro H.C. Lima, Luiz A.F. Cavalcante, Marcelo C.M. Teixeira Filho, Durgesh K. Tripathi, Javier Pitti Caballero, Renato Grillo. “ *Polysaccharide-based sustainable hydrogel spheres for controlled release of agricultural inputs* ”. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.135202>

## ABSTRACT

Producing food in quantity and quality to meet the growing population demand is a challenge for the coming years. In addition to the need to improve the use and efficiency of conventional agricultural inputs, we face climate change and disparity in access to food. In this context, creating innovative, efficient, and ecologically approaches is necessary to transform this global scenario. Several delivery systems are being developed to encapsulate agrochemicals, aiming to improve the controlled release of active ingredients and protect them against environmental biotic and abiotic factors. Among these systems, hydrogel spheres are particularly notable for their ability to be fabricated from biodegradable materials, allowing the encapsulation of molecules, nanomaterials, and even organisms (e.g., bacteria and fungi). This review provides an overview of the latest progress in developing polysaccharide-based hydrogel spheres for agriculture. In addition, we describe methods for preparing hydrogel spheres and discuss the encapsulation and release of agricultural inputs in the field. Finally, we put hydrogel spheres into perspective and seek to highlight some current challenges in the field to spark new inspiration and improve the development of environmentally friendly and cost-effective delivery systems for the agricultural sector.

**Keywords:** Polysaccharide beads, Agrochemicals, Controlled release, Encapsulation. Sustainable agriculture, Hydrogels.

## 1. Introduction

Currently, one of the most significant challenges facing the agricultural sector is guaranteeing sustainable food production and meeting the demands of a growing global population while seeking to mitigate environmental impacts [20]. Furthermore, a series of factors, such as i) climate change [21, 22], ii) degradation of fertile soils [23], iii) water scarcity [24], and iv) loss of biodiversity [25], are intensifying concerns in this area. In addition, agricultural practices such as deforestation and excessive use of pesticides contribute to increasing environmental problems, harming living beings and human health [26]. All these issues urge humanity to create innovative technologies to improve food production and make agriculture more sustainable worldwide. Among technologies, biomaterials have been improving agro-economy practices - especially natural polysaccharides [27]. They are derived from plants, algae, animals, bacteria, and fungi [28-30], and their structures have advantages over synthetic polymers (with fossil origin) [31] as they are biodegradable and generally require a small amount of toxic reagents for their extraction [32]. Therefore, they are considered eco-friendly and potentially safe materials for environmental applications [33]. In the agricultural sector, they are used in the production of microparticles, nanoparticles, films, and hydrogels [34-37].

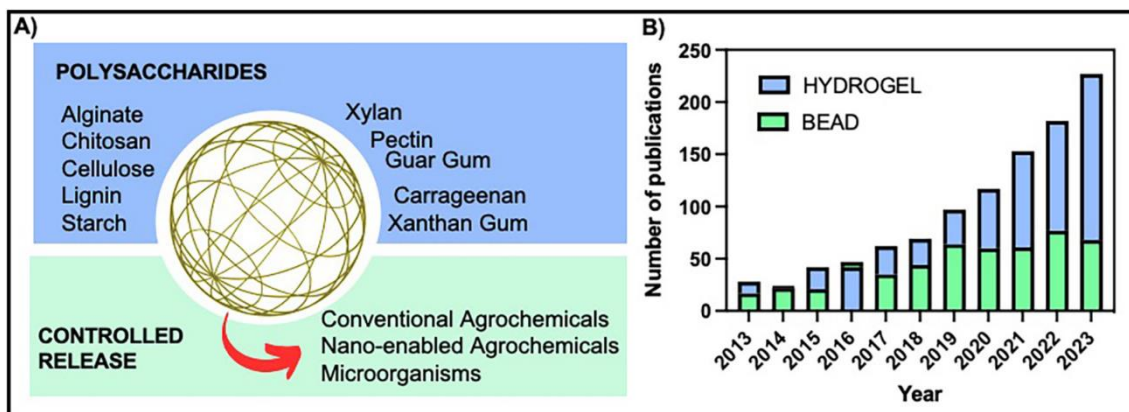
The synthesis of micro- and nanoparticles using natural polysaccharides has been focused on controlled-release systems for agrochemicals (pesticides and fertilizers). The nanometer-scale release is a precise approach that offers greater effectiveness in protecting plants [38, 39] due to its reduced size and increased surface area. This allows the encapsulated active ingredient within the nanoparticles to interact differently with plants, maximizing the efficacy of conventional treatments while minimizing adverse impacts [40].

For example, lignin [41, 42] and chitosan-based nanomaterials [43] can encapsulate agrochemicals and increase their stability against abiotic and biotic factors in the environment. Furthermore, nanoparticles made up of polysaccharides have been used as seed primers. They provide protective layers to the seeds and prevent diseases/pests [44]. In addition, specific polysaccharides, such as those derived from seaweed (e.g., alginate) or crustaceans (e.g., chitosan), can have biostimulant properties and promote plant growth [45, 46] by increasing nutrient absorption [33], regulation of plant hormones, and root growth [47].

In agricultural delivery systems, some platforms may support nanodevices. Hydrogels lead the way since they bring bioavailability in agrochemical delivery into fields, reducing

leach rates and toxicity. Hydrogels are porous structures mainly composed of polysaccharides, and they have excellent biocompatibility and biodegradability [31], hydrophilic character, and are three-dimensionally cross-linked. They can absorb and retain immense amounts of water in their interstitial sites [48], improve plant resistance in dry periods, and reduce irrigation needs in arid regions [49]. Hydrogels' polysaccharides can be derived from starch [50], sodium alginate [51], chitosan [52], cellulose [53] and their derivatives (carboxymethylcellulose [54], microcrystalline cellulose [55], cellulose acetate [56], lignin [57], xylan [58], carrageenan [59], xanthan gum [60], guar gum [61], and pectin [62]. A variety of 3D hydrogel models can be found in the literature: bulk hydrogels, microparticles, spheres, etc [27, 63, 64].

Hydrogel spheres (also known as beads) made from polysaccharides have gained prominence in the agricultural sector. Their morphologies are like conventional granules but with the benefit of encapsulating various active ingredients and nanoparticles within their structures (**Figure 1-A**). Allowing controlled release of bioactive ingredients [65], reducing the physicochemical degradation and [66] leaching of agrochemicals/nanoparticles into the environment [55]. Furthermore, hydrogel spheres can encapsulate microorganisms to control phytopathogens, protecting them against environmental biotic and abiotic stresses. Thus, they reduce contamination during storage and transport and promote plant growth [67].



**Figure 1.** A) Schematic representation of hydrogel spheres considering the main types of polysaccharides and active ingredients that can be used for the agricultural sector; B) Number of papers published using descriptors “hydrogel and agriculture and release” (blue bars); “bead and agriculture and release” (green bars) in the ISI Web of Knowledge database from 2013 to 2023.

A search of the Web of Science (WoS) database from 2013 to 2023 using the descriptors “hydrogel and agriculture and release” yielded 1,043 published scientific articles. Another search using “bead and agriculture and release” descriptors totaled 516

scientific articles published for the same period (**Figure 1-B**). However, few systems are manufactured with polysaccharides, indicating a potential area for expansion. Among the works found, polymeric spheres capable of encapsulating conventional agrochemicals (for example, mineral fertilizers, pesticides, and hormones) are the most studied systems, followed by the encapsulation of microorganisms and hybrid systems (classified in this study as spheres containing more than one class of encapsulated compound, such as conventional active ingredients and nanoparticles or microorganisms).

Thus, this review focuses on the latest advances in developing hydrogel spheres consisting of polysaccharides that can encapsulate agrochemicals, nano-enabled agrochemicals, and microorganisms for agricultural purposes. Furthermore, we discuss methods for preparing these hydrogels and their ability to release active ingredients into the environment. Finally, we put into perspective hydrogel spheres for the controlled release of agrochemicals. These systems can contribute to developing eco-friendly and cost-effective solutions to increase agricultural productivity.

## **2. Exploring methods for producing polysaccharide-based sustainable hydrogel spheres**

Producing natural polysaccharides hydrogel has proven promising in sustainable agriculture [32, 45]. These materials are abundant in nature, have reduced costs, and have low environmental impact. However, it is essential to understand the process of synthesis of spheres and the materials involved. First, preparation, method, and type of polysaccharide can exhibit different physicochemical properties and enable specific application requirements in the field, such as i) improving the mechanical properties of the system, ii) promoting sustained and/or intelligent release, and iii) increasing environmental compatibility [68]. For example, Qin et al. (2019) successfully produced chitosan-alginate core-shell gel spheres by a dripping method using calcium chloride as a cross-linker. These spheres exhibited a sol-gel transition property responsive to pH stimulation from chitosan and calcium alginate and could release magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and fluorescent compounds in an aqueous medium [69].

Nevertheless, most beads are made with cross-linkers aid through physical and chemical interactions [70]. Chemical cross-linkers are recognized for having cross-linkers that form covalent bonds. On the other hand, physical cross-linkers present hydrogen interactions, physical domains, and ionic and hydrophobic interactions [71]. Chemical cross-linkers can be made through the polymerization of monomers or small molecules

[72]. Various cross-linkers are used in the construction of hydrogel spheres, such as divinyl sulfone [73], thiourea formaldehyde [74], ethylene glycol dimethacrylic acid (EGDMA) [61], citric acid [75], acrylamide [76], etc. Due to their active groups, these molecules can bind to polymer chains through chemical reactions, including esterification [77] and cross-linking [78]. For example, Knijnenburg et al. (2021) encapsulated zinc oxide nanoparticles in sodium alginate and polyvinyl alcohol (PVA) spheres cross-linked with two ions ( $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ ) through ionotropic gelation. This study observed that hydrogels containing PVA increased water absorption and retention, making them more hydrophilic than those without PVA. Furthermore, the release kinetics were found to be dependent on the cross-linker used, as the spheres cross-linked with Zn released the ion quickly, while those cross-linked with Ca were slower [79].

Inappropriate use of cross-linking agents can cause changes in the physicochemical properties of polysaccharides, altering their surface area, particle size, volume, and pore dimensions and affecting their thermal degradation and swelling of the polymer [80]. For example, using concentrations of cross-linker that are higher than necessary can result in denser and more rigid three-dimensional networks. This can impede the mobility of molecular chains, reducing the interstices between the liquid molecules in the network [81]. On the other hand, epichlorohydrin, a cross-linking agent commonly used in polysaccharides, can control the hydrogel's swelling and thermal stability. That is, as the concentration of this molecule increases, the swelling capacity decreases, and the material's thermal stability improves [59]. Therefore, the concentration of cross-linkers is fundamental, and their use depends on the type of biopolymer and the desired properties of the material.

Besides cross-linkers, parameters such as temperature and pH can interfere with the synthesis of hydrogel spheres. For example, Cai and Zhang (2006) showed an interaction between cellulose and NaOH in an aqueous urea solution (pre-cooled below  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) where they rapidly dissolved cellulose at room temperature. Furthermore, their results showed cellulose gelation when dropped in the  $59.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $30.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  range and irreversible gel behavior at temperatures above  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  or below  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$  [82]. Therefore, changing temperature can alter the viscosity of polysaccharide solutions since molecular interactions and movement of polymer chains are affected by changes in the thermal energy of the solution [83]. Under higher temperature conditions, for example, greater sphericity of the material [84] and an increase in swelling capacity can be achieved [85]. Additionally, temperature is closely linked to the active ingredient release processes. At

lower temperatures, around 4 °C, reducing the diffusion of the active ingredient to the external environment is possible since structural changes may occur in the spheres, making them more compact or altering their porosity [86].

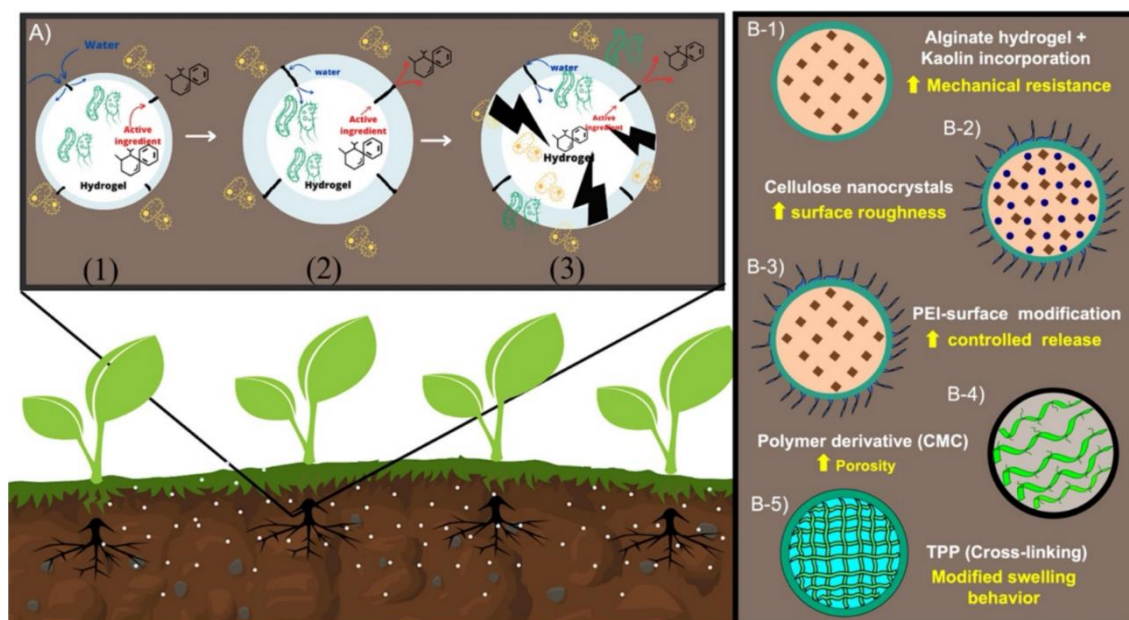
Furthermore, changes in pH values can influence the mechanical properties, such as tenacity and hardness of hydrogels, due to their interactions between polymer chains that can form cross-links, increasing the rigidity and resistance of the gel [87]. Furthermore, when the sphere construction process is used to encapsulate cells or microorganisms, the pH during their formation can impact the viability and performance of the encapsulated organisms [88]. Thus, pH optimization is fundamental in designing and manufacturing these materials for various applications.

On the other hand, another factor that can influence the preparation of hydrogel spheres is the mixture of polysaccharides with inorganic substances, including metallic oxides and silica, in their composition [27]. This association can provide unique and combined properties between two or more systems, such as excellent structural stability, mechanical resistance, and capacity for controlled release of active substances. It can also result in structures with high porosity, low density, and resistance to extreme temperatures [89]. For example, Eddara et al. (2022) manufactured chitosan and kaolinite clay spheres by dip-immersion for controlled release of NPK fertilizers. They observed that the inclusion of clay affected the mechanical properties of the system, resulting in better physical resistance, increased cation exchange capacity with the soil, and delayed degradation and release of the active ingredient compared to those containing only chitosan [90]. Furthermore, incorporating inorganic nanoparticles uniformly distributed in the matrix of polysaccharide spheres is another strategy used to increase the hydrogel's resistance in acidic or alkaline media and improve its thermal stability [91].

### **3. Hydrogel spheres as delivery systems**

The development of intelligent systems for the controlled release of agrochemicals and microorganisms that are biodegradable, low-cost, and scalable has attracted the attention of the agricultural sector. In this context, hydrogel spheres composed of polysaccharides can improve the effectiveness of agrochemicals, reducing the number of applications required and decreasing the irrigation frequency since these spheres are superabsorbent and can protect active ingredients. However, release mechanisms in complex matrices (such as soils and tributaries) have yet to be fully elucidated. The primary rationale is based exclusively on the swelling caused by osmosis in the polymeric

network. The water absorption increases pressure, swells the hydrogel, and stretches the polymeric network as the pores expand, allowing permeabilization to the environment [92]. A possible mechanism for the release of agrochemicals/microorganisms in hydrogel spheres in the soil can be interpreted as shown in **Figure 2-A**, followed by the steps: 1) it begins with the expansion process (swelling), which aims to facilitate the diffusion of the encapsulated compound; 2) then, there is a migration of free water towards the interior of the coating through the pores, contributing to triggering the release; 3) subsequently, the polymer itself gradually disintegrates, a process driven by environmental microorganisms during the decomposition phase, thus, accelerating the release process [93]. However, it is worth noting that in the case of encapsulation of microorganisms or nano-enabled agrochemicals, other factors may influence this release model.



**Figure. 2.** A) Scheme of the controlled release mechanism of polysaccharide spheres: 1- Water from the environment penetrates the structure of the sphere through the pores, causing its expansion; 2-Migration of free water into the sphere causes the diffusion of the active ingredient into the environment through the pores of the hydrogel; 3- Microorganisms promote residual degradation of insoluble active ingredients; B) Examples of different hydrogel spheres and their effects when adding other materials to the system (B1 and B2), applying a new coating (B3), or mixing with different polysaccharides (B4 and B5). Parts of the figure were created using Canva.

The release rates of (nano-)agrochemicals/microorganisms can also be controlled by changing the thickness and total content of the encapsulated active ingredient [76, 94]. Furthermore, aspects such as crystallinity, material composition, surface charge, type and concentration of active ingredient, particle size, hydrophilic-hydrophobic interactions, porosity, and cross-linking are related to the spheres' degradation (and release)

mechanisms [70]. Therefore, surface morphology is extremely important since spheres with well-defined porous structures absorb more water, facilitating compounds' degradation and release rate. Thus, mixing different materials enables the design of new surface roughness, pores size, and release mechanisms of active ingredients [95]. For example, sodium alginate is the polysaccharide most used in developing these hydrogel spheres as it meets the requirements such as good biocompatibility, biodegradability, and non-toxicity. However, when the spheres are made purely of alginate, they have low mechanical resistance, which limits their applications [79].

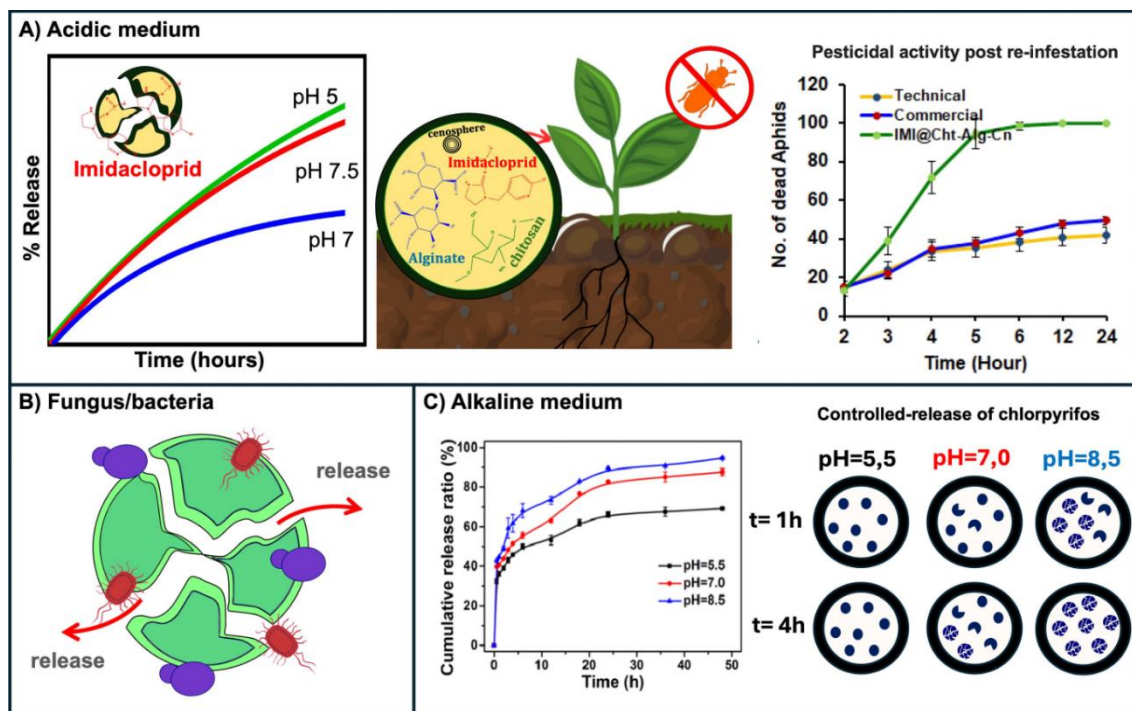
Changing spheres' structures and understanding physical-chemical behaviors (alongside resistance, surface, thickness, and pore size) have been challenging [96]. For example, Li et al. (2016) produced a series of alginate- and kaolin-based beads with surface modification with polyethyleneimine (PEI) and polysaccharides fillers: cellulose powder, cellulose nanocrystals, starch, and xylan (**Figure 2-1, B2 and B3**). Their results indicated that the addition of an inorganic clay such as kaolin improved the spheres' mechanical resistance, the surface modification was directly proportional to the control of phenylacetic acid (a plant growth regulator) release rate, and cellulose nanocrystals caused rougher surfaces [58].

Another way to modify beads is by incorporating a polymer derivative (a polymer with chemical modifications), e.g., carboxymethyl cellulose (CMC) **Figure 2-B4** is known to improve water mobility and porosity of the spheres [97]. As previously mentioned, physicochemical proprieties may also differ with cross-linking molecules. Perez et al. (2016) examined spheres produced from a mixture of starch and chitosan using the dripping technique in an aqueous solution of sodium tripolyphosphate (TPP) as an ionotropic cross-linking agent (**Figure 2-B5**). They observed that the starch content and cross-linking time affected the characteristics of the spheres, influencing the swelling behavior and fertilizer release capacity [98]. Furthermore, beads such as those derived from lignin, a polyphenolic material, can be degraded by bacteria and fungi, enabling its use in constructing microorganism-responsive beads. Lignin beads can also improve the slow-release behavior of fertilizers and the effectiveness of pesticides such as atrazine [99, 100]. Beads containing only alginate or chitosan may exhibit a slow degradation rate by microorganisms; however, this rate may vary due to their specific chemical structures and environmental conditions [52, 99].

### 3.1. Encapsulation of conventional agrochemicals in hydrogel spheres

The encapsulation of conventional agricultural inputs such as pesticides and fertilizers [26, 101] in polysaccharide matrix hydrogel spheres opens new possibilities for the sustainable management of agricultural inputs in a more efficient and ecologically conscious pathway by reducing the degradation of active ingredients against biotic and abiotic factors and improving their availability to plants.

A study by Singh et al. (2022) on encapsulating the insecticide imidacloprid in hydrogel spheres composed of chitosan, alginate, and cenosphere revealed that insecticidal activity was achieved without affecting the host plant in the long term. The leaching analysis indicated that the loss of the active ingredient was twice as slow, at only 12 %, compared to the commercial formulation. Furthermore, insecticidal efficacy reached 100 % against *Aphis crassivora* (cowpea aphid) over 48 h, demonstrating superior performance compared to the conventional formulation. The authors also observed pH responsiveness in the beads (**Figure 3-A**) [102]. Parallel to this study, hybrid spheres of polysaccharides and clay showed great potential for water retention and prolonged release of up to 60 times greater than non-encapsulated active ingredients [103]. Yan et al. (2013) also developed a hybrid system of alginate, chitosan, and bentonite prepared by extrusion in a calcium chloride solution. The inclusion of bentonite demonstrated the potential to improve the particles' sphericity, causing the insecticide acetamiprid's loading rate and encapsulation efficiency to increase from 36.36 % to 63.01 %. While the sphere containing only chitosan and sodium alginate increased from 36.36 % to 54.29 %, the synergism between the mixture also improved the release performance [104].



**Figure 3.** Examples of responsive release hydrogel spheres: A) pH-responsive release of imidacloprid from hydrogel spheres and their pesticidal activity following re-infestation of aphids after 48 h; B) Fungus-bacteria responsive release hydrogel; C) pH-responsive chlorpyrifos hydrogel sphere and their cumulative release rate in different pH. Reproduced with permission from Ref. [102, 105] Copyright (2022, 2018), Elsevier. Parts of the image were created using Canva.

Furthermore, Li et al. (2012) produced hydrogel spheres composed of carboxymethyl chitosan and bentonite to encapsulate atrazine (an herbicide) and imidacloprid (an insecticide). The release study showed that the time required to release 50 % of the active ingredients ( $t_{50}$ ) was extended to 572 h for atrazine and 24 h for imidacloprid. The difference in release behavior between the two herbicides is related to the active ingredient's hydrophobicity and water solubility. In addition, leaching studies showed that the amount of pesticide available decreased due to the sorption promoted by bentonite [106]. Also, the construction of hydrogel spheres developed by Liu and colleagues (2021) for the controlled release of clothianidin, using tannic acid/Fe(III) as a coating and sodium alginate as a matrix, showed long-lasting effectiveness in managing the bean aphid, increasing the absorption and bioconcentration capacity of clothianidin in plants [107].

Hydrogels that respond to external parameters are gaining attention for releasing bioactive ingredients, as biodegradable beads can degrade in contact of bacteria and fungus of soil (**Figure 3-B**) [99]. Also, Xiang et al. (2018) developed a pH-responsive

controlled-release nanosystem composed of chlorpyrifos, polydopamine, attapulgit, and calcium alginate. The results indicated that the spheres tended to collapse in an alkaline environment and promoted the release of chlorpyrifos, demonstrating their effectiveness in combating larvae (grubs) (**Figure 3-C**). Furthermore, the system protected the active ingredient from ultraviolet light, which is considered promising for extending the pesticide's duration in the field [105].

**Table 1.** Examples of conventional agrochemicals encapsulated in hydrogel spheres and their main results.

Sphere type	Agrochemical	Findings	Ref
Alginate/Bentonite	Emamectin benzoate	Effective in controlling <i>Spodoptera frugiperda</i> in corn plants. Bentonite content increased and the release rate decreased.	[108]
Starch/Chitosan/Calcium Alginate	Spirotetramat	Controlled release and slow degradation rate. Improved insecticide efficacy.	[109]
Sodium alginate/Chitosan	Chlorantraniliprole	Controlled release of the insecticide and better efficiency in controlling <i>Chilo suppressalis</i> and <i>Sesamia inferens</i> .	[110]
Starch/Sodium Alginate/Natural Rubber	2,4-dichlorophenoxy	The system improved bioavailability and prolonged herbicide release for 700 h.	[111]
Carboxymethyl chitosan	Prothioconazole	The system showed pH-responsive release for the insecticide, good fungicidal capacity against <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i> , and decreased dosage of insecticide.	[112]
Sodium alginate/PNIPAM	Glyphosate	The system showed multi-responsive release for the herbicide.	[113]
Cellulose	Zinc sulfate	Capacity for nutrient release and absorption by plant roots.	[114]
Sodium Alginate/Lignin	Ferric chloride	Sustained iron release behavior and degradation rate of 55.6 % after 50 days of exposure in the soil.	[115]

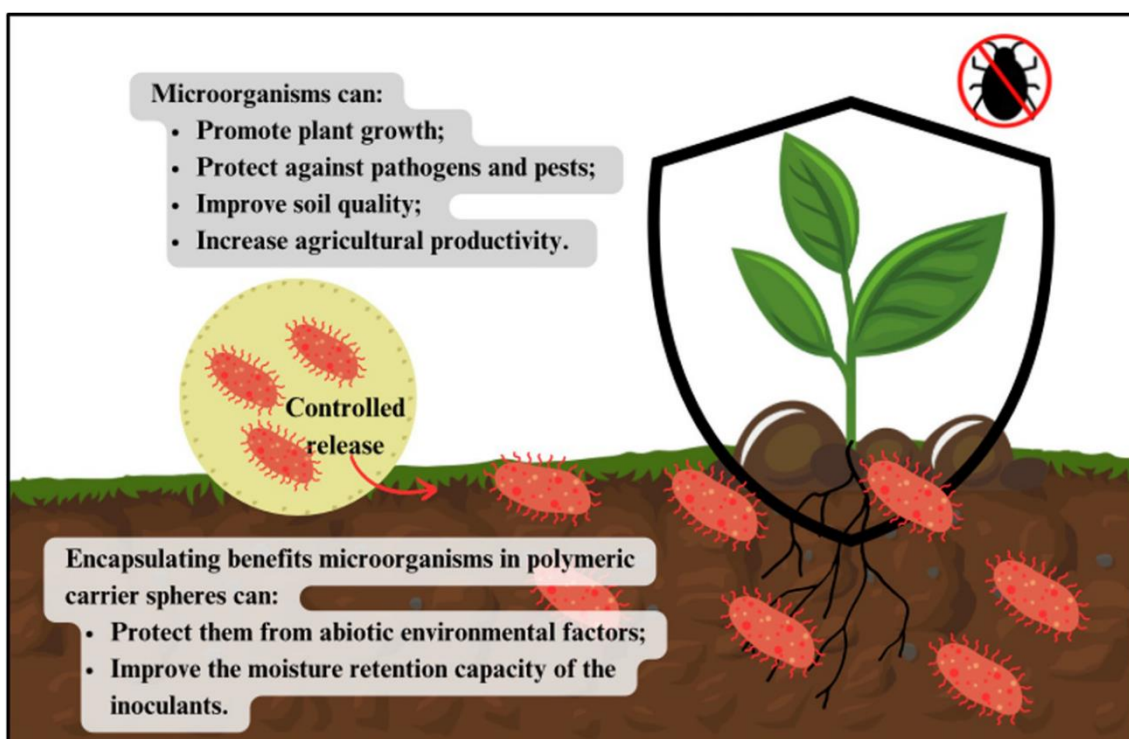
Sphere type	Agrochemical	Findings	Ref
Alginate/Lignin	Potassium nitrate/Potassium phosphate	Prolonged release of fertilizer over 25 days. Variations in alginate/lignin concentrations directly affected the a.i. release.	[116]
Sodium alginate	Ammonium nitrate/Potassium chloride	The system decreased the nutrient release rate compared to pure salts.	[117]
Sodium alginate/carboxymethylcellulose	Cu <sup>2+</sup> ions	Slow release of micronutrients, good bioavailability, and lower fertilizer application rates.	[118]

On the other hand, hydrogel spheres can entrap and control the release of fertilizers, such as Nitrogen, Phosphorus, and Potassium (NPK), showing greater efficiency than conventional fertilizers due to the slower release of these nutrients [119, 120]. For example, Chen et al. (2023) produced a potassium-based fertilizer encapsulated in a starch-alginate matrix. They observed that the ability to control the release of the nutrient was associated with the concentration of polysaccharides used in preparing the formulation. Higher concentrations of sodium alginate, combined with lower concentrations of potassium chloride, achieved good encapsulation efficiency, decreased swelling, reduced potassium release, and a 25 % increase in the spheres' biodegradation rate [121]. Therefore, research and development in this area can potentially improve the use of agrochemicals. Technological advancement meets the efficiency requirements of modern agriculture and the growing demand for sustainable agricultural practices that involve circular economy precepts. Table 1 summarizes other examples of agrochemicals encapsulated in hydrogel spheres for agriculture.

### 3.2. Encapsulation of microorganisms in hydrogel spheres

Microorganisms play an important role in promoting plant growth, protecting against pathogens and pests, improving soil quality, and increasing agricultural productivity [122]. Microorganisms have multiple mechanisms of action in plant growth, such as the production and secretion of phytohormones such as indole-3-acetic acid (IAA), cytokinins, gibberellins, and ethylene; plant growth regulators (abscisic acid, nitric oxide, and polyamines such as spermidine, spermine); increased nutrient availability, phosphate solubilization, nitrate reductase activity, and N use efficiency; biocontrol of

phytopathogens and diseases; protection of plants against saline stress and toxic elements in the soil; in addition to biological nitrogen fixation. In this way, bacteria, fungi, and other beneficial microorganisms can be used to enhance plant development [32, 123] and agricultural productivity [124, 125]. Therefore, the interest in encapsulating microorganisms in polymeric carrier systems has increased [123] since many of these organisms can suffer from abiotic environmental factors, and encapsulation can protect them, making them more available over time. Thus, the encapsulation of microorganisms in polysaccharide spheres is of great value. Being hydrophilic, they can improve the moisture retention capacity of the inoculants, which is crucial for the survival and growth of microorganisms in the environment [66] (**Figure 4**).



**Figure 4.** Action and benefits of controlled release of microorganisms encapsulated in polymeric carrier systems into the soil. Image was created using.

Plant growth-promoting and nitrogen-fixing rhizobacteria in soil are efficient candidates for field application. They can potentially increase crop productivity, suppress plant diseases, and act as biofertilizers [126]. For example, Lima-Tenorio and colleagues (2023) conducted a study using a mixture of cationic starch polysaccharide and chitosan to produce a biofertilizer. In this way, Ab-V5 and Ab-V6 strains of *Azospirillum brasilense* were encapsulated inside a double sphere by a swelling diffusion method followed by desiccation. The spheres were obtained using the dripping technique and cross-linked with sodium tripolyphosphate. The results showed that the treated plants

maintained the viability of *A. brasilense* for at least 60 days and demonstrated efficiency in promoting corn growth [127]. Also, Chen et al. (2013) used this method to encapsulate *Bacillus cereus* (strain C1L) and maintained 42 % of its viability. They used 18.3 % maltodextrin and 12.5 % gum arabic as coating materials to act as a biofungicide, and this system effectively protects encapsulated bacteria and inhibits *Cochliobolus heterostrophus* [128].

On the other hand, fungal entomopathogenic organisms can be a promising alternative to synthetic insecticides for the biocontrol of pests and insects. For example, encapsulation in calcium alginate and starch spheres was used to encapsulate the fungus *Metarhizium brunneum* (BIPESCO5), considered a beneficial organism for pest control, capable of promoting endophytism in tomato plants. Thus, mycelium encapsulation increased drying survival by 31.5 %. The co-encapsulated starch was degraded by 24.8 % after 21 days and served as a source of nutrients for its growth in soil. When applied to soil, encapsulation significantly increased endophytism by 3.8 to 7.0 times compared to plants treated with unformulated fungal biomass [129]. In another study, hydrogel spheres were produced by the ionic gelation method in a sodium alginate matrix modified with different polymers to encapsulate the *Trichoderma* sp. fungus (a potential biological control agent) to evaluate the viability of conidia during encapsulation. The results revealed good compatibility with *Trichoderma*, as formulations stored after 14 months showed concentrations of viable cells above 10<sup>6</sup> CFU/g [130]. Also, Muskat et al. (2022) encapsulated the fungus Entomophthorales *Pandora* sp. (ARSEF 13372) to develop a biopesticide in the form of spheres using the extrusion method. Thus, various combinations of sodium alginate with starch, chitin, and skimmed milk powder were used to encapsulate the fungal conidia. Hence, skimmed milk increased the number of fungal conidia by 2.95 times and released a significantly greater number of conidia from the spheres than the other combinations. Furthermore, a higher mortality rate of the formulation was observed for summer apple psyllid pests, e.g., about 48 % for *Cacopsylla picta* and 75 % for *Cacopsylla pyri* [131].

It is worth highlighting that according to Wu et al. (2012), when microorganisms are incorporated into a hybrid matrix composed of clays and natural polymers, the clay can increase the cellular stability of the encapsulated microorganisms, forming a protective layer against adverse conditions, such as changes in temperature, pH among others, improving the overall stability and survival rate of encapsulated cells [132]. Furthermore, clays in polymeric spheres improve interaction with microorganisms

present in the environment [133, 134]. Also, spheres manufactured from chitosan/carbon black nanopowders can adsorb phosphate. When in contact with microorganisms, these spheres decompose, releasing primary nutrients (nitrogen, phosphorus, and potassium) [135, 136]. Therefore, encapsulation of microorganisms is a promising technique that continues to evolve and offers innovative solutions to various challenges across different industries. In general, it can be difficult to study the effect of microorganisms on polymeric and hybrid polysaccharide spheres due to the complexity of interactions between microorganisms and the physicochemical properties of the spheres, which can influence the growth and activity of microorganisms [137]. Therefore, as research and development in this area progresses, the application of encapsulated microorganisms in agriculture is expected to become more effective, playing an increasingly important role in promoting sustainability and improving agricultural practices worldwide. Table 2 presents other examples of microorganisms encapsulated in hydrogel spheres and the main results obtained from these studies.

**Table 2.** Examples of microorganisms encapsulated in hydrogel spheres and their main results.

Sphere type	Microorganisms	Findings	Ref
Chitosan/Starch	<i>Azospirillum brasilense</i> / <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Immobilization of bacteria in hydrogel spheres benefits bacterial survival rates. Promotion of root growth in corn plants.	[138]
Alginate-montmorillonite/Alginate-halloysite	<i>Pseudomonas fluorescens</i> / <i>Azospirillum brasilense</i>	Slow release of plant growth-promoting bacteria after 15 days of incubation and effectiveness on the growth of wheat plants.	[139]
Sodium alginate	<i>Enterobacter hormaeche</i>	Significantly higher okra growth and yield were observed after 60 days. Soil quality improved, with a yield increase of up to 75.6 %.	[140]

Sphere type	Microorganisms	Findings	Ref
Gelatin alginate	<i>Enterobacter</i> sp. ITCB-09	The bacterial strain exhibited the ability to solubilize inorganic phosphate (865.98 µg/ml). Positive effect on <i>Capsicum chinense</i> Jacq. seedling growth.	[141]
Sodium alginate/Calcium chloride	<i>Trichoderma harzianum</i>	Increased levels of denitrifying bacteria compared to control. Enhanced chitinolytic and cellulosic activities, resulting in effective control of <i>S. sclerotiorum</i> .	[142]
Gum Arabic/Maltodextrin	<i>Bacillus subtilis</i> B99-2	The survival rate was 87.53 % after 540 days of storage. Effective biocontrol reached 79.91 % against <i>Rhizoctonia</i> tomato rot under field conditions.	[143]
Alginate/Carboxymethylcellulose/Pectin	<i>Heterorhabditis</i> sp.	The alginate spheres demonstrated nematode retention capacity.	[144]
Starch/Chitosan	<i>Azospirillum brasilense</i> / <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Controlled release of bacteria into water and soil.	[145]

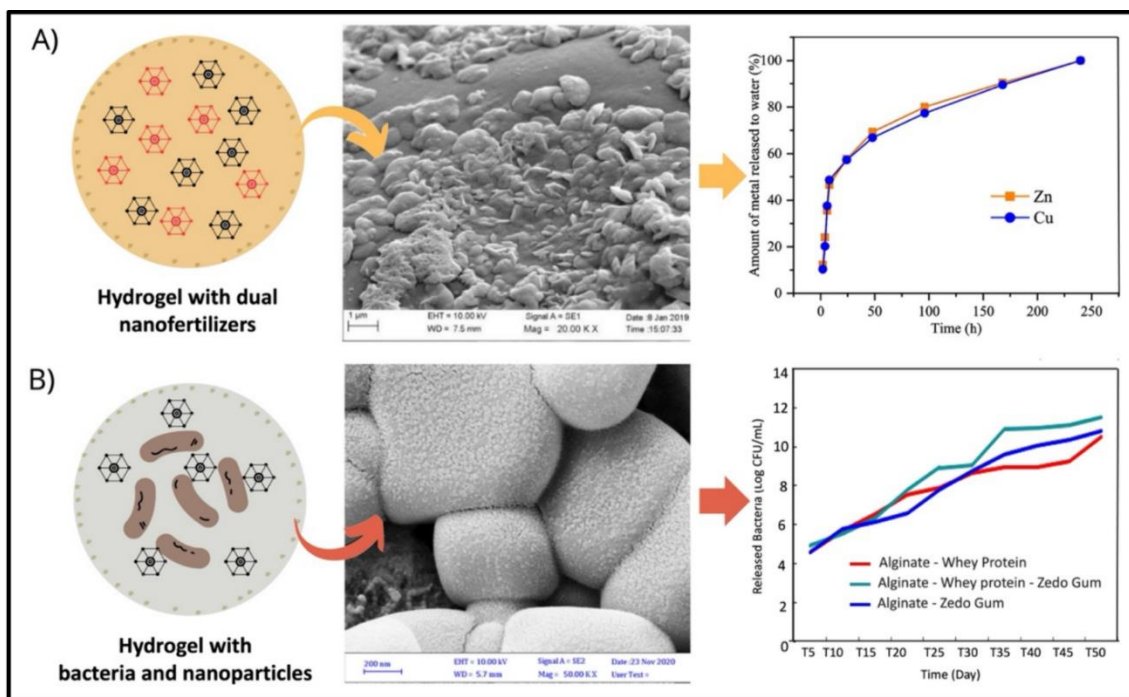
### 3.3. Encapsulation of hybrid systems in hydrogel spheres

With advances in the production of hydrogel spheres, the ability to encapsulate multiple active ingredients within their structure arises, creating hybrid systems. These systems combine different interconnected components within the same matrix, enabling the sequential release of multiple active ingredients over time [146]. For example, nutrients can be encapsulated with components that reduce soil acidity, contributing to a better productivity culture, or nanoparticles associated with microorganisms can be used [147]. For example, spheres made of slow-release sodium alginate that enable the release of insecticides and fertilizers (organic and inorganic) in a single application were developed by Joshi et al. (2020) using the microorganism *Bacillus thuringiensis* as a

biopesticide and nitrogen, phosphorus, and potassium as fertilizers. The results showed different release patterns between the encapsulated active ingredients, with  $\text{KNO}_3$  and  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  showing a monophasic prolonged release pattern. In contrast, nitrogen showed a lower release rate during the same 24-h of study. Regarding the effectiveness of this biopesticide against *Heliothis virescens* larvae, a 35 % survival rate was reported, while the control achieved 72.5 % after 120 h of exposure [148].

The association of different active ingredients in hydrogel spheres was also observed by Ma et al. (2023), who prepared double-layer spheres for the controlled release of various nitrogen, selenium, and copper-based fertilizers. Urea was encapsulated as the core of the fertilizer, and copper ions were present in the outer shell of the hydrogel. In addition, mesoporous silica nanoparticles loaded with sodium selenate were encapsulated in the hydrogel network. In this study, the release time of nutrients from the sphere reached approximately 42 days, as the outer layer of the hydrogel increased the diffusion distance of nutrients, thereby prolonging the release time. However, the slow release of  $\text{Cu}^{+2}$  showed an antifungal effect, improving cherry radish's productivity and nutritional value (*R. sativus*) [146].

In the meantime, the encapsulation of nanoparticles associated with nutrients, biopesticides, or even microorganisms in hydrogel spheres has also been the target of investigation, as nanoparticles may behave differently than conventional active ingredients. For instance, Ekanayake et al. (2021) synthesized a dual-functional alginate hydrogel containing ZnO and CuO nanoparticles. They observed that the loosely held ions in the hydrogel were released before the cross-linking ions in the polymer chains (**Figure 5-A**) [149]. Also, Pour et al. (2022) encapsulated *Bacillus velezensis* in an alginate gum polymer hydrogel enriched with  $\text{TiO}_2$  and  $\text{SiO}_2$  nanoparticles and observed that the bacteria remained viable and were released from the carriers for >50 days (**Figure 5-B**) [150]. In addition, Panichikkal et al. (2021) produced hybrid spheres composed of alginate, salicylic acid, zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs), and *Pseudomonas* sp. DN18. This system showed antifungal activity against *Sclerotium rolfsii*. In addition, it revealed that plant growth and biocontrol properties were superior to those of *Pseudomonas* sp. DN18 in trials using rice (*Oryza sativa*) seedlings [147].



**Figure 5.** Examples of encapsulation of hybrid systems in hydrogel spheres. A) Hydrogel spheres with dual-functional nanofertilizers embedding ZnO and CuO nanoparticles. Reproduced with permission from Ref. [149] Copyright (2021), American Chemical Society; B) Hydrogel encapsulated with *Bacillus velezensis* and TiO<sub>2</sub> and SiO<sub>2</sub> nanoparticles. Reproduced with permission from Ref. [150] Copyright (2022), MDPI. Parts of the image were created using canva.com.

Furthermore, hydrogel spheres can be engineered according to their application by mixing materials to modulate active ingredients' release effect or promote compatibility with specific microorganisms. For example, Humbert et al. (2017) described the synthesis of hydrogel spheres from calcium alginate chloride to encapsulate amyloglucosidase and *Saccharomyces cerevisiae* and to assist in releasing CO<sub>2</sub> [151]. The production of CO<sub>2</sub> from yeast acted as a biocontrol agent against pests, and it was even possible to encapsulate compounds with insecticidal properties that could interact with the encapsulated microorganisms [152, 153]. Another study evaluated the release of CO<sub>2</sub> from synergistic interactions between a *Beauveria bassiana* fungus with *Saccharomyces cerevisiae* and corn starch, prolonging and increasing the release of CO<sub>2</sub> [154].

Therefore, developing new sustainable hybrid systems with intelligent release capacity is crucial to enable agricultural productivity [1]. Thus, with hydrogel spheres, it is possible to encapsulate and control the release of different nanofertilizers. For instance, Vincekovic et al. (2016) produced a chitosan/alginate-based hydrogel sphere, co-encapsulating with the microorganism *Trichoderma viride* and the micronutrient copper,

offering multiple effects in the field. Their results revealed that release can be controlled by both the size of the spheres and by incorporating the microorganism into their matrix [155]. Furthermore, such systems can potentially present a slow release when the nanoparticles are encapsulated within them.

#### **4. Concluding remarks and future perspectives**

The evolution of technology and global challenges are constantly changing in the agricultural sector. It is crucial to anticipate and understand the trends that will guide us to achieve safe and efficient systems in the coming years. Developing intelligent systems for the controlled release of agrochemicals is already a reality [156, 157], and nanotechnology plays a critical role in improving these systems [158]. However, when moving towards the use of beneficial microorganisms in plants, encapsulation in nanoparticulated systems is not as suitable due to their size, as many of these microorganisms have a larger structural organization than nanometric systems. In addition, such organisms are in constant metabolic activity, carrying out a series of biological processes, such as cell replication and cell division, among others [132, 140].

Furthermore, microorganisms are highly susceptible to dehydration and quickly lose viability [88, 127]. In this way, developing new intelligent materials, such as hybrid spheres made of polysaccharides, makes it possible to create structures resistant to adverse climatic conditions to encapsulate microorganisms and increase their viability in the field. These structures can also provide food for survival and multiplication, allowing the encapsulation of conventional agrochemicals and nanoparticles. Therefore, hydrogel beads have the potential to significantly improve the use of microorganisms and other active ingredients in traditional agriculture, promoting more sustainable agricultural practices and boosting responsible food production on the planet. Numerous patents have been issued on this topic (e.g., US 10,865,160 B2; US 7,422,737 B1). However, there are still challenges to be overcome for the full implementation of this technology, such as:

- Some hydrogels, such as spheres made solely of alginate, can be difficult to degrade in soil, significantly delaying the release of the active ingredient. To overcome this, it is necessary to develop more complex systems, such as hydrogels combined with clays, organic matter, or other biodegradable polymers.
- The size of the hydrogel spheres limits their application mainly to soil, as foliar application remains inefficient. Their size prevents internalization or adherence to the

leaf. However, strategies can be developed to modify the size and surface of the spheres by using coatings that enhance adhesion to the leaf surfaces.

- There is a need for in-depth studies on the release mechanisms of these hybrid systems, especially for bacteria and hybrid systems under real environmental conditions. Furthermore, responsive polysaccharides should be further explored to control the release of active ingredients. For example, chitosan can generate a system responsive to changes in pH [102], while xanthan gum can create a system responsive to temperature due to its rheological changes, such as changes in viscosity and stability [159].

- The production cost of hydrogel spheres can be high, especially when considering large-scale agricultural applications. Therefore, cheap and innovative methods of manufacturing hybrid hydrogel bead systems must be improved. For example, Jiang et al. (2023) created a rapid process of producing spheres using the Pickering emulsion method. In this method, droplets surrounded by layers of air and water are formed by an air jet passing through a small reservoir containing a liquid layer composed of a suspension of nanoparticles and biopolymer, allowing the generation of up to 300 spheres per second [160]. Furthermore, the spray drying technique is also used to produce these systems on a larger scale [161]. However, it has limitations related to the stability of the complex precursor solution/dispersion during the atomization process, high energy consumption, etc. [162].

- There is a need for a better understanding of the impact of these systems on the environment and human health, particularly when involve multiple active ingredients or nanomaterials. The effects of these hydrogel spheres should also be based on the timing of application and different environmental conditions. This understanding is crucial for supporting regulatory processes and ensuring acceptance by producers and the public in the future.

In addition, this study suggests new strategies for developing formulations based on hydrogel spheres. The main future perspectives include:

- Investigate how different combinations of polysaccharides and microorganism agents can further improve the efficiency and sustainability of hydrogels, adapting them to a broader range of adverse environmental conditions and other crops.

- Explore the use of nanomaterials with improved properties, such as greater controlled release capacity and responses to specific environmental stimuli (pH, temperature, humidity, etc.).

- Promote the development of materials integrated with precision agriculture technologies for more efficient and localized administration of agricultural inputs, reducing waste and maximizing yields.
- Conduct large-scale field trials to evaluate the effectiveness of these materials in various agricultural conditions and climates, providing real data on their performance and economic and environmental benefits.
- Conduct environmental impact studies and life cycle analyses to quantify the benefits and potential drawbacks of widespread adoption of hydrogels in agriculture, helping to develop guidelines for their sustainable use.
- Explore the encapsulation of new types of active ingredients, such as biofertilizers and beneficial microorganisms with pest biocontrol capabilities, to broaden the reach of the technology and promote even greener agriculture.

Therefore, developing and implementing new strategies for the controlled release of agricultural inputs is essential to mitigate environmental impacts and improve food production. In this way, we hope that innovation research will continue to explore new ways to harness the potential of these hydrogel spheres for the agricultural sector, always aiming to contribute to more sustainable and efficient farming practices.

### **Acknowledgment**

São Paulo Research Foundation (FAPESP, grant number: #2022/03219-2), National Council for Scientific and Technological Development (CNPQ, #440214/2021-1), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Finance Code 001) and Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e innovación (SENACYT, Proyecto: FIED21-036). M.M.L.H.F. thanks FAPESP for the fellowship (#2023/09217-4).

## **CAPÍTULO II**

### **OTIMIZAÇÃO DAS ESFERAS DE HIDROGEL**

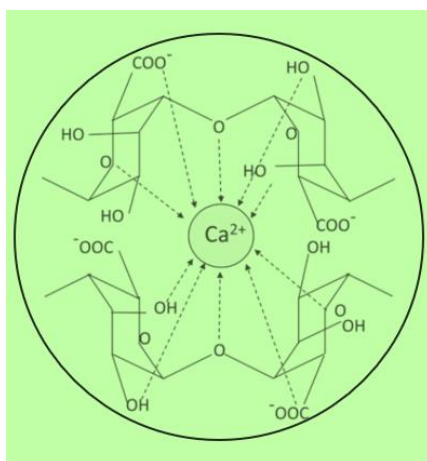
**PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DOS DIFERENTES TIPOS DE  
ESFERAS DE HIDROGEL,**

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS**

**CULTIVO DAS ESTIRPES AB-V5 E AB-V6 DE *AZOSPIRILLUM  
BRASILENSE***

## 1 – INTRODUÇÃO

A busca por esferas de hidrogel com potencial de combinação de propriedades desejáveis tem impulsionado as pesquisas na área do setor agrícola [163]. Tendo como seu principal aliado o alginato de sódio (AS), por ser biocompatível, biodegradável, baixo custo e ter capacidade de formar esferas perfeitas [164, 165]. Sendo este um polissacarídeo de cadeia linear composto por  $\beta$ -D-manuronato (M) e  $\alpha$ -L-guluronato (G) [166], com capacidade de se reticular com íons divalentes, como cloreto de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), por meio dos blocos G da cadeia polimérica, formando estruturas bidimensionais denominada como “caixa de ovo” [164]. Suas unidades enriquecidas por ácido  $\alpha$ -l-gulurônico, lhe conferem rigidez, enquanto as  $\beta$ -d-manurônico, que lhe confere flexibilidade [167]. Devido à sua capacidade de formar géis na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  (**Figura 1**) [168], ele tem o potencial de aprisionar ativos em seu interior, sua morfologia e resistência são dependentes da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  [109, 169, 170].



**Figura 1.** Representação esquemática da formação das esferas de AS reticuladas por  $\text{Ca}^{2+}$  [168]

Além disso a mistura de diferentes matérias, associados a matriz do alginato pode provocar alterações significativas nas propriedades físico-químicas dos materiais envolvidos, tais como, mudanças na superfície, morfologia, tamanho de poros, entre outros [95, 96, 171].

A combinação de esferas com nanopartículas de zinco tem sido explorada na agricultura, uma vez que esses sistemas têm potencial de liberar zinco de forma lenta as plantas. Assim, este sistema pode reduzir as perdas deste insumo agrícola pela degradação físico-química e lixiviação no solo [55]. Entre os métodos mais comuns para obtenção de NPs de zinco, destaca-se o método de nanoprecipitação, conhecido por sua simplicidade

e baixo custo [172] [173]. Esse método pode utilizar diversos sais de zinco, como acetato de zinco [174], sulfato de zinco [175] e nitrato de zinco [176], que são adicionados a uma solução contendo um agente precipitante, como hidróxido de sódio. A adição resulta na formação de um precipitado de hidróxido de zinco, que, ao ser submetido à calcinação em altas temperaturas, se transforma em ZnONP [174]. Durante esse processo o hidróxido de zinco perde água por desidratação, levando à formação do óxido de zinco [177]. Além disso, é comum a utilização de surfactantes, como o brometo de cetil trimetil amônio (CTAB) [178], o dodecil sulfato de sódio (SDS) [179] e triton [180] para revestir e estabilizar as nanopartículas. Essa abordagem não apenas melhora a dispersão das nanopartículas, mas também pode influenciar suas propriedades finais, tornando-as mais eficazes em aplicações agrícolas.

Além do uso de ZnONPs, as bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) do gênero *Azospirillum brasilense* também desempenham um papel importante na agricultura, promovendo o crescimento vegetal por meio da fixação de nitrogênio e da produção de substâncias bioativas que melhoram a absorção de nutrientes pelas plantas, encontrando-se predominantemente na rizosfera [181]. A espécie de *Azospirillum* é um gênero de bactérias gram-negativas [182], e foi isolada pela primeira vez em 1978 em solo brasileiro [183]. Desde então, tem sido considerada uma importante ferramenta para a agricultura, especialmente em culturas de grãos [184, 185]. Essas bactérias são muito utilizadas na inoculação de sementes e, quando combinadas com nanopartículas de zinco, *A. brasilense* pode potencializar ainda mais os efeitos benéficos, contribuindo para a bioacumulação de zinco nas plantas [17, 99, 125, 186]. Essa sinergia entre as nanopartículas e as bactérias não apenas melhora a disponibilidade de micronutrientes, mas também aumenta a absorção de Zn, promovendo um crescimento mais robusto das plantas [187]. *A. brasilense* é cultivada em meios de cultura específicos que favorecem seu crescimento e atividade, contendo componentes como açúcares e nutrientes [183]. Entretanto, sua disponibilidade no solo é afetada por fatores bióticos e abióticos do ambiente e, portanto, a encapsulação dessas bactérias em sistemas biodegradáveis, como esferas de hidrogel, tem sido amplamente estudadas atualmente [163].

A combinação de diferentes tipos de materiais como orgânico e inorgânico associados as esferas de hidrogel apresenta uma abordagem inovadora e promissora para melhorar a agricultura. As esferas de alginato atuam como um sistema de liberação controlada, permitindo a liberação gradual e prolongada de zinco e das BPCV, tornando o Zn mais disponível para absorção pela planta e maximizando a bioacumulação de zinco

nas plantas, pois o zinco tem baixa mobilidade no solo e pode se tornar menos disponível quando se precipita com fosfatos ou quando é complexado em solos com alto teor de matéria orgânica [188-190]. Portanto, nanopartículas e bactérias podem ser encapsuladas em matrizes polimérica de hidrogéis.

Neste contexto, este capítulo tem como objetivo otimizar diferentes tipos de esferas de hidrogel baseadas em matrizes de alginato de sódio, avaliando o efeito da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  e da incorporação de outros polissacarídeos na formação das esferas. Adicionalmente, buscou-se analisar a capacidade de encapsulação de diversas NPs (inorgânicas e orgânicas) nesses hidrogéis, visando aprimorar sua estabilidade e gerar potencial de uso agrícola. Atrelado a isso, microrganismos da espécie *Azospirillum brasilense* (estirpes Ab-V5 e Ab-V6), foram cultivados e encapsulados posteriormente em esferas de hidrogel. Por fim, a avaliação e os resultados obtidos neste capítulo permitiram compreender como as esferas de hidrogel interagem com diferentes materiais, além de identificar quais combinações de esferas, NPs e bactérias demonstraram maior potencial de aplicação na agricultura.

## **2- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### **2.1 Materiais**

Os reagentes utilizados no estudo foram: tripalmitina (glicerol tripalmitato) e alginato de sódio adquiridos pela Sigma-Aldrich, ácido oleico (AO), cloreto de ferro (III) hexa-hidratado 97%, cloreto de ferro (II) tetra-hidratado  $\geq 99\%$ , triglicerídeo de ácido cáprico/caprílico (Myritol 318) doado pela empresa ChemSpecs. A xilana foi extraída da cana-de-açúcar e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Michel Brienzo, UNESP. As estirpes bacterianas foram gentilmente cedidas pela Embrapa Soja. Os demais reagentes e solventes orgânicos utilizados foram de alto grau de pureza analítica adquiridos em mercados nacionais. A água Milli-Q foi obtida no próprio laboratório usando um sistema Direct-Q3 UV Smart com resistividade de 18,2  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ .

### **2.2 Métodos**

#### **2.2.1 Síntese das nanopartículas para serem encapsuladas nas esferas**

##### **2.2.1.1 Síntese de nanopartículas de óxido zinco**

As nanopartículas de óxido de zinco foram sintetizadas a partir do método descrito por Aditya e seus colaboradores [191] com modificações. Assim, 2 g de sulfato de zinco e 0,016 g de SDS foram dissolvidos em 40 ml de metanol. Após a dissolução foram

adicionadas 12,5 ml de água deionizada. Em seguida, foi adicionada uma solução gota a gota, contendo 0,74 g de hidróxido de sódio em 30 ml de metanol e, mantida em agitação por 30 minutos. Posteriormente, o precipitado formado foi centrifugado e lavado com etanol e acetona (1:1).

### **2.2.1.2 Síntese de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de Fe estabilizadas com ácido oleico**

Nanopartículas superparamagnéticas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@OA\_NPs$ ) foram sintetizadas utilizando o método de coprecipitação descrito por [192, 193], que consiste na adição de 15 g de cloreto de ferro (III) hexa-hidratado e 9,2 g de cloreto de ferro (II) tetra-hidratado em 250 ml de água Milli-Q e agitação mecânica por 10 min a 50 °C. Após 10 minutos,  $\text{NH}_4\text{OH}$  ( $12 \text{ mol.L}^{-1}$ ) foi adicionado à solução, resultando em um precipitado escuro de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Em seguida foram adicionados 2,5 ml de ácido oleico a mistura, e então foi aquecida a 80 °C durante 1 h. O Excesso de  $\text{NH}_4\text{OH}$  e ácido oleico foram removidos por isolamento magnético do precipitado, utilizando um ímã durante 15 minutos e subsequente redispersão em clorofórmio. O procedimento de lavagem foi repetido cinco vezes com água Milli-Q e quatro vezes com clorofórmio. Por fim, as nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@OA$  (contendo 337,7 mg/L de Fe) foram armazenadas em frasco âmbar à temperatura ambiente.

### **2.2.1.3 Síntese de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) híbridos**

O método emulsificação/evaporação de solvente empregado para a preparação do carreador lipídico nanoestruturado (CLN) foi descrito inicialmente por Campos et al. (2015) [194] com modificações. Assim, 250 mg de tripalmitina (lipídio sólido) e 75 mg Myritol 318 (lipídio líquido) foram dissolvidos em clorofórmio contendo 0,5 ml de AuNPs (as AuNPs foram utilizadas para a marcação potencial dos CLNs). Em seguida a fase orgânica foi adicionada a uma fase aquosa por imersão, contendo 0,370 g de PVA em 30 ml de água. Logo após a mistura foi sonicada por 4 minutos a uma potência de 90 W em sonicador de ponta (Ultrassônico QR 550 W). Posteriormente homogeneizou-se em um Turrax (IKA T25) por 7 min a 12.000 rpm. Logo após a formação da emulsão, a nanoformulação foi transferida para e evaporador rotativo, onde foi concentrada em 10 ml. A amostra foi armazenada em frasco de vidro âmbar em temperatura ambiente.

## **2.2.2 Ensaios com bactérias**

### **2.2.2.1 Preparo do meio de cultivo *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6)**

O meio de cultura YMA (Yeast Mannitol Agar), com modificações [195], foi preparado da seguinte maneira: manitol (20 g/L), extrato de levedura (10 g/L), fosfato de potássio (0,5 g/L), sulfato de magnésio (0,2 g/L), cloreto de sódio (0,02 g/L) foram dissolvidos em água Milli-Q (18.2 MΩ·cm 25 °C), ajustando o pH para 6,8 e adicionando ágar (15 g/L). Após completa dissolução do ágar em banho-maria, o meio foi esterilizado por autoclavagem a 121°C por 20 minutos. Após o resfriamento a 50°C, o meio foi vertido em placas de Petri estéreis e deixado solidificar à temperatura ambiente.

### **2.2.2.2 Cultivo e crescimento de *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6)**

As estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* foram reidratadas com o meio de cultura YM líquido mencionado anteriormente, sem adição de ágar. Utilizando uma alça de platina flambada, as amostras foram transferidas individualmente para placas de Petri contendo meio YMA solidificado pelo método de esgotamento por estrias na superfície do meio de cultura. As placas foram incubadas na posição invertida em uma incubadora B.O.D. MA 415 (Marconi) a 28°C (±2°C) por 7 dias, sendo monitoradas diariamente. Após o cultivo das estirpes, as colônias bacterianas foram cuidadosamente isoladas em meios sólidos. Posteriormente, cada uma das colônias isoladas foi transferida para erlenmeyers contendo 20 ml de meio de cultura YMA líquido, o qual foi previamente esterilizado. Os erlenmeyers foram então colocados em um agitador orbital (shaker), onde as culturas ficaram sob agitação contínua para garantir uma oxigenação homogênea. O processo de cultivo foi realizado em condições controladas dentro de uma incubadora, mantendo-se a temperatura constante de 28°C (±2°C) durante um período de 7 dias, permitindo o crescimento e multiplicação das células.

### **2.2.2.3 Caracterização das bactérias *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6)**

#### **i) Coloração de Gram**

Para diferenciar bactérias com base na composição da parede celular, utilizou-se a técnica de coloração de Gram [196]. Inicialmente, as estirpes foram espalhadas (esfregaço) em lâminas de vidro usando uma alça de platina flambada e fixadas sob o bico de Bunsen. Em seguida, aplicou-se o corante cristal violeta por 60 segundos. Posteriormente, as amostras foram cobertas com lugol por 60 segundos, seguido pela rápida descoloração com álcool-acetona e novamente lavadas com esguicho de água deionizada. Então, as lâminas foram coradas com safranina por 30 segundos, seguido de

novamente da lavagem com água deionizada e secas. Em seguida foi realizada a observação no microscópio Zeiss Primo Star equipado com câmera AxioCam ERc5s, utilizando as objetivas de 40x e 100x.

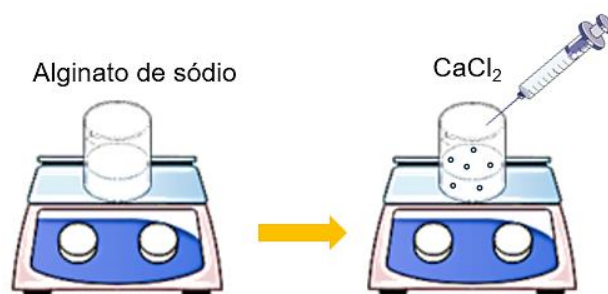
#### **2.2.2.4 Padronização da metodologia analítica pra bactérias *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6).**

A padronização das bactérias *A. brasilense* das estirpes Ab-V5 e Ab-V6 foi determinada pela densidade óptica (DO) utilizando o método de turbidimetria, por espectrofotometria UV-Vis na absorvância de 600 nm. As amostras foram suspensas em solução tampão fosfato estéril e submetidas a diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ). A solução tampão fosfato estéril foi utilizada como branco para zerar a leitura no espectrofotômetro. Após as diluições, procedeu-se à quantificação dos microrganismos pelo método de pesagem da massa seca total das células. Cada amostra foi submetida a um processo de filtração. Em seguida, as amostras foram cuidadosamente pesadas e transferidas para uma estufa de secagem, onde permaneceram a uma temperatura constante de 105 °C, garantindo a remoção total da umidade e a obtenção da massa seca. Vale ressaltar que todas as diluições foram realizadas em triplicata, visando maior linearidade nos valores obtidos. Os gráficos foram plotados no software Prism 10.0, relacionando os valores de massa seca com a densidade óptica medida a 600 nm [197].

### **2.2.3 Preparo das esferas**

#### **2.2.3.1 Preparo das esferas de polissacarídeo**

As esferas foram preparadas pelo método extrusão/precipitação descrito por Mandal e seus colaboradores [51] com modificações (**Figura 2**). Uma solução aquosa de alginato de sódio a 2% (m/v) foi introduzida gota a gota em 100 ml de solução aquosa de cloreto de cálcio, nas concentrações de 1%, 0,75%, 0,5% e 0,25%, utilizando uma seringa com agulha de 13 × 0,45 mm. O sistema foi mantido sob agitação a 400 rpm por 30 minutos. Após a formação, as esferas foram coletadas por filtração e lavadas com água Milli-Q.



**Figura 2.** Representação do preparo das esferas de hidrogel.

### **2.2.3.2 Preparo das esferas híbridas e associação com NPs e organismos**

As esferas foram preparadas pelo mesmo método de extrusão/precipitação descrito no item 2.2.1. Inicialmente, foi preparada uma solução de alginato de sódio a 2% (m/v), contendo as estirpes Ab-V5 (=CNPSo 2083) e Ab-V6 (=CNPSo 2084) de *A. brasilense* na concentração de 0,15 mg/ $\mu$ L, em seguida, foram adicionados 300 mg de ZnONPs, mantidos em agitação por 10 minutos. Em seguida, a mistura foi introduzida gota a gota com o auxílio de uma seringa com uma agulha de tamanho 13 x 0,45 mm, em 100 mL em uma solução aquosa de cloreto de cálcio a 1% (m/v), sendo agitada a 400 rpm por 30 minutos. Após a formação, as esferas foram coletadas por filtração e lavadas com água Milli-Q. Além disso, as esferas foram associadas a outros compostos, tais como bentonita, xilana, celulose microcristalina e goma guar, na concentração de 2%, sendo adicionados à solução de AS.

## **2.3 Caracterização Físico-química**

### **2.3.1 Espectroscopia no ultravioleta visível (UV-Vis)**

O espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu UV-1800) foi utilizado para estudar as bandas de absorção das ZnONPs. Os espectros foram coletados de 200 a 800 nm e os resultados foram plotados utilizando o software GraphPad Prism 10.1.

### **2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia por energia dispersiva (MEV/EDS)**

As nanoformulações, estirpes bacterianas e as esferas foram analisadas por MEV com acoplamento de detector de energia dispersiva (EDS), para avaliar morfologia, superfície e mapeamento das amostras. As amostras de nanoformulação foram diluídas (1:1000) e gotejada sobre um suporte de silício previamente limpo e seco por 24 horas em dessecador contendo Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. As esferas de hidrogel foram secas à temperatura

ambiente. As estirpes de *A. brasilense* puras e as esferas contendo as estirpes foram submetidas a uma série de etapas de desidratação em diferentes concentrações de álcool etílico, seguido pelo processo de secagem crítica com dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Posteriormente, todas as amostras receberam uma fina camada de ouro, exceto aquelas contendo CLN\_AU, que foram revestidas com uma fina camada de carbono. As micrografias foram obtidas por um microscópio eletrônico, modelo EVO-LS15 da marca Carl Zeiss, do DFQ, UNESP Campus de Ilha Solteira.

### **2.3.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos com a utilização de um espectrofotômetro Nicolet 5DXB FT-IR (Nicolet Instruments, Madison, WI) instalado no DFQ – UNESP Ilha Solteira. As pastilhas utilizadas na análise foram feitas a partir da mistura de brometo de potássio (KBr) e amostra seca suficiente para compor 1% (m/m) da mistura, que foi macerada até ficar totalmente uniforme. Para a obtenção dos espectros FTIR foi empregado, para cada amostra, um mínimo de 64 varreduras numa resolução de  $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$ , na faixa de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . Dessa forma, foi possível observar bandas de absorção nos espectros, permitindo correlacioná-las com as possíveis interações entre as ZnONPs, microrganismos e as esferas de polissacarídeos.

### **2.3.4 Difração de Raios-X (DRX)**

A técnica de difração raios-X (DRX) foi utilizada para analisar estruturas cristalinas na formação ZnONPs. Além disso foi empregada para determinar o tamanho do cristalito ( $\epsilon$ ) da nanopartícula inorgânica, através da equação de Scherrer (**Equação 1**).

$$\epsilon = 0,89 \cdot \lambda / \beta \cdot \cos\theta \quad \text{Eq. (1)}$$

onde:  $\lambda$  é o comprimento de onda dos raios-X (0,154 nm),  $\beta$  é a largura total ao meio máximo,  $\theta$  é o ângulo de difração.

Os difratogramas foram obtidos através de medidas realizadas no difratômetro Shimadzu modelo XRD-6000, alocado no Departamento de Física e Química - UNESP Ilha Solteira, utilizando como fonte de radiação a linha de emissão do cobre ( $\lambda \text{ Cu K}\alpha$

=1,5418Å). Os parâmetros utilizados foram: varredura no ângulo de 5 a 80°, uma velocidade de varredura do ângulo 1°/min com um step de 0,02°, voltagem de 30 kV e uma corrente de 40 mA.

### **2.3.5 Termogravimetria (TG)**

As análises de termogravimétrica foram feitas no equipamento da marca TA Instruments, modelo Q-600 do Departamento de Física e Química - UNESP Ilha Solteira, em cadinho de platina, utilizando cerca de 3 - 6 mg de amostra seca. Os experimentos foram realizados com programação de rampa de aquecimento de 10 °C até 800 °C, com razão de aquecimento de 10 °C/min. A vazão de nitrogênio foi mantida em 100 ml/min.

### **2.3.6 Degradação das esferas de alginato de sódio**

Para investigar a degradação das esferas de alginato de sódio, utilizou-se um microscópio óptico modelo U1000x com DSP de 24 bits e resolução de 640x480. As esferas foram dispersas em suspensão aquosa (3 mg/mL), agitadas constantemente em baixa velocidade por 20 dias e avaliadas em intervalos de tempo específicos. Posteriormente, as esferas foram depositadas sobre uma superfície lisa e, com um aumento de 1000x, foi possível realizar uma observação detalhada do material. Todas as análises foram conduzidas em temperatura ambiente a 25 °C.

### **2.3.7 Dinâmica de Secagem e Intumescimento de Esferas**

Para investigar a taxa de secagem dos diferentes tipos de esferas, utilizou-se uma balança analítica. As esferas intumescidas foram pesadas inicialmente e, em seguida, deixadas para secar em temperatura ambiente por diferentes períodos e pesadas novamente, e a diferença entre os pesos inicial e final foi calculado. Da mesma forma, a taxa de intumescimento foi analisada. As esferas secas foram pesadas antes de serem submersas em água deionizada, onde foram mantidas em temperatura ambiente e por diferentes períodos, as esferas foram pesadas novamente, e a diferença entre os pesos inicial e final foi igualmente calculada.

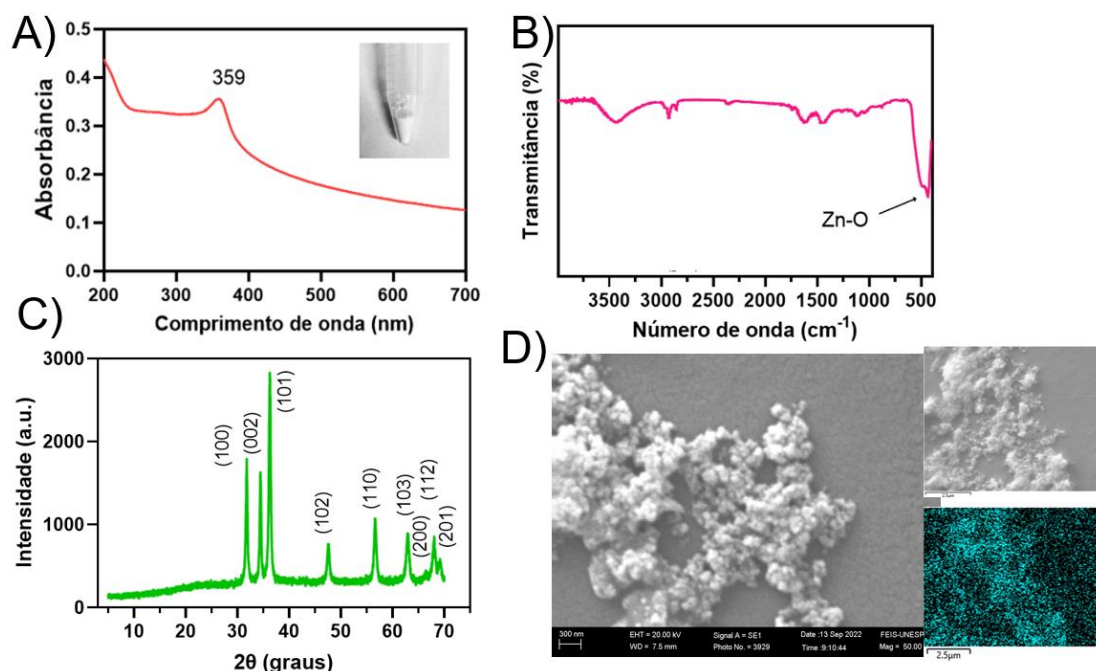
## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Caracterização das nanopartículas**

#### **3.1.1 Caracterização das nanopartículas de óxido de zinco**

As caracterizações realizadas sugerem a formação de nanopartículas de ZnO. A espectroscopia UV-Vis mostrou um pico de absorbância em 359 nm, conforme mostrado na **Figura 3-A**, condizente com a literatura [198]. Os espectros vibracionais do FTIR (**Figura 3-B**), na faixa de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , evidenciaram bandas referentes ao estiramento O-H em aproximadamente 3453  $\text{cm}^{-1}$ , ao alongamento simétrico de C-H em torno de 2939 e 2859  $\text{cm}^{-1}$ , à vibração do grupo C=O em 1632 e 1432  $\text{cm}^{-1}$ , e à banda de vibração de estiramento C-O em torno de 1112  $\text{cm}^{-1}$  [198]. A banda em aproximadamente 492  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída à vibração de estiramento da ligação Zn-O [199].

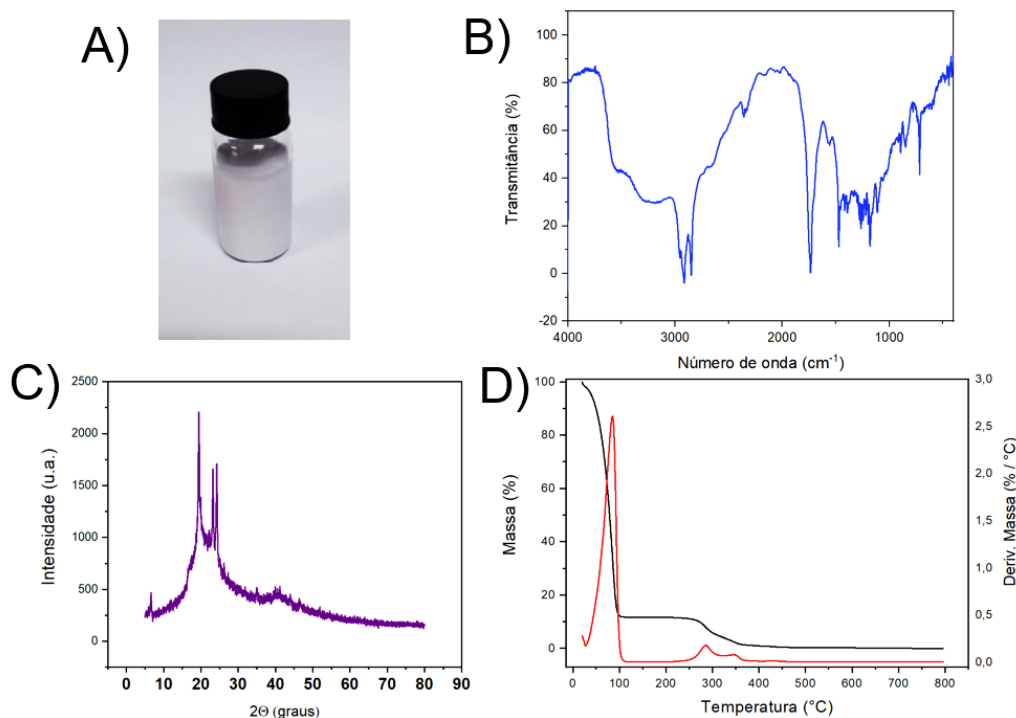
As medidas de difração de raios X, mostradas na **Figura 3-C**, revelam picos em  $2\theta = 31,70^\circ, 34,37^\circ, 36,21^\circ, 47,41^\circ, 56,54^\circ, 62,89^\circ, 67,86^\circ, 69,02^\circ$  e  $76,99^\circ$ , correspondendo aos planos (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112), (201), respectivamente. Esses picos estão totalmente de acordo com o padrão DRX da estrutura cristalina wurtzita hexagonal de ZnO (JCPDS Card No. 00-005-0664) [200]. Através da equação de Scherer, foi possível determinar um tamanho médio de cristalito em torno de 19,8 nm. Esses resultados sugerem a formação de nanopartículas. Na micrografia obtida por MEV (**Figura 3-D**), é possível observar um aglomerado de nanopartículas com uma morfologia não muito definida, uma vez que as ZnO-NPs são muito reativas e tendem a se aglomerar [201].



**Figura 3.** Caracterização de nanopartícula de óxido de zinco: A) Análise do UV-Vis e imagem da ZnONPs (inset); B) Espectros vibracionais por FTIR; C) Difratograma de raio-X; D) Micrografias de MEV/EDS das ZnONPs.

### 3.1.2 Caracterização dos carreadores lipídicos nanoestruturados

A caracterização físico-química da formulação do carreador lipídico nanoestruturado contendo ouro (CLN\_Au@CTAB) (**Figura 4-A**) foi investigada a fim de analisar suas propriedades físico-químicas e possíveis interações entre os compostos da formulação. A análise de FTIR (**Figura 4-B**) revela os espectros dos modos vibracionais do CLN\_Au@CTAB, onde observa-se banda em aproximadamente  $1736\text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento da ligação C=O da função éster presente nos lipídeos, e  $715\text{ cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento das ligações C-H. Além disso, em  $2914\text{ cm}^{-1}$  e  $2850\text{ cm}^{-1}$ , observa-se o estiramento da ligação C-H do grupamento alquila. Ademais, não foram observadas bandas características de interação com Au. O difratograma de raios-X mostrado na **Figura 4-C** permite notar picos de difração em  $24,1^\circ$  e  $19,4^\circ$ , que correspondem ao lipídio utilizado, de acordo com alguns relatados na literatura [202, 203]. Os dados de DRX sugerem que o efeito das nanopartículas plasmônicas de Au na estrutura do núcleo/invólucro do CLN é insignificante, evidenciando o revestimento bem-sucedido feito pelo lipídio. Além disso, as análises das propriedades térmicas (**Figura 4-D**) permitiram investigar as alterações provocadas pela variação de temperatura do material. Assim, observa-se uma perda de massa inicial em temperaturas abaixo de  $100^\circ\text{C}$ , associada à perda de água e degradação de compostos voláteis. Constata-se na derivada que ocorrem três picos: o primeiro a  $80^\circ\text{C}$ , correspondente à maior perda de massa devido à perda de água nessas amostras; o segundo pico próximo a  $284^\circ\text{C}$ , provavelmente relacionado à temperatura inicial de degradação do lipídio por ruptura das ligações para formar um composto intermediário (transições térmicas secundárias, por não ser puro o lipídio); e em torno de  $350^\circ\text{C}$  encontra-se o terceiro pico, indicando a perda de massa da decomposição final para o CLN\_Au@CTAB.

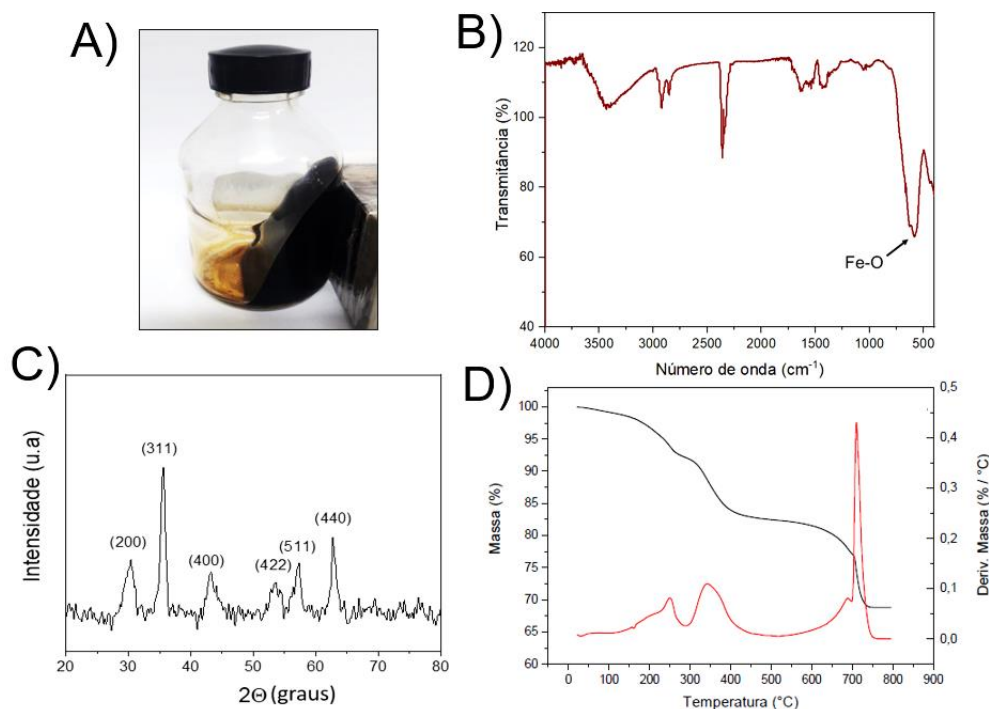


**Figura 4.** Caracterização do carreador lipídico nanoestruturado: A) Imagem da nanoformulação CLN\_Au@CTAB; B) Espectros vibracionais por FTIR; C) Difratoograma de raio-X; D) Análise termogravimétrica das nanopartículas orgânicas. **Figura 4** reproduzida de Antunes (2020) [204].

### 3.1.3 Caracterização das nanopartículas magnéticas

As nanopartículas magnéticas revestidas com ácido oleico ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@OA$ ), ilustradas na **Figura 5-A**, foram caracterizadas por diversas técnicas analíticas. Análise de FTIR (**Figura 5-B**) revelou bandas características atribuídas aos modos vibracionais em aproximadamente  $583\text{ cm}^{-1}$ , referentes à ligação Fe-O, e picos de absorção típicos das ligações em torno de  $3420$  e  $2923\text{ cm}^{-1}$ , atribuídos aos grupos hidroxila presentes no -COOH e  $-\text{CH}_2$ , respectivamente, do ácido oleico utilizado como revestimento das NPs. Os picos de difração das NPs inorgânicas foram utilizados para identificar a estrutura cristalina, como mostrado na **Figura 5-C**. Assim, quatro picos de difração foram identificados para as NPs magnéticas em aproximadamente  $\sim 30^\circ$  (220),  $35,4^\circ$  (311),  $64^\circ$  (440) e  $57^\circ$  (511), sugerindo ser a estrutura da magnetita (tipo espinélio inverso), de acordo com o Crystallographic Open Database. As curvas TGA/DTG são mostradas na **Figura 5-D**. Observa-se quatro picos na curva DTA, relacionados às quatro perdas de massa presentes nas nanopartículas magnéticas. O primeiro pico, centrado em  $242^\circ\text{C}$ , próximo ao ponto de ebulição ou decomposição do ácido oleico, possivelmente devido à remoção do ácido oleico livre da superfície das NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . O segundo pico, centrado em  $350^\circ\text{C}$ , está fortemente ligado à perda de massa do ácido oleico das NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

Por sua vez, o terceiro pico, centrado em 687°C, é atribuído à transição de fase de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> para FeO, que é termodinamicamente estável acima de 570°C, conforme apresentado no diagrama de fases do sistema Fe-O. O quarto pico, localizado em 711°C, está relacionado a outra perda de massa, possivelmente devido à desoxidação de FeO, uma vez que a análise TGA/DTG foi realizada sob atmosfera de N<sub>2</sub> [205].

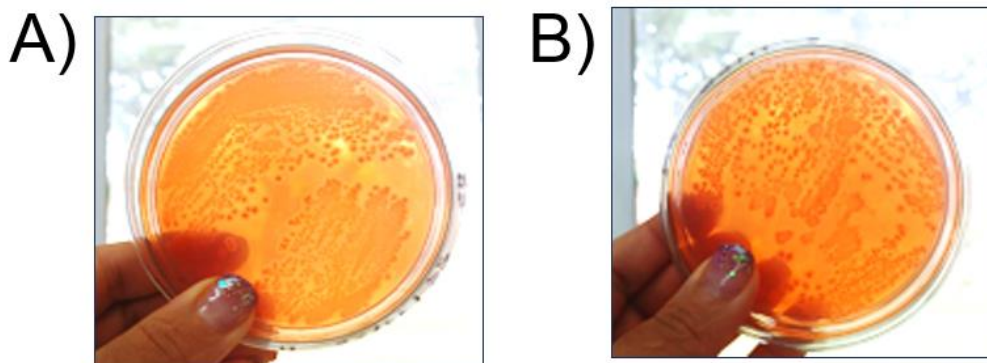


**Figura 5.** Caracterização de nanopartículas magnéticas: A) Imagem da nanoformulação Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@OA; B) Espectros vibracionais por FTIR; C) Difratoograma de raio-X; D) Análise termogravimétrica das nanopartículas inorgânicas. **Figura 5** reproduzida de Antunes (2020) [204].

### 3.2 Caracterização bactérias *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6)

#### 3.2.1 Cultivo *Azospirillum brasilense*

O cultivo das estirpes Ab-V5 e Ab-V6, submetido à técnica de esgotamento por estrias após um período de 7 dias de incubação, apresentou um crescimento perceptível em ambas as estirpes, como mostrado na **Figura 6 A-B**, formando colônias pequenas, circulares ou irregulares característicos de *A. brasilense* [206-208].



**Figura 6.** Crescimento bacteriano de *A. brasilense* em placas de petri: A) Estirpe Ab-V5; B) Estirpe Ab-V6.

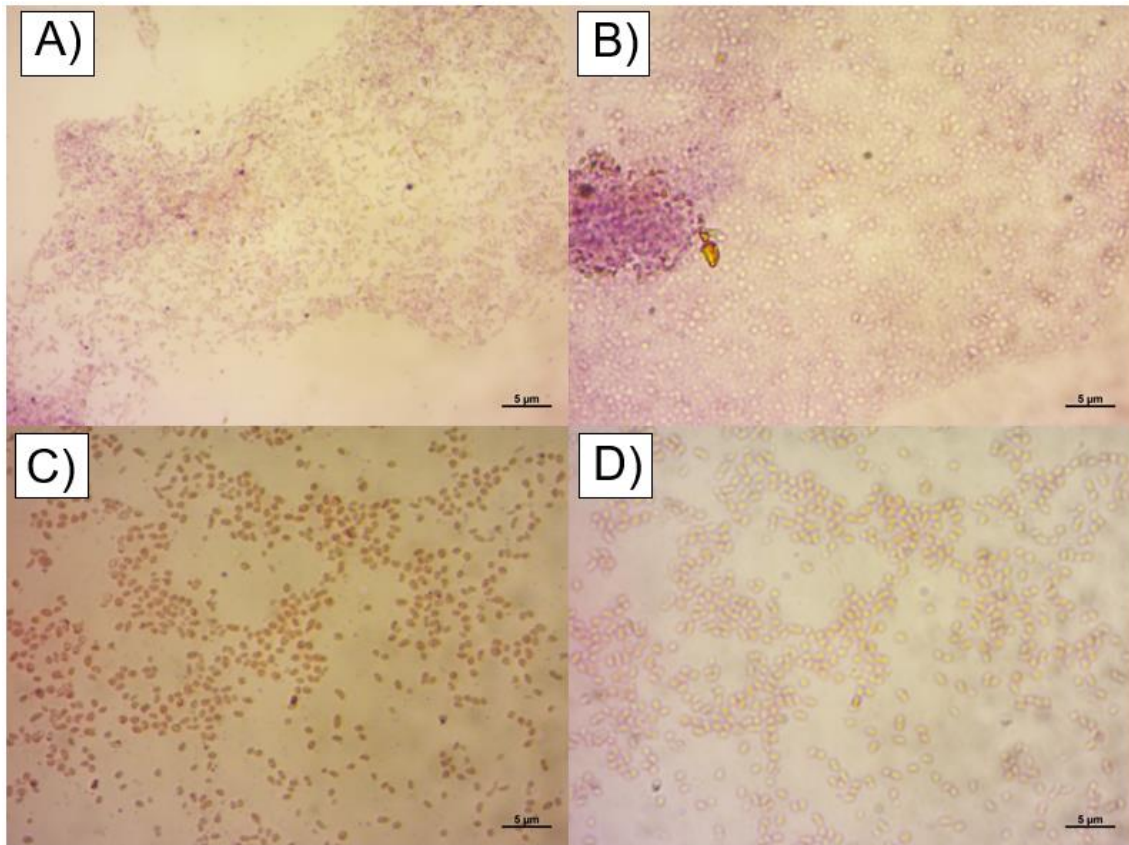
O crescimento bacteriano realizado tanto em erlenmeyer quanto em tubos de ensaio pode ser considerado satisfatório, pois pode ser observado a olho nu, como evidenciado na **Figura 7**. Esses resultados indicam que as condições de cultivo foram ideais para o crescimento de ambas as espécies.



**Figura 7.** Crescimento bacteriano das estirpes das estirpes Ab-V5 e Ab-V6.

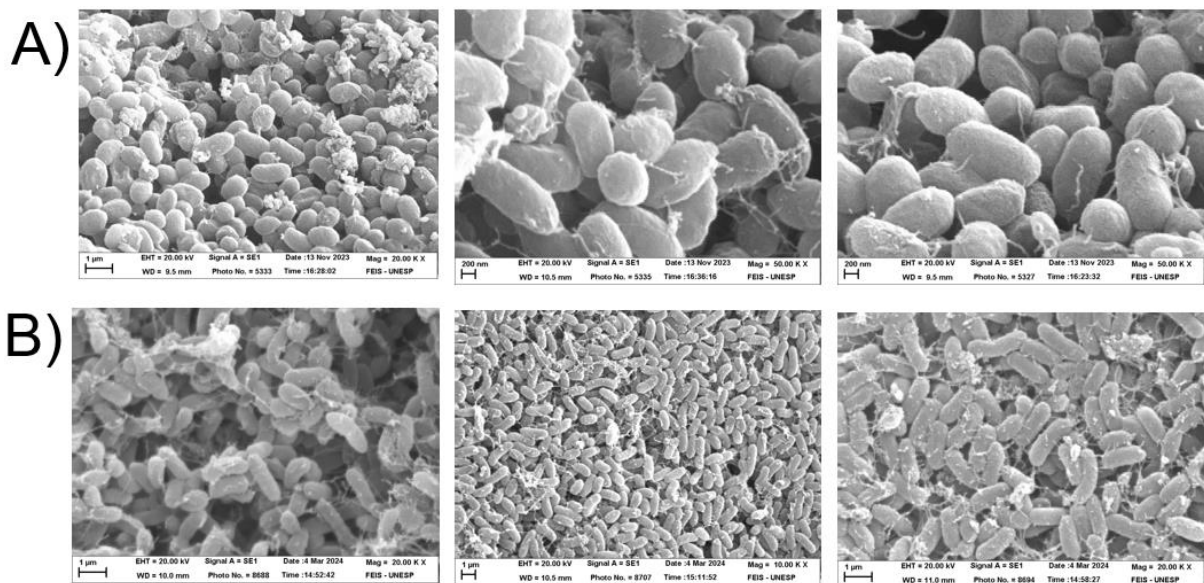
### 3.2.2 Caracterização das bactérias *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6)

A coloração de Gram revelou a presença das bactérias *A. brasilense* em ambas as estirpes, exibindo coloração vermelha característica de bactérias gram-negativas (**Figura 8-A e C**) com morfologia em forma de pequenos bastonetes, evidenciado pela mudança de contraste do microscópio óptico (MO), através da interferência de feixes de luz polarizada apresentada na **Figura 8-B e D**, típico de *A. brasilense* [207] [209].



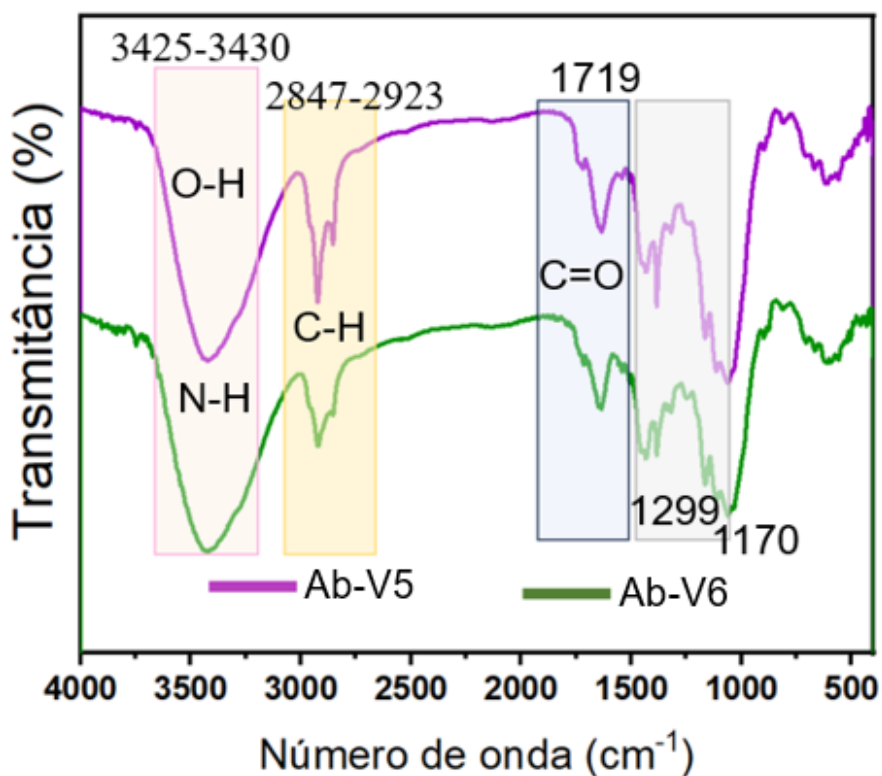
**Figura 8.** Imagem da *A. brasilense* por **MO** referente ao teste de coloração de gram no aumento de 100X: A) Estirpe Ab-V5, B) Ab-V5 sob a incidência de luz polarizada, C) Estirpe Ab-V6 e D) Ab-V6 sob a incidência de luz polarizada.

As imagens obtidas por MEV mostram a morfologia das bactérias, conforme **Figura 9 A-B**. A morfologia de ambas as estirpes é no formato de bastonetes [210, 211], confirmando o que foi observado no microscópio óptico.



**Figura 9.** Micrografia por MEV de *A. brasilense*: A) Estirpe Ab-V5 e B) Ab-V6.

O espectro de FTIR (**Figura 10**) das diferentes estirpes de *A. brasilense* revelaram várias bandas vibracionais característicos da espécie. É possível observar banda em torno de 3425-3430  $\text{cm}^{-1}$ , associado a estiramentos N-H e OH de amidas e proteínas, e banda em torno de 2847-2923  $\text{cm}^{-1}$  relacionados a estiramentos C-H em grupos metil e metileno, típicos de lipídios. Uma banda aproximadamente em 1719  $\text{cm}^{-1}$  indica estiramentos C=O de grupos carbonilas presentes em lipídios e proteínas, enquanto picos em torno de 1633  $\text{cm}^{-1}$  sugerem bandas de amida I e II associadas a estruturas secundárias de proteínas. Banda em aproximadamente 1299  $\text{cm}^{-1}$  indicam grupos fosfato em ácidos nucleicos e alguns lipídios, e bandas em torno de 1170  $\text{cm}^{-1}$  estão relacionadas a grupos éster e éter em carboidratos e lipídios. Além disso, picos em torno de 1438  $\text{cm}^{-1}$  são típicos de deformações C-H em lipídios [127, 212]. Esses picos ajudam a indicar a composição bioquímica das células de *A. brasilense* e confirmam ainda mais a sua pureza e existência nas amostras.

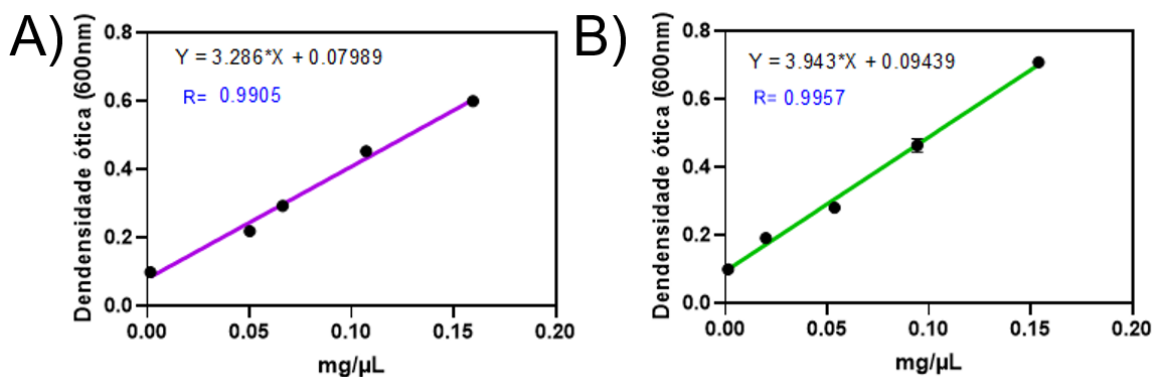


**Figura 10.** Espectro de FTIR das Estirpes Ab-V5 e Ab-V6.

### 3.2.3 Curva de padronização das espécies bacterianas

Após a confirmação da presença de *A. brasilense* no crescimento do meio, foi determinada a curva de calibração por densidade óptica, a qual foi essencial para

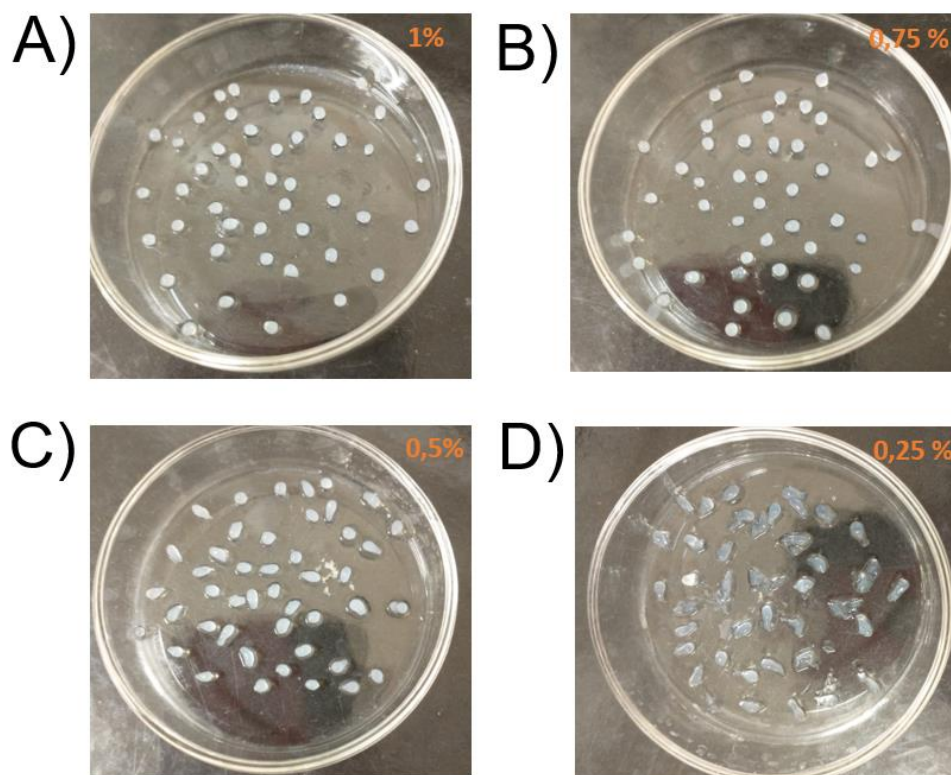
quantificar a concentração das espécies. A estirpe Ab-V5 apresentou uma D.O de aproximadamente 0,6 mg/ $\mu$ L (**Figura 11-A**), enquanto a Ab-V6 apresentou cerca de 0,7 mg/ $\mu$ L (**Figura 11-B**). Nossos resultados são considerados satisfatórios, pois indicaram condições ideais de crescimento para as bactérias. A análise revelou um comportamento linear, com um coeficiente de determinação próximo de 1 para ambas as estirpes.



**Figura 11.** Curva de padronização de *A. brasilense*: A) Estirpe Ab-V5; B) Estirpe Ab-V6.

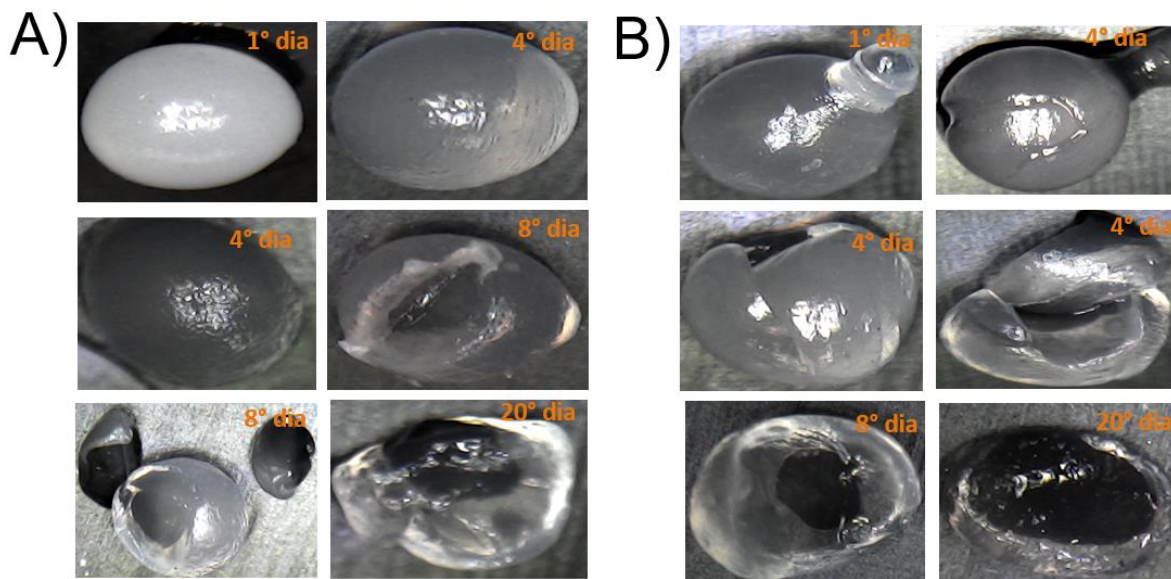
### 3.3 Caracterização físico-química de esferas de hidrogel

Inicialmente, foram preparadas esferas contendo apenas alginato de sódio, por ser o mais utilizado na construção de esferas de hidrogel, devido à sua boa biocompatibilidade, biodegradabilidade e potencial de formar esferas perfeitas [165]. Testes variando a concentração do reticulante foram realizados nas concentrações de 1%, 0,75%, 0,5% e 0,25% de  $\text{Ca}^{2+}$ . Conforme observado na **Figura 12**, à medida que a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  diminui, a capacidade de formar esferas também diminui. Nota-se que nas concentrações de 1% e 0,75% de  $\text{Ca}^{2+}$  (**Figura 12-A e B**), o formato esférico é predominante. Enquanto na concentração mais baixa de 0,5% (**Figura 12-C**), o formato esférico não prevalece, e sua capacidade de formar esferas é ainda mais restringida na concentração mais baixa de 0,25% como mostrado na **Figura 12-D**. Isso ocorre devido à capacidade reduzida de formar ligações cruzadas entre os íons  $\text{Ca}^{2+}$  do reticulante com o bloco G do alginato, através dos grupos carboxílicos e hidroxilas presentes no polissacarídeo [213]. Assim, quanto maior a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ , mais íons  $\text{Ca}^{2+}$  livres estão disponíveis para se ligar aos grupos do alginato [169, 170]. Portanto, a quantidade de reticulante influencia diretamente na formação das esferas [81].



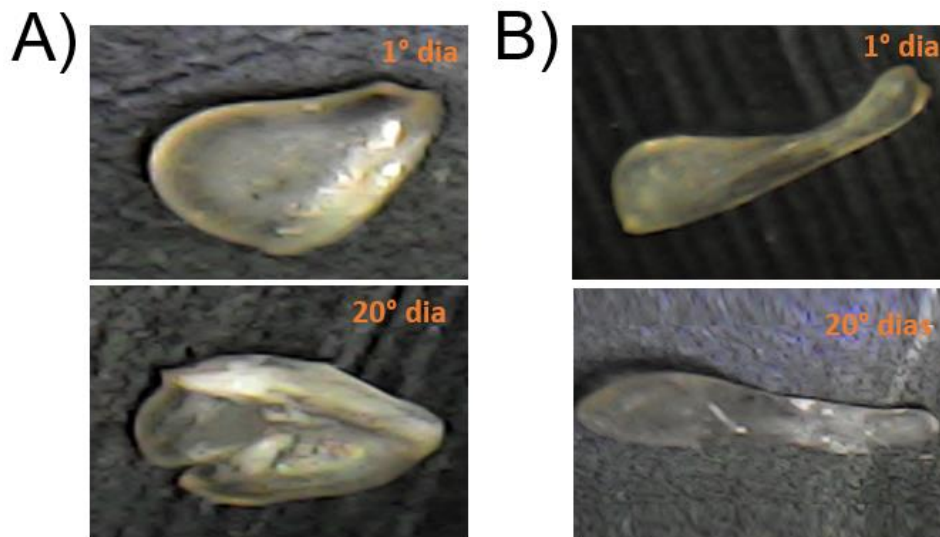
**Figura 12.** Esferas de Alginato de sódio sob efeito de variação do reticulante  $\text{Ca}^{2+}$ : A) 1%; B) 0,75%; C) 0,5%; D) 0,25 % de  $\text{CaCl}_2$ .

Assim como a quantidade do reticulante  $\text{Ca}^{2+}$  influencia a formação das esferas, ele também está diretamente relacionado com sua degradação. Ensaio de degradação em meio aquoso foram realizados tanto em esferas intumescidas (**Figura 13**) quanto esferas secas (**Figura 14**), na maior concentração do reticulante  $\text{Ca}^{2+}$  de 1% e na menor de 0,5% (A concentração de 0,25% não foi utilizada nos testes de degradação, pois não houve formação de esferas nessa concentração) por um período de 20 dias, sendo observadas em microscópio ótico (MO). Nota-se que na concentração de 1% (**Figura 13-A**), a degradação da esfera é mais lenta, começando a danificar sua estrutura a partir do oitavo dia, enquanto na concentração menor de 0,5% (**Figura 13-B**), os danos à estrutura ocorrem mais rapidamente, a partir do quarto dia. Isso acontece porque a quantidade de reticulante, além de afetar a formação das esferas, também influencia sua rigidez [214]. Em menores quantidades de reticulante, a instabilidade é maior, tornando as esferas menos resistentes à deformação e à quebra, e vice-versa [215]. As esferas formadas em menores concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ , fazem menos ligações cruzadas do que aquelas em maiores concentrações e isso resulta em uma maior capacidade de absorção de água, maior expansão, o que enfraquece a estrutura do gel, tornando-o mais frágil, levando a quebra da estrutura da caixa de ovo causando a desintegração das esferas [166, 216, 217].



**Figura 13.** Degradação das esferas de hidrogel de alginato de sódio intumescidas, observadas por MO com aumento de 1000x (zoom digital): A) concentração de 1%; B) concentração de 0,5% de reticulante  $\text{CaCl}_2$ .

A degradação das esferas secas seguiu o mesmo comportamento das esferas intumescidas. Ao final do período de 20 dias, foi possível observar que a esfera produzida com a maior concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  (1%, **Figura 14-A**) apresentava apenas uma rachadura em sua superfície. Em contraste, a esfera com a menor concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  (0,5%, **Figura 14-B**) exibiu uma superfície totalmente desgastada e uma coloração significativamente mais clara em comparação a esfera de maior concentração. Isso indica que a degradação das esferas é menor quando a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  é maior, sugerindo que a degradação é inversamente proporcional à concentração de reticulante. Ou seja, quanto maior a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ , menor é a degradação. Desta forma, nossos resultados revelaram que a degradação da esfera com menor concentração foi mais pronunciada. Isso ocorre porque a quantidade de íons  $\text{Ca}^{2+}$  ligados às cadeias de alginato é menor, resultando em mais espaços disponíveis [218]. Devido à menor reticulação iônica e à baixa força osmótica, a presença predominante do alginato favorece uma maior absorção de água [51, 219]. Isso justifica a coloração mais clara na esfera com baixa concentração obtida em nosso experimento, uma vez que essa esfera contém mais água.



**Figura 14.** Degradação de esferas do hidrogel alginato de sódio secas observadas por MO: A) concentração de 1%; B) concentração de 0,5% de reticulante  $\text{CaCl}_2$ .

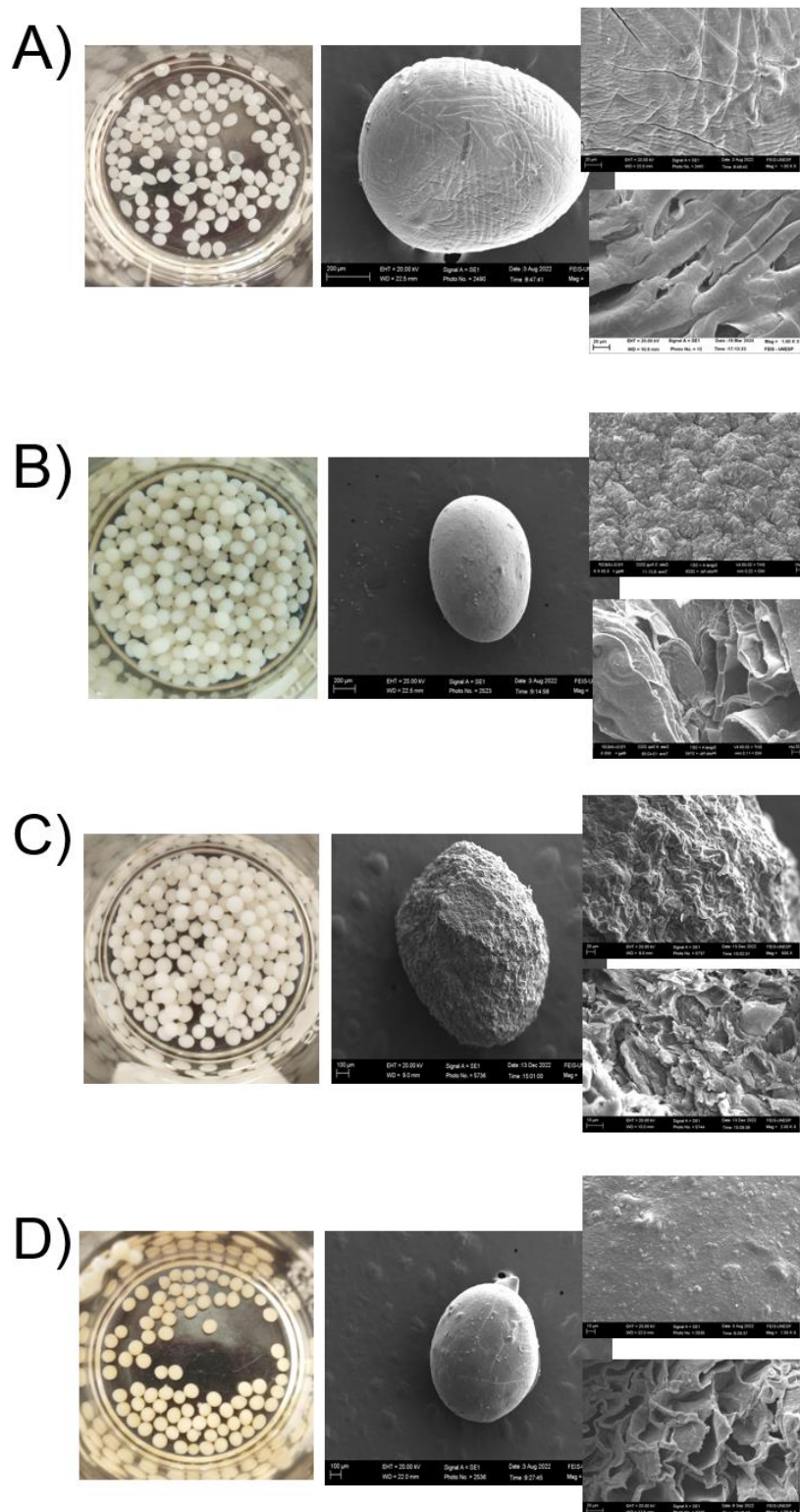
O alginato de sódio, além de possuir as características citadas anteriormente, é também atóxico [79] e de baixo custo [32]. Quando associado a outros materiais, pode alterar suas propriedades, como mudanças em sua superfície, estabilidade, tamanho de poro, etc [95, 96, 171]. Dessa forma, esferas de alginato de sódio combinadas com diferentes componentes, tais como bentonita, celulose microcristalina, xilana e goma guar, foram produzidas neste trabalho.

Na **Figura 15**, é possível observar que a morfologia de todas as amostras apresentou formatos predominantemente esféricos, independentemente da combinação dos compostos. No entanto, foi possível observar algumas diferenças entre uma mistura e outra. Logo de início, nota-se que a coloração das esferas difere em todas as amostras. A micrografia da esfera constituída apenas por alginato na **Figura 15-A** revela uma superfície lisa e quase não se nota a presença de poros em seu interior, ao contrário das esferas formadas pela mistura de componentes. No entanto, quando comparada à esfera constituída pela mistura de alginato e bentonita (**Figura 15-B**), nota-se que sua superfície é mais rústica, de aparência áspera, com a presença de poros mais visíveis e bem definidos. Já as esferas produzidas a partir de alginato e celulose microcristalina (**Figura 15-C**) mostram uma estrutura mais robusta, com superfície rugosa e irregularidades mais pronunciadas, e aparentemente sem poros em seu interior. Na **Figura 15-D**, observa-se que a esfera produzida pela mistura de alginato e xilana exibe uma superfície mais lisa, semelhante à superfície da esfera constituída apenas por alginato. No entanto, seu interior apresenta o maior número de poros, com maior definição, entre todos os tipos observados.

As diferenças observadas na superfície e na distribuição de poros dos diferentes tipos de esferas podem ser explicadas pelas interações entre os componentes adicionados ao alginato durante o processo de preparação [27]. A bentonita, conhecida por sua capacidade de formar estruturas porosas dependendo da concentração utilizada, pode interagir com o alginato e expandir-se durante a gelificação, criando poros ou rachaduras [108]. A celulose microcristalina é um polímero de origem natural com baixa solubilidade em água [220], com o potencial de aumentar a viscosidade da solução de alginato ao dispersar-se no meio e formar uma suspensão [221, 222]. As partículas de celulose microcristalina são distribuídas uniformemente na matriz, ocupando os espaços do alginato por meio de interações físicas, podendo alterar a textura, aumentar a consistência e modificar a forma como o alginato se solidifica [223]. O aumento da viscosidade diminui a capacidade da solução de fluir, o que pode justificar a aparência da superfície e a ausência de poros no interior da esfera.

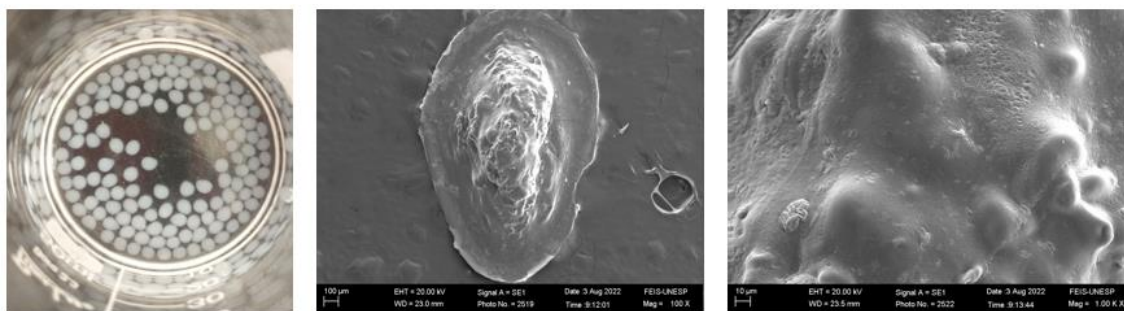
As esferas produzidas pela mistura de alginato de sódio (AS) e xilana (Xil) apresentaram superfície mais lisa, indicando uma boa compatibilidade e solubilidade, já que ambos podem interagir bem em soluções aquosas de pH neutro a alcalino por meio de interações de ligações de hidrogênio, facilitando a homogeneização da solução [224, 225]. A presença de um maior número de poros no interior da esfera indica que a xilana pode influenciar a estrutura interna das esferas, formando estruturas mais abertas [58, 219], influenciando a forma como o alginato se reticula e gelifica.

A reticulação formada por ligações cruzadas para formar gel em todos os tipos de esferas, é predominante entre o AS e o  $\text{Ca}^{2+}$ , pois os demais componentes não possuem carboxilas suficientes para interagir com o  $\text{Ca}^{2+}$ , da mesma forma que o AS [108, 221]. Entre todas as misturas, a bentonita é a que oferece maior rigidez às esferas de AS, pois forma uma rede tridimensional densa criando uma estrutura rígida [226]. Embora a celulose microcristalina também possa aumentar a rigidez das esferas de alginato ao aumentar a viscosidade, seu efeito de rigidez é menos pronunciado do que o da bentonita. Isso se deve à estrutura lamelar da argila, que permite uma interação mais eficaz com o AS, além de sua capacidade de troca catiônica com o  $\text{Ca}^{2+}$ , fortalecendo ainda mais a estrutura do gel [227]. Por sua vez, a Xil teve um impacto menor nas esferas em comparação com a bentonita e a celulose microcristalina.



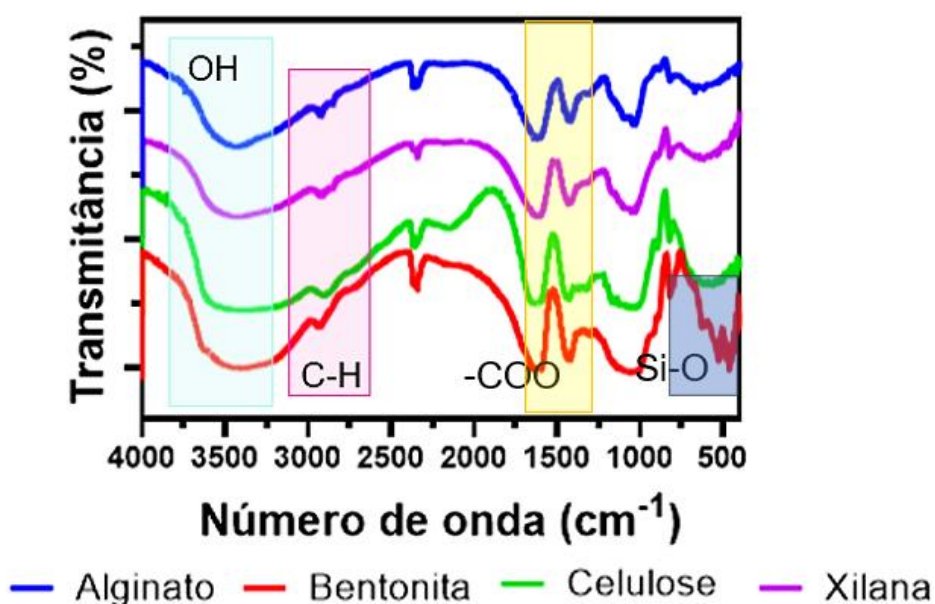
**Figura 15.** Diferentes tipos de esfera de hidrogel com suas respectivas micrografias por MEV, sendo observado morfologia, superfície e poros no seu interior: A) esferas contendo apenas AS; B) esferas contendo a mistura de AS e bentonita; C) AS e celulose microcristalina; D) AS e xilana (Xil).

Em contrapartida, as esferas produzidas pela mistura de alginato e goma guar não apresentou formação de esferas estáveis, como mostrado na **Figura 16**, pois não manteve um formato esférico e apresentou uma superfície conglomerada. Isso se deve ao fato de que a goma guar não pode formar gel na presença de cátions divalentes [87]. A adição de goma guar ao alginato resultou em um tipo de gel com pouca consistência.



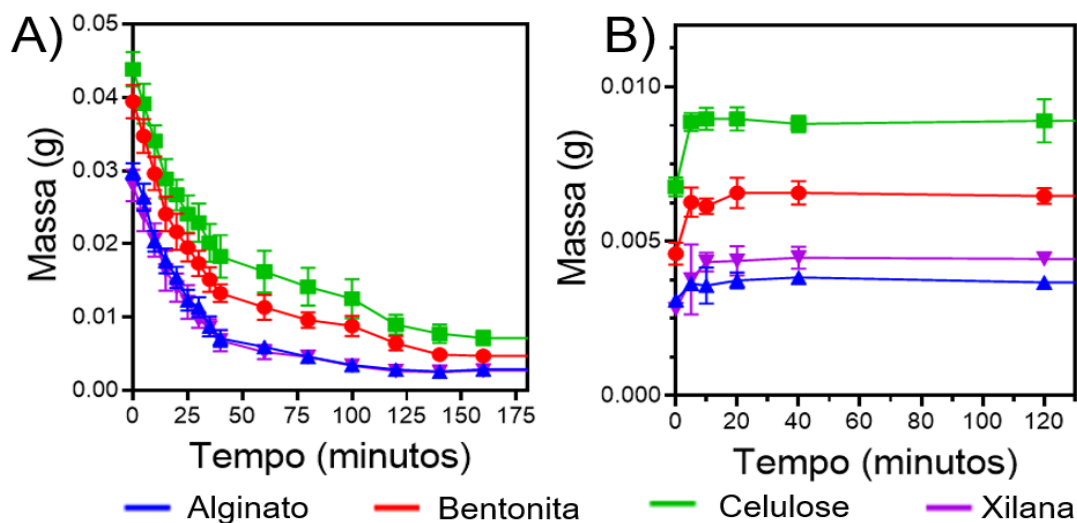
**Figura 16.** Esfera de hidrogel resultante da mistura de alginato e goma guar e micrografia por **MEV**.

As atribuições dos modos vibracionais das esferas de alginato e os demais componentes (exceto na mescla com goma guar, devido à falta de estabilidade esférica), foram observadas nos espectros de FTIR (**Figura 17**). Nota-se que a maioria das bandas são típicas de polissacarídeos, como estiramento de OH em aproximadamente  $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ , estiramento de C-H de grupos alifáticos próximo a  $\sim 2932\text{ cm}^{-1}$ , e estiramentos simétrico e assimétrico de grupamentos carboxílicos -COO em aproximadamente  $\sim 1600$  e  $1400\text{ cm}^{-1}$  [228]. Vibrações de flexão do tipo Si-O em aproximadamente  $\sim 500\text{ cm}^{-1}$  são observadas na mistura de alginato e bentonita, e podem estar associadas à incorporação da bentonita na esfera [229].



**Figura 17.** Microscopia na região do infravermelho das esferas

O comportamento de secagem das esferas (**Figura 18-A**) com as diferentes misturas revela que a combinação de AS e Xil apresentou comportamento semelhante ao do alginato puro, indicando que a xilana não alterou a capacidade do alginato de reter água, uma vez que ambos são solúveis em pH neutro a ligeiramente alcalino. É possível notar que a mistura de AS e celulose microcristalina teve uma menor perda de massa, podendo estar relacionada à sua estrutura mais robusta. Além disso, o peso inicial da mistura entre bentonita e celulose microcristalina era bem próximo, mas, após 175 minutos, essa diferença se ampliou. Isso pode ser atribuído ao fato de a bentonita ter a capacidade de formar gel e de interagir com o AS [230], resultando em maior retenção de água e, conseqüentemente, maior perda água. Essas relações entre os tratamentos também podem ser associadas ao comportamento de intumescimento (**Figura 18-B**). Curiosamente todos os sistemas se tornaram estáveis após 30 min. No entanto, vale ressaltar que o aumento no ganho de massa para a mistura de AS e Xil foi maior em comparação com o alginato puro, o que pode ser devido à maior distribuição de poros no interior da esfera conforme foi evidenciado na **Figura 15-D**.

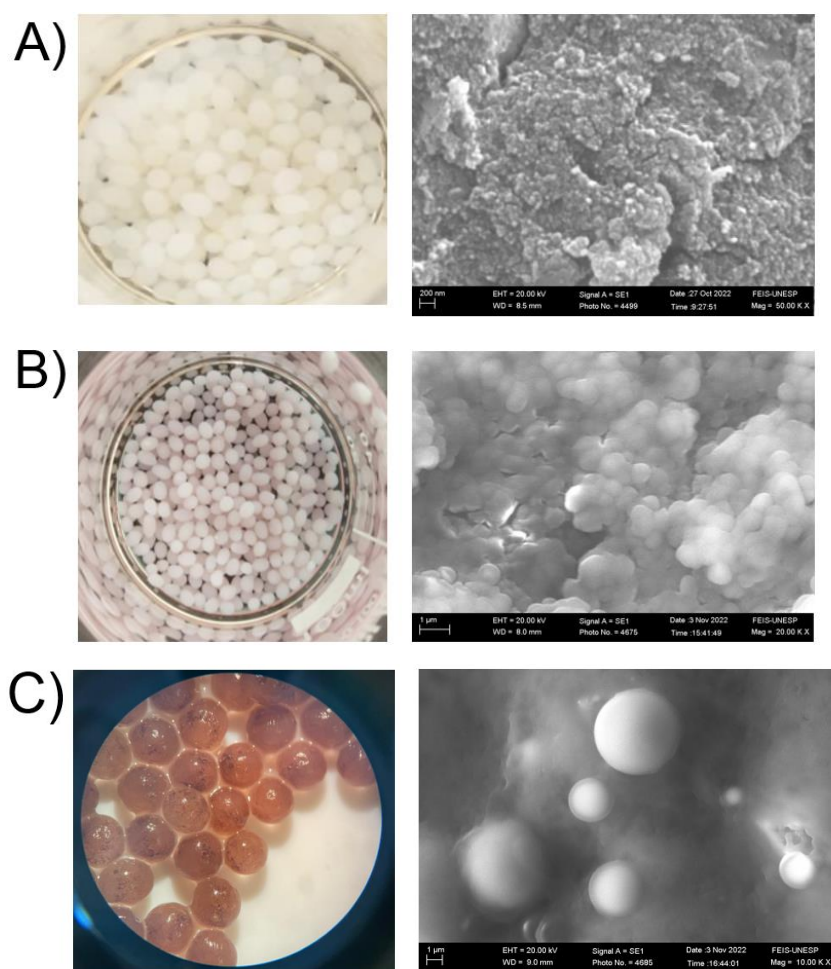


**Figura 18.** Desidratação e intumescimentos dos diferentes tipos de esfera: A) desidratação; B) intumescimento.

### 3.2.4 Encapsulamento de nanopartículas em esferas de hidrogel

As diferentes nanopartículas foram encapsuladas apenas em esferas de alginato de sódio, preparadas conforme descrito no item 2.2.1 deste capítulo, tal estudo foi realizado, a fim de observar se nanopartículas inorgânicas ou orgânicas poderiam ser associadas a estes tipos de hidrogéis.

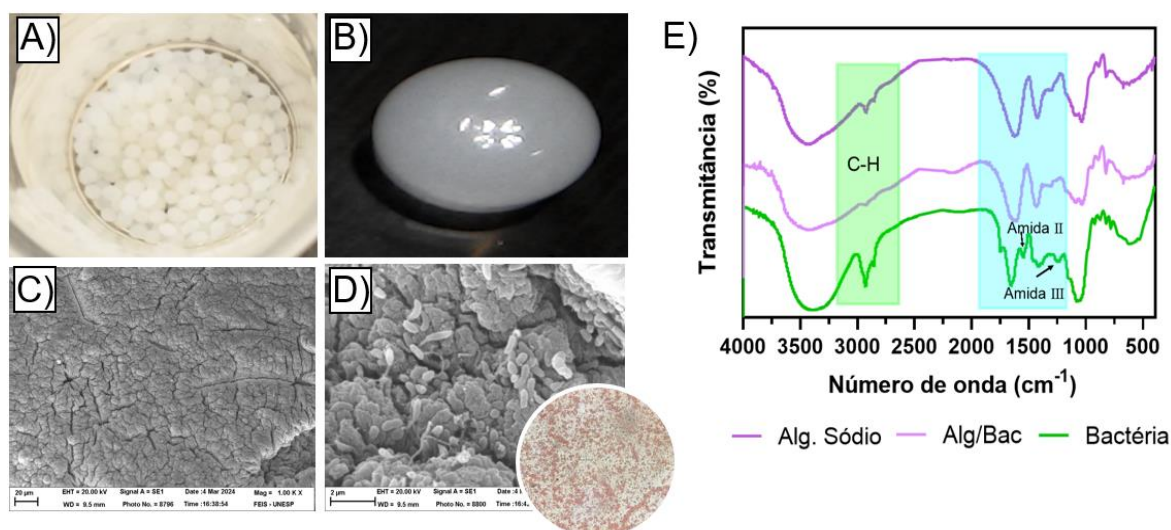
A **Figura 19-A** mostra a imagem e a micrografia do interior das esferas de alginato de sódio contendo ZnONPs, onde é possível notar as nanopartículas distribuídas em toda a superfície da esfera. Na **Figura 19-B**, também é possível observar aglomerados do CLN\_Au@NPs em toda a superfície das esferas, com um tamanho aparentemente maior que as ZnONPs, enquanto na **Figura 19-C**, a imagem das esferas contendo Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@OA apresenta rachaduras visíveis em sua superfície, indicando fragilidade, e sua micrografia nos mostra que as nanopartículas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@OA estão localizadas pontualmente em algumas regiões no interior das esferas. Esses resultados revelaram que as esferas de hidrogel podem encapsular diferentes tipos de sistemas nanoparticulados, tanto inorgânico (nanofertilizantes) como orgânicos (nanopesticidas).



**Figura 19.** Escapsulamento de NPs em esfera de alginato de sódio: A) Esfera contendo ZnONPs; B) CLN\_Au@NPs; C) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@OA.

### 3.3.4 Encapsulamento de bactérias em esferas de hidrogel

As esferas contendo as estirpes *Ab-V5* e *Ab-V6* foram produzidas exclusivamente pela matriz de alginato para avaliar o seu encapsulamento (**Figura 20-A**). A análise ao MO mostrou que a morfologia das esferas permaneceu esférica (**Figura 20-B**). A micrografia obtida por MEV revelou uma superfície mais rugosa (**Figura 20-C**) e um maior número de poros em comparação com as esferas contendo apenas AS, sugerindo que a presença das bactérias alterou a forma como o alginato se solidifica. Além disso, observou-se que as bactérias estavam localizadas no interior das esferas (**Figura 20-D**), não sendo visíveis na superfície. Isso indica que o encapsulamento foi bem-sucedido e que a integridade das bactérias foi preservada. Os espectros de FTIR (**Figura 20-E**) mostraram bandas de vibração na região de  $3400\text{ cm}^{-1}$ , relacionadas ao grupo  $-\text{OH}$ , presente em todas as curvas. Foi observada uma banda de absorção na região de  $1663\text{--}1613\text{ cm}^{-1}$ , correspondente a amidas, com um deslocamento significativo para  $1623\text{ cm}^{-1}$  na curva de alginato/bactéria, atribuída à amida I, indicando que a mistura causou esse deslocamento. Além disso, os espectros apresentaram picos em aproximadamente  $1543\text{ cm}^{-1}$ , associados à amida II, e uma banda referente à amida III em  $1242\text{ cm}^{-1}$ , originadas de proteínas devido ao dobramento N-H [231]. Em torno de  $2933\text{ cm}^{-1}$ , houve uma diminuição da banda C-H na curva de mistura alginato/bactéria, indicando a perda de alcenos e a redução da cristalinidade, o que resultou na alteração dos poros, corroborando com as observações do MEV, uma vez que alguns microrganismos são capazes de degradar hidrocarbonetos [232].



**Figura 20.** Caracterização das esferas contendo a bactéria *A. brasilense* : A) Imagem das esferas; B) Imagem obtida por MO; C) micrografia realizada por MEV da superfície da esfera; D) micrografia do interior da esfera contendo bactérias; E) Espectro de FTIR.

#### 4- Conclusão

Este capítulo, foi dedicado a detalhar o início dos experimentos, abordando a produção de esferas utilizando inicialmente apenas AS para observar seu comportamento. Neste estudo, ficou evidente que a estabilidade das esferas depende da concentração de reticulante. Após a observação da concentração adequada de  $\text{Ca}^{2+}$  a ser utilizada, as esferas subsequentes foram produzidas a 1% de  $\text{Ca}^{2+}$  devido ao seu potencial em formar esferas mais estáveis e utilizando menos reticulante. Pois, a quantidade de reticulante está diretamente ligada à liberação dos componentes associados as esferas, como será discutido no próximo capítulo. Além disso, investigou-se o comportamento das esferas contendo diferentes misturas, com o intuito de apontar a melhor estrutura para o andamento do projeto. A mistura de AS e Xil foi escolhida para os experimentos subsequentes devido à sua maior compatibilidade, solubilidade, menor rigidez e melhor distribuição de poros. Também foram sintetizadas nanopartículas orgânica e inorgânica com o objetivo de encapsulá-las dentro das esferas. Escolhemos as ZnONPs devido ao seu menor tamanho, melhor distribuição na superfície e por ser um micronutriente de plantas para os próximos estudos. Adicionalmente, bactérias fixadoras de nitrogênio do tipo *A. brasilense* foram cultivadas e caracterizadas, e seu crescimento celular foi considerado satisfatório e sua presença revelada por meio de análises de MO e MEV. Ademais, tais microrganismos também foram encapsulados em esfera de AS, e foi constatado que as bactérias ficaram aprisionadas no interior das esferas, e sua integridade mantida. O próximo capítulo abordará a construção e aplicação de esferas híbridas a partir dos resultados apresentados neste capítulo.

## **CAPÍTULO III**

**ESFERAS DE ALGINATO E ALGINATO/XILANA:  
PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, ESTUDO DA  
DEGRADAÇÃO, LIBERAÇÃO E EFEITO EM  
PLANTAS**

## 1-Introdução

Esferas de hidrogel, são pequenas partículas em formatos esférico, de rede tridimensional que podem ser utilizados em diversas áreas, tais como: farmacêutica [233]; ambiental [234]; industrial [235]; alimentícia [236]; agricultura [79]. Geralmente são formados por hidrogéis a base de polímero [237] e polissacarídeos [127], e frequentemente são utilizadas para a liberação controlada de fármacos [233], biorremediação de águas e solo [238], liberação controlada de insumos agrícolas, com potencial de protegê-lo da degradação [90], proporcionando uma liberação gradual aumentando a eficiência do uso reduzindo impactos ambientais [68].

Entre os materiais mais utilizados na construção dessas esferas está o alginato de sódio (AS), que é um polissacarídeo natural extraído de algas marrons, linear, composto por duas unidades estruturais de ácido  $\beta$ -D-manurônico e ácido  $\alpha$ -L-gulurônico, cuja estrutura contém grupo carboxila (-COOH) e grupos hidroxila (-OH) [239]. Esse polissacarídeo possui propriedades gelificantes por reticulação iônica [240], utilizando íons divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$  para formar redes tridimensionais capazes de originar materiais biodegradáveis e biocompatíveis [241]. Atualmente tem sido feito blends destes hidrogéis com outros tipos de materiais, como quitosana [155], bentonita [242], lignina [232], celulose [56], e hemicelulose [58] resultando em mudanças de suas propriedades físicas e químicas.

Entre as hemicelulose está a xilana (Xil), que é encontrada nas paredes celulares dos vegetais, e é composta principalmente de xilose [243]. A Xil desempenha funções estruturais nas plantas, fornecendo rigidez e resistência [244]. No entanto, pode ser degradada por microrganismos, que utilizam enzimas específicas para sua catálise [245].

Para o setor agrícola, esferas de hidrogéis estão sendo utilizadas para a liberação de pesticidas [113] e fertilizantes [107]. Atualmente a liberação do micronutriente zinco (Zn), por exemplo, vem sendo explorada [114]. Pois, o Zn é o micronutriente com a maior deficiência em solos em todo o mundo [246, 247]. A falta dele reduz drasticamente a produção agrícola, pois este nutriente é importante para processos fisiológicos, enzimáticos e metabólicos do crescimento de plantas [190]. Sua internalização na planta ocorre principalmente por meio da absorção de  $\text{Zn}^{2+}$  presente solo pelas raízes da planta [190, 248], sendo transportado por sistemas vasculares como xilema e floema [249]. A nanotecnologia tem contribuído para suprir a deficiência de Zn nas culturas a fim de melhorar a fertilização e conseqüentemente a internalização deste nutriente na planta

[250]. Um estudo realizado por Knijnenburg et al. (2021), por exemplo, encapsulou nanopartículas de óxido de zinco (ZnONPs) em esferas de alginato, para avaliar a sua liberação, e observaram que a liberação foi lenta, e consideraram que as esferas melhoraram a adubação com Zn [79]. Martins e seus colaboradores (2020) encapsularam ZnONPs em esferas de hidrogel e avaliaram seu potencial de liberação em solos agrícolas por 30 dias. Tal estudo mostrou que a formulação de Zn convencional lixiviou no solo mais rápido em comparação com a formulação de ZnONPs [55].

A biofortificação depende da biodisponibilidade de nutrientes nos solos, e do desempenho da população microbiana da rizosfera na dinâmica de nutrientes [251]. As bactérias promotoras do crescimento de plantas (**BPCP**), do tipo *A. brasilense* se multiplicam na rizosfera promovendo uma maior biodisponibilidade de nutrientes contribuindo para uma agricultura sustentável [186, 252-254]. Essas bactérias possuem a capacidade de fixação biológica do nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) [255], reduzindo o N<sub>2</sub> a amônio (NH<sub>4</sub>) [256]. Além disso, as espécies de *Azospirillum* são capazes de produzir e secretar fitohormônios como auxinas, citocininas e giberelinas, que promovem o crescimento vegetal [181, 257]. Além disso, essas bactérias têm o potencial de solubilizar o Zn disponível no solo [125, 186, 258].

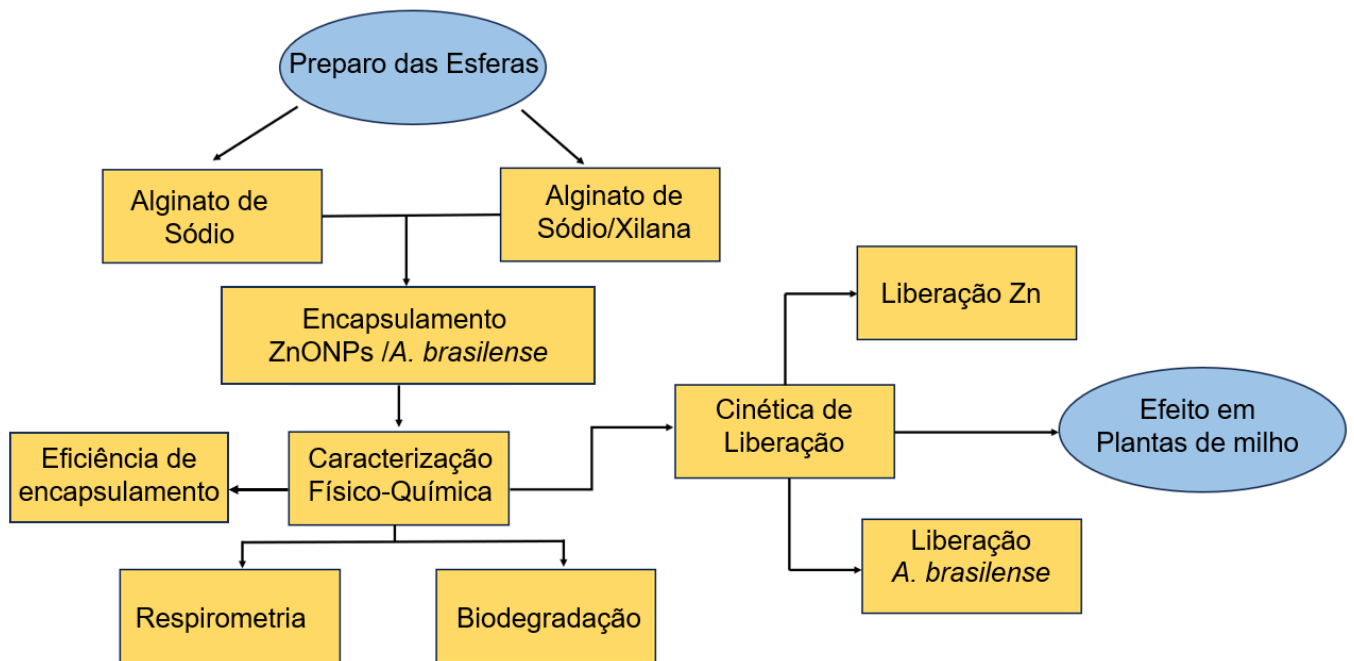
O encapsulamento dessas bactérias em esferas de hidrogel tem sido explorado como uma ferramenta na fertilização. Lima e colaboradores (2023), encapsularam *A. brasilense* Ab-V5e Ab-V6 em esferas de hidrogel, com o intuito de mantê-las viáveis por mais tempo no solo, e obtiveram um aumento no comprimento radicular, no peso seco e na clorofila e ainda se mantiveram viáveis por 60 dias [127]. Um outro estudo mostrou que o encapsulamento de *A. brasilense* FP2 em hidrogéis manteve a viabilidade por sete meses e como resultado obteve um maior rendimento no crescimento do milho [259].

Atrelado a isso, esferas de hidrogel híbridas vem sendo desenvolvidas e são denominadas como híbridas, por serem compostas por materiais de características diferentes que lhes conferem propriedades únicas, como maior resistência mecânica, biocompatibilidade, propriedades antimicrobianas e entre outras. Vale ressaltar que as esferas podem ser consideradas híbridas de duas formas: 1) pela construção do sistema, por exemplo, AS e bentonita (orgânico e inorgânico) [242]; ou 2) pela utilização de nanopartículas associadas a microrganismos (inorgânico e orgânico) [147].

Portanto, neste capítulo será apresentado resultados do preparo e caracterização de esferas de hidrogel híbridas, constituídas de AS ou pela mistura de AS e Xil, para o encapsulamento de ZnONPs e *A. brasilense*, visando à liberação simultânea de ZnONPs

e *A. brasilense* no campo. Além disso, foi avaliado a degradação, a atividade biológica, bem como, a capacidade de liberar nutrientes e BPCP no solo, visando melhorar a eficiência dos insumos agrícolas e otimizar os sistemas agrícolas convencionais. Os objetivos específicos deste trabalho podem ser encontrados na forma de fluxograma, como descrito abaixo.

### FLUXOGRAMA DETALHADO DOS ESTUDOS



## **2- PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### **2.1 Materiais**

O alginato de sódio foi adquirido pela Sigma-Aldrich. A xilana foi extraída de cana-de-açúcar e cedida gentilmente pelo Prof. Michel Brienzo do IPBEN-UNESP. As estirpes bacterianas foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Mariângela Hungria (Embrapa Soja). Os demais reagentes e solventes orgânicos utilizados foram de alto grau de pureza analítica adquiridos em mercados nacionais. A água Milli-Q foi obtida no próprio laboratório usando um sistema Direct-Q3 UV Smart com resistividade de 18,2 MΩ.cm.

### **2.2 Métodos**

#### **2.2.1 Preparo das esferas híbridas**

As esferas híbridas foram preparadas pelo método de extrusão/precipitação [51], conforme descrito no capítulo anterior. Foram introduzidas gota a gota, com o auxílio de uma seringa com uma agulha de tamanho 13 × 0,45 mm, uma solução aquosa contendo pelo polímero natural SA a 2% (m/v) em 100 mL de uma solução aquosa de Ca<sup>2+</sup> a 1% (m/v), sendo agitada a 400 rpm por 30 minutos. As esferas foram coletadas por filtração e lavadas com água deionizada. O polissacarídeo Xil foi adicionado à solução aquosa de SA na mesma concentração, 2% (m/v), quando desenvolvidos esferas de hidrogéis híbridas. Além disso, para o preparo de esferas contendo fertilizante, foi acrescentado 30 mg de ZnONPs, conforme a dose recomendada para adubação no estado de São Paulo, de acordo com o Boletim Técnico 100 [260]. Para esferas contendo bactérias, BPCV *A. brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6) foram adicionados na concentração de 1,9 x 10<sup>9</sup> UFC ml<sup>-1</sup>. Além disso, esferas contendo somente ZnONPs e *A. brasilense* foram preparados em um mesmo sistema, a fim de comparar com os sistemas únicos de liberação.

#### **2.2.2 Eficiência de encapsulação de Zn e *A. brasilense***

Para determinar o conteúdo total de Zn nas esferas, foi empregada a análise de espectrometria de absorção atômica (AAS) em forno de grafite (Spectra, Varian®), pertencente ao Laboratório de Nutrição de Plantas DEFERS – Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos, em λ de 214 nm. As ZnONPs e as esferas foram previamente pesadas e digeridas em HNO<sub>3</sub> (20%) por 2 h sob aquecimento (95 °C). A concentração de Zn foi quantificada usando curvas de calibração traçadas com uma

solução padrão previamente validada. A porcentagem de eficiência de encapsulamento (EE) foi calculada usando a **Equação 1** [261, 262].

$$\%EE = \frac{\text{Valor real}}{\text{Valor teórico}} \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

A % EE foi calculada como a razão entre o conteúdo real e o teórico do ingrediente ativo [263, 264]. Para estimar a **EE** bacteriana, as esferas contendo *A. brasilense* foram previamente pesadas e mantidas em suspensão sob agitação. Alíquotas foram recolhidas e semeadas em meio YMA, incubadas a 28 °C. Após a incubação, a quantificação bacteriana foi realizada por meio da contagem de UFC, antes e depois do encapsulamento, seguindo a **Equação 2** [265, 266].

Eq. (2)

$$\%EE = \frac{N}{N_0} \times 100$$

Onde N é o número de **UFC** encapsulados nas esferas e  $N_0$  é o número total de **UFC** antes do encapsulamento.

## 2.3 Caracterização Físico-química

### 2.3.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos com um espectrofotômetro Nicolet 5DXB FT-IR no DFQ – UNESP Ilha Solteira referente aos diferentes tipos de esferas, ZnONPs e *A. Brasilense*. As pastilhas para análise foram feitas com brometo de potássio (KBr) e a amostra seca, representando 1% (m/m) da mistura, macerada até ficar homogênea. Para cada amostra, foram realizadas 64 varreduras em resolução de  $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$ , na faixa de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ .

### 2.3.2 Microscopia estereoscópica (ME)

Para uma melhor observação das esferas produzidas, utilizou-se um microscópio estereoscópico modelo Leica EZ4 W. As esferas foram depositadas sobre uma superfície lisa e, com um aumento de 35x, foi possível realizar uma análise minuciosa do material. Todas as análises foram conduzidas à temperatura ambiente, a 25 °C.

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

As esferas híbridas foram analisadas por MEV com o objetivo de investigar sua morfologia, superfície e estrutura interna de forma mais detalhada. Assim, as amostras foram submetidas a uma série de etapas de desidratação em diferentes concentrações de álcool etílico, seguidas pelo processo de secagem crítica com dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Posteriormente, as amostras receberam uma fina camada de ouro e foram analisadas, utilizando o microscópio eletrônico modelo EVO-LS15 da marca Carl Zeiss, pertencente ao DFQ, UNESP Campus de Ilha Solteira.

### **2.3.4 Calorimetria Exploratória Diferencial**

As medidas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foram realizadas em um equipamento DSC 25-TA Instruments, pertencente ao Departamento de Física e Química da UNESP Ilha Solteira. Utilizou-se cerca de 10 mg de cada amostra, colocadas em compartimentos de alumínio apropriados e hermeticamente fechados. A taxa de aquecimento empregada foi de 10 °C/min, em uma faixa de temperatura de 10 °C até 200 °C, sob atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 ml.min<sup>-1</sup>. Os resultados de DSC foram apresentados como termogramas, representados por fluxo de calor (cal.g<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>) em função da temperatura (°C), e as transições térmicas foram correlacionadas.

### **2.3.5 Espectrometria de Absorção Atômica (AAS)**

A concentração de zinco foi determinada por espectrometria de absorção atômica (AAS). Tanto as ZnONPs quanto as esferas de hidrogel foram pesadas e digeridas em HNO<sub>3</sub> (20%) por 2 horas a 95 °C. Após o resfriamento, as amostras foram diluídas com HNO<sub>3</sub> 1% (v/v) até alcançar um volume total de 2 mL. A quantificação da concentração de Zn foi realizada por meio de curvas de calibração, utilizando uma solução padrão do Zn previamente validada. As análises foram realizadas utilizando o equipamento SpectrAA, Varian®, disponível no Laboratório de Nutrição de Plantas DEFERS – Departamento de Fitossanidade, Engenharia Rural e Solos da UNESP. Os resultados foram plotados com o software GraphPad Prism 10.0.

### **2.3.6 Degradação das esferas**

A degradação das esferas em meio aquoso foi observada pelo espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu UV-1800). As esferas foram pesadas, submersas em 32 ml de água e mantidas sob agitação lenta por um período de 60 dias. Um volume de aproximadamente 2 ml foi recolhido e transferido para uma cubeta de quartzo, sendo analisado antes e após esse período pelo UV-Vis. O aumento na absorbância do material foi considerado como degradação das cadeias poliméricas do polímero.

## 2.4 Atividade Biológica

### 2.4.1 Respiração basal do solo

Para quantificar o C-CO<sub>2</sub> liberado pela microbiota do solo, foram utilizados 50 g de solo previamente peneirado e com umidade ajustada para 60% da capacidade de campo. O solo foi então acondicionado em frascos de vidro com tampa de rosca. O tempo de exposição das diferentes formulações variou entre 24, 168 e 360 horas. No centro de cada pote foi depositado um frasco contendo 10 ml de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>, e os potes foram hermeticamente fechados e incubados por cinco dias. A titulação do NaOH livre foi realizada com HCl (0,5 mol L<sup>-1</sup>) usando fenolftaleína (1%) como indicador. Como controle, foram preparados potes de vidro sem esferas, contendo frascos com NaOH. A titulação da base livre permitiu calcular, por subtração, a quantidade de CO<sub>2</sub> que reage com NaOH [267, 268] e, conseqüentemente, o C-CO<sub>2</sub> liberado pela respiração microbiana.

### 2.4.2 Biodegradação das esferas

A biodegradação dos diferentes tipos de esferas foi investigada pela perda de massa durante 60 dias de exposição ao solo. Aproximadamente 100 ± 0,05 mg (W<sub>i</sub>) das esferas secas foram enterradas a 5 cm abaixo da superfície do solo, contidas em tubos. O solo foi mantido em temperatura ambiente e regado diariamente. O monitoramento da biodegradabilidade das esferas foi realizado pela pesagem das amostras enterradas após diferentes intervalos de tempo (W<sub>f</sub>), e a taxa de biodegradação foi calculada de acordo com a **Equação 3** [242]. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, utilizando como controle as esferas sem a presença de ZnONPs e *A. brasilense*.

$$\text{Biodegradação} = \frac{W_i - W_f}{W_i} \times 100$$

Eq. (3)

### 2.4.3 Análises da degradação das esferas em rizotron

Um volume de 9 L de solo foi cuidadosamente adicionado ao rizotron, onde sementes de milho foram plantadas, e esferas de hidrogel foram posicionadas próximas às sementes para facilitar a liberação gradual de nutrientes. Durante um período de 45 dias, monitorou-se o desenvolvimento das raízes e o processo de biodegradação das esferas de hidrogel, avaliando-se o impacto do hidrogel no crescimento radicular e na interação com o solo, bem como o potencial das esferas como fonte de nutrientes as plantas.

## 2.5 Cinética de liberação de Zn e *A. brasilense*

Para a determinação da cinética de liberação dos íons de Zn e *A. brasilense* livres e associados às esferas de hidrogel, foi utilizado um compartimento contendo 32 mL de água com uma massa conhecida de formulação, mantida sob agitação leve. Alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo durante 60 dias. Para a determinação de Zn, alíquotas foram quantificadas por AAS, e os dados resultantes foram plotados como porcentagem de liberação em função do tempo. Para determinar a liberação de *A. brasilense*, as alíquotas foram diluídas, adicionadas ao meio de cultura YMA e incubadas a 28 °C por 7 dias. As amostras foram avaliadas a partir do 4º dia e, ao final do período, as UFCs foram quantificadas em função do tempo [242]. Além disso, à cinética de liberação de *A. brasilense* foi avaliado no solo. Assim, diferentes tipos de esferas foram pesados e enterrados em solo estéril e mantidos em temperatura ambiente por 60 dias. Para manter a umidade do solo, água deionizada estéril foi pulverizada conforme necessário. Em diferentes intervalos de tempo, um grama de solo foi pesado e adicionado a 10 ml de água deionizada estéril. Em seguida, foram feitas as diluições e estas foram adicionadas ao meio de cultura, e mantidas a 28 °C, por um período de 7 dias onde as colônias foram contadas [269]. A partir das curvas de liberação dos íons Zn e de *A. brasilense*, utilizou-se o software KinetDS 3.0 [270] para simular diferentes modelos matemáticos de dissolução (**Tabela 1**). Esses modelos foram empregados para compreender o mecanismo de liberação do ativo nas diferentes esferas. O melhor modelo foi selecionado com base no coeficiente de determinação ( $r^2$ ) mais próximo de 1, e a constante de velocidade (K) foi calculada para cada tipo de esfera.

**Tabela 1.** Modelos cinéticos aplicados ao perfil de liberação nas diferentes esferas de hidrogel.

Modelo Cinético	Equações Matemáticas*
Cinética de ordem zero	$Q_t = Q_0 + Kt$
Cinética de primeira ordem	$\ln Q_t = \ln Q_0 + Kt$
Higuchi	$Q_t = Kt^{1/2}$
Hixson-Crowell	$Q_t = 100 [1 - (1 - k \cdot t)^3]$
Korsmeyer-Peppas	$Q_t/Q_\infty = Kt^n$

Onde  $Q_t$ :  $Q_t$  é a quantidade de ativos liberados em um determinado tempo  $t$ ,  $Q_\infty$  é a quantidade de ativos liberados em um tempo infinito,  $k$  é a constante cinética de liberação de acordo com cada modelo e  $n$  é o expoente de liberação.

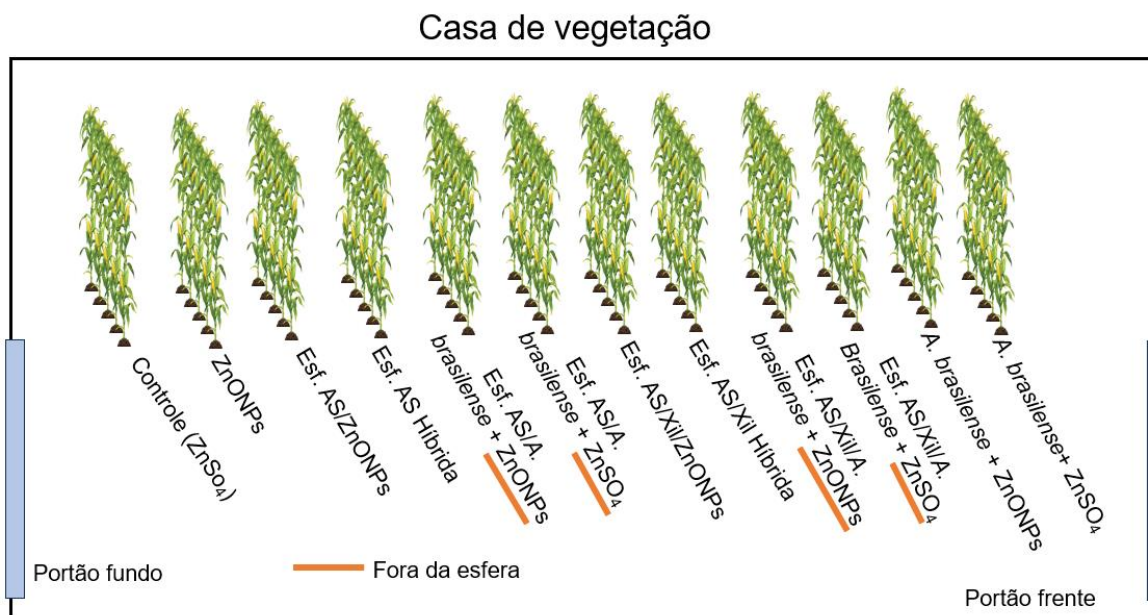
## 2.6 Efeito das esferas híbridas em plantas de milho

### 2.6.1 Manejo e semeadura do milho

O solo utilizado foi coletado da estação experimental localizado na Fazenda de Extensão e Pesquisa da Faculdade de Engenharia da Universidade Estadual Paulista (UNESP). Amostras aleatórias de solo foram coletadas antes do início do experimento a partir da camada de 0,00 a 0,20 m de profundidade. As amostras foram devidamente homogeneizadas e, em seguida, secas em temperatura ambiente para a análise físico-química.

Um volume de 15 litros de solo foi adicionado aos vasos, e foi realizada adubação convencional, adicionando-se ao suco 0,675 g de N, 8,01 g de  $P_2O_5$ , 0,675 g de  $K_2O$  e 0,264 g de  $H_3BO_3$  [260] para garantir um fornecimento adequado de nutrientes durante o cultivo. A adubação de cobertura, foi aplicado no estágio de crescimento V6 (30 e 31 dias após a semeadura), sendo 3,08 g de N e 1,24g de KCl foi realizada em todos os tratamentos. Uma segunda adução de cobertura foi realizada após 60 dias da semeadura, aplicando 7,34 de  $(NH_4)_2SO_4$  e 1,24g de KCl. Além disso, foi necessário a aplicação do inseticida clorantniliprole (Prêmio), para o controle de pragas em todos os tratamentos. No total, foram conduzidos 12 tratamentos ilustrado na **Figura 1**: Controle (contendo apenas  $ZnSO_4$ ), ZnONPs, esfera AS/ZnONPs, esfera AS Híbrida, esfera AS/*A. brasilense* + ZnONPs, esfera AS/*A. brasilense* +  $ZnSO_4$ , esfera AS/Xil/ZnONPs, esfera AS/Xil híbrida, esfera AS/Xil *A. brasilense* + ZnONPs, esfera AS/Xil *A. brasilense* +  $ZnSO_4$ , *A. brasilense* + ZnONPs e *A. brasilense* +  $ZnSO_4$ . Os ensaios foram realizados em quintuplicata, com uma planta por vaso para cada tratamento. A semente do milho comercial SHU 119 (SHULL®) foi semeada em 5 cm de profundidade, [271] em todos

os tratamentos e cultivado em casa de vegetação por 120 dias (período de dez/2023 a abr/2024) em temperatura ambiente. Durante o período de crescimento, as plantas foram irrigadas conforme necessário. Após o experimento foi realizado novamente a análise físico-química do solo.



**Figura 1.** Representação esquemática do ensaio conduzido em casa de vegetação com diferentes tratamentos

### 2.6.2 Desenvolvimento da planta

Após 21 dias da semeadura, entre os estágios fenológicos V3 e V4, o desenvolvimento das plantas foi monitorado. Em cada planta amostrada, foram avaliados o diâmetro entre o 1º e o 2º entrenó (d1 e d2, em cm) e a altura da planta (h, em m), medindo-se o comprimento da planta desde a superfície do solo até o ápice superior do pendão [272, 273]. Para a contagem do número de folhas, foram consideradas apenas aquelas totalmente estendidas [274]. A análise fotossintética dos pigmentos foi realizada para determinar os níveis de clorofila totais, utilizando um medidor digital de teor de clorofila portátil ClorofiLOG, da marca Falker®.

### 2.6.3 Nutrição de plantas

As plantas, após o período de 120 dias, foram colhidas, secas e pesadas em balança analítica para determinar a matéria seca da parte aérea e da parte radicular. A análise do acúmulo de zinco foi realizada tanto na parte aérea quanto nas raízes, sendo estimada a partir da razão entre a concentração de Zn e a matéria seca de ambas. A concentração de

Zn foi determinada após a digestão nitroperclórica e quantificada com AAS, seguindo os protocolos de Malavolta et al. (1997) [275].

## 2.7 Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada usando análise de variância (One-way ANOVA com o teste de Tukey) e foi considerado diferenças significantes como  $p < 0,05$ .

## 3- Resultados e discussão

### 3.1 Eficiência de encapsulamento

A eficiência de EE das ZnONPs e de *A. brasilense* revela que as esferas apresentam valores elevados de encapsulamento em todos os tipos de esferas, conforme descrito na **Tabela 1**. Isso devido ao fato de que as esferas possuem altos valores de área e volume em seu interior, o que permite que diferentes tipos de ativos sejam facilmente encapsulados [242, 276].

**Tabela 2.** Valores de eficiência de encapsulação das esferas de hidrogel, contendo ZnONPs e *A. brasilense*, para os diferentes tipos de esferas.

Esferas de Hidrogel	Zn %	<i>A. brasilense</i> %
Esf. AS/ZnONPs	96,8	--
Esf. AS/ <i>A. brasilense</i>	--	92,0
Esf. AS Híbrida	69,2	72,8
Esf. AS/Xil/ZnONPs	95,9	--
Esf. AS/Xil / <i>A. brasilense</i>	--	74,9
Esf. AS/Xil Híbrida	73,3	86,1

No entanto, nota-se que as esferas híbridas, tanto da matriz de AS quanto da mescla de AS/Xil, apresentam um percentual de EE menor. Isso pode ser atribuído ao fato de que as esferas híbridas contém um maior número de poros e, embora os poros encapsulem o ativo com facilidade em seu interior, eles também facilitam a sua fuga [277]. No entanto, sua EE ainda pode ser considerada alta. Um estudo realizado por

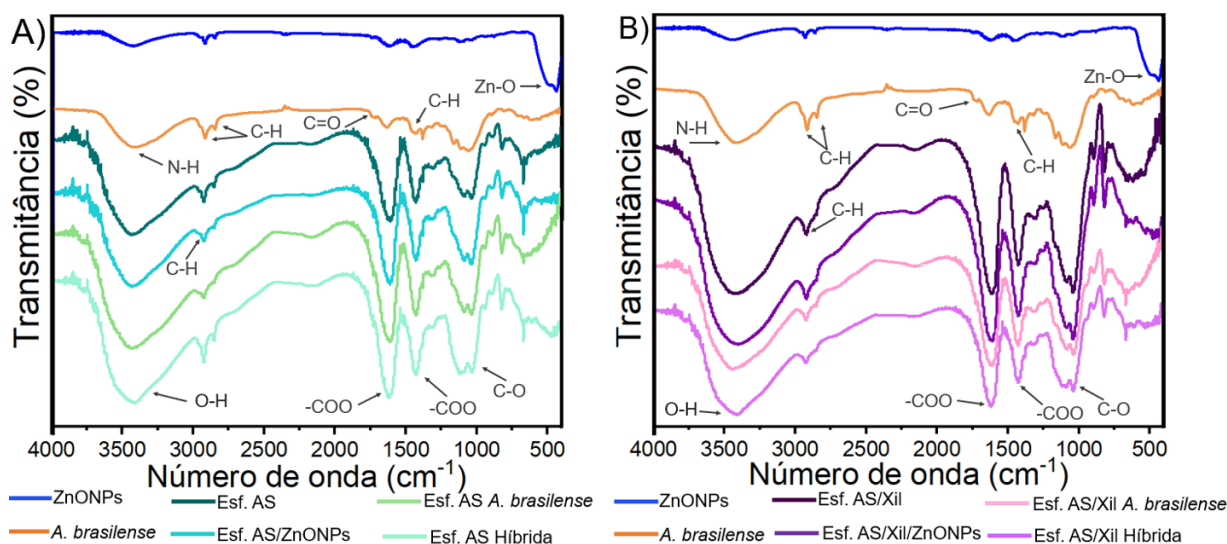
Takka e Gurel (2010) mostrou que a mescla de quitosana à matriz de alginato diminuiu o potencial de encapsulamento das esferas [278]. Cesari et al. (2020) obtiveram um rendimento parecido para o encapsulamento de *A. brasilense* em esferas de hidrogel, atingindo  $77,5 \pm 5,2$  [279]. As esferas constituídas pela mescla entre AS/Xil manteve o EE semelhante aos da esferas constituída apenas por AS, pois a xilana apresenta afinidade com a água [280], e também a uma boa biocompatibilidade com o alginato [58, 224].

## 3.2 Caracterização físico-química

### 3.2.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A **Figura 2** revela modos vibracionais somente das ZnONPs, sendo possível notar uma banda característica da interação Zn-O em aproximadamente  $496 \text{ cm}^{-1}$  [199]. Além disso, nesta mesma figura é possível observar os modos vibracionais referentes *A. brasilense* [212] como controle, conforme já discutido no capítulo anterior.

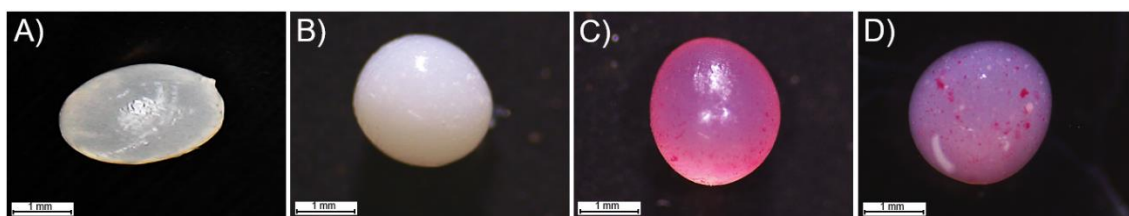
Os resultados dos espectros vibracionais das esferas híbridas constituídas de AS (**Figuras 2-A**) e AS/Xil (**Figuras 2-B**) sem e com ativos (e.x., ZnONPs, *A. brasilense* e ZnONPs+*A. brasilense*) também foram estudados, e revelaram possíveis interações entre os constituintes e as matrizes de polissacarídeos. No entanto, em ambos os espectros, tanto para as esferas AS quanto para as esferas da mescla AS/Xil, podem ser observadas bandas características dos polissacarídeos. É mostrado bandas pertencentes à O-H em aproximadamente  $3439\text{-}3300 \text{ cm}^{-1}$ , bandas na região de  $2930\text{-}2863 \text{ cm}^{-1}$  que indicam ligações -CH, e banda em cerca de  $1600 \text{ cm}^{-1}$  atribuída à vibração de estiramento do grupo  $\text{-COO}^-$ , que é o grupamento responsável pelas ligações iônicas com  $\text{Ca}^{2+}$  [281]. Além disso, a banda em torno de  $1027 \text{ cm}^{-1}$  refere-se ao grupo C-O, relacionado à ligação C-O [100, 228, 280]. A banda em  $818 \text{ cm}^{-1}$  indica a vibração da ligação Na-O (Cesari et al., 2020). Também é possível notar um alargamento da banda na região de  $3300 \text{ cm}^{-1}$  nas curvas das esferas contendo *A. brasilense* e nas esferas híbridas, tanto na **Figura 2-A** quanto na **2-B**. Esse alargamento pode ser atribuído à hidratação das bactérias ou à ligação N-H nos grupos amida das proteínas presentes nas bactérias [212, 231, 279].



**Figura 2.** Espectros vibracionais na região do infravermelho: A) Espectro referente às esferas de alginato de sódio; B) Espectro referente às esferas da mescla de alginato de sódio e xilana.

### 3.2.2 Microscopia estereoscópica (ME)

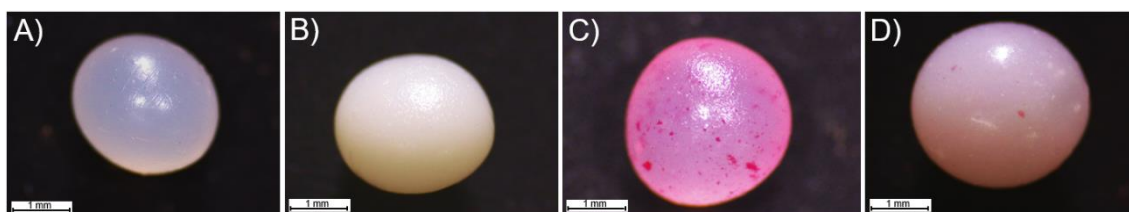
A observação realizada no ME proporcionou uma imagem ampliada das esferas, revelando informações preliminares sobre sua morfologia predominantemente esférica. Na **Figura 3**, são exibidas as imagens das esferas constituídas pela matriz AS, com um tamanho médio de 2,5 mm. A **Figura 3-A** mostra a esfera produzida exclusivamente por alginato, com coloração translúcida. Na **Figura 3-B**, a esfera composta por AS com a adição de ZnONPs apresenta uma coloração mais esbranquiçada, resultado da presença das nanopartículas encapsuladas. A **Figura 3-C** exibe a esfera constituída por AS e *A. brasilense*, que exibe uma coloração rosa, atribuída ao meio de cultivo das BPCV, além de uma aparência levemente translúcida. Por fim, a esfera composta por AS híbridas não apresenta aparência translúcida, devido à adição de ZnONPs, e exibe uma coloração rósea devido da presença das BPCP.



**Figura 3.** Imagem ampliada dos diferentes tipos de esferas constituída por AS: A) Esf. AS; B) Esf. AS/ZnONPs; C) Esf. AS/*A. brasilense*; D) Esf. AS Híbrida.

As esferas formadas pela mescla de AS/Xil podem ser observadas na **Figura 4**. Assim como as esferas feitas apenas de alginato, sua morfologia também é

predominantemente esférica, mas apresentam um tamanho médio de 3 mm, um pouco maior. Esse aumento no tamanho das esferas pode ser atribuído ao fato de que tanto o AS quanto a Xil possuem cadeias longas. Isso sugere que a Xil pode influenciar na densidade da reticulação devido ao seu grupo ácido carboxílico, que é carregado negativamente, permitindo que mais íons  $\text{Ca}^{2+}$  se liguem às esferas de alginato [58].

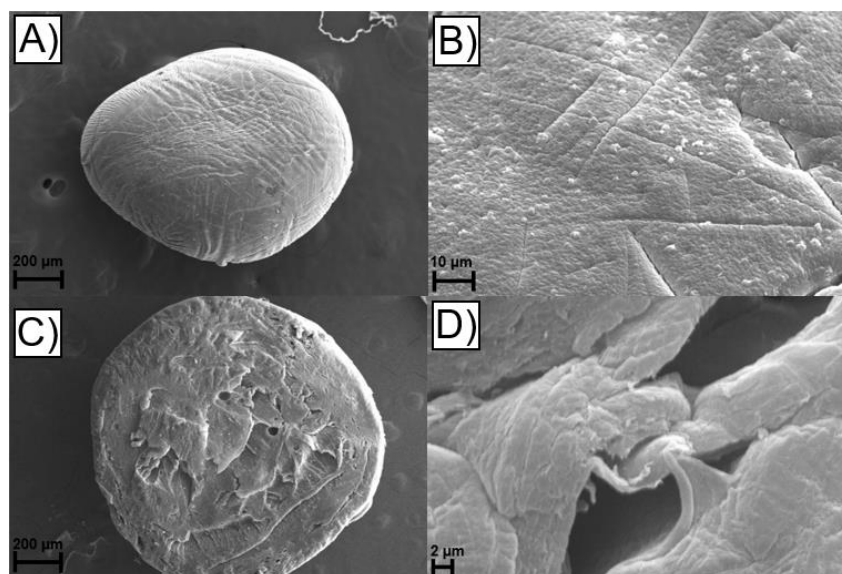


**Figura 4.** Imagem ampliada dos diferentes tipos de esferas constituída por AS/Xil: A) Esf. AS/Xil; B) Esf. AS/Xil/ZnONPs; C) Esf. AS/Xil/*A. brasilense*; D) Esf. AS/Xil Híbrida.

A esfera constituída por AS/Xil exibida na **Figura 4-A**, apresenta uma aparência semelhante à da **Figura 3-A**, mas com uma aparência mais opaca. Isso pode ser atribuído pela presença de lignina residual durante o processo de extração da Xil, uma coloração marrom [280]. Na **Figura 4-B**, é apresentada a esfera AS/Xil/ZnONPs, que tem um tom um pouco mais amarelado em comparação com a esfera AS/ZnONPs mostrada na **Figura 3-B**. As **Figuras 4-C** e **4-D**, estão as esferas constituídas por AS/Xil/*A. brasilense* e AS/Xil híbrida, respectivamente, com uma coloração rosada menos opaca e um tom mais amarelado, se comparadas com as esferas AS/Xil/*A. brasilense* e AS/Xil híbrida. Esses resultados mostram que a incorporação da Xil à matriz de AS ocorreu com sucesso, assim como a incorporação das ZnONPs e de *A. brasilense* em ambos os sistemas.

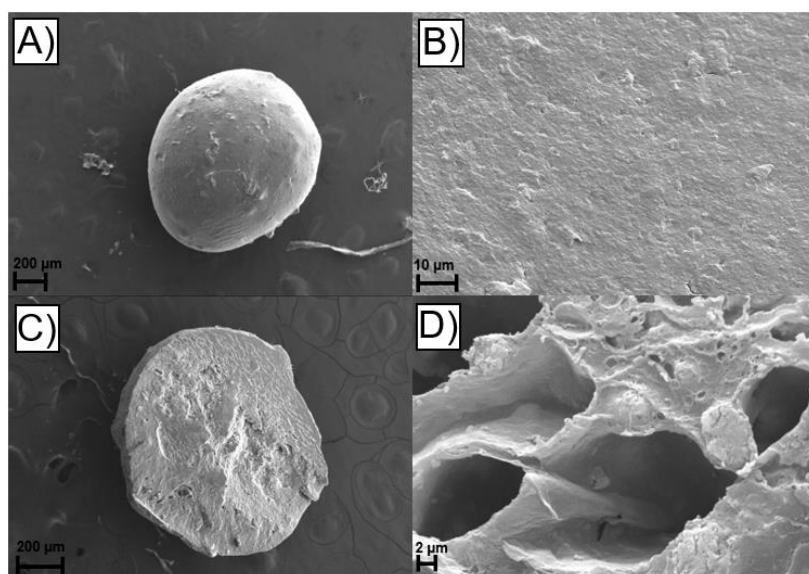
### 3.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A caracterização foi crucial para uma análise mais detalhada das esferas produzidas, pois suas imagens revelam a topografia da superfície, bem como do interior. A **Figura 5-A** exibe a micrografia da esfera constituída por AS, onde é possível observar sua morfologia esférica e uma superfície relativamente lisa (**5-B**). O interior da esfera é mostrado na figura **5-C**, e também é possível notar a presença de poros em seu interior na figura **5-D**.



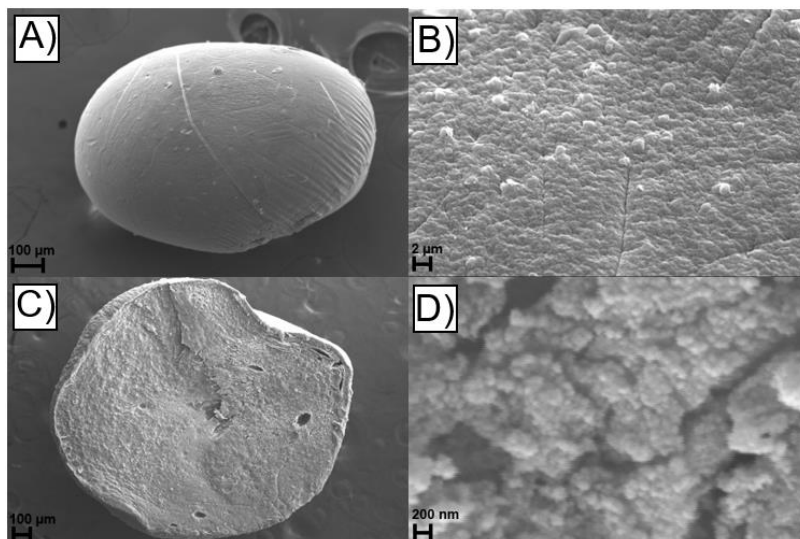
**Figura 5.** Micrografia por MEV da esfera de AS: A) Morfologia; B) Superfície; C) Interior da esfera; D) Presença de poros.

Da mesma forma, a **Figura 6** apresenta a esfera produzida pela mescla de AS/Xil. Na figura **6-A**, é possível notar a esfera inteira, que também apresenta morfologia esférica e superfície lisa (**6-B**). O interior da esfera é mostrado na **Figura 6-C**, e a presença de poros é destacada na **Figura 6-D**. O que difere a esfera formada apenas por AS da esfera formada pela mescla de AS/Xil é que esta última possui um interior com aparência mais áspera e maior formação de poros, apresentando paredes mais finas e uma estrutura mais porosa. Isso se deve à capacidade de mudança de propriedades da estrutura do AS ao inserir um outro material em sua matriz [58, 95].



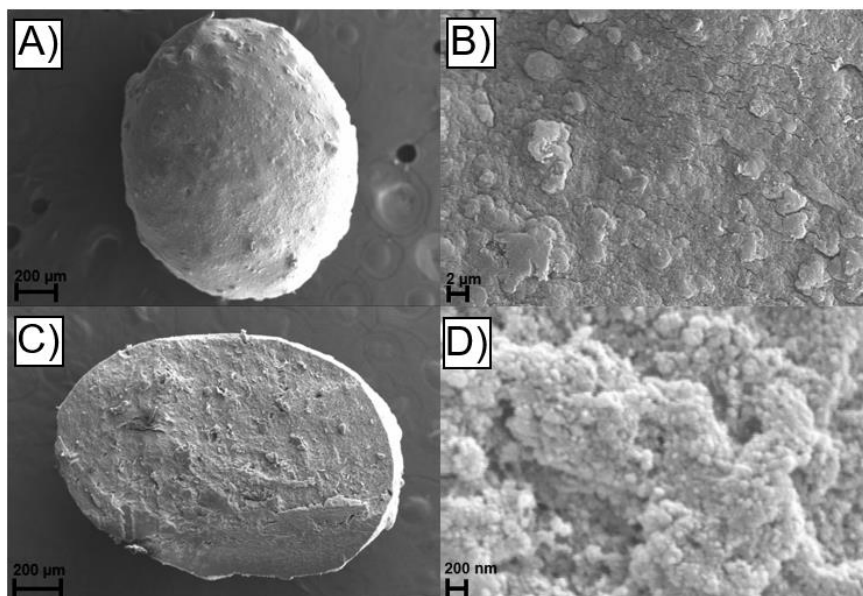
**Figura 6.** Micrografia por MEV da esfera de AS/Xil: A) Morfologia; B) Superfície; C) Interior da esfera; D) Presença de poros.

As **Figuras 7 e 8** apresentam as esferas que encapsularam as ZnONPs em seu interior, sendo produzidas por AS/ZnONPs e AS/Xil/ZnONPs. A **Figura 7-A** confirma a morfologia esférica, apresentando uma superfície mais rugosa (**7-B**) e um interior mais áspero (**7-C**) se comparada à figura **5-C**. É possível notar na figura **7-D** um aglomerado de ZnONPs em seu interior.



**Figura 7.** Micrografia por MEV da esfera de AS/ZnONPs: A) Morfologia; B) Superfície; C) Interior da esfera; D) Presença de ZnONPs.

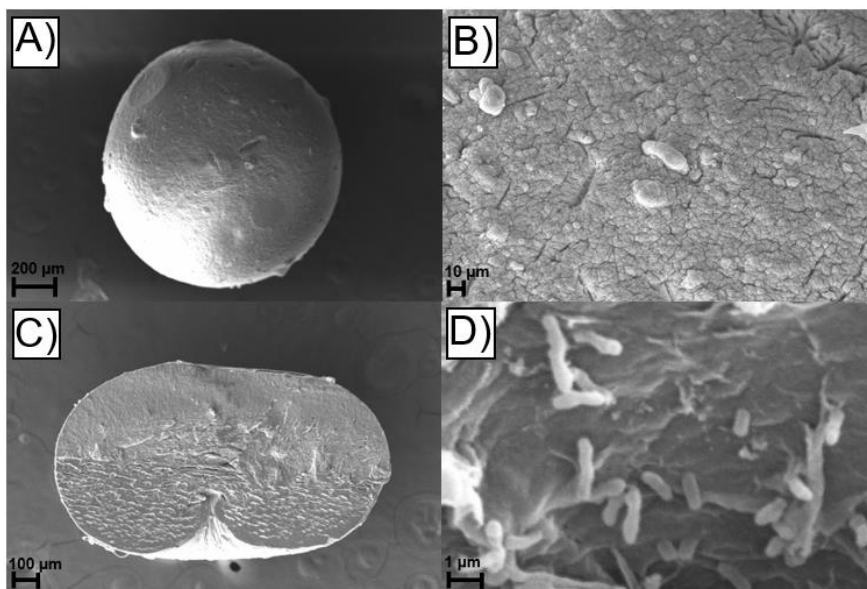
Do mesmo modo a **Figura 8-A** revela uma morfologia esférica, apresentando uma superfície rugosa (**7-B**) e um interior robusto (**7-C**). Também é possível notar na figura **7-D** um aglomerado de ZnONPs em seu interior.



**Figura 8.** Micrografia por MEV da esfera de AS/Xil/ZnONPs: A) Morfologia; B) Superfície; C) Interior da esfera; D) Presença de ZnONPs.

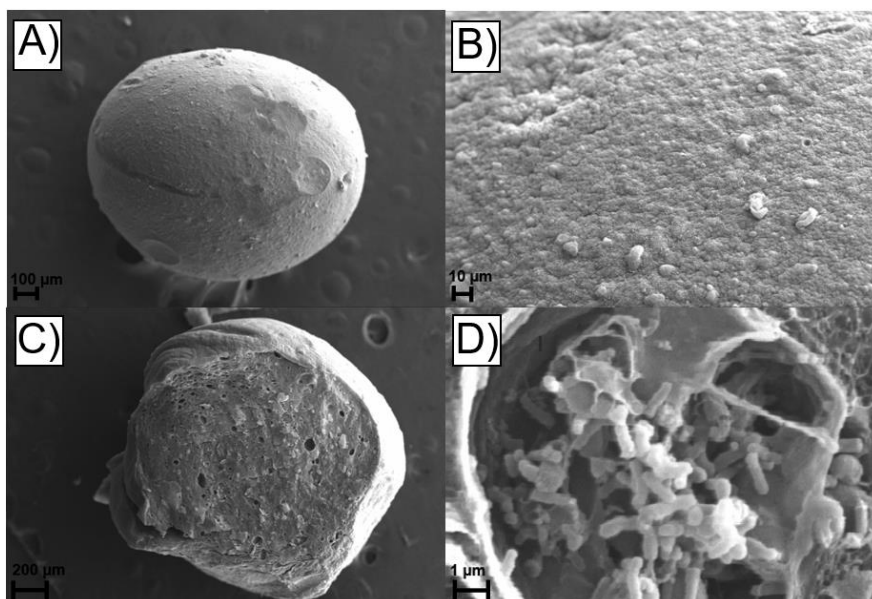
Pela micrografia realizada por MEV, foi possível observar algumas diferenças entre as esferas constituídas por AS/ZnONPs e AS/Xil/ZnONPs. As esferas formadas pela mescla AS/Xil/ZnONPs apresentaram uma estrutura mais robusta, uma superfície irregular e um interior mais rugoso. Isso se deve à concentração de ZnONPs que foi utilizada, pois em concentrações elevadas podem causar irregularidades e deformações na superfície, se tornando mais densa [282]. A distribuição das ZnONPs no interior das esferas se apresentou de forma aglomerada em ambas as composições, o que é característico dessas nanopartículas altamente reativas, que tendem a se aglomerar [201].

A **Figura 9-A** evidenciou que a morfologia continua esférica mesmo após a adição das BPCV, apresentando uma superfície rugosa (**Figura 9-B**) e um interior áspero mostrado na **Figura 9-C**. Na **Figura 9-D**, é possível observar a presença das BPCV *A. brasilense*, em forma de bastonetes, que é o formato característico na parede do poro.



**Figura 9.** Micrografia por MEV da esfera de AS/*A. brasilense*: A) Morfologia; B) Superfície; C) Interior da esfera; D) Presença de *A. brasilense* no poro da esfera.

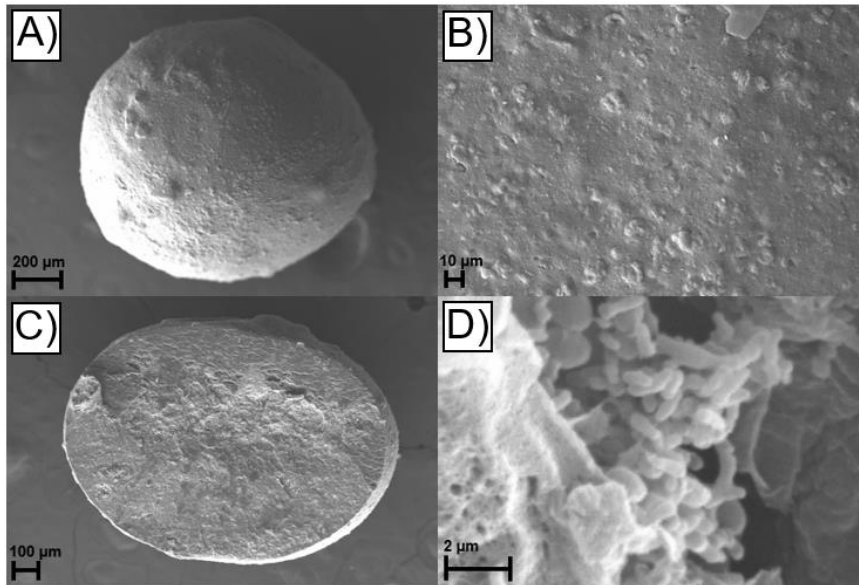
Na **Figura 10-A**, é apresentada a estrutura esférica da formulação por AS/Xil *A. brasilense*, revelando uma superfície rugosa (**Figura 10-B**) e um interior poroso. Também é possível observar, na **Figura 10-D**, a presença de *A. brasilense* em forma de bastonetes.



**Figura 10.** Micrografia por MEV da esfera de AS/Xil/*A. brasilense*: A) Morfologia; B) Superfície; C) Interior da esfera; D) Presença de *A. brasilense* no poro da esfera.

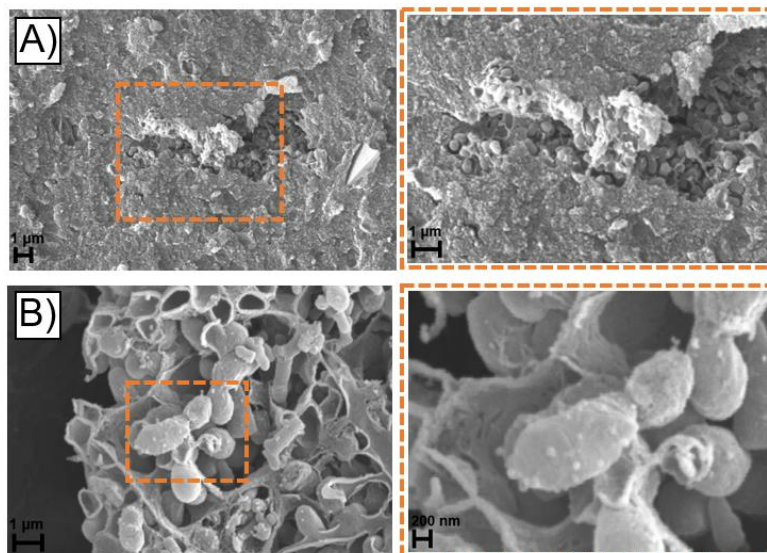
E possível notar que quase não se houve mudanças na estrutura morfológicas das esferas contendo BPCP, pois mantiverem morfologia esféricas e superfície rugosa. No entanto, uma grande diferença no interior das esferas AS/XIL *A. brasilense* foi observada, uma vez que exibiu maior número de poros. E isso pode corroborar com a sua menor eficiência de encapsulamento. Pois, devido a esses poros, as estruturas podem se solidificar de forma irregulares, e apresentar diferentes taxas de eficiências de encapsulamento [277], já que os poros maiores possibilitam que os ativos contidos em seu interior escapem durante o preparo [283]. No entanto, esse grande número de poros também pode promover uma maior liberação das BPCP.

As esferas híbridas também podem ser consideradas híbridas por terem encapsulados em seu interior compostos inorgânicos e orgânicos em uma única esfera. Na **Figura 11-A** é mostrada a esfera híbrida de AS com forma predominantemente esférica, superfície rugosa (**Figura 11-B**), interior áspero (**Figura 11-C**), revelando que em seu interior contém aglomerados de ZnONPs e *A. brasilense*, na forma de bastonetes (**Figura 11-D**).



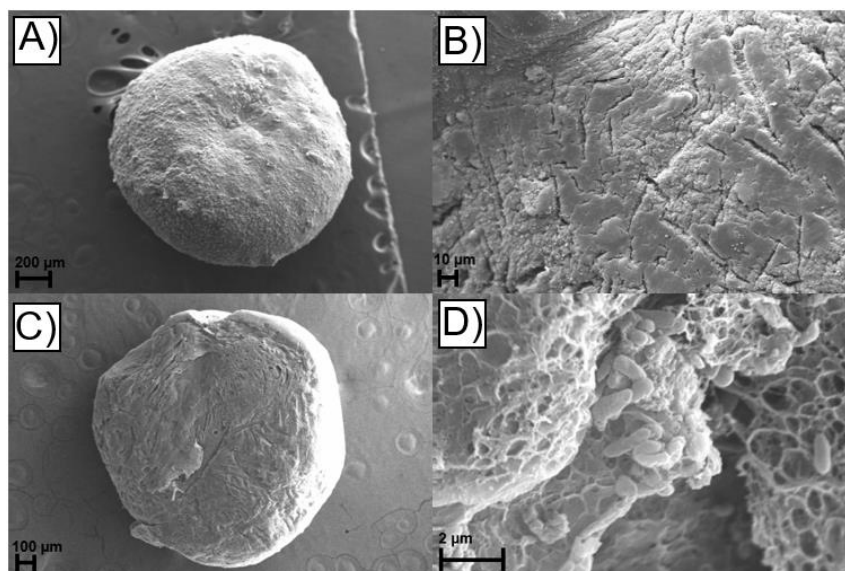
**Figura 11.** Micrografia por MEV da esfera AS híbridas: A) Morfologia; B) Superfície; C) Interior da esfera; D) Interior da esfera exibindo ZnONPs e *A. brasilense* em seu interior.

A presença de compostos inorgânicos e organismos vivos é evidenciada na **Figura 12**, em ângulos diferentes, onde consta no interior da mesma esfera. Na **Figura 12-A**, é possível notar um aglomerado de ZnONPs nas bordas do poro e, mais ao fundo, as *A. brasilense* distribuídas pelo poro. Em uma micrografia de maior ampliação (**Figura 12-B**), é possível visualizar a presença das BPCP *A. brasilense*, com aglomerados de ZnONPs sobre elas.



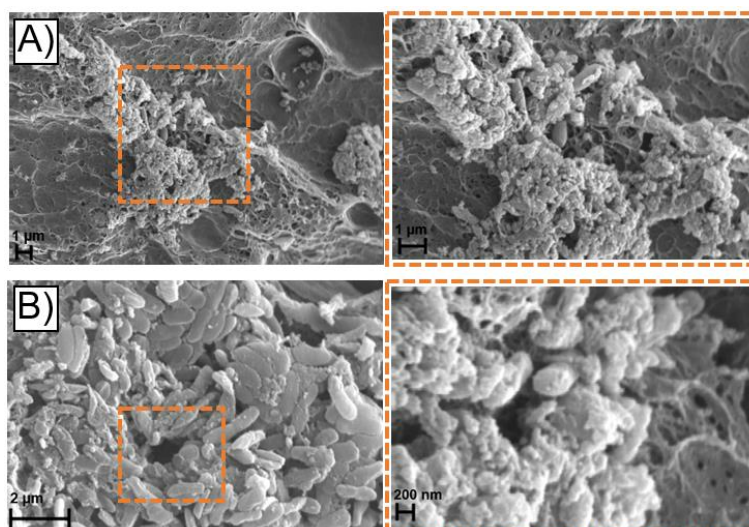
**Figura 12.** Micrografia interior da esfera AS. híbrida: A) Interior da esfera; B) Micrografia do interior da esfera com maior ampliação.

Da mesma forma, foi realizada a micrografia das esferas híbridas produzidas pela mescla AS/Xil. Na **Figura 13-A**, é mostrada a esfera AS/Xil híbrida com formato esférico, apresentando uma superfície irregular com pequenas fissuras (**Figura 13-B**) e um interior poroso (**Figura 13-C**). Na **Figura 13-D**, é revelado o interior da esfera, evidenciando a coexistência de ZnONPs e *A. brasilense*.



**Figura 13.** Micrografia por MEV da esfera AS/Xil híbridas: A) Morfologia; B) Superfície; C) Interior da esfera; D) Interior da esfera exibindo ZnONPs e *A. brasilense* em seu interior.

Em uma micrografia de maior ampliação é possível notar no corte transversal a presença da *A. brasilense* rodeada de aglomerado de ZnONPs (**Figura 14 A-B**).



**Figura 14.** Micrografia interior da esfera AS/Xil. híbrida: A) Interior da esfera; B) Micrografia do interior da esfera com maior ampliação.

Esses resultados indicam que foi possível a construção de um sistema híbrido capaz de encapsular componentes de características diferentes. A associação de ZnONPs com *A. brasilense* já é conhecida no âmbito da agricultura [17]. No entanto, a combinação dos dois encapsulados em uma única esfera ainda não foi revelada. Além disso, a mescla de AS/Xil para o encapsulamento de ativos voltados para a agricultura ainda não é tão explorada.

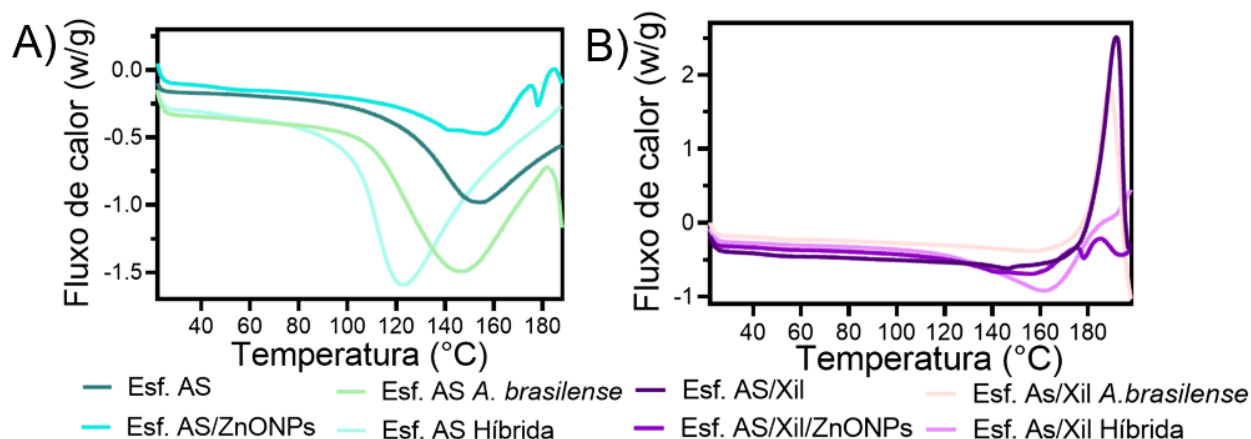
### 3.3.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A **Figura 14** apresenta o termograma de **DSC** dos diferentes tipos de esferas. É possível notar na **Figura 14-A** picos de transições endotérmicas, que são característicos do SA. A esfera de AS foi utilizada como controle para as análises térmicas, já que não contém mistura em sua matriz nem outro componente em sua construção. Pode-se observar que a esfera AS possui um pico centrado em aproximadamente 154 °C, enquanto a esfera AS/ZnONPs apresentou dois picos, sendo o primeiro centrado em aproximadamente 156 °C e o segundo centrado em aproximadamente 177 °C. A esfera AS *A. brasilense* apresentou pico centrado em aproximadamente 144 °C, enquanto a esfera híbrida obteve pico centrado em 125 °C.

As diferenças nos picos de transição para cada tipo de esfera revelaram variações significativas, indicando que a composição afeta suas propriedades térmicas [27, 284]. O pico evidenciado na esfera AS representa a evaporação de água [285]. Comparando a esfera AS com a esfera AS/ZnONPs, observou-se um deslocamento e dois picos, sendo o primeiro na mesma região da esfera AS e o segundo com um maior deslocamento, indicando que as ZnONPs podem estar interagindo com a matriz e causando um aumento nas propriedades térmicas do material [286]. A adição de nanopartículas metálicas tende a oferecer maior cristalinidade ao polissacarídeo devido à sua natureza cristalina, proporcionando maior estabilidade térmica [285]. A esfera AS *A. brasilense*, com um pico em aproximadamente 144 °C, demonstra ter menor estabilidade térmica, provavelmente devido à interferência do *A. brasilense*, que não possui cristalinidade [287]. Curiosamente, as esferas AS híbridas apresentaram uma temperatura de transição mais baixa do que a constituída por AS/*A. brasilense*, mesmo contendo ZnONPs. Isso sugere que o encapsulamento de ZnONPs e *A. brasilense* na mesma esfera esteja interagindo e causando uma diminuição em sua temperatura de transição.

O termograma da **Figura 14-B** mostra que as esferas formadas pela mescla AS/Xil apresentaram temperaturas de transição diferentes das esferas constituídas apenas por AS.

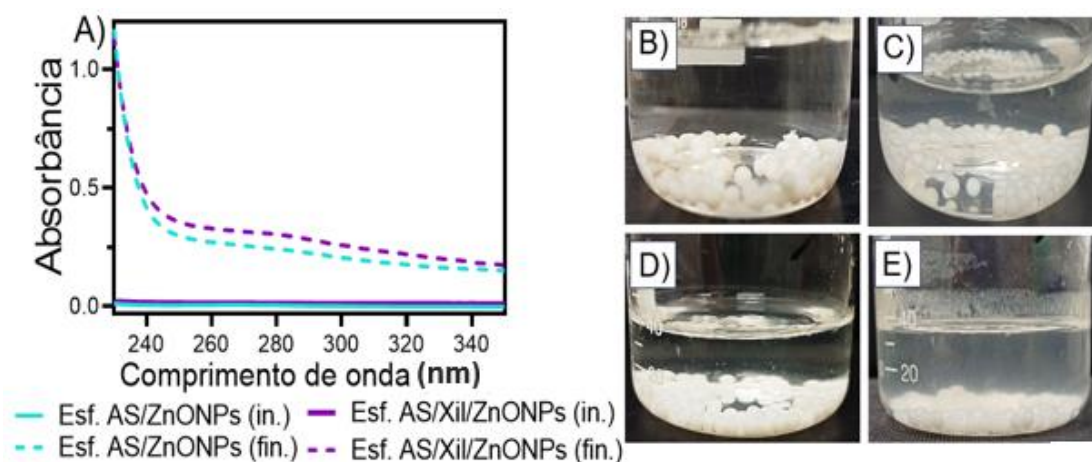
O pico de transição da esfera AS/Xil foi centrado em aproximadamente 192 °C, enquanto as esferas AS/Xil/ZnONPs apresentaram dois picos, sendo o primeiro centrado em aproximadamente 158 °C e o segundo em aproximadamente 178 °C. As esferas AS/Xil *A. brasilense* exibiu pico centrado em aproximadamente 189 °C, e, por fim, a esfera híbrida AS/Xil apresentou pico centrado em aproximadamente 162 °C. O pico da esfera AS/Xil foi exotérmico, devido à xilana ter essa característica [288, 289], o que indica maior estabilidade térmica em relação à esfera AS. No entanto, os picos apresentados pela esfera AS/Xil/ZnONPs foram endotérmicos, devido à presença das ZnONPs, que possuem essa característica [290], e também à presença do AS, que também é endotérmico, indicando que ocorreu uma transição de fase. Assim, a transição endotérmica foi mais evidenciada na esfera. É possível notar um alargamento no pico dessa esfera, indicando que a cristalinidade diminuiu [291]. A esfera AS/Xil *A. brasilense* também exibiu pico exotérmico, pois a característica exotérmica da Xil prevaleceu. No entanto, houve uma diminuição na intensidade de seu pico, isso pode ser atribuído à presença das BPCV, que não possuem cristalinidade, indicando uma redução na cristalinidade nas esferas AS/Xil *A. brasilense*. Por fim, a esfera híbrida AS/Xil novamente apresentou pico endotérmico, devido à maior presença de componentes que possuem essas características (AS e ZnONPs). Em comparação com a esfera AS híbrida, a AS/Xil híbrida apresentou uma maior temperatura de transição, indicando maior estabilidade térmica. No entanto, também foi possível observar que a temperatura de transição da esfera AS/Xil é maior que a da esfera híbrida AS/Xil híbrida, o que pode ser atribuído à estrutura porosa da formação dessa esfera, que pode comprometer sua estabilidade térmica. Além disso, a esfera AS/Xil híbrida apresentou apenas um pico de transição, mesmo que cada componente presente na mistura tenha picos de transição diferente. Isso indica que ao apresentar apenas um pico, mostra que ocorreu interação entre eles [288].



**Figura 14.** Análise térmica por DSC: A) Esfera formulada por AS; B) Esfera formulada por AS/XIL.

### 3.3.4 Degradação das esferas

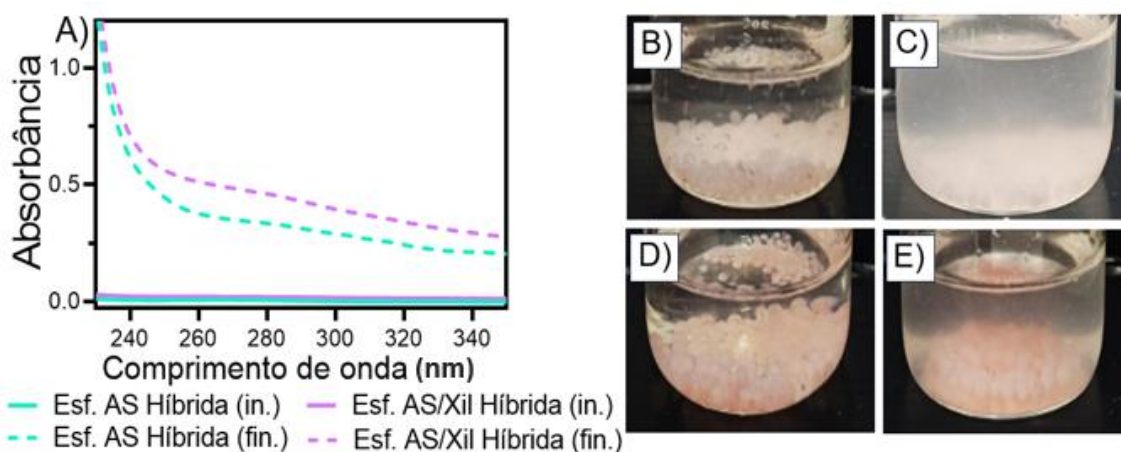
A degradação das esferas AS/ZnONPs e AS/Xil/ZnONPs em meio aquoso foi observada por UV-vis, durante um período de 60 dias. Conforme mostrado na **Figura 15-A**, tanto as esferas AS/ZnONPs quanto AS/Xil/ZnONPs não apresentaram absorção no início do ensaio, enquanto no final apresentaram uma absorção elevada. Neste contexto, foi possível notar que a absorção das esferas AS/Xil/ZnONPs é maior. A diferença na degradação dessas esferas também pode ser vista a olho nu, conforme mostrado nas **Figuras 14-B** e **14-C**, que representam o tempo inicial e final, respectivamente, das esferas AS/ZnONPs, e nas **Figuras 14-D** e **14-E**, que mostram o tempo inicial e final das esferas AS/Xil/ZnONPs. Observa-se que, no tempo inicial, as amostras são totalmente incolores, enquanto no final apresentam turbidez. No entanto, as esferas compostas por AS/Xil/ZnONPs mostram uma aparência mais turva no final, indicando uma maior degradação dessas esferas e, conseqüentemente, apresentou uma maior absorbância. Conforme a lei de Beer-Lambert indica, a quantidade de luz absorvida é proporcional à concentração do meio, ou seja, quanto mais matéria tiver, menos luz passa através dela, mais é absorvida [292, 293]. Portanto, no tempo inicial em que as amostras se apresentam incolores, toda a luz incidente é transmitida, ou seja, não ocorre absorção. Enquanto no tempo final, a luz incidente foi absorvida por ambas as amostras, sendo que a com AS/Xil/ZnONPs apresentou maior absorção devido à maior desintegração das esferas, resultando em uma aparência mais turva e, conseqüentemente, maior absorção de luz.



**Figura 14.** Ensaio de degradação das esferas por UV-Vis: A) Espectro de absorção; B) Início do ensaio das esferas AS/ZnONPs; C) Final do ensaio das esferas AS/ZnONPs; D) Início do ensaio das esferas AS/Xil/ZnONPs; E) Final do ensaio das esferas

AS/Xil/ZnONPs. Na Figura A do espectro do UV-Vis, o início do ensaio está abreviado como 'in.' e o final como 'fin.'

O mesmo comportamento foi observado para as esferas híbridas, mostrando que, no início do ensaio, o espectro de absorção das esferas AS híbrida e AS/Xil híbrida foi parecido. No início do ensaio, não houve absorção em ambas as esferas, enquanto no final do ensaio, sim (**Figura 15-A**). Pode-se observar que a degradação de ambas as esferas híbridas também foi maior do que a das esferas que continham apenas ZnONPs. Esse fato pode ser atribuído à presença de *A. brasilense* encapsulada nas esferas híbridas, que contribuiu para sua maior degradação. No entanto, as esferas AS/Xil híbridas foram mais degradadas do que as esferas AS híbridas, possivelmente devido à adição da xilana à matriz do AS. Embora as análises térmicas indiquem que as esferas AS híbridas tenham maior resistência térmica, esse efeito não foi observado em meio aquoso. Isso se deve ao fato de que, em meio aquoso, tanto o AS quanto a Xil têm potencial para absorver água, e a adição da Xil torna a matriz de AS mais porosas, conforme evidenciado pelas análises de MEV. Isso sugere que sua adição contribuiu para a maior degradação. Uma vez que se tem mais poros, maior será a absorção de água e intumescimento. Conforme as análises de espectroscopia de UV-VIS, sugere-se que as esferas AS/Xil híbridas têm maior potencial de degradação em meio aquoso.



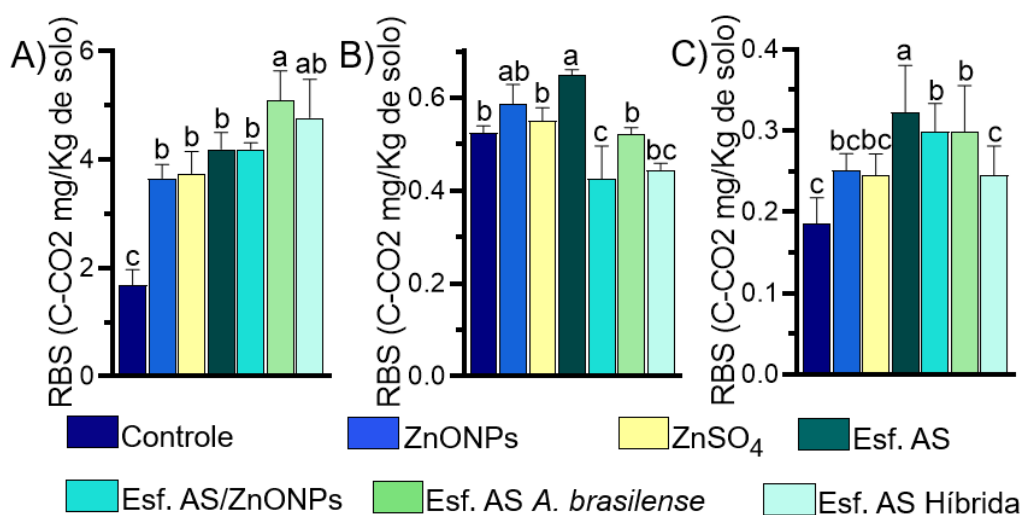
**Figura 15.** Ensaio de degradação das esferas híbridas por UV-Vis: A) Espectro de absorção; B) Início do ensaio das esferas AS híbridas; C) Final do ensaio das esferas AS híbridas; D) Início do ensaio das esferas AS/Xil híbridas; E) Final do ensaio das esferas AS/Xil híbridas. Na Figura A do espectro do UV-Vis, o início do ensaio está abreviado como 'in.' e o final como 'fin.'

### 3.4 Atividade biológica

#### 3.4.1 Respiração basal do solo

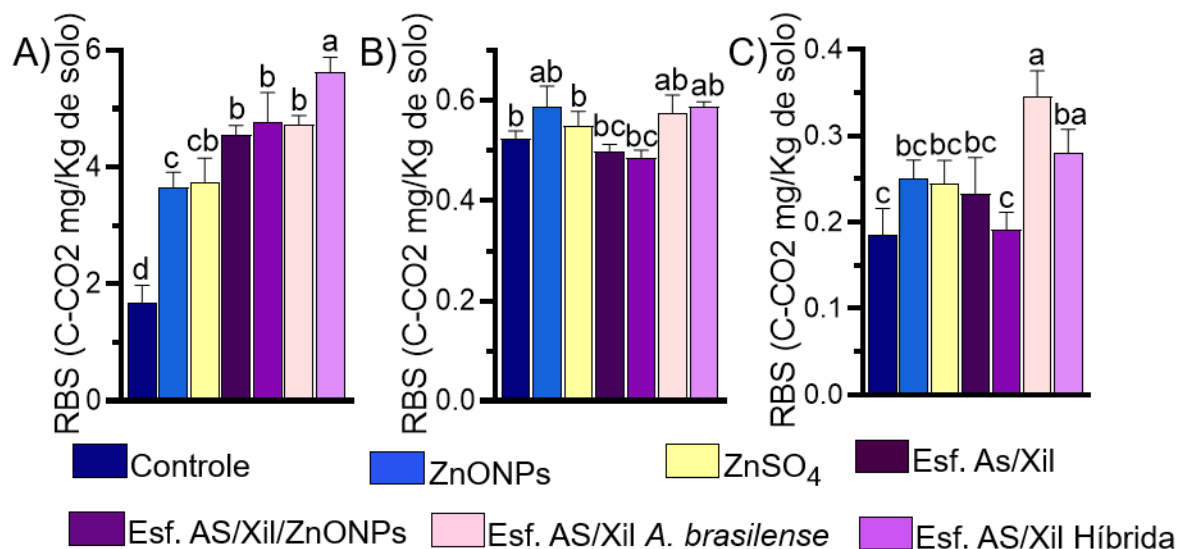
A análise da respiração basal do solo em nosso ensaio foi essencial para avaliar a atividade microbiana e entender como as diferentes esferas influenciam a capacidade dos organismos em decompor a matéria orgânica presente no solo. As análises do controle, ZnONPs e ZnSO<sub>4</sub> foram as mesmas para a exposição do solo contendo esferas constituídas por AS e AS/Xil com o intuito de avaliar as diferenças entre os tratamentos dos diferentes tipos de esferas.

Na **Figura 16-A** reflete na atividade microbiana após 24 h de exposição do solo contendo esferas de AS, e se mostrou maior do que quando comparado com 168 (**Figura 16-B**) e 360 horas (**Figura 16-C**). Também foi possível notar que, após 24 horas, as esferas que continham *A. brasilense* apresentaram maiores valores de C-CO<sub>2</sub>.



**Figura 16.** Respiração basal da comunidade microbiana após a exposição do solo às esferas de SA: A) Análise da respiração basal do solo após 24h de exposição; B) Análise da respiração basal do solo após 168 h de exposição; C) Análise da respiração basal do solo após 360 h de exposição. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

Os resultados da RBS expostos às esferas da mescla de AS/Xil seguiram o mesmo perfil da exposição às esferas AS. A atividade microbiana após 24 horas de exposição do solo às esferas (**Figura 17-A**) também foi maior do que a atividade exposta a 168 horas (**Figura 17-B**) e 360 horas (**Figura 17-C**). Entretanto, as esferas AS/Xil que encapsularam *A. brasilense* apresentaram maior C-CO<sub>2</sub> em todos os períodos da análise, não apenas na de 24 horas, como ocorreu nas esferas de AS.



**Figura 17.** Respiração basal da comunidade microbiana após a exposição do solo as esferas de AS/Xil: A) Análise da respiração basal do solo após 24h de exposição; B) Análise da respiração basal do solo após 168 h de exposição; C) Análise da respiração basal do solo após 360 h de exposição. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

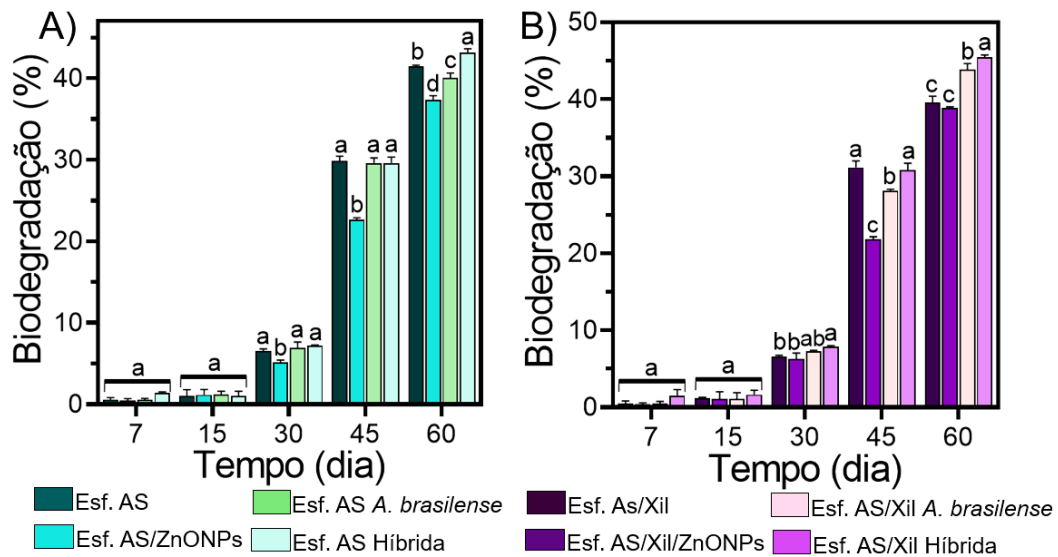
A investigação por RBS revela o nível de atividade microbiana por meio da quantificação do CO<sub>2</sub> liberado nas funções metabólicas dos microrganismos, o que possibilita avaliar a velocidade de degradação dos substratos inseridos no solo [294, 295]. Além disso, a biomassa microbiana do solo desempenha um papel importante, pois ela é a atividade microbiana medida pela respiração (medida do CO<sub>2</sub> liberado), que define a qualidade do solo [296, 297]. Nossos resultados indicaram que o solo exposto às esferas teve um aumento na atividade microbiana, principalmente no período de 24 h em ambas as esferas. No entanto, ocorreu uma diminuição com o passar do tempo, principalmente nas esferas AS. Segundo Vieira et al. (2011), essa redução se deve ao fato de que a respiração microbiana pode estar relacionada à redução do carbono, que pode ser facilmente oxidável [298]. Isso indica que, à medida que a respiração microbiana ocorre, o carbono presente nas esferas pode estar sendo oxidado, e isso explica o motivo que o C-CO<sub>2</sub> diminuiu com o passar do tempo.

Outro ponto que foi observado é que as esferas que encapsularam *A. brasilense* obtiveram maiores valores de C-CO<sub>2</sub>. Isso pode ser explicado pelo fato de que bactérias gram-positivas têm como alvo a degradação de nitrogênio, enquanto bactérias gram-negativas têm como alvo a degradação do carbono, que geralmente resulta na liberação de CO<sub>2</sub> [299]. Ou seja, as esferas que produzimos são ricas em carbono, servindo como fonte de alimento para *A. brasilense*, o que aumenta sua atividade. Isso pode ser

observado pelo aumento de C-CO<sub>2</sub> nas esferas que encapsularam *A. brasilense*. Outro fato observado é que as esferas que continham Xil tiveram maior C-CO<sub>2</sub>, pois possuem um número maior de carbonos do que o SA, além de conter xilose, que é um tipo de açúcar que serve como fonte de alimento para alguns microrganismos [300], enquanto o alginato possui ácido gulurônico [239]. Isso explica por que as esferas que contêm xilana apresentam maiores valores de C-CO<sub>2</sub>. De modo geral, apesar das esferas após 168 e 360 horas de exposição apresentarem C-CO<sub>2</sub> mais reduzidos, os tratamentos em ambas as esferas ainda podem ser considerados positivos, pois apresentaram resultados elevados, em relação ao controle, indicando que as esferas foram capazes de aumentar a atividade microbiana.

### 3.4.2 Degradação *in vitro* das esferas

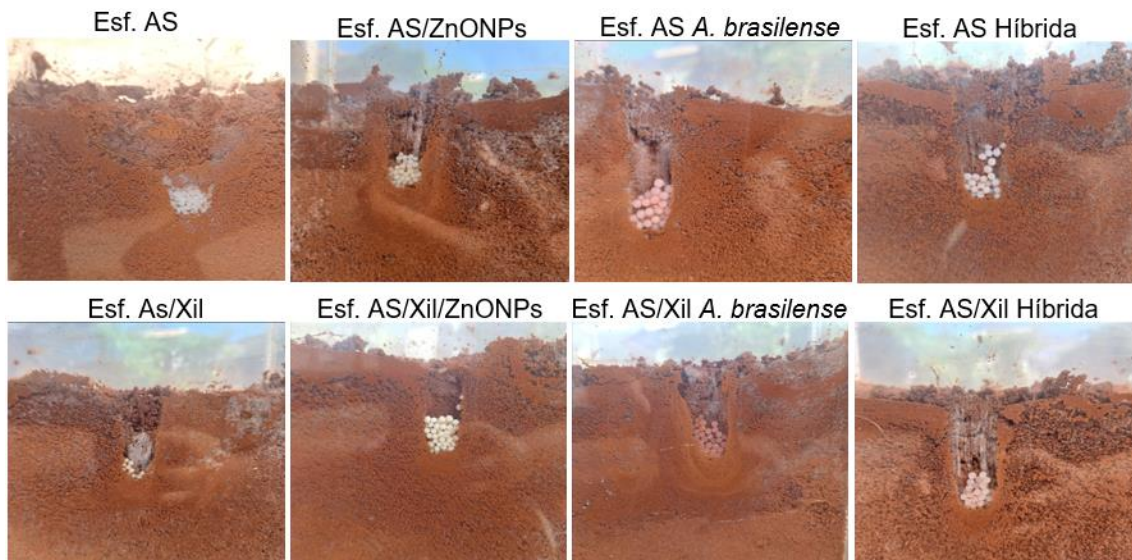
O ensaio de biodegradação das esferas de AS e AS/Xil, mostrado nas **Figuras 18-A** e **18-B**, respectivamente, apresentou perfis parecidos. É possível observar que os resultados obtidos no 7º e no 15º dia foram estatisticamente iguais. A partir do 30º dia, os tratamentos dos diferentes tipos de esferas começam a se diferenciar, no entanto, as esferas contendo *A. brasilense* e as híbridas possuem maiores percentuais de degradação. O mesmo comportamento se repete nos dias 45º e 60º, em ambos os tratamentos. Embora os tratamentos com os diferentes tipos de esferas apresentem comportamentos semelhantes, as esferas contendo Xil em sua composição possuem maior percentual de biodegradação, corroborando com a análise de RBS mencionada acima. O fato de as esferas conterem *A. brasilense* e Xil é justificado pelo mesmo motivo. Devido ao fato de a Xil, ser uma fonte de carboidrato e conter xilose em sua estrutura, aumenta a atividade microbiana e, assim, promove maior biodegradação [299, 300]. No entanto, as esferas que encapsularam apenas ZnONPs apresentam menor valor de biodegradação, devido ao fato de o Zn ser uma partícula inorgânica, o que reduziu a biodegradação tanto nas esferas AS/ZnONPs quanto nas esferas AS/Xil/ZnONPs.



**Figura 18.** Biodegradação: A) Esferas AS; B) Esfera AS/Xil. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

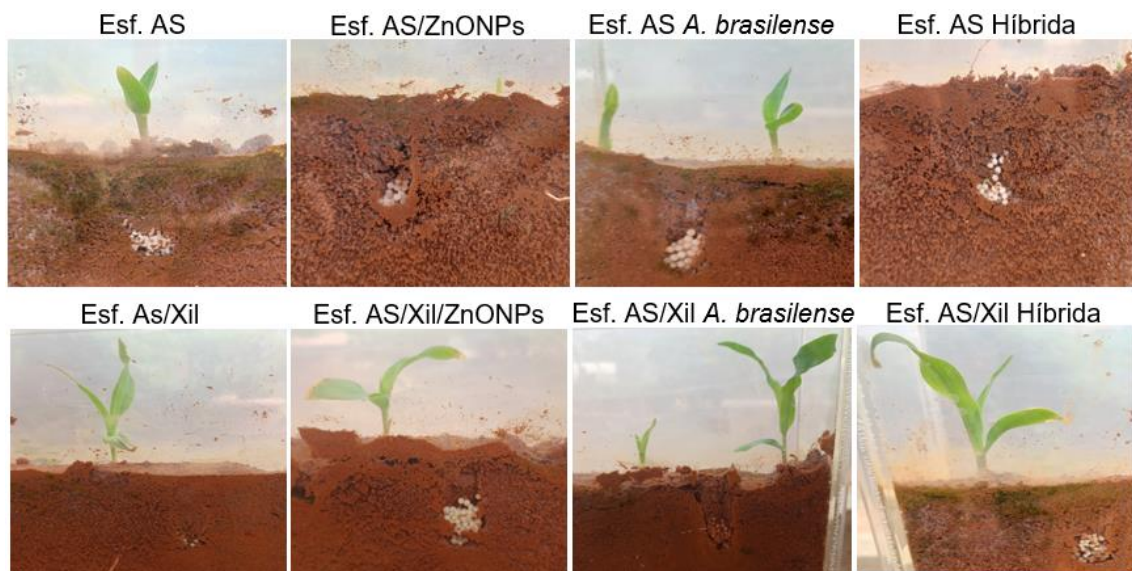
### 3.4.3 Degradação das esferas em condições reais do campo

A técnica rizotron é uma técnica não destrutiva utilizada para analisar o crescimento radicular de plantas, com o intuito de acompanhar e descrever aspectos morfológicos [301]. O rizotron foi utilizado como uma ferramenta para a realização de observações do desenvolvimento das raízes próximas às esferas, assim como para a biodegradação de forma qualitativa. Este método forneceu uma análise visual da degradação das esferas ao longo do tempo em condições reais, permitindo a observação das mudanças morfológicas e estruturais que ocorreram durante o processo de degradação. O dia 1º exibido na **Figura 19**, foi o dia em as esferas foram colocadas no Rizotron.



**Figura 19.** 1º Dia de exposição das esferas.

Após 7 dias de exposição as esferas, observou-se que todos os tratamentos apresentaram plântulas de milho, exceto os tratamentos com as esferas AS/ZnONPs e AS híbrida. Também foi possível observar a formação de musgo ao redor delas, mas não houve alterações visíveis nas esferas.



**Figura 20.** 7º Dia de exposição das esferas.

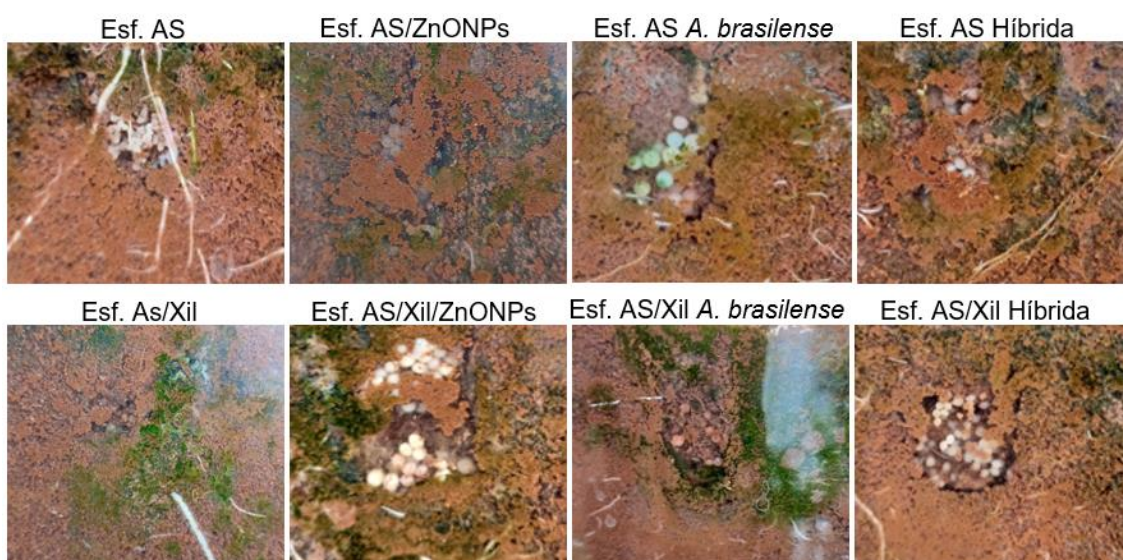
No 15º dia, é possível observar raízes na superfície do rizotron, e que o musgo está muito mais próximo das esferas, e até mesmo sobre elas. Nota-se uma mudança na morfologia das esferas AS, além de uma alteração na coloração das esferas AS *A. brasilense*. A esfera AS/Xil *A. brasilense* apresentou um aspecto mais gelatinoso

(desfazendo o formato esférico), e há uma diminuição de tamanho nas esferas AS/Xil híbrida.



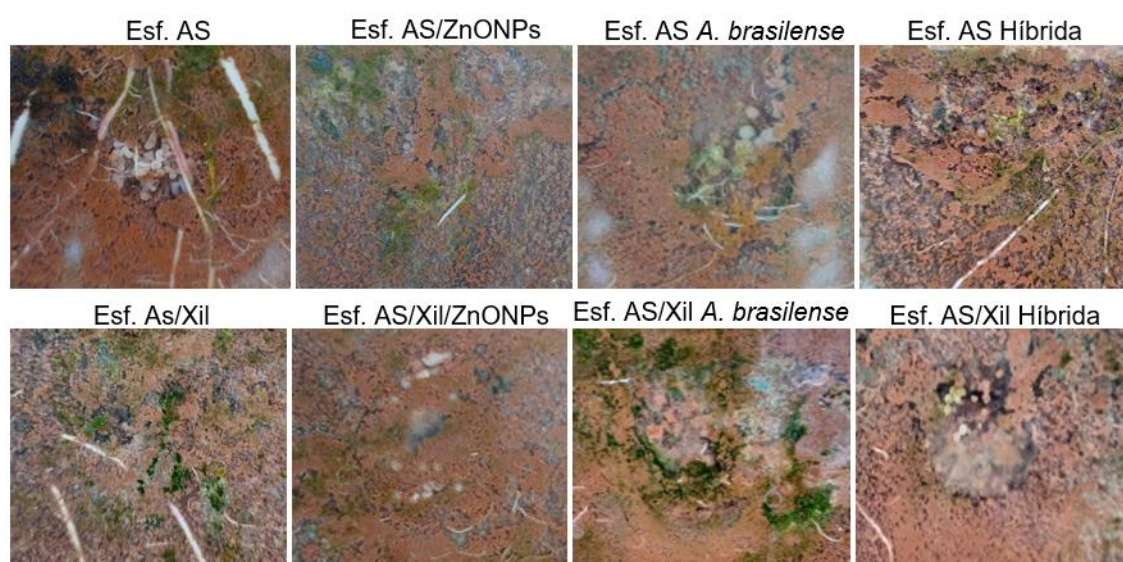
**Figura 21.** 15° Dia de exposição das esferas.

No 30° dia, é possível observar que as mudanças ocorridas no 15° dia se intensificam em todos os tratamentos. As esferas que apresentam menor aparência de degradação são aquelas que encapsularam as ZnONPs, enquanto a que mais apresenta efeitos de biodegradadas são as esferas AS/Xil *A. brasilense*. Além disso, é possível notar que as esferas AS/Xil híbrida estão se aglomerando.



**Figura 22.** 30° Dia de exposição das esferas.

No 45º dia, a imagem foi ampliada para observar melhor os aspectos físicos da degradação. É possível notar uma diminuição nas esferas compostas apenas por AS, enquanto as esferas AS/ZnONPs mantêm uma morfologia aparentemente mais estável. Algumas esferas AS/A. *brasiliense* desapareceram da superfície do rizótron, deixando espaços ociosos, o que sugere que essas esferas tenham degradado. Também foram observadas ausências em algumas esferas AS híbridas. As esferas AS/Xil desapareceram, restando apenas marcas esbranquiçadas onde estavam posicionadas. Nas esferas AS/Xil/ZnONPs, ainda é possível visualizar algumas, embora haja espaços vazios com marcas esbranquiçadas. As esferas AS/Xil/A. *brasiliense* já não possuem formato esférico, indicando que todas tenham degradado. Já nas esferas AS/Xil híbridas, é possível notar a presença de poucas, com tamanho bastante reduzido, e um grande espaço vazio, além de marcas sobre a superfície do vidro onde as esferas estavam.



**Figura 23.** 45º Dia de exposição das esferas

Ao 60 dia as esferas não foram mais visualizadas, indicando que todas ou a maioria das esferas tenha degradado. Embora não de para quantificar a biodegradação das esferas pelo método do rizotron, ainda assim, essas observações foram de extrema importância, para visualizar o processo de biodegradação das esferas. A presença do musgo indica que a atividade microbiana do solo está ocorrendo, e entre todos os tipos de esferas, a que apresenta a maior quantidade de musgo é a esfera AS/Xil/A. *brasiliense*, e também foi ela que mais degradou. Também é evidente que as esferas que contém Xil na sua composição apresentam maiores biodegradação, corroborando com os dados da degradação *in vitro*

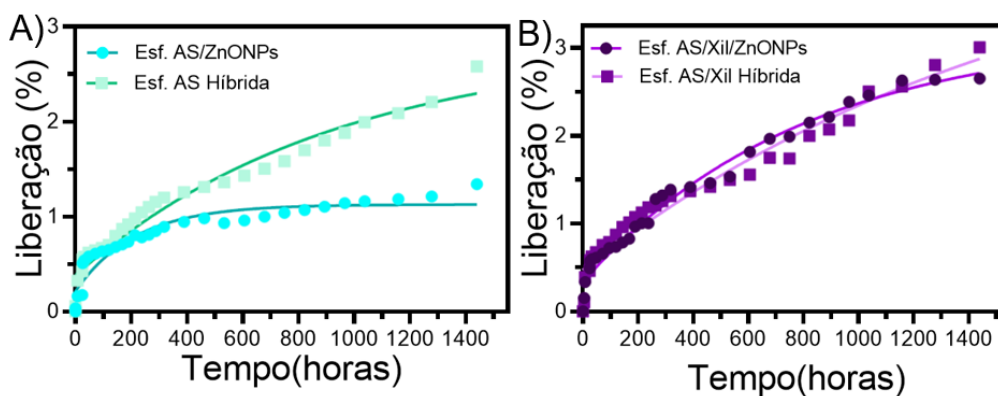
(Figura 18). Também é notado que as esferas que encapsularam apenas ZnONPs tiveram menor biodegradação. Todas essas observações corroboram com as análises de atividade biológica. Outro aspecto a ser considerado é que a presença de plantas, e, conseqüentemente, das raízes e da comunidade da rizosfera nessa região, pode ter acelerado o processo de biodegradação. Pois, as raízes das plantas são ricas em ácidos orgânicos estimulam a multiplicação de microrganismos presentes na rizosfera e aceleram a degradação da matriz polimérica [302].

## 2.4 Cinética de Liberação

### 2.5.1 Cinética de Liberação Zn e *A. brasilense*

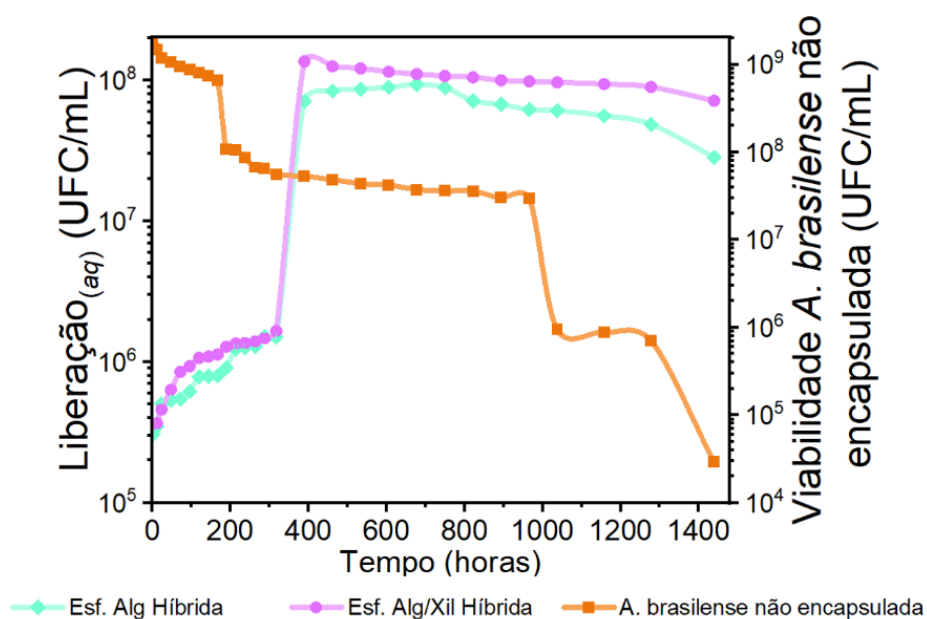
A liberação de ativos contidos nas esferas pode ser determinada por inúmeros fatores, entre eles, o tamanho das partículas, a natureza dos reagentes, a biocompatibilidade e o tipo de interação entre eles [303]. Neste sentido, comparou-se a liberação das esferas que encapsularam apenas ZnONPs e aquelas que encapsularam apenas *A. brasilense*. Também se avaliou a liberação das esferas híbridas, que encapsularam, no interior de uma única esfera, tanto ZnONPs quanto *A. brasilense*, a fim de verificar alterações no perfil da cinética de liberação.

Na Figura 24-A é apresentado o perfil de liberação das esferas composta por AS enquanto na Figura 24-B é apresentado o perfil de liberação das esferas composta pela mescla AS/Xil para o íon Zn. Inicialmente, o perfil para todas as esferas formuladas foi rápido, devido à liberação do ativo não encapsulado, e posteriormente tornou-se mais lento com o passar do tempo. Também foi possível notar diferença no comportamento de liberação dependendo do tipo de esfera, nota-se que a adição na Xil modificou o comportamento de liberação. Esses resultados mostram que todas as esferas produzidas possuem capacidade para atuar como sistemas de liberação de ativos.



**Figura 24.** Cinética de liberação *in vitro* de íons Zn das esferas de hidrogel: A) Esfera de matriz AS; B) Esfera de matriz AS/Xil. Determinação em triplicata (n=3).

Da mesma forma, o perfil de liberação e a viabilidade de *A. brasilense* das esferas híbridas em meio aquoso foi investigado (**Figura 25**). É possível notar que a liberação das esferas híbridas constituídas pela mescla entre AS/Xil é maior do que a das esferas AS híbridas. Essa diferença pode ser atribuída à presença de um maior número de poros que as AS/Xil contêm e também à maior afinidade que os microrganismos têm em degradar a Xil [58, 95, 245]. Nota-se também que a viabilidade de *A. brasilense* é reduzida sem o encapsulamento realizado pelas esferas.

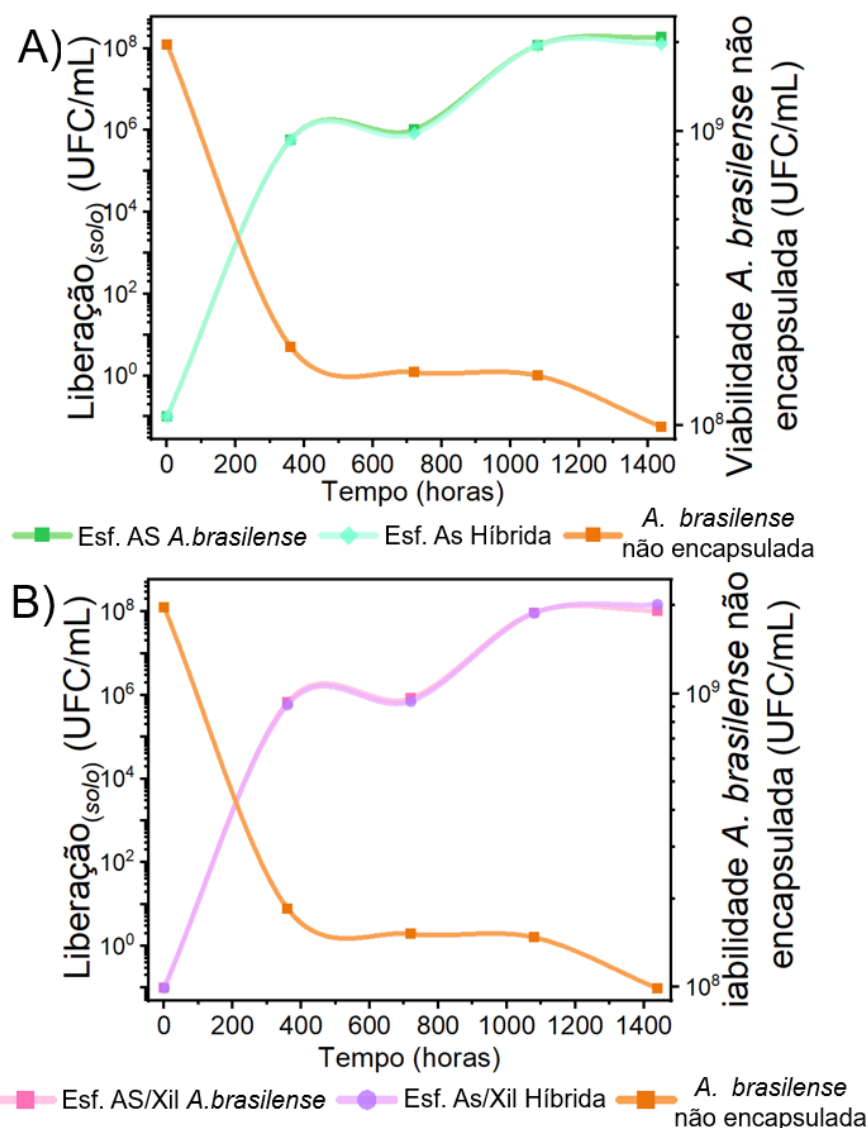


**Figura 25.** Cinética de liberação *A. brasilense* das esferas híbridas em meio aquoso. Determinação em triplicata (n=3).

O perfil de liberação das *A. brasilense* no solo também foi avaliado. Na **Figura 26-A** é apresentado o perfil de liberação da *A. brasilense* encapsulada em esferas composta por AS enquanto na **Figura 26-B** é apresentado o perfil de liberação das *A. brasilense* esferas compostas pela mescla AS/Xil. No mesmo gráfico também é possível observar a viabilidade das bactérias sem o encapsulamento na esfera, com o intuito de verificar a viabilidade das bactérias.

O perfil de liberação de *A. brasilense* no solo foi semelhante em ambos os tipos de esfera, a adição da Xil não influenciou a liberação no solo. Isso pode estar relacionado à eficiência de encapsulamento mais baixa obtida pelas esferas que encapsularam *A.*

*brasiliense*. Também foi possível notar que a viabilidade das esferas não encapsuladas reduziu drasticamente.



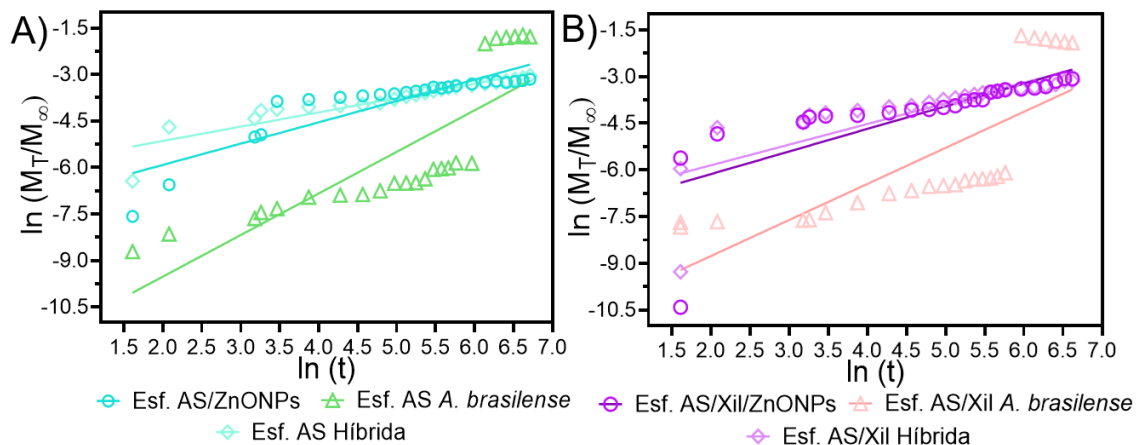
**Figura 26.** Cinética de liberação *A. brasiliense* no solo das esferas de hidrogel: A) Esfera de matriz AS; B) Esfera de matriz AS/Xil. Determinação em triplicata (n=3).

A análise do mecanismo de liberação de ativos pode ser uma ferramenta poderosa para desenvolver novas formas de dosagem de ingredientes ativos para a agricultura, e assim fornecer informações importantes a respeito dos fatores que governam a liberação destes ativos [304]. Portanto, alguns modelos matemáticos foram testados, conforme descrito pelas equações representadas na **Tabela 1**, e o modelo que apresentou coeficiente de correlação ( $R^2$ ) mais próximo de 1 foi o escolhido para representar tais sistemas (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Modelos matemáticos de cinética aplicados ao perfil de liberação de ativos nas diferentes esferas de hidrogel.

Esferas de Hidrogel	Modelos (R <sup>2</sup> )				
	Ordem zero	Primeira Ordem	Higuchi	Korsmeyer-Peppas	Hickson-Crowell
Esf. AS/ZnONPs	0,7250	0,8400	0,6647	0,9771	0,3997
Esf. AS <i>A. brasilense</i>	0,8025	0,7263	0,5810	0,9527	0,8776
Esf. AS Híbrida	0,9290	0,0991	0,8019	0,9823	0,5870
Esf. AS/Xil/ZnONPs	0,9374	0,1026	0,7984	0,98361	0,6448
Esf. AS/Xil <i>A. brasilense</i>	0,7776	0,7061	0,6196	0,9589	0,8575
Esf. AS/Xil Híbrida	0,9466	0,0993	0,7979	0,9820	0,6197

O modelo semi-empírico de Korsmeyer-Peppas (**Figura 27**) foi o que apresentou melhor r<sup>2</sup>. Neste contexto, a partir das curvas de liberação, e em função deste modelo foram realizadas regressões lineares a fim de se determinar os valores da constante cinética de liberação (k), bem como o coeficiente de correlação linear (r), e, portanto, o expoente da liberação (n) foram calculados (**Tabela 4**).



**Figura 27.** Modelagem matemática segundo o modelo de Korsmeyer Peppas.

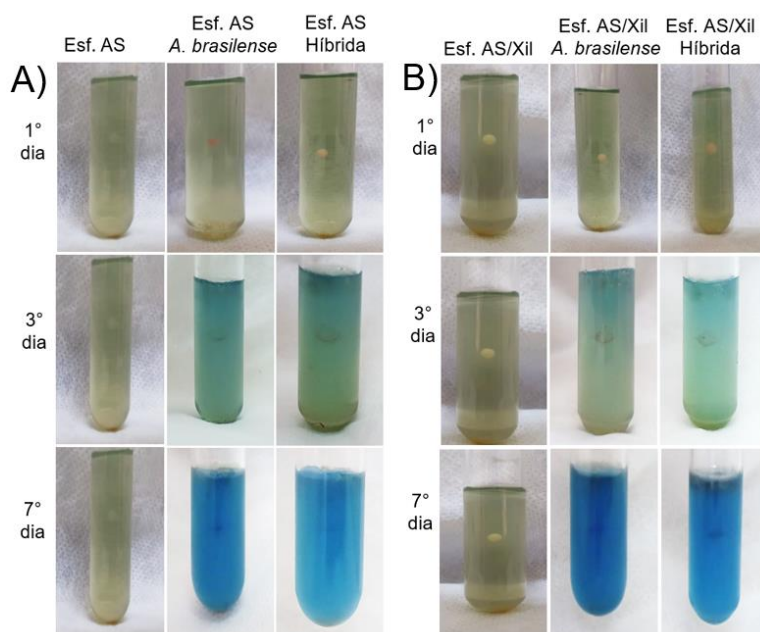
**Tabela 4.** Dados referentes a modelagem matemática segundo Korsmeyer Peppas.

<b>Esferas de Hidrogel</b>	<b>Constante de liberação (k)</b>	<b>Expoente de liberação (n)</b>	<b>Equação da reta</b>
Esf. <b>AS</b> /ZnONPs	$4,59 \times 10^{-3}$	0,69	$Y = 0,6870 * X - 7,287$
Esf. <b>AS</b> <i>A. brasilense</i>	$6,08 \times 10^{-6}$	1,34	$Y = 1,341 * X - 12,20$
Esf. <b>AS</b> Híbrida	$8,91 \times 10^{-3}$	0,46	$Y = 0,4612 * X - 6,063$
Esf. <b>AS/Xil</b> /ZnONPs	$1,7 \times 10^{-2}$	0,73	$Y = 0,7260 * X - 7,586$
Esf. <b>AS/Xil</b> <i>A. brasilense</i>	$6,14 \times 10^{-6}$	1,16	$Y = 1,158 * X - 11,08$
Esf. <b>AS/Xil</b> Híbrida	$6,80 \times 10^{-3}$	0,66	$Y = 0,6638 * X - 7,180$

O valor do expoente da liberação (n), é quem indica o tipo de mecanismo que está envolvido na liberação, assim os valores de n são variados, e ajudam a interpretar o mecanismo de liberação que ativos são liberados de esferas poliméricas. Assim sendo, quando n é igual a 0,45, o mecanismo principal que controla a liberação do ativo no sistema é a difusão pura (difusão Fickiana clássica), quando o n assume o valor 0,89, a equação corresponde a cinética de liberação de ordem zero, sendo a liberação controlada por mecanismo de transporte de Caso II, ou seja, pelo fenômeno de intumescimento (relaxamento da matriz ou liberação mediante erosão). Outros valores de n ( $0,45 < n < 0,89$ ) indicam cinética de transporte anômalo, ou seja, uma combinação dos dois mecanismos de difusão e de transporte de Caso II, os valores de  $n > 0,89$  é referente mecanismo de transporte super caso-II, que consiste em fenômenos de inchamento/relaxamento da matriz, na qual envolve a transição de um estado semi-rígido a outro mais flexível, como processos determinantes na liberação de ativos [305, 306]. Em nosso sistema, os valores de n para a liberação do íon Zn associados as esferas estão compreendidos entre 0,46 e 0,73, indicando que a liberação foi governada pelo mecanismo de transporte anômalo. Já os valores de n para as *A. brasilense* estão entre 1,16 e 1,34, indicando que o mecanismo que governa é o de transporte super caso-II. Esses diferentes tipos de mecanismos mostram que o perfil de liberação foi modificado de acordo com o ingrediente ativo associado as esferas.

A liberação de *A. brasilense* das esferas também pode ser visualizada qualitativamente pela mudança de cor do meio NFB. Este meio é produzido em pH 6,8 e

possui coloração em tons de verde. A liberação de *A. brasilense* para o meio provoca uma alteração no pH, que se eleva para 7, tornando o meio azul. As **Figuras 28-A e 28-B** mostram a liberação das esferas AS e a liberação das esferas AS/Xil.



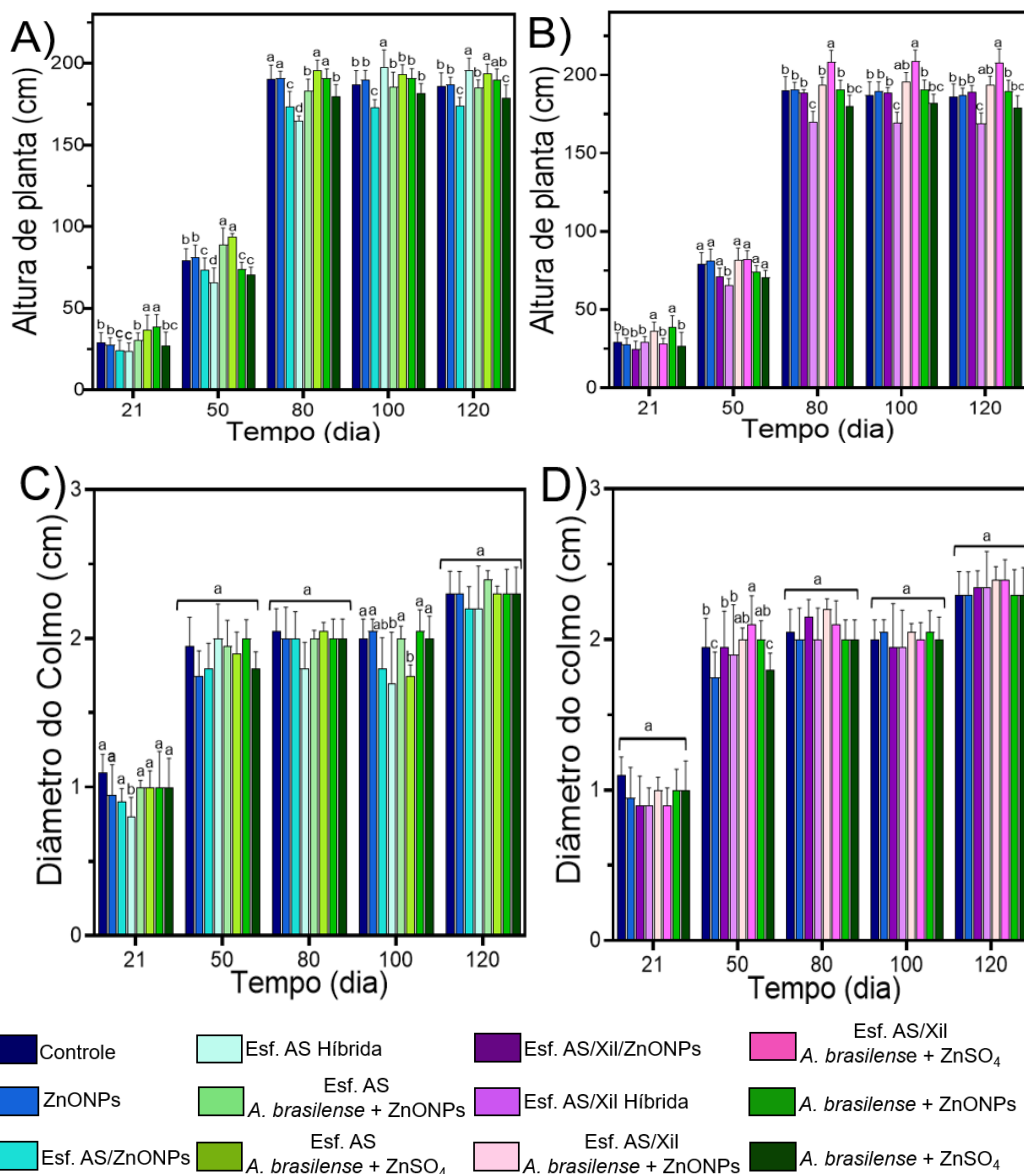
**Figura 28.** Liberação gradativa de *A. brasilense* contido nas esferas para o meio NFB. A) Esferas de AS; B) Esferas de AS/Xil.

### 3.5 Efeito das esferas em plantas

#### 3.5.1 Desenvolvendo de plantas

Os diferentes tipos de esferas produzidas foram aplicados na cultura de milho com o objetivo de avaliar os efeitos da formulação em condições reais. Após o crescimento das plantas foram avaliados parâmetros físicos e bioquímicos do vegetal. As medidas de altura das plantas, por exemplo, podem ser vistas nas Figuras 29-A e 29-B, sendo o tratamento A referente as esferas constituídas de XS e o tratamento B para AS/XIL. Já nas figuras 29-C e 29-D, são apresentados os diâmetros do colmo das plantas expostas as diferentes formulações. De modo geral, em comparação ao controle, os tratamentos que tiveram maior desenvolvimento no crescimento das plantas, foram os tratamentos com as esferas que encapsularam *A. brasilense*, tanto nas esferas AS quanto nas AS/Xil. Isso ocorre porque, ao encapsular as BPCV nas esferas, elas ficam protegidas, mantendo-se viáveis por mais tempo e atuando de forma mais eficiente na planta. No entanto, os efeitos foram mais pronunciados nas esferas que continham AS/Xil, o que pode ser explicado pelo fato de que a Xil serve como fonte de açúcares para *A. brasilense*, aumentando a atividade microbiana. Comparando os efeitos das esferas que encapsularam apenas

ZnONPs, observou-se uma redução no crescimento em relação ao controle, principalmente para as esferas de AS/ZnONPs. Isso sugere que a menor biodegradação das esferas AS/ZnONPs resulta em uma liberação mais lenta do zinco, prejudicando o crescimento da planta. Entre as esferas híbridas, a AS híbridas demonstrou um efeito de crescimento mais significativo a partir do 100º dia de observação, enquanto a AS/Xil híbrida apresentou efeitos negativos em todas as medições de altura da planta. Esses resultados sugerem que, ao associar as ZnNPs nas esferas, a disponibilidade de Zn diminuiu, indicando que a liberação de Zn foi tardia. Além disso, a presença de *A. brasilense* na AS híbridas podem ter contribuído para esse efeito.

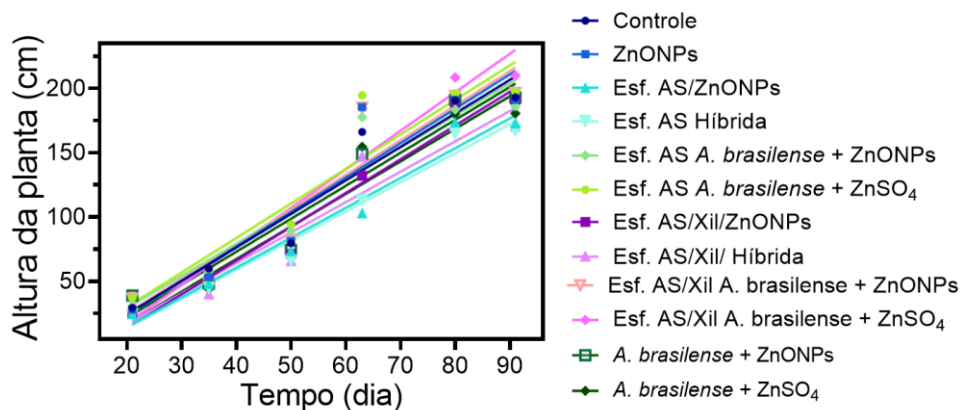


**Figura 29.** Parâmetros biométricos do desenvolvimento do milho: A) Medidas de altura da planta expostas às esferas AS; B) Medidas de altura da planta expostas às esferas AS/Xil; C) Medidas de diâmetro do colmo expostas às esferas AS; D) Medidas de

diâmetro do colmo expostas às esferas AS/Xil. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

Em relação às médias do diâmetro do colmo, quase não houve diferença significativa. As diferenças observadas nos tratamentos com SA foram entre os tratamentos contendo esferas AS híbridas e as esferas AS contendo *A. brasilense*, que continham ZnSO<sub>4</sub> fora da esfera, embora com um efeito negativo. Por outro lado, para as esferas AS/Xil com *A. brasilense* que continham ZnSO<sub>4</sub> fora da esfera, o efeito foi positivo.

A análise de regressão apresentada na **Figura 30** foi utilizada para investigar se houve uma resposta linear no crescimento das plantas em função dos diferentes tipos de tratamentos aplicados ao longo do tempo. É possível notar que todos os tratamentos, responderam linearmente.



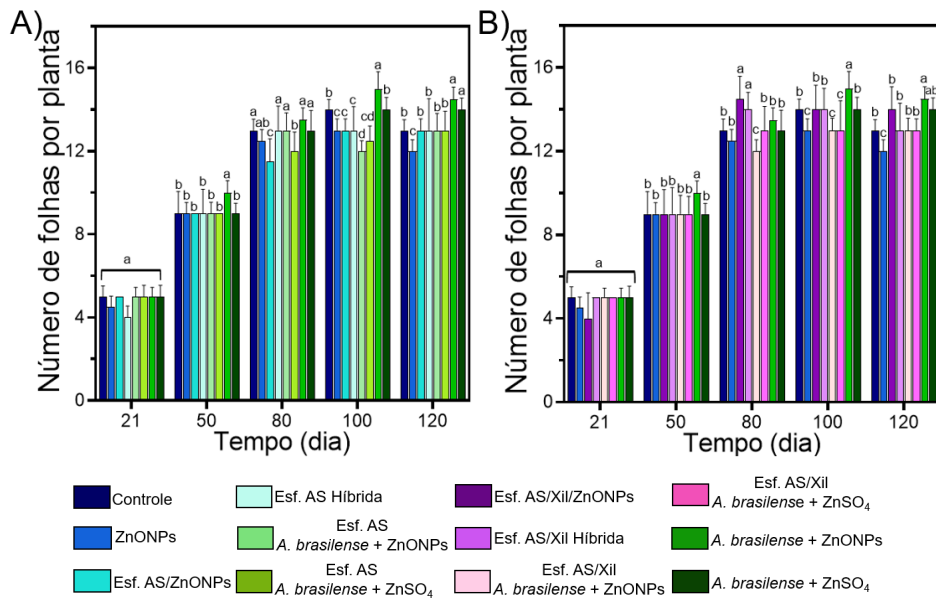
**Figura 30.** Análise de regressão linear do tamanho das plantas com diferentes tratamentos.

Na **Tabela 5**, é possível observar que os tratamentos que influenciaram o crescimento das plantas com resposta linear foram, principalmente, aqueles que continham ZnONPs encapsuladas nas esferas, tanto nas constituídas por AS quanto nas constituídas pela mescla AS/Xil. Esses resultados indicam que o ZnONPs contido nas esferas foi preservado, permanecendo disponível por mais tempo no solo. Isso ocorre porque o Zn é facilmente adsorvido pelo solo, tornando-se indisponível para as plantas antes do desenvolvimento das raízes [307-309].

**Tabela 5.** Análise de regressão linear do crescimento da planta.

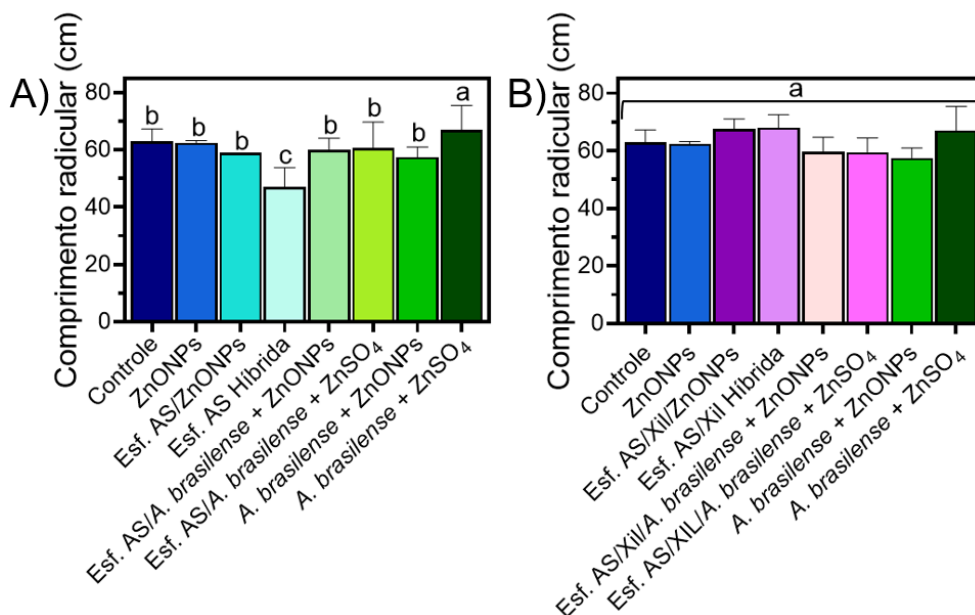
Esferas de Hidrogel	Crescimento de planta	R <sup>2</sup>
Controle	Y = 2,607*X - 28,09	0,9310
ZnONPs	Y = 2,679*X - 30,17	0,8832
Esf. AS/ZnONPs	Y = 2,321*X - 32,25	0,9632
Esf. AS Híbrida	Y = 2,265*X - 31,77	0,9672
Esf. AS <i>A. brasilense</i> + ZnONPs	Y = 2,498*X - 20,86	0,9012
Esf. AS <i>A. brasilense</i> + ZnSO <sub>4</sub>	Y = 2,686*X - 23,89	0,8759
Esf. AS/Xil/ZnONPs	Y = 2,627*X - 39,12	0,9630
Esf. AS/Xil Híbrida	Y = 2,365*X - 30,49	0,9132
Esf. AS/Xil <i>A. brasilense</i> + ZnONPs	Y = 2,692*X - 28,90	0,8850
Esf. AS/Xil <i>A. brasilense</i> + ZnSO <sub>4</sub>	Y = 2,997*X - 42,82	0,9171
<i>A. brasilense</i> + ZnONPs	Y = 2,564*X - 29,72	0,9355
<i>A. brasilense</i> + ZnSO <sub>4</sub>	Y = 2,533*X - 34,10	0,9235

Uma das formas de avaliar o desenvolvimento do milho é a observação do número de folhas, pois as folhas são indicadoras do crescimento da planta e da sua capacidade de fotossíntese. Na **Figura 31-A**, é mostrado o número de folhas das plantas cultivadas com esferas AS, e na **Figura 31-B** com esferas AS/Xil. Entre os tratamentos realizados com as esferas, apenas os tratamentos AS/Xil/ZnONPs e AS/Xil híbrida no 80° dia tiveram um efeito maior do que o controle. Nos demais dias, todos os tratamentos com outros tipos de esferas apresentaram resultados iguais ou inferiores ao controle. Entre os efeitos iguais ou inferiores, estão os tratamentos realizados com AS/ZnONPs no 80° dia.



**Figura 31.** Análise do número de folhas: A) Contagem dos números de folhas tratadas com esferas AS; B) Contagem dos números de folhas tratadas com esferas AS/Xil. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

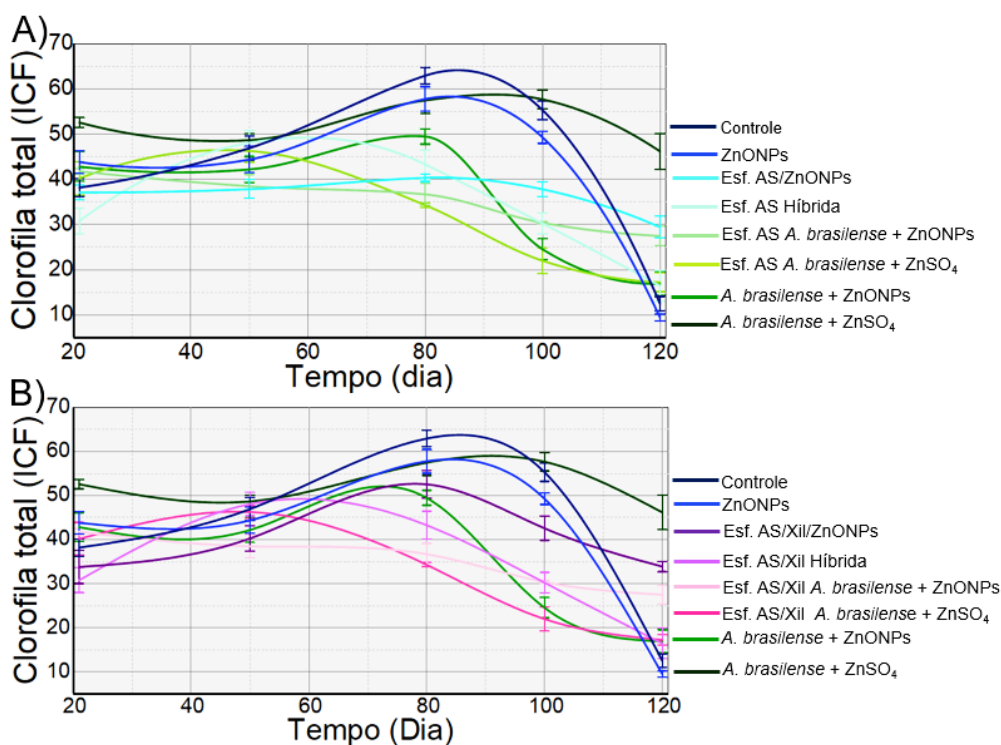
A análise biométrica de comprimento radicular permite investigar qual tratamento proporciona maior crescimento radicular. Na **Figura 32-A**, estão os tratamentos com AS, e na **Figura 32-B**, estão os tratamentos com AS/Xil. Em nosso ensaio, não houve crescimento significativo nos tratamentos com as esferas em ambos os sistemas. Exceto o tratamento AS híbrida, que apresentou um efeito menor que o controle.



**Figura 32.** Análise do sistema radicular: A) Comprimento radicular das plantas tratadas com esferas AS; B) Comprimento radicular das plantas tratadas com esferas AS/Xil. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo

teste de Tukey a 5% de significância. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

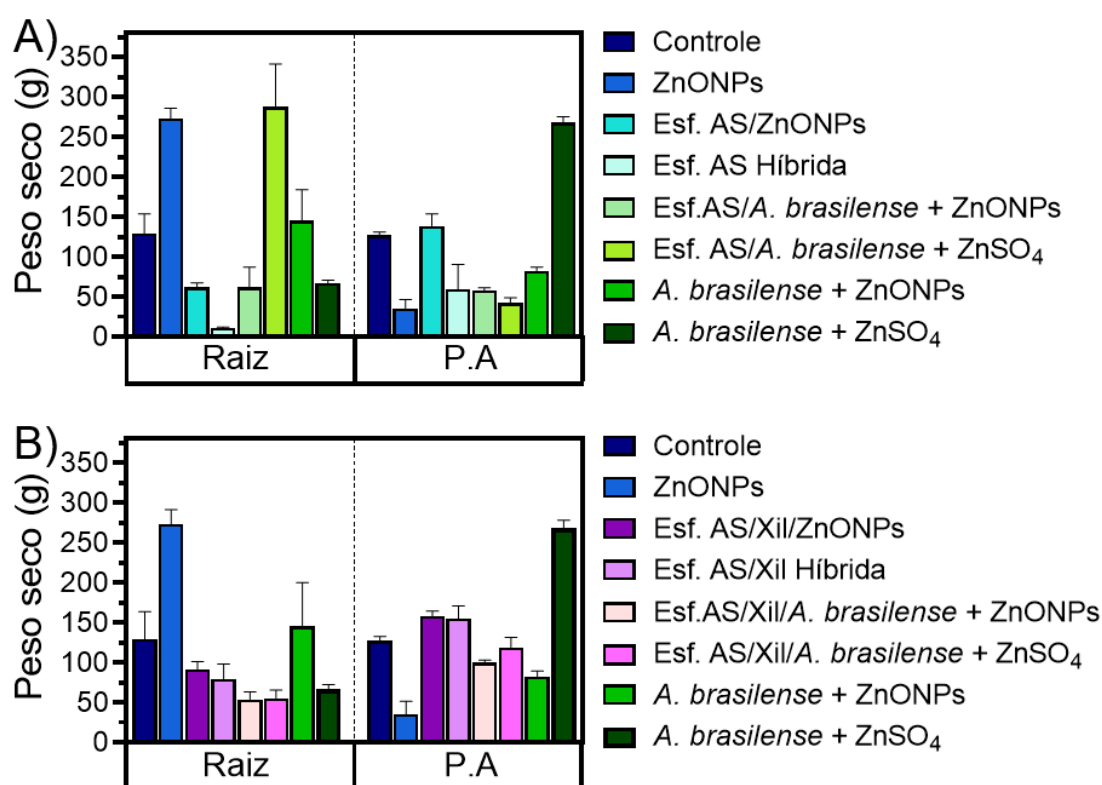
A análise de clorofila permite identificar quais tratamentos estão sendo mais eficientes, pois pode ser relacionado a taxa de fotossíntese no vegetal. As **Figuras 33-A** e **33-B** representam os tratamentos das esferas constituídas por AS e AS/XIL, respectivamente. Os resultados revelam que nenhum dos tratamentos com as esferas foi superior ou igual ao controle até a medida no 100º dia em ambos os tipos de esferas. No entanto, na medida do 120º dia, os tratamentos que continham a maior quantidade de clorofila foram os que incluíam esferas ZnONPs em ambos os sistemas, como evidenciado na **Figura 39**, onde os tratamentos com as esferas contendo ZnONPs apresentam coloração em tons mais verdes. Isso pode indicar que a liberação de Zn foi tardia, sendo evidente apenas no final do experimento. O tratamento que se igualou ou foi superior ao controle foi o de *A. brasilense* + ZnSO<sub>4</sub> não encapsulado nas esferas.



**Figura 33.** Análise da clorofila total: A) Plantas tratadas com esferas AS; B) Plantas tratadas com esferas AS/Xil. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

A análise de rendimento por massa seca, que avaliou o peso da parte aérea e o peso da parte radicular das plantas, permitiu determinar qual parte mais se beneficiou com os tratamentos. Na **Figura 34-A**, são apresentados os tratamentos realizados com as

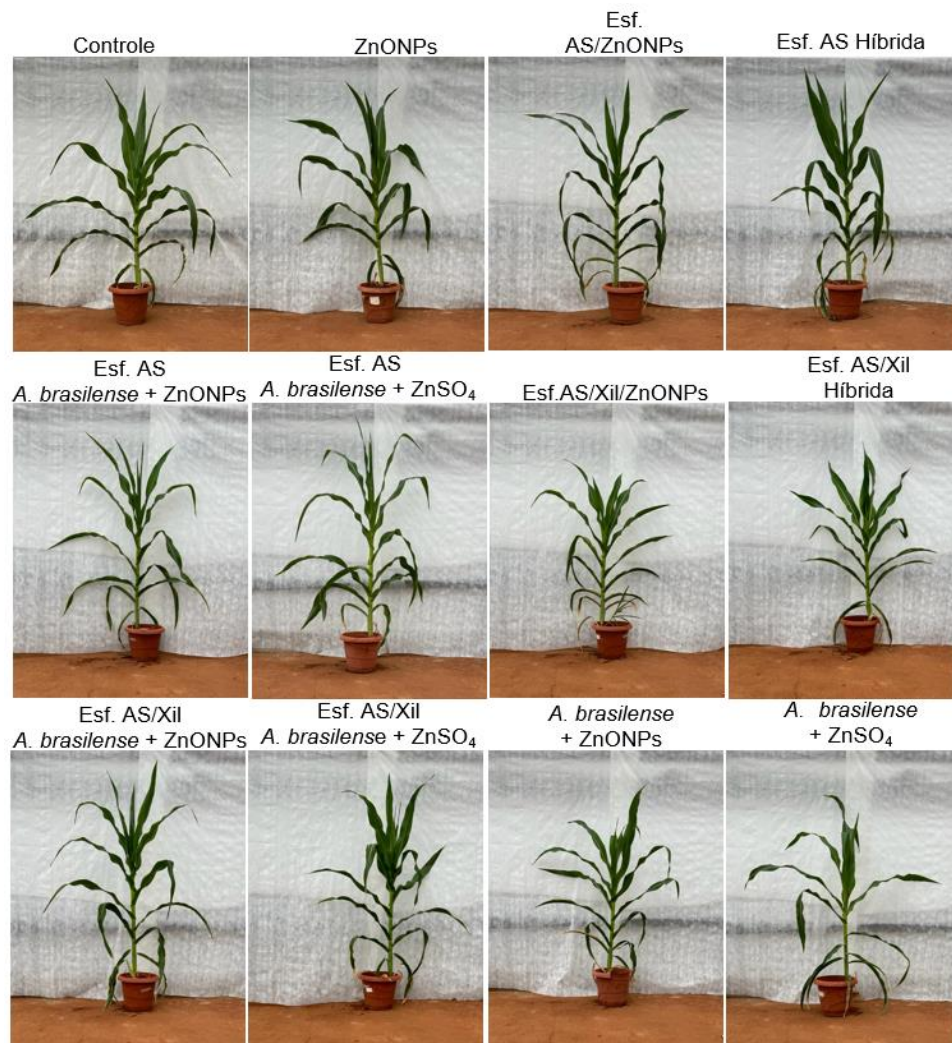
esferas AS. Observou-se um aumento na massa seca da parte radicular nos tratamentos com esferas AS. Em contrapartida, o tratamento com as esferas da mescla AS/Xil demonstrou maior rendimento na parte aérea. Portanto, uma maior massa seca da parte aérea indica que o sistema com as esferas de Xil é mais eficaz. Isso também sugere que a capacidade das esferas AS/Xil em promover o crescimento e a produção da planta é maior. Outro resultado destacado foi que as ZnONPs não encapsuladas nas esferas apresentaram uma maior massa seca na raiz, pois o maior teor de Zn se dá na parte onde ele é inicialmente absorvido. Isso sugere que a liberação de Zn tenha sido lenta, pois o Zn normalmente é adsorvido pelo solo rapidamente [307-309] ou foi internalizado no vegetal, aumentando o desenvolvimento das raízes.



**Figura 34.** Análise de rendimento por massa seca do peso da parte aérea e do peso da parte Radicular: A) Plantas tratadas com esferas AS; B) Plantas tratadas com esferas AS/Xil. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

A observação qualitativa do desenvolvimento das plantas de milho ao longo do tempo é fundamental para entender como a formulação influencia no processo de crescimento do vegetal. Essa análise permite visualizar as mudanças morfológicas e funcionais no desenvolvimento das plantas. Na **Figura 35**, é possível observar o

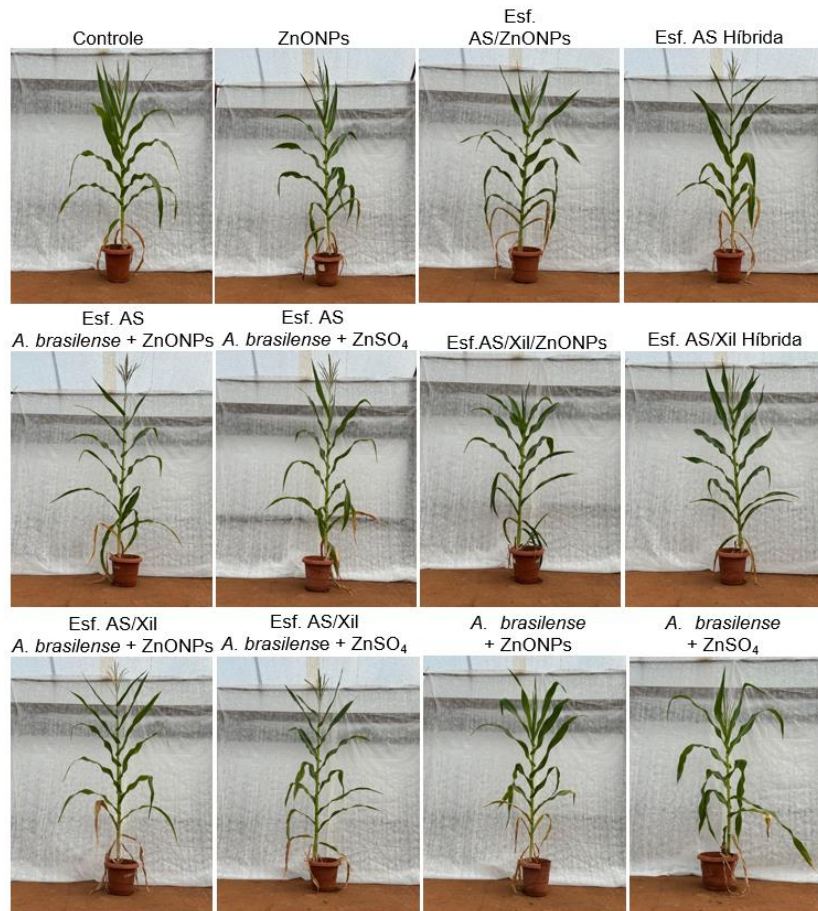
crescimento das plantas após 21 dias de semeadura, quando elas se encontram no estágio V5 da fase do desenvolvimento vegetativo. É possível notar que todos os tratamentos foram bem-sucedidos, com folhas completamente estendidas. Além disso, é possível observar que, na planta AS/Xil/ZnONPs, surgiu um novo broto na lateral da planta matriz. Isso, nesta fase, é um indício de que a planta está saudável. No entanto, esse broto pode ser prejudicial, pois pode competir com a planta matriz por nutrientes e recursos como água, luz solar e espaço.



**Figura 35.** Avaliação do crescimento das plantas de milho 21 dias após a semeadura.

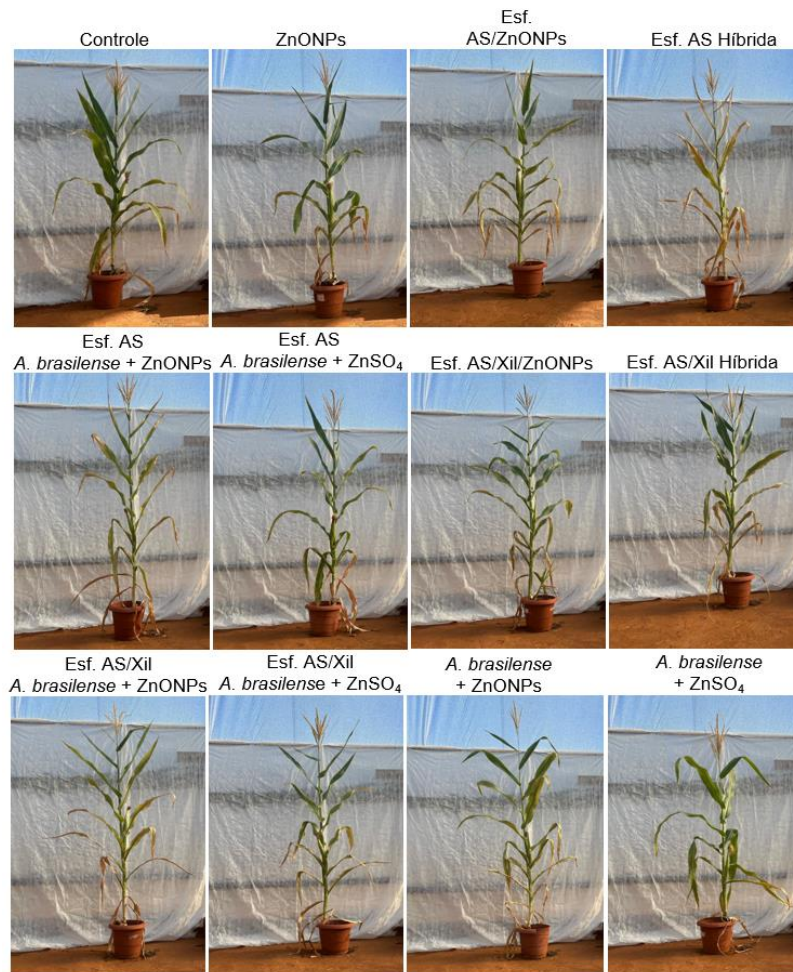
Na **Figura 36**, é possível observar o crescimento da planta após 50 dias de semeadura. Nota-se que, nesta fase, todas as plantas de todos os tratamentos já emitiram o pendão, que é a parte masculina da planta. Esse pendão é fundamental para a reprodução, pois é responsável pela produção das flores e, conseqüentemente, dos grãos de milho. Exceto a planta com o tratamento AS/Xil/ZnONPs, que contém um broto

lateral. Esse broto lateral prejudicou o desenvolvimento da planta, pois compete com o pendão por nutrientes. Também é possível notar que algumas folhas estão secas, e isso pode ser em decorrência das altas temperaturas enfrentadas durante o estudo.



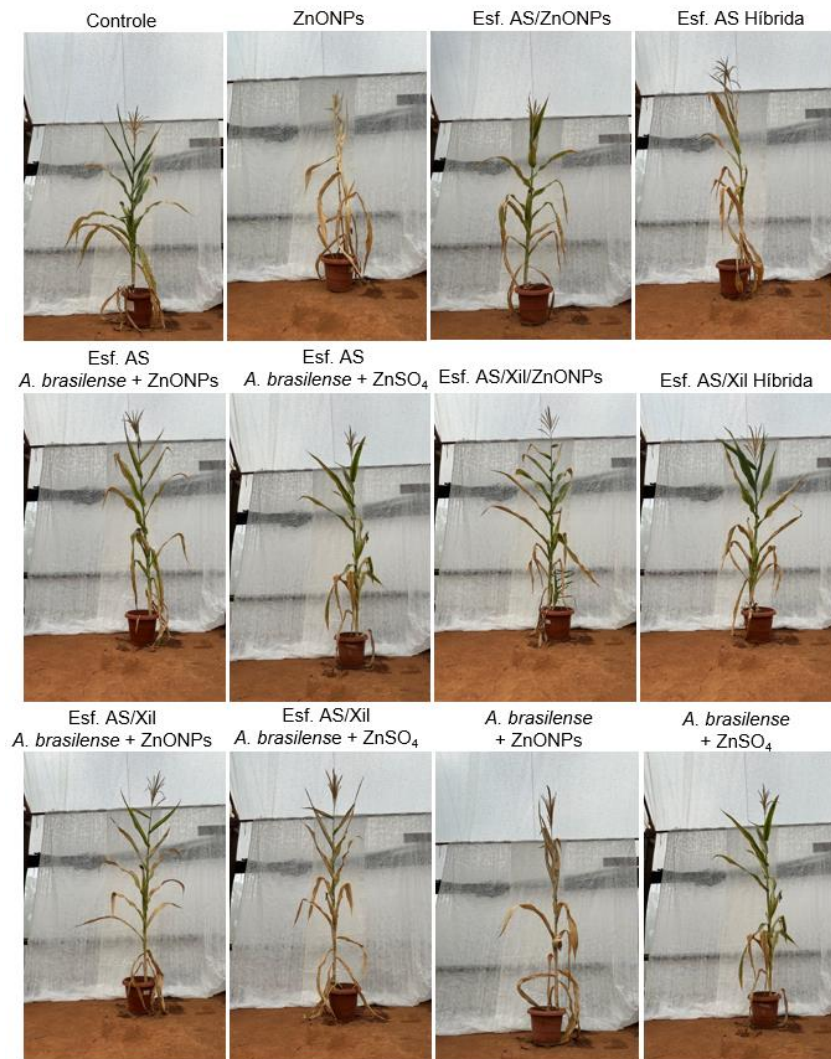
**Figura 36.** Avaliação do crescimento das plantas de milho 50 dias após a semeadura.

Na **Figura 37**, é possível observar o crescimento da planta após 80 dias de semeadura. Esta fase é crucial para a reprodução, pois tanto a parte masculina (pendão) quanto a feminina (espiga) estão bem formadas, iniciando assim o processo de polinização para a produção de grãos. É possível notar que em todos os tratamentos já se tem espigas.



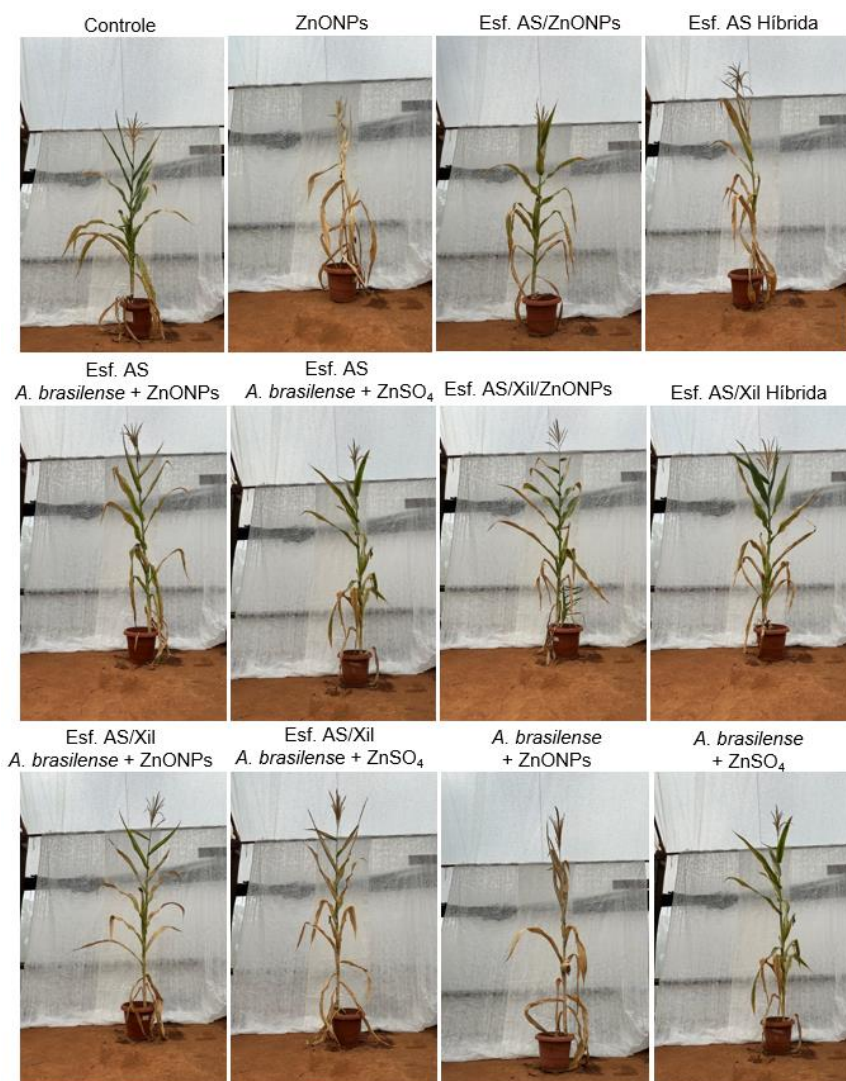
**Figura 37.** Avaliação do crescimento das plantas de milho 80 dias após a sementeira.

Na **Figura 38**, é possível observar o crescimento da planta após 100 dias de sementeira. Nesta fase ocorre o desenvolvimento do grão. E isso faz com que todos os recursos e nutrientes sejam principalmente para a granação e não para a planta. Nota-se que todas as plantas apresentaram folhas secas. Também pode ser observado que o tratamento realizado com ZnONPs não encapsulado na esfera está completamente seco (murcho). Isso pode indicar que a presença de ZnONPs sem encapsulamento pode ser tóxica ao vegetal.



**Figura 38.** Avaliação do crescimento das plantas de milho 100 dias após a semeadura.

Por fim é observado na **Figura 39** o último dia do experimento, após 120 dias da semeadura. Esta é a fase da maturação do grão. Nota-se que quase todas as plantas estão secas.



**Figura 39.** Avaliação do crescimento das plantas de milho 120 dias após a semeadura.

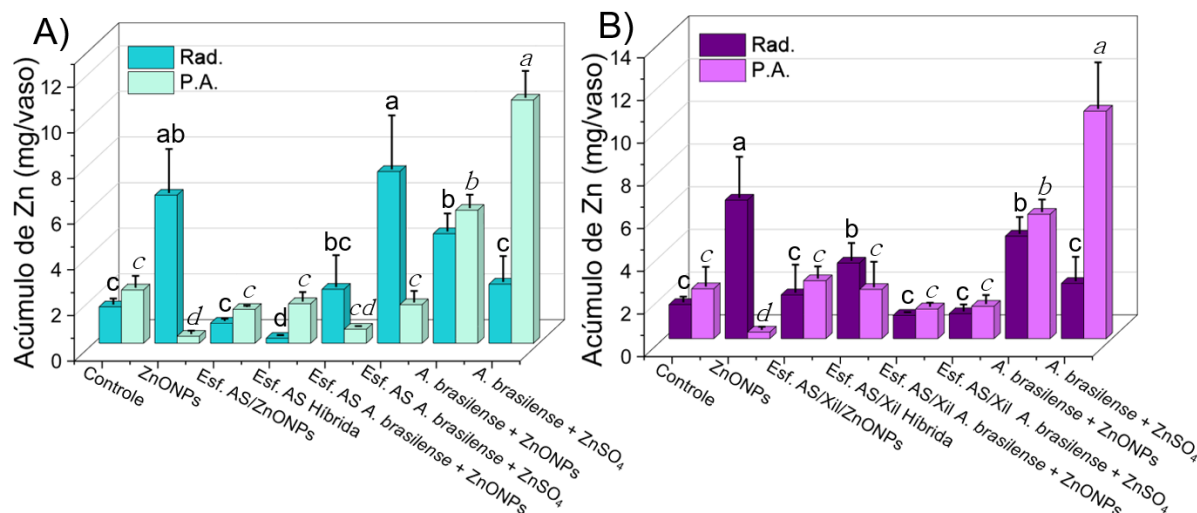
### 2.6.2 Nutrição das plantas

A análise de nutrição das plantas foi realizada apenas na quantificação do micronutriente Zn, que é o foco do nosso estudo. Sintetizamos ZnONPs para observar seus efeitos nas plantas, considerando seu encapsulamento nas esferas e sua associação com *A. brasilense*. A quantidade de Zn acumulada foi medida tanto na parte aérea quanto nas raízes das plantas, permitindo avaliar em qual parte se concentrava mais o Zn que foi absorvido pela planta. Na **Figura 40 -A**, são apresentados os resultados dos tratamentos feitos com as esferas compostas por AS. Observa-se que, entre os tratamentos nas raízes, o que apresentou o maior acúmulo em relação ao controle foi o tratamento com a esfera AS *A. brasilense* + ZnSO<sub>4</sub> (não encapsulado nas esferas), devido ao fato das *A. brasilense* serem solubilizadoras de Zn e interagirem diretamente nas raízes [17, 186, 252, 308].

Seguido pelo tratamento com ZnONPs não encapsulados. E isso se deve ao fato de que as raízes contêm maiores teores de zinco do que na parte aérea, principalmente em solos ricos desse elemento [310]. Além disso, deve-se levar em consideração o fato de que uma grande parte do Zn é armazenada nas raízes das plantas e com pouco movimento para as partes aéreas [311]. Nossos resultados sugerem que a liberação de Zn das esferas tenha sido lenta, já que o Zn se encontrava aprisionado nas esferas, resultando em um menor teor de Zn na parte aérea. Em contrapartida, as esferas AS híbridas apresentaram o menor valor de acúmulo para a parte radicular, para a parte aérea o menor teor de Zn, foi para as ZnONPs não encapsulada nas esferas.

A menor absorção de Zn observada foi nas esferas AS híbridas. Os maiores valores de acúmulos se deram para aqueles tratamentos que continham Zn não encapsulado, o Zn já estava disponível no solo na forma de íons ou nanopartículas, enquanto o Zn na esfera AS híbridas estavam retidas na matriz. Da mesma forma, na parte aérea, o maior acúmulo de Zn foi encontrado no tratamento que continha a fonte de Zn não encapsulada. E também os maiores valores foram para os tratamentos que continham *A. brasilense*, devido ao seu potencial de solubilizar o Zn [17, 125]. Em geral, tanto para os tratamentos com a esfera AS quanto para os tratamentos com a esfera produzida pela mescla AS/Xil (**Figura 40-B**), os maiores valores de acúmulo de Zn foram observados naqueles que não continham Zn encapsulado. Isso sugere que a liberação de Zn das esferas foi lenta, não sendo positiva para a cultura do milho.

Observou-se também que os maiores valores de acúmulo de Zn, em relação ao controle, tanto na parte aérea quanto nas raízes, foram encontrados nas plantas que foram tratadas com *A. brasilense*, indicando que essas PBCV contribuíram para uma maior absorção [308]. Entre as esferas híbridas, as que continha Xil em sua matriz apresentou um maior acúmulo de Zn. Ao correlacionar esses resultados com altura da planta (**Figura 29 A-B**) e o peso seco da parte aérea (**Figura 34 A-B**), é possível notar, que os tratamentos com as esferas híbridas AS/Xil resultaram em menores valores de alturas de planta, mas um maior rendimento de peso na parte aérea, ao contrário dos tratamentos com as esferas AS híbrida. Isso indica que, embora a altura não tenha sido maior, as plantas mostraram-se mais robustas, apresentando maiores rendimentos de peso seco. Além disso, o maior acúmulo de Zn na raiz pode indicar que *A. brasilense* solubilizaram Zn, tornando o nutriente mais disponível para sua absorção, indicando que isso pode ter ocorrido devido ao fato de *A. brasilense* terem maior afinidade pelas esferas AS/Xil, as quais correspondem a maior biodegradação no solo.



**Figura 40.** Acúmulo de Zn na parte aérea e no sistema radicular em dois tratamentos: A) Esferas de AS; B) Mescla de esferas AS/Xil. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

### 3.6.4 Fertilidade do Solo

A análise da fertilidade do solo foi fundamental para determinar a disponibilidade de nutrientes. Assim, permite identificar deficiências ou excessos de nutrientes. Neste sentido, foi realizada a análise de fertilidade antes e depois do experimento. A **Tabela 5** apresenta os dados da fertilidade antes do início do experimento.

**Tabela 5.** Dados de fertilidade do solo antes do experimento

pH	MO (g/dm <sup>3</sup> )	P (mg/dm <sup>3</sup> )	K (mmolc/dm <sup>3</sup> )	Ca (mmolc/dm <sup>3</sup> )	Mg (mmolc/dm <sup>3</sup> )	H+Al (mmolc/dm <sup>3</sup> )	Al (mmolc/dm <sup>3</sup> )
5,7	13	2	0,5	14	10	15	0

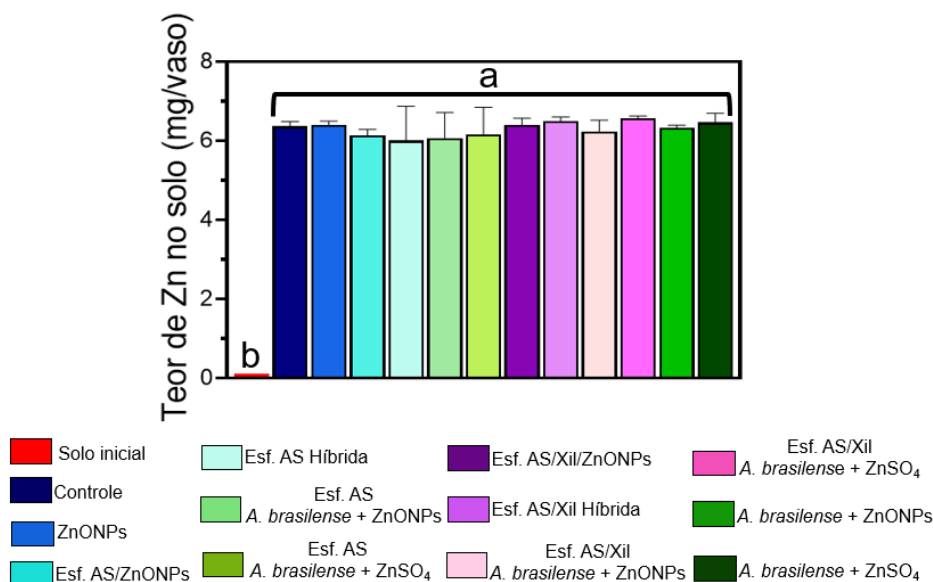
Na **Tabela 6**, são mostrados os resultados após os tratamentos (após 120 dias). É possível notar um aumento de pH em todos os tratamentos, incluindo o controle, o que pode reduzir a absorção de Zn pela planta, já que em pH 7 pode causar deficiência de Zn na planta [312]. Além disso, foi observado que os tratamentos que continham *A. brasilense* não encapsulada e os tratamentos com a esfera AS/Xil *A. brasilense* apresentaram o maior aumento de pH, sugerindo liberação de *A. brasilense*. Isso corrobora com os resultados do ensaio qualitativo utilizando o meio NFB, no qual *A.*

*brasiliense* demonstrou potencial para alterar o pH, evidenciado pela mudança de coloração.

**Tabela 6.** Dados de fertilidade do solo depois do experimento

<b>Tratamento</b>	<b>pH</b>	<b>MO (g/dm<sup>3</sup>)</b>	<b>P (mg /dm<sup>3</sup>)</b>	<b>K (mmolc/ dm<sup>3</sup>)</b>	<b>Ca (mmolc /dm<sup>3</sup>)</b>	<b>Mg (mmolc /dm<sup>3</sup>)</b>	<b>H+Al (mmolc /dm<sup>3</sup>)</b>	<b>Al (mmolc /dm<sup>3</sup>)</b>
<b>Controle</b>	6.5	13	111	1.1	28	15	10	0
<b>ZnONPs</b>	6.5	11	41	0.9	22	11	9	0
<b>Esf. AS/ZnONPs</b>	6.5	12	60	0.9	25	14	9	0
<b>Esf. AS Híbrida</b>	6.4	11	70	0.8	22	11	9	0
<b>Esf. AS/ A. brasiliense + ZnONPs</b>	6.4	13	143	1.1	29	16	10	0
<b>Esf. AS/ A. brasiliense + ZnSO<sub>4</sub></b>	6.2	12	121	0.9	26	16	10	0
<b>Esf. AS/Xil/ ZnONPs</b>	6.5	12	62	0.9	30	23	9	0
<b>Esf. AS/Xil Híbrida</b>	6.7	12	93	0.9	25	14	9	0
<b>Esf. AS/Xil/ A.brasiliense + ZnONPs</b>	6.7	11	85	0.9	23	13	9	0
<b>Esfera AS/XIL/ A. brasiliense + ZnSO<sub>4</sub></b>	7	13	98	1.1	30	19	8	0
<b>A. brasiliense + ZnONPs</b>	6.9	11	80	1.0	33	25	8	0
<b>A. brasiliense + ZnSO<sub>4</sub></b>	6.9	13	81	1.0	27	18	8	0

O teor de Zn no solo foi avaliado antes e depois dos tratamentos. Inicialmente, o solo apresentava um teor de Zn de apenas 0,1 mg/vaso. Os resultados apresentados na **Figura 40** indicam um aumento significativo no teor de Zn após a realização de todos os tratamentos. No entanto, estatisticamente, não ocorreram mudanças significativas entre os tratamentos, diferenciando-se apenas do solo inicial.



**Figura 41.** Teor de Zn no solo antes e depois dos tratamentos. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

#### 4- Conclusão

Neste capítulo, abordamos o desenvolvimento das esferas híbridas, destacando suas características e interações com ZnONPs e *A. brasilense*. Os resultados apresentados mostraram que as esferas híbridas encapsularam com sucesso tanto as ZnONPs quanto *A. brasilense*. Também demonstraram que a adição da Xil influenciou tanto a atividade biológica quanto o comportamento da liberação. Estudos em milho mostraram que as esferas podem melhorar o crescimento do vegetal, principalmente quando há presença apenas de bactéria nas formulações. No entanto, os resultados foram bastante variados, o que indica que ainda são necessários mais estudos para entender melhor os fatores que influenciam esse efeito e melhorar as condições para o cultivo do milho. Os resultados apresentados aqui serão discutidos no próximo capítulo.

## **CAPÍTULO IV**

### **DISCUSSÃO E CONCLUSÃO**

#### 4- DISCUSSÃO

O desenvolvimento de novos sistemas agrícolas que visa aumentar o uso de materiais biodegradáveis e promover uma agricultura moderna e sustentável é uma tendência nos últimos anos [68]. Pesquisas estão em andamento para proteger as plantas de condições ambientais adversas [187] e melhorar o seu desempenho no campo. A nanotecnologia se destaca como uma ferramenta valiosa na modernização da agricultura, pois permite a entrega controlada de insumos agrícolas diretamente no alvo, de forma controlada [5], sem desperdício de ativos. A produção de macro e micronutrientes em escala nanométrica vem apresentando resultados favoráveis [79]. Entre os nutrientes mais aplicados na agricultura está o Zn, devido à sua escassez em diversas culturas [15].

No sentido de tornar a agricultura mais sustentável, o uso de biofertilizantes, especialmente os baseados em BPCP, vem se destacando e está em ascensão [313]. No entanto, a encapsulação desses microrganismos para manter sua viabilidade continua sendo um grande desafio [314]. Neste contexto, esferas de hidrogéis têm ganhado espaço no setor agrícola [32].

Neste cenário de modernização, a presente Tese visa inovar no desenvolvimento de um sistema esférico híbrido capaz de encapsular compostos orgânicos e inorgânicos em sistemas biodegradáveis, capazes de liberar de forma controlada insumos agrícolas. Além disso, este trabalho levanta o potencial de modificar o comportamento de liberação desses compostos por meio da mescla de materiais que compõem as esferas. Ou seja, conforme relatado nos capítulos anteriores, construímos aqui uma esfera de matriz de SA, que teve o potencial de se modificar através da adição de Xil. A mistura entre AS e Xil no setor agrícola ainda é pouco explorada. Também, em nosso estudo, encapsulamos ZnONPs juntamente com as bactérias promotoras do crescimento vegetal *Azospirillum brasilense* na mesma esfera, com o objetivo de promover a liberação de ambos ao mesmo tempo. Esse sistema pode ser considerado duplamente híbrido: primeiro, por encapsular dois compostos distintos na mesma esfera e, em segundo lugar, por promover a liberação dos dois compostos ao mesmo tempo. A liberação de nanopartículas e microrganismos de forma isolada já ocorre há algum tempo, no entanto, a liberação simultânea desses elementos, coexistindo na mesma esfera, ainda não foi amplamente estudada [163].

Em nosso estudo, a eficiência de encapsulamento apresentou um valor considerado alto, muito próximo dos valores encontrados na literatura [315], mostrando uma eficiência de encapsulamento de 88% para ZnONPs, enquanto para *Azospirillum* foi de 77% [279].

Os resultados de FTIR confirmaram a formação das esferas híbridas de alginato AS e AS/Xil. Ambas mostraram picos característicos, com bandas de -COO-, que indicam a ligação cruzada com o reticulante, formando redes tridimensionais conforme mostra a literatura [100, 228, 280, 281]. Além disso, também evidenciou a encapsulação de *A. brasilense* pela presença de bandas de NH, associadas às proteínas [212, 231, 279].

As análises de imagens de ME e MEV mostraram que ocorreu a formação de diferentes tipos de esferas devido a mudança de coloração, morfologia e aumento no número de poros. Segundo a literatura, Xil tem a capacidade de tornar as estruturas de alginato mais porosas [58, 95]. O encapsulamento de ZnONPs, mantiveram as NPs retidas no interior das esferas, apresentaram uma distribuição semelhante à estudos anteriores [316-318].

As análises térmicas de DSC mostraram que a adição de ZnONPs mudou as propriedades das esferas, tornando-as mais resistentes. Um estudo realizado por Lal et al. (2024) produziu esferas constituídas por quitosana, alginato e ZnONPs, que apresentaram o mesmo efeito, pois a presença das ZnONPs aumentou a estabilidade térmica das esferas [284-286, 319]. No entanto, a adição de *A. brasilense* tem o potencial de diminuir a resistência térmica das esferas, por não ser cristalina [287].

A análise de degradação em meio, mostrou que as esferas híbridas **AS/Xil** foram as que mais se degradaram, o que indica que a resistência do alginato pode ser modificada [292].

Em nosso estudo de cinética de liberação, mostramos que ao adicionar xilana à matriz de alginato de sódio, a liberação pode ser modificada. Alguns trabalhos já descrevem este tipo de fenômeno [102, 118, 239, 320]. Por exemplo He et al. (2015), que adicionou bentonita à matriz de SA e retardou a liberação de *Raoultella planticola* [242]. Nossos resultados também revelaram que a liberação dos íons  $Zn^{2+}$  na forma nanoparticulada contidos na matriz de AS é muito mais lenta em comparação a outros tipos de esferas. Neste contexto, um estudo realizado por Gomes e seus colaboradores (2022) construiu esferas de celulose carregadas com  $ZnSO_4$ , que mostraram que as esferas em meio aquoso liberaram todo o  $Zn^{2+}$  em cerca de 30 minutos [114]. Isso indica que nosso sistema tem o potencial de retardar a liberação, visto que o percentual de liberação das esferas produzidas neste trabalho foi relativamente baixo. Além disso, nossos resultados mostraram que os mecanismos de liberação da *A. brasilense* condiz com a literatura, que tende ao mecanismo de transporte super Case-II [145].

As análises de atividade biológica realizadas em nosso ensaio corroboram uma com a outra. Na respiração basal do solo, as esferas que continham Xil apresentaram maiores valores de C-CO<sub>2</sub>, pois a xilana serviu como fonte de açúcares para os microrganismos. As esferas constituídas pela mistura AS/Xil e *A. brasilense* tiveram a liberação de C-CO<sub>2</sub> aumentada, devido ao incremento da atividade microbiana. Um estudo que avaliou a liberação de CO<sub>2</sub> a partir de interações sinérgicas entre o fungo *Beauveria bassiana* e *Saccharomyces cerevisiae*, com a mistura entre o amido de milho ao AS, mostrou que essa mescla prolongou e aumentou a liberação de CO<sub>2</sub> [321]. E esse mesmo efeito é encontrado em nosso estudo. Além disso, o mesmo comportamento foi observado no ensaio de biodegradação. As observações obtidas pelo rizotron corroboram com o ensaio de respiração e o da biodegradação, onde é visível que nas esferas AS/Xil que contêm *A. brasilense*, os efeitos são mais significativos.

Os resultados obtidos dos ensaios sobre os efeitos das esferas em plantas foram variados, não mantendo um padrão. Nas análises biométricas, que envolveram altura de plantas, diâmetro do colmo e comprimento das raízes, quase não houve diferença das formulações em relação ao controle. Estudos realizados na cultura do milho mostram resultados significativamente maiores para os tratamentos realizados com Zn [309, 315, 316]. Um estudo utilizando ZnONPs não encapsulado em um sistema hidropônico, mostrou os efeitos cultura do milho (*Zea mays* L.). Os resultados mostraram que aplicação ZnONPs atenuaram significativamente o estresse salino e melhorou o comprimento da raiz em +175%, o comprimento do broto em +39%, a área foliar em +181%, o conteúdo total de clorofila em +33%. Além disso, aumentou a absorção de Zn pelas raízes e folhas em comparação controle [322].

Os resultados obtidos nas análises de clorofila, indicaram que os tratamentos realizados com as esferas se diferenciaram do controle apenas no último dia, tendo um resultado mais elevado para as plantas tratadas com ZnONPs encapsuladas em ambos os tipos de esferas. Quanto aos rendimentos de massa seca, entre a parte aérea e a raiz, os tratamentos com a esfera AS obtiveram maior rendimento na raiz, enquanto os tratamentos com AS/Xil renderam mais na parte aérea, é isso pode ser atribuído ao fato do maior acúmulo de Zn e a presença de *A. brasilense*. Um estudo realizado por Lima et al. (2023), avaliou os efeitos do encapsulamento da *A. brasilense* em esferas de hidrogel no milho, seus resultados revelaram um aumento no comprimento da raiz em 19%, no peso seco da parte aérea em 17% e no conteúdo de clorofila em 71% [127]. Enquanto, um outro estudo utilizando as BPCP, também utilizando a planta do milho investigados

por Hungria et al. (2022) e os efeitos de *A. brasilense* livres, ou seja, não encapsuladas observados por diferentes métodos de aplicação, sendo por via sementes e pulverização foliar no estágio de crescimento V3 nas raízes. Ambos revelaram que as *A. brasilense* foram benéficas, aumentando o comprimento e o volume da raiz melhorando absorção de água e de nutrientes [323]. Em nossos estudos, os resultados obtidos se devem ao fato de que as esferas AS/Xil têm um percentual de liberação maior do que as esferas AS, o que resulta em uma maior quantidade de Zn disponível para a planta. Além disso, o fato de essas esferas apresentarem uma maior biodegradação também contribuiu para esse efeito.

Em relação ao maior teor de Zn na nutrição das plantas, comparando apenas os tratamentos com as esferas, os tratamentos com Xil obtiveram maior acúmulo de Zn. E isso também pode ser devido ao fato de que as esferas AS/Xil têm um percentual de liberação e de biodegradação. Um estudo utilizado Zn na forma iônica proveniente dos sais de sulfato de Zn, aplicado no solo foi investigado utilizando como planta de teste o milho, seus resultados revelaram que os maiores teores de zinco foram obtidos nas raízes, cerca de 2 a 4 vezes a mais do que na partes aéreas [324].

As análises de fertilidade do solo indicaram que as condições de plantio eram boas e também mostraram um aumento no pH em todos os tratamentos, sendo mais pronunciados nas formulações que continham *A. brasilense*. Também foi possível notar que a quantidade de Zn no início do experimento foi maior do que no fim. No entanto, não houve diferenças significativas no fim do experimento entre os tratamentos, com relação ao controle. Estudos mostram que o uso de Zn associado *A. brasilense*, resultam em maiores quantidades de Zn, pois essas bactérias são solubilizadoras de Zn [125, 186, 258, 308].

Um ponto importante para os resultados obtidos, que deve ser levado em consideração é a temperatura elevada durante o experimento. As temperaturas mínimas e máximas registradas pela UNESP foram de 33 e 39 °C, respectivamente. Enquanto isso, as temperaturas dentro da casa de vegetação variaram de mínima de 34 °C a máxima de 44 °C. Essas temperaturas indicam que pode ter ocorrido estresse térmico, o que pode ter impactado o desenvolvimento das plantas, e assim reduziram os potenciais benefícios das formulações na cultura. A temperatura ideal para o crescimento do milho é de 33-35 °C [325, 326]. Estudos mostram que, acima de 32 °C, ocorre uma redução significativa no rendimento de milho [327]. A temperatura também pode ter influenciado na viabilidade da *A. brasilense*, pois a temperatura no ambiente para *A. brasilense* é de 33-36 °C [328].

Isso pode indicar que os resultados em casa de vegetação podem ter sido em decorrência de altas temperaturas.

## **5- Conclusão**

Nos últimos anos, muitos sistemas de liberação para defensivos agrícolas baseados em esferas de hidrogéis têm sido desenvolvidos, no intuito de criar novas estratégias para aprimorar a eficácia desses sistemas no campo. Embora a pesquisa seja crescente neste com este tema, ainda é limitada o entendimento de liberação sistemas complexos e a eficácia deles. Assim, este trabalho não só reforça a relevância de pesquisas nesta área, mas também aponta para a necessidade de estudos adicionais que garantam a eficácia e segurança dos novos sistemas de liberação no ambiente agrícola. O desenvolvimento de esferas híbridas, que encapsulam e liberam simultaneamente compostos orgânicos e inorgânicos, representa uma inovação promissora.

Os resultados reportaram que as esferas constituídas somente por AS, assim como a blenda AS/Xil, demonstraram uma alta eficiência de encapsulamento e podem ser bons transportadores do micronutriente Zn, bem como de BPCV *A. brasilense*. Além disso, demonstraram que a liberação pode ser modificada pela mistura de materiais. As interações entre as nanopartículas de Zn e *A. brasilense*, indicam que este sistema híbrido pode promover um aumento na disponibilidade de nutrientes para as plantas.

Entretanto, as variações nos resultados nos efeitos em plantas e o impacto das condições ambientais, como estresse térmico e presença de pragas, indicam a necessidade de estudos adicionais para potencializar o uso dessas tecnologias sob diferentes condições. Apesar disso, a pesquisa demonstrou que a integração da nanotecnologia e do uso de biofertilizantes oferece uma direção promissora para práticas agrícolas mais sustentáveis, e abrem novas perspectivas sobre esses sistemas para futuras aplicações.

## **6- Impacto e relevância científico-social**

Considerando os resultados obtidos, a relevância associada ao tema deste trabalho técnico-científico pode ser atribuída à produção de novos conhecimentos no desenvolvimento de sistemas de liberação híbridos na agricultura moderna. Desta forma, os impactos sobre o científico, social e ambiental em nosso estudo foi baseada nos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) estabelecida pela Nações Unidas, exibido na **Figura 1**.



**Figura 1:** ODS que representam os impactos da nossa pesquisa. Adaptado de [329].

Na **Figura 1**, a meta número 2 declara “ Acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhorar a nutrição e promover a agricultura sustentável ”; meta número 12 “Garantir padrões de consumo e produção sustentáveis ”; meta número 13 “ Tomar medidas urgentes para combater as alterações climáticas e os seus impactos ” e meta número 17 “ Fortalecer os meios de implementação e revitalizar a parceria global para o desenvolvimento sustentável” [329].

A meta número 2 do ODS é refletida em nosso trabalho, pois desenvolvemos um sistema que promove a biofortificação por meio da liberação de micronutrientes, contribuindo para a segurança alimentar. Nosso sistema também está alinhado com a meta número 12, pois é sustentável, utilizando fontes renováveis e materiais biodegradáveis, como polissacarídeos. Além disso, as bactérias fixadoras de nitrogênio presentes em nosso sistema reduzem a necessidade de fertilizantes minerais, promovendo práticas agrícolas mais sustentáveis. Em um cenário global, a produção de alimentos e as atividades humanas estão relacionadas à mudança climática, especialmente devido ao uso excessivo de fertilizantes e pesticidas, que contaminam rios e solos. É por isso que destacamos a meta número 13, uma vez que utilizamos materiais biodegradáveis e biofertilizantes que diminuem a dependência de fertilizantes minerais, ajudando a mitigar a poluição e as emissões de gases de efeito estufa. Além disso, a meta 17 também é refletida em nossa pesquisa, pois estabelecemos colaborações experimentais e intelectuais com instituições como o Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá (IDIAP), a Embrapa Soja e o IPBEN-Unesp Câmpus Rio Claro. Essas colaborações fortalecem nosso trabalho e ampliam nosso impacto nas áreas de nanotecnologia e biofertilizantes, o que pode impactar positivamente sustentabilidade e a produtividade das culturas.

Além disso, este estudo pode servir como modelo para futuros pesquisadores, incentivando a exploração de sistemas de liberação controlada em sistemas esféricos em diferentes contextos agrícolas e ambientais, contribuindo para a saúde do solo e o aumento da produção agrícola.

## Anexo 1



**Ministério do Meio Ambiente**  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**  
**SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO**  
**Comprovante de Cadastro de Acesso**  
**Cadastro nº AAD1A38**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AAD1A38**  
Usuário: **UNESP**  
CPF/CNPJ: **48.031.918/0001-24**  
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

### **Espécie**

**Azospirillum brasilense**

Título da Atividade: **Desenvolvimento de sistema de liberação controlada de microorganismos**

### **Equipe**

**Renato Grillo** **UNESP**  
**Debora Ribeiro Antunes** **UNESP**

Data do Cadastro: **21/11/2024 17:25:09**  
Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **17:26** de **21/11/2024**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
ASSOCIADO - **SISGEN**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. V. e. a. Stupar. The effect of fertility control on soil conservation The effect of fertility control on soil conservation as a basic as a basic as a basic resource of sustainable agriculture resource of sustainable agriculture Vladanka 2024.
2. Y. Hu, Y. Liu. Impact of fertilizer and pesticide reductions on land use in China based on crop-land integrated model. *Land Use Policy*. 2024;141:107155.
3. I. Zahoor, A. Mushtaq. Water pollution from agricultural activities: A critical global review. *Int J Chem Biochem Sci*. 2023;23(1):164-176.
4. G. O. Yager, M. K. A. Wahab, T. Agboola. Risk of agrochemical on biodiversity and human health: conservation implications and sustainable mitigations strategies. *One Health Implications of Agrochemicals and their Sustainable Alternatives: Springer*; 2023. p. 181-209.
5. H. Mansouri, H. Ait Said, H. Noukrati, A. Oukarroum, H. Ben youcef, F. Perreault. Advances in Controlled Release Fertilizers: Cost-Effective Coating Techniques and Smart Stimuli-Responsive Hydrogels. *Advanced Sustainable Systems*. 2023;7(9):2300149.
6. Y.-M. Peh, B.-B. Lee, F. H. Kasim, A. H. Ma'Radzi, A. R. W. Yaakub, H. M. Johar, editors. Comparative study on mechanisms of gases release from Ca-alginate beads. *BIO Web of Conferences*; 2024: EDP Sciences.
7. M. M. Forini, M. S. Pontes, D. R. Antunes, P. H. de Lima, J. S. Santos, E. F. Santiago, R. Grillo. Nano-enabled weed management in agriculture: From strategic design to enhanced herbicidal activity. *Plant Nano Biology*. 2022;1:100008.
8. R. Grillo, P. C. Abhilash, L. F. Fraceto. Nanotechnology applied to bio-encapsulation of pesticides. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2016;16(1):1231-1234.
9. P. H. C. d. Lima, D. R. Antunes, M. M. d. L. Forini, M. d. S. Pontes, B. D. Mattos, R. Grillo. Recent advances on lignocellulosic-based nanopesticides for agricultural applications. *Frontiers in Nanotechnology*. 2021;3:809329.
10. H. C. Oliveira, R. Stolf-Moreira, C. B. R. Martinez, R. Grillo, M. B. de Jesus, L. F. Fraceto. Nanoencapsulation enhances the post-emergence herbicidal activity of atrazine against mustard plants. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132971.
11. A. E. Pereira, R. Grillo, N. F. Mello, A. H. Rosa, L. F. Fraceto. Application of poly (epsilon-caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an alternative

technique to control weeds and reduce damage to the environment. *Journal of hazardous materials*. 2014;268:207-215.

12. J. Pathak, D. K. Singh, P. R. Singh, N. Kumari, J. Jaiswal, A. Gupta, R. P. Sinha. Application of nanoparticles in agriculture: nano-based fertilizers, pesticides, herbicides, and nanobiosensors. *Molecular Impacts of Nanoparticles on Plants and Algae: Elsevier*; 2024. p. 305-331.

13. S. S. Elsabagh, E. A. Elkhatib, M. Rashad. Novel nano-fertilizers derived from drinking water industry waste for sustained release of macronutrients: performance, kinetics and sorption mechanisms. *Scientific Reports*. 2024;14(1):5691.

14. M. dos Santos Silva, D. S. Cocenza, R. Grillo, N. F. S. de Melo, P. S. Tonello, L. C. de Oliveira, D. L. Cassimiro, A. H. Rosa, L. F. Fraceto. Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: preparation, characterization and soil sorption studies. *Journal of hazardous materials*. 2011;190(1-3):366-374.

15. G. Hacisalihoglu. Zinc (Zn): The last nutrient in the alphabet and shedding light on Zn efficiency for the future of crop production under suboptimal Zn. *Plants*. 2020;9(11):1471.

16. I. Ahmad, W. Ahmad, J. Nepal, M. B. Junaid, N. A. Bukhari, M. Usman, N. Ahmad, R. N. Khan. Synergistic enhancement of maize crop yield and nutrient assimilation via zinc oxide nanoparticles and phosphorus fertilization. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2024.

17. A. Jalal, E. F. Júnior, M. C. M. Teixeira Filho. Interaction of zinc mineral nutrition and plant growth-promoting bacteria in tropical agricultural systems: a review. *Plants*. 2024;13(5):571.

18. A. Pedrinho, L. W. Mendes, F. M. do Rêgo Barros, J. W. Bossolani, T. N. Kühn, M. C. Quecine, F. D. Andreote. The interplay between *Azospirillum brasilense* and the native bacterial communities in the soil and rhizosphere of maize (*Zea mays* L.). *Soil Biology and Biochemistry*. 2024;189:109292.

19. F. Sporchia, M. Antonelli, A. Aguilar-Martínez, A. Bach-Faig, D. Caro, K. F. Davis, R. Sonnino, A. Galli. Zero hunger: future challenges and the way forward towards the achievement of sustainable development goal 2. *Sustainable Earth Reviews*. 2024;7(1):10.

20. R. Grillo, B. D. Mattos, D. R. Antunes, M. M. L. Forini, F. A. Monikh, O. J. Rojas. Foliage adhesion and interactions with particulate delivery systems for plant nanobionics and intelligent agriculture. *Nano Today*. 2021;37.

21. M. T. Sohail, S. Mustafa, M. M. Ali, S. Riaz. Agricultural Communities' Risk Assessment and the Effects of Climate Change: A Pathway Toward Green Productivity and Sustainable Development. *Frontiers in Environmental Science*. 2022;10.
22. H. Guo, Y. Xia, J. Jin, C. Pan. The impact of climate change on the efficiency of agricultural production in the world's main agricultural regions. *Environmental Impact Assessment Review*. 2022;97.
23. J. L. Wee, M. C. Law, Y. S. Chan, S. Y. Choy, A. N. T. Tiong. The Potential of Fe-Based Magnetic Nanomaterials for the Agriculture Sector. *Chemistryselect*. 2022;7(17).
24. W. Xiang, M. Tan, X. Yang, X. Li. The impact of cropland spatial shift on irrigation water use in China. *Environmental Impact Assessment Review*. 2022;97.
25. S. R. Jaeger, F. R. Harker, G. Ares. Consumer insights about sustainable and 'beyond organic' agriculture: A study of biodynamics in the United Kingdom, Australia, Singapore, and Germany. *Journal of Cleaner Production*. 2023;401.
26. J. Dong, X. Liu, Y. Chen, W. Yang, X. Du. User-safe and efficient chitosan-gated porous carbon nanopesticides and nanoherbicides. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2021;594:20-34.
27. A. Mun, H. S. Yameen, G. Edelbaum, D. Seliktar. Alginate hydrogel beads embedded with drug-bearing polycaprolactone microspheres for sustained release of paclobutrazol. *Scientific Reports*. 2021;11(1).
28. M. E. M. Mekhzoum, A. Aasfar, A. Mzibra, N. E. Mernissi, Y. Farrie, M. Khouloud, R. Boulif, A. E. K. Qaiss, I. M. Kadmiri, R. Bouhfid. Phosphorus fertilizer coated with polysaccharide-enriched extracts from the red seaweed for slow release and water retention. *Journal of Applied Phycology*. 2023;35(2):935-948.
29. K. S. Ojha, R. Aznar, C. O'Donnell, B. K. Tiwari. Ultrasound technology for the extraction of biologically active molecules from plant, animal and marine sources. *Trends in Analytical Chemistry*. 2020;122.
30. Y. Ren, Y. Bai, Z. Zhang, W. Cai, A. D. Flores. The Preparation and Structure Analysis Methods of Natural Polysaccharides of Plants and Fungi: A Review of Recent Development. *Molecules*. 2019;24(17).
31. R. S. Riseh, M. Ebrahimi-Zarandi, M. G. Vazvani, Y. A. Skorik. Reducing Drought Stress in Plants by Encapsulating Plant Growth-Promoting Bacteria with Polysaccharides. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(23).

32. M. Brondi, C. Florencio, L. Mattoso, C. Ribeiro, C. Farinas. Encapsulation of with nanocellulose/carboxymethyl cellulose nanocomposite. *Carbohydrate Polymers*. 2022;295.
33. S. Fertahi, M. Ilsouk, Y. Zeroual, A. Oukarroum, A. Barakat. Recent trends in organic coating based on biopolymers and biomass for controlled and slow release fertilizers. *Journal of Controlled Release*. 2021;330:341-361.
34. D. Das, P. Prakash, P. K. Rout, S. Bhaladhare. Synthesis and Characterization of Superabsorbent Cellulose-Based Hydrogel for Agriculture Application. *Starch-Starke*. 2021;73(1-2).
35. M. Leonardi, G. M. Caruso, S. C. Carroccio, S. Boninelli, G. Curcuruto, M. Zimbone, M. Allegra, B. Torrisi, F. Ferlito, M. Miritello. Smart nanocomposites of chitosan/alginate nanoparticles loaded with copper oxide as alternative nanofertilizers. *Environmental Science-Nano*. 2021;8(1):174-187.
36. L. L. Messa, C. F. Souza, R. Faez. Spray-dried potassium nitrate-containing chitosan/montmorillonite microparticles as potential enhanced efficiency fertilizer. *Polymer Testing*. 2020;81.
37. E. Stasi, A. Giuri, F. Ferrari, V. Armenise, S. Colella, A. Listorti, A. Rizzo, E. Ferraris, C. E. Corcione. Biodegradable Carbon-based Ashes/Maize Starch Composite Films for Agricultural Applications. *Polymers*. 2020;12(3).
38. S. Elbasuney, G. S. El-Sayyad, M. S. Attia, A. M. Abdelaziz. Ferric Oxide Colloid: Towards Green Nano-Fertilizer for Tomato Plant with Enhanced Vegetative Growth and Immune Response Against Fusarium Wilt Disease. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*. 2022;32(11):4270-4283.
39. L. Wang, G. Yu, J. Li, Y. Feng, Y. Peng, X. Zhao, Y. Tang, Q. Zhang. Stretchable hydrophobic modified alginate double-network nanocomposite hydrogels for sustained release of water-insoluble pesticides. *Journal of Cleaner Production*. 2019;226:122-132.
40. H. Guo, J. C. White, Z. Wang, B. Xing. Nano-enabled fertilizers to control the release and use efficiency of nutrients. *Current Opinion in Environmental Science & Health*. 2018;6:77-83.
41. S. Beckers, S. Peil, F. R. Wurm. Pesticide-Loaded Nanocarriers from Lignin Sulfonates-A Promising Tool for Sustainable Plant Protection. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*. 2020;8(50):18468-18475.
42. O. E. Mendez, C. E. Astete, R. Cueto, B. Eitzer, E. A. Hanna, F. Salinas, C. Tamez, Y. Wang, J. C. White, C. M. Sabliov. Lignin nanoparticles as delivery systems to

facilitate translocation of methoxyfenozide in soybean (*Glycine max*). *Journal of Agriculture and Food Research*. 2022;7.

43. R. Shower, E. S. El-Leithy, R. S. Abdel-Rashid, A. S. Eltaweil, R. S. Baeshen, N. Mori. Preparation of Lambda-Cyhalothrin-Loaded Chitosan Nanoparticles and Their Bioactivity against. *Nanomaterials*. 2022;12(18).

44. A. T. Soni, J. E. Rookes, S. S. Arya. Chitosan Nanoparticles as Seed Priming Agents to Alleviate Salinity Stress in Rice (

L.) Seedlings. *Polysaccharides*. 2023;4(2):129-141.

45. D. Jiménez-Arias, S. Morales-Sierra, P. Silva, H. Carrêlo, A. Gonçalves, J. F. T. Ganança, N. Nunes, C. S. S. Gouveia, S. Alves, J. P. Borges, M. Â. A. P. Carvalho. Encapsulation with Natural Polymers to Improve the Properties of Biostimulants in Agriculture. *Plants-Basel*. 2023;12(1).

46. F. Rachidi, R. Benhima, Y. Kasmi, L. Sbabou, H. E. Arroussi. Evaluation of microalgae polysaccharides as biostimulants of tomato plant defense using metabolomics and biochemical approaches. *Sci Rep*. 2021;11(1):930.

47. L. Lucini, Y. Rouphael, M. Cardarelli, P. Bonini, C. Baffi, G. Colla. A Vegetal Biopolymer-Based Biostimulant Promoted Root Growth in Melon While Triggering Brassinosteroids and Stress-Related Compounds. *Frontiers in Plant Science*. 2018;9.

48. M. Rizwan, S. R. Gilani, A. I. Durani, S. Naseem. Materials diversity of hydrogel: Synthesis, polymerization process and soil conditioning properties in agricultural field. *J Adv Res*. 2021;33:15-40.

49. T. M. Neethu, P. K. Dubey, A. R. Kaswala. Prospects and Applications of Hydrogel Technology in Agriculture. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2018;7(05):3155-3162.

50. D. Lawrencja, S. K. Wong, D. Y. S. Low, B. H. Goh, J. K. Goh, U. R. Ruktanonchai, A. Soottitantawat, L. H. Lee, S. Y. Tang. Controlled Release Fertilizers: A Review on Coating Materials and Mechanism of Release. *Plants-Basel*. 2021;10(2).

51. S. Mandal, S. S. Kumar, B. Krishnamoorthy, S. K. Basu. Development and evaluation of calcium alginate beads prepared by sequential and simultaneous methods. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;46(4):784-792.

52. B. Qu, Y. Luo. Chitosan-based hydrogel beads: Preparations, modifications and applications in food and agriculture sectors - A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;152:437-448.

53. G. Nie, Y. Zang, W. Yue, M. Wang, A. Baride, A. Sigdel, S. Janaswamy. Cellulose-based hydrogel beads: Preparation and characterization. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*. 2021;2.
54. N. Işiklan. Controlled release of insecticide carbaryl from sodium alginate, sodium alginate/gelatin, and sodium alginate/sodium carboxymethyl cellulose blend beads crosslinked with glutaraldehyde. *Journal of Applied Polymer Science*. 2005;99(4):1310-1319.
55. N. C. T. Martins, A. Avellan, S. Rodrigues, D. Salvador, S. M. Rodrigues, T. Trindade. Composites of Biopolymers and ZnO NPs for Controlled Release of Zinc in Agricultural Soils and Timed Delivery for Maize. *Acs Applied Nano Materials*. 2020;3(3):2134-2148.
56. C. Callaghan, D. Califano, M. H. F. Gomes, H. W. P. Carvalho, K. J. Edler, D. Mattia. Cellulose Acetate Microbeads for Controlled Delivery of Essential Micronutrients. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*. 2023;11(12):4749-4758.
57. C. A. Busatto, M. E. Taverna, M. R. Lescano, C. Zalazar, D. A. Estenoz. Preparation and Characterization of Lignin Microparticles-in-Alginate Beads for Atrazine Controlled Release. *Journal of Polymers and the Environment*. 2019;27(12):2831-2841.
58. M. Li, M. A. Tshabalala, G. Buschle-Diller. Formulation and characterization of polysaccharide beads for controlled release of plant growth regulators. *Journal of Materials Science*. 2016;51(9):4609-4617.
59. S. Keppeler, A. Ellis, J. C. Jacquier. Cross-linked carrageenan beads for controlled release delivery systems. *Carbohydrate Polymers*. 2009;78(4):973-977.
60. T. Berninger, N. Dietz, O. G. López. Water-soluble polymers in agriculture: xanthan gum as eco-friendly alternative to synthetics. *Microbial Biotechnology*. 2021;14(5):1881-1896.
61. N. Thombare, S. Mishra, M. Z. Siddiqui, U. Jha, D. Singh, G. R. Mahajan. Design and development of guar gum based novel, superabsorbent and moisture retaining hydrogels for agricultural applications. *Carbohydrate Polymers*. 2018;185:169-178.
62. M. M. Lopes, C. A. Oliveira-Paiva, C. S. Farinas. Modification of pectin/starch-based beads with additives to improve encapsulation for agricultural applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023;246.

63. Y. Huang, X. Li, Z. Lu, H. Zhang, J. Huang, K. Yan, D. Wang. Nanofiber-reinforced bulk hydrogel: preparation and structural, mechanical, and biological properties. *Journal of Materials Chemistry B*. 2020;8(42):9794-9803.
64. J. Ma, Y. Faqir, Y. Chai, S. Wu, T. Luo, S. Liao, A. R. Kaleri, C. Tan, Y. Qing, M. T. Kalhor, N. Umer, W. Hadir. Chitosan microspheres-based controlled release nitrogen fertilizers enhance the growth, antioxidant, and metabolite contents of Chinese cabbage. *Scientia Horticulturae*. 2023;308.
65. A. S. Roy, S. K. Pillai, S. S. Ray. A Comparison of Nitrate Release from Zn/Al-, Mg/Al-, and Mg-Zn/Al Layered Double Hydroxides and Composite Beads: Utilization as Slow-Release Fertilizers. *Acs Omega*. 2023.
66. D. Szopa, M. Mielczarek, D. Skrzypczak, G. Izydorczyk, K. Mikula, K. Chojnacka, A. Witek-Krowiak. Encapsulation efficiency and survival of plant growth-promoting microorganisms in an alginate-based matrix-A systematic review and protocol for a practical approach. *Industrial Crops and Products*. 2022;181.
67. M. Schoebitz, M. D. López, A. Roldán. Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil-plant fertilization. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 2013;33(4):751-765.
68. K. Mikula, G. Izydorczyk, D. Skrzypczak, M. Mironiuk, K. Moustakas, A. Witek-Krowiak, K. Chojnacka. Controlled release micronutrient fertilizers for precision agriculture - A review. *Science of the Total Environment*. 2020;712.
69. C. Qin, J. Zhou, Z. Zhang, W. Chen, Q. Hu, Y. Wang. Convenient one-step approach based on stimuli-responsive sol-gel transition properties to directly build chitosan-alginate core-shell beads. *Food Hydrocolloids*. 2019;87:253-259.
70. A. Firmanda, F. Fahma, K. Syamsu, Y. W. Sari, L. Suryanegara, K. Wood, Y. Saito. Factors Influencing the Biodegradability of Agro-biopolymer Based Slow or Controlled Release Fertilizer. *Journal of Polymers and the Environment*. 2022;31(5):1706-1724.
71. M. Amiri, P. Khazaeli, A. Salehabadi, M. Salavati-Niasari. Hydrogel beads-based nanocomposites in novel drug delivery platforms: Recent trends and developments. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2021;288.
72. A. Roy, J. Bajpai, A. K. Bajpai. Dynamics of controlled release of chlorpyrifos from swelling and eroding biopolymeric microspheres of calcium alginate and starch. *Carbohydrate Polymers*. 2009;76(2):222-231.

73. A. A. M. Shimojo, A. M. B. Pires, R. Lichy, M. H. A. Santana. The Performance of Crosslinking with Divinyl Sulfone as Controlled by the Interplay Between the Chemical Modification and Conformation of Hyaluronic Acid. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2015;26(3):506-512.
74. H. A. Essawy, M. B. Ghazy, F. A. El-Hai, M. F. Mohamed. Superabsorbent hydrogels via graft polymerization of acrylic acid from chitosan-cellulose hybrid and their potential in controlled release of soil nutrients. *Int J Biol Macromol*. 2016;89:144-151.
75. R. Michalik, I. Wandzik. A Mini-Review on Chitosan-Based Hydrogels with Potential for Sustainable Agricultural Applications. *Polymers*. 2020;12(10).
76. A. Firmanda, F. Fahma, K. Syamsu, L. Suryanegara, K. Wood. Controlled/slow-release fertilizer based on cellulose composite and its impact on sustainable agriculture: review. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr*. 2022;16(6):1909-1930.
77. G. L. Zobot, F. S. Rodrigues, L. P. Ody, M. V. Tres, E. Herrera, H. Palacin, J. S. Cordova-Ramos, I. Best, L. Olivera-Montenegro. Encapsulation of Bioactive Compounds for Food and Agricultural Applications. *Polymers (Basel)*. 2022;14(19).
78. L. Pang, Z. Gao, H. Feng, S. Wang, Q. Wang. Cellulose based materials for controlled release formulations of agrochemicals: A review of modifications and applications. *J Control Release*. 2019;316:105-115.
79. J. T. N. Knijnenburg, P. Kasemsiri, K. Amornratanaworn, S. Suwanree, W. Iamamornphan, P. Chindapasirt, K. Jetsrisuparb. Entrapment of nano-ZnO into alginate/polyvinyl alcohol beads with different crosslinking ions for fertilizer applications. *Int J Biol Macromol*. 2021;181:349-356.
80. C. G. Chiaregato, D. França, L. L. Messa, T. Dos Santos Pereira, R. Faez. A review of advances over 20 years on polysaccharide-based polymers applied as enhanced efficiency fertilizers. *Carbohydr Polym*. 2022;279:119014.
81. K. Hemvichian, A. Chanthawong, P. Suwanmala. Synthesis and characterization of superabsorbent polymer prepared by radiation-induced graft copolymerization of acrylamide onto carboxymethyl cellulose for controlled release of agrochemicals. *Radiation Physics and Chemistry*. 2014;103:167-171.
82. J. Z. Cai, L. Unique Gelation Behavior of Cellulose in NaOH/Urea Aqueous Solution. *Biomacromolecules*. 2006:183-189.

83. L. Zhang, C. Sheng, C. Chen, J. Luo, Z. Wu, H. Cao. Ecofriendly polysaccharide-based alginate/pluronic F127 semi-IPN hydrogel with magnetic collectability for precise release of pesticides and sustained pest control. *Int J Biol Macromol.* 2023;251:126175.
84. P. B. Smrdel, M. Mrhar, A. The Influence of Selected Parameters on the Size and Shape of Alginate Beads Prepared by Iontropic Gelation. *Scientia Pharmaceutica.* 2008;76(1):77-89.
85. A. A. Altam, L. Zhu, W. Wang, H. Yagoub, S. Yang. Stability improvement of carboxymethyl cellulose/chitosan complex beads by thermal treatment. *Int J Biol Macromol.* 2022;223(Pt A):1278-1286.
86. H. Demircan, R. A. Oral. Parameters affecting calcium-alginate bead characteristics: Viscosity of hydrocolloids and water solubility of core material. *Int J Biol Macromol.* 2023;236:124011.
87. T. Ramdhan, S. H. Ching, S. Prakash, B. Bhandari. Physical and mechanical properties of alginate based composite gels. *Trends in Food Science & Technology.* 2020;106:150-159.
88. M. Liouni, P. Drichoutis, E. T. Nerantzis. Studies of the mechanical properties and the fermentation behavior of double layer alginate–chitosan beads, using *Saccharomyces cerevisiae* entrapped cells. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2007;24(2):281-288.
89. C. Vilela, R. J. B. Pinto, S. Pinto, P. Marques, A. Silvestre, C. S. D. R. F. Barros. Polysaccharide Based Hybrid Materials Metals and Metal Oxides, Graphene and Carbon Nanotubes Conclusions and Future Perspectives. *Polysaccharide Based Hybrid Materials: Metals and Metal Oxides, Graphene and Carbon Nanotubes.* 2018:115-A116.
90. E. M. Eddarai, M. El Mouzahim, R. Boussen, A. Bellaouchou, A. Guenbour, A. Zarrouk. Chitosan-kaolinite clay composite as durable coating material for slow release NPK fertilizer. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2022;195:424-432.
91. Y. Liu, J. P. Wang, H. Y. Chen, D. D. Cheng. Environmentally friendly hydrogel: A review of classification, preparation and application in agriculture. *Science of the Total Environment.* 2022;846.
92. T. Cano, H. Na, J. Y. Sun, H. Y. Kim. Swelling kinetics of constrained hydrogel spheres. *Soft Matter.* 2023;19(45):8820-8831.

93. N. Lakshani, H. S. Wijerathne, C. Sandaruwan, N. Kottegoda, V. Karunarathne. Release Kinetic Models and Release Mechanisms of Controlled-Release and Slow-Release Fertilizers. *Acs Agricultural Science & Technology*. 2023;3(11):939-956.
94. Q. Duan, S. Jiang, F. Chen, Z. Li, L. Ma, Y. Song, X. Yu, Y. Chen, H. Liu, L. Yu. Fabrication, evaluation methodologies and models of slow-release fertilizers: A review. *Industrial Crops and Products*. 2023;192.
95. W. Tanan, J. Panichpakdee, S. Saengsuwan. Novel biodegradable hydrogel based on natural polymers: Synthesis, characterization, swelling/reswelling and biodegradability. *European Polymer Journal*. 2019;112:678-687.
96. S. V. Shilova, G. M. Mirgaleev, V. P. Barabanov. Chitosan-Modified Calcium Alginate Microspheres for Cefotaxime Immobilization. *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2022;95(3):401-407.
97. D. P. Wever, R. Oliveira-Silva, J. Marreiros, R. Ameloot, D. Sakellariou, P. Fardim. Topochemical Engineering of Cellulose-Carboxymethyl Cellulose Beads: A Low-Field NMR Relaxometry Study. *Molecules*. 2021;26(1).
98. J. J. Perez, N. J. Francois. Chitosan-starch beads prepared by ionotropic gelation as potential matrices for controlled release of fertilizers. *Carbohydrate Polymers*. 2016;148:134-142.
99. Y. Achmon, F. R. Dowdy, C. W. Simmons, C. Zohar-Perez, Z. Rabinovitz, A. Nussinovitch. Degradation and bioavailability of dried alginate hydrocolloid capsules in simulated soil system. *Journal of Applied Polymer Science*. 2019;136(43).
100. F. Z. E. Bouchtaoui, E. H. Ablouh, I. Kassem, Z. Kassab, H. Sehaqui, M. E. Achaby. Slow-release fertilizers based on lignin-sodium alginate biopolymeric blend for sustained N-P nutrients release. *Journal of Coatings Technology and Research*. 2022;19(5):1551-1565.
101. J. Jancar, P. Skarpa, A. M. Abdel-Mohsen. Fertilizer technology based on optimized nitrogen release from urea-loaded natural superabsorbent carriers. *Soil Use and Management*. 2023;39(4):1583-1599.
102. A. Singh, A. K. Kar, D. Singh, R. Verma, N. Shraogi, A. Zehra, K. Gautam, S. Anbumani, D. Ghosh, S. Patnaik. pH-responsive eco-friendly chitosan modified cenosphere/alginate composite hydrogel beads as carrier for controlled release of Imidacloprid towards sustainable pest control. *Chemical Engineering Journal*. 2022;427.

103. J. Huang, L. Chen, M. Huang, M. Liu. Urea intercalated halloysite/sodium alginate composite hydrogels for slow-release fertilizers. *Applied Clay Science*. 2023;242.
104. H. Yan, Y. Feng, W. Hu, C. Cheng, R. Liu, C. Wang, J. Li, Q. Lin. Preparation and Evaluation of Alginate-Chitosan-Bentonite Based Beads for the Delivery of Pesticides in Controlled-Release Formulation. *Asian Journal of Chemistry*. 2013;25(17):9936-9940.
105. Y. Xiang, G. Zhang, C. Chen, B. Liu, D. Cai, Z. Wu. Fabrication of a pH-Responsively Controlled-Release Pesticide Using an Attapulgite-Based Hydrogel. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*. 2018;6(1):1192-1201.
106. J. Li, J. Yao, Y. Li, Y. Shao. Controlled release and retarded leaching of pesticides by encapsulating in carboxymethyl chitosan /bentonite composite gel. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*. 2012;47(8):795-803.
107. T. Liu, J. Luo, S. Liu, T. Li, H. Li, L. Zhang, W. Mu, N. Zou. Clothianidin loaded TA/Fe (III) controlled-release granules: improve pesticide bioavailability and alleviate oxidative stress. *Journal of Hazardous Materials*. 2021;416.
108. F. Zhu, H. Zhang, C. Chen, Y. Long, G. Liao, M. Chen, L. Qin, X. Chen, Y. He, Z. Chen. Controlled-release alginate-bentonite polymer gel granules of emamectin benzoate and control efficacy against. *Pest Management Science*. 2023;79(1):324-335.
109. Y. L. Xie, W. Jiang, F. Li, Y. Zhang, X. Y. Liang, M. Wang, X. Zhou, S. Y. Wu, C. H. Zhang. Controlled Release of Spirotetramat Using Starch-Chitosan-Alginate-Encapsulation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2020;104(1):149-155.
110. L. Yang, S. Wang, R. Wang, Q. Zheng, Q. Ma, S. Huang, J. Chen, Z. Zhang. Floating chitosan-alginate microspheres loaded with chlorantraniliprole effectively control *Chilo suppressalis* (Walker) and *Sesamia inferens* (Walker) in rice fields. *Science of the Total Environment*. 2021;783.
111. S. A. Riyajan. A Novel Hybrid 2,4-Dichlorophenoxy Acetate Bead from Modified Cassava Starch and Sodium Alginate with Modified Natural Rubber Coating. *Journal of Polymers and the Environment*. 2018;26(5):1950-1961.

112. C. Xu, L. Cao, M. Bilal, C. Cao, P. Zhao, H. Zhang, Q. Huang. Multifunctional manganese-based carboxymethyl chitosan hydrogels for pH-triggered pesticide release and enhanced fungicidal activity. *Carbohydrate Polymers*. 2021;262.
113. D. Zheng, K. Wang, B. Bai, N. Hu, H. Wang. Swelling and glyphosate-controlled release behavior of multi-responsive alginate-g-P(NIPAm-co-NDEAm)-based hydrogel. *Carbohydrate Polymers*. 2022;282.
114. M. H. F. Gomes, C. Callaghan, A. C. S. Mendes, K. J. Edler, D. Mattia, Q. D. van Lier, H. W. P. Carvalho. Cellulose Microbeads: Toward the Controlled Release of Nutrients to Plants. *Acs Agricultural Science & Technology*. 2022;2(2):340-348.
115. T. Li, S. Lü, Y. Ji, T. Qi, M. Liu. A biodegradable Fe-fertilizer with high mechanical property and sustainable release for potential agriculture and horticulture applications. *New Journal of Chemistry*. 2018;42(23):19129-19136.
116. D. Legras-Lecarpentier, K. Stadler, R. Weiss, G. M. Guebitz, G. S. Nyanhongo. Enzymatic Synthesis of 100% Lignin Biobased Granules as Fertilizer Storage and Controlled Slow Release Systems. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2019.
117. R. D. van der Merwe, N. J. Goosen, R. W. M. Pott. Macroalgal-Derived Alginate Soil Amendments for Water Retention, Nutrient Release Rate Reduction, and Soil pH Control. *Gels*. 2022;8(9).
118. D. Skrzypczak, A. Witek-Krowiak, A. Dawiec-Lisniewska, D. Podstawczyk, K. Mikula, K. Chojnacka. Immobilization of biosorbent in hydrogel as a new environmentally friendly fertilizer for micronutrients delivery. *Journal of Cleaner Production*. 2019;241.
119. D. Gomez-Maldonado, S. G. Phillips, S. R. Vaidya, P. C. Bartley, J. C. White, D. H. Fairbrother, M. S. Peresin. Modifying soluble NPK release with hydrophobized nanocellulose-based hydrogels for sustainable enhanced efficiency fertilizers. *Environmental Science-Nano*. 2024;11(2):529-545.
120. E. Motamedi, M. Safari, M. Salimi. Improvement of tomato yield and quality using slow release NPK fertilizers prepared by carnauba wax emulsion, starch-based latex and hydrogel nanocomposite combination. *Scientific Reports*. 2023;13(1).
121. Y. S. Chen, S. W. Phang, A. S. Shuib, J. L. Tee. Release behavior and biodegradability of controlled-release potassium fertilizer encapsulated in starch-alginate matrix. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*. 2023;18(6).
122. J. L. Guía-García, A. V. Charles-Rodríguez, M. H. Reyes-Valdés, F. Ramírez-Godina, A. Robledo-Olivo, H. T. García-Osuna, M. A. Cerqueira, M. L. Flores-López.

Micro and nanoencapsulation of bioactive compounds for agri-food applications: A review. *Industrial Crops and Products*. 2022;186.

123. M. Ali, J. Cybulska, M. Frac, A. Zdunek. Application of polysaccharides for the encapsulation of beneficial microorganisms for agricultural purposes: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023;244.

124. F. S. Galindo, P. H. Pagliari, E. C. da Silva, B. H. de Lima, G. C. Fernandes, C. C. Thiengo, J. V. S. Bernardes, A. Jalal, C. E. S. Oliveira, L. D. Vilela, E. J. r. Furlani, T. A. R. Nogueira, V. do Nascimento, M. C. M. Teixeira, J. Lavres. Impact of nitrogen fertilizer sustainability on corn crop yield: the role of beneficial microbial inoculation interactions. *Bmc Plant Biology*. 2024;24(1).

125. A. Jalal, C. E. D. Oliveira, A. D. Bastos, G. C. Fernandes, B. H. de Lima, E. Furlani, P. H. G. de Carvalho, F. S. Galindo, I. M. B. Gato, M. C. M. Teixeira. Nanozinc and plant growth-promoting bacteria improve biochemical and metabolic attributes of maize in tropical Cerrado. *Frontiers in Plant Science*. 2023;13.

126. D. Kour, K. L. Rana, A. N. Yadav, N. Yadav, M. Kumar, V. Kumar, P. Vyas, H. S. Dhaliwal, A. K. Saxena. Microbial biofertilizers: Bioresources and eco-friendly technologies for agricultural and environmental sustainability. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020;23.

127. M. K. Lima-Tenório, F. Furmam-Cherobim, P. R. Karas, D. Hyeda, W. Y. Takahashi, A. S. P. Junior, C. W. Galvao, E. T. Tenório-Neto, R. M. Etto. *Azospirillum brasilens* AbV5/6 encapsulation in dual-crosslinked beads based on cationic starch. *Carbohydrate Polymers*. 2023;308.

128. K.-N. Chen, C.-Y. Chen, Y.-C. Lin, M.-J. Chen. Formulation of a novel antagonistic bacterium based biopesticide using microencapsulated techniques in fungal disease control. *Journal of Agricultural Science*. 2013;5(3).

129. V. Krell, D. Jakobs-Schoenwandt, S. Vidal, A. V. Patel. Encapsulation of *Metarhizium brunneum* enhances endophytism in tomato plants. *Biological Control*. 2018;116:62-73.

130. G. O. Locatelli, G. F. dos Santos, P. S. Botelho, C. L. L. Finkler, L. A. Bueno. Development of *Trichoderma* sp formulations in encapsulated granules (CG) and evaluation of conidia shelf-life. *Biological Control*. 2018;117:21-29.

131. L. C. Muskat, L. M. Gorg, P. Humbert, J. Gross, J. Eilenberg, A. V. Patel. Encapsulation of the psyllid-pathogenic fungus *Pandora* sp. nov. inedit. and experimental infection of target insects. *Pest Manag Sci*. 2022;78(3):991-999.

132. Z. Wu, L. Guo, S. Qin, C. Li. Encapsulation of *R. planticola* Rs-2 from alginate-starch-bentonite and its controlled release and swelling behavior under simulated soil conditions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2012;39(2):317-327.
133. A. Rashidzadeh, A. Olad. Slow-released NPK fertilizer encapsulated by NaAlg-poly(AA-co-AAm)/MMT superabsorbent nanocomposite. *Carbohydrate Polymers*. 2014;114:269-278.
134. D. Zheng, B. Bai, H. Zhao, X. Xu, N. Hu, H. Wang. Stimuli-responsive Ca-alginate-based photothermal system with enhanced foliar adhesion for controlled pesticide release. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2021;207.
135. J. Li, N. Li, X. Wu, S. Wang, S. Li, C. Guo, L. Yu, Z. Wang, P. Murto, X. Xu. Photothermal Aerogel Beads Based on Polysaccharides: Controlled Fabrication and Hybrid Applications in Solar-Powered Interfacial Evaporation, Water Remediation, and Soil Enrichment. *Acs Applied Materials & Interfaces*. 2022.
136. M. D. Patil, V. D. Patil, A. A. Sapre, T. S. Ambone, A. T. A. Torris, P. G. Shukla, K. Shanmuganathan. Tuning Controlled Release Behavior of Starch Granules Using Nanofibrillated Cellulose Derived from Waste Sugarcane Bagasse. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*. 2018;6(7):9208-9217.
137. K. H. Kucharzyk, V. M. Fulwider, A. Duong, M. Duffy, J. Cafmeyer, S. Ducceschi, C. Hinton. Assessment of Long-Term Stability of Encapsulated Agricultural Biologicals in Lipid-Coated Alginate Beads. *Acs Agricultural Science & Technology*. 2023;3(5):389-398.
138. M. Fernández, L. A. Pagnussat, M. P. Borrajo, J. J. P. Bravo, N. J. Francois, C. M. Creus. Chitosan/starch beads as bioinoculants carrier: long-term survival of bacteria and plant growth promotion. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2022;106(23):7963-7972.
139. I. M. Kadmiri, E. N. Mernissi, S. E. Azaroual, M. E. M. Mekhzoum, A. E. K. Qaiss, R. Bouhfid. Bioformulation of Microbial Fertilizer Based on Clay and Alginate Encapsulation. *Current Microbiology*. 2021;78(1):86-94.
140. M. A. M. Roslan, Z. M. Sobri, A. T. K. Zuan, N. A. A. Rahman. Okra Growth, Yield and Rhizosphere Microbiome Responses to the Encapsulated Bioinoculant Application under Reduced Fertilization Regime. *Biology-Basel*. 2022;11(8).
141. G. E. Mendoza-Arroyo, M. J. Chan-Bacab, R. N. Aguila-Ramírez, B. O. Ortega-Morales, R. E. C. Solís, A. O. Chab-Ruiz, K. I. Cob-Rivera, B. Dzib-Castillo, R. E. Tun-

Che, J. C. Camacho-Chab. Inorganic Phosphate Solubilization by a Novel Isolated Bacterial Strain *Enterobacter* sp. ITCB-09 and Its Application Potential as Biofertilizer. *Agriculture-Basel*. 2020;10(9).

142. C. R. Maruyama, N. Bilesky-José, R. de Lima, L. F. Fraceto. Encapsulation of *Trichoderma harzianum* Preserves Enzymatic Activity and Enhances the Potential for Biological Control. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020;8.

143. X. Ma, X. Wang, J. Cheng, X. Nie, X. Yu, Y. Zhao, W. Wang. Microencapsulation of *Bacillus subtilis* B99-2 and its biocontrol efficiency against *Rhizoctonia solani* in tomato. *Biological Control*. 2015;90:34-41.

144. D. F. Bogantes, L. Castellón, E. Uribe, L. Encapsulation of entomopathogenic nematodes in polymer-based materials and their effect on *Galleria mellonella*. 2018.

145. J. J. Perez, N. J. Francois, G. A. Maroniche, M. P. Borrajo, M. A. Pereyra, C. M. Creus. A novel, green, low-cost chitosan-starch hydrogel as potential delivery system for plant growth-promoting bacteria. *Carbohydrate Polymers*. 2018;202:409-417.

146. X. Ma, S. Zhang, Y. Yang, Z. Tong, T. Shen, Z. Yu, J. Xie, Y. Yao, B. Gao, Y. C. Li, M. I. D. Helal. Development of multifunctional copper alginate and biopolyurethane bilayer coated fertilizer: Controlled-release, selenium supply and antifungal. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023;224:256-265.

147. J. Panichikkal, G. Prathap, R. A. Nair, R. E. Krishnankutty. Evaluation of plant probiotic performance of *Pseudomonas* sp. encapsulated in alginate supplemented with salicylic acid and zinc oxide nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;166:138-143.

148. P. P. C. Joshi, A. V., D. W. Held, J. A. Howe, M. L. Auad. Preparation of slow release encapsulated insecticide and fertilizer based on superabsorbent polysaccharide microbeads. *Journal of Applied Polymer Science*. 2020;137(39).

149. S. A. Ekanayake, P. I. Godakumbura. Synthesis of a dual-functional nanofertilizer by embedding ZnO and CuO nanoparticles on an alginate-based hydrogel. *ACS omega*. 2021;6(40):26262-26272.

150. M. Moradi Pour, R. Saberi Riseh, R. Ranjbar-Karimi, M. Hassanisaadi, A. Rahdar, F. Baino. Microencapsulation of *Bacillus velezensis* using alginate-gum polymers enriched with TiO<sub>2</sub> and SiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Micromachines*. 2022;13(9):1423.

151. P. Humbert, M. Vemmer, M. Giampà, H. Bednarz, K. Niehaus, A. V. Patel. Co-encapsulation of amyloglucosidase with starch and *Saccharomyces cerevisiae* as basis for a long-lasting CO<sub>2</sub> release. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2017;33(4).
152. P. Humbert, M. Vemmer, F. Mävers, M. Schumann, S. Vidal, A. V. Patel. Development of an attract-and-kill co-formulation containing *Saccharomyces cerevisiae* and neem extract attractive towards wireworms. *Pest Management Science*. 2018;74(7):1575-1585.
153. P. Humbert, M. Vemmer, A. V. Patel. Increased neem extract content enhances drying survival of co-encapsulated *Saccharomyces cerevisiae* and decreases relative release of azadirachtin. *Biocontrol Science and Technology*. 2018;28(2):185-191.
154. M. Vemmer, M. Schumann, W. Beitzten-Heineke, B. W. French, S. Vidal, A. V. Patel. Development of a CO<sub>2</sub>-releasing coformulation based on starch, *Saccharomyces cerevisiae* and *Beauveria bassiana* attractive towards western corn rootworm larvae. *Pest Management Science*. 2016;72(11):2136-2145.
155. M. Vincekovic, N. Jalsenjak, S. Topolovec-Pintaric, E. Dermic, M. Bujan, S. Juric. Encapsulation of Biological and Chemical Agents for Plant Nutrition and Protection: Chitosan/Alginate Microcapsules Loaded with Copper Cations and. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016;64(43):8073-8083.
156. Y. Wang, X. Yu, S. Ma, S. Cao, X. Yuan, W. Zhu, H. Wang. High-value utilization of lignin: construction of an intelligent release system for targeting the delivery of pesticides. *Green Chemistry*. 2024;26(1):42-56.
157. N. Wei, Z. Lv, X. Meng, Q. Liang, T. Jiang, S. Sun, Y. Li, J. Feng. Sodium alginate-carboxymethyl chitosan hydrogels loaded with difenoconazole for pH-responsive release to control wheat crown rot. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023;252.
158. T. Piroonpan, E. Huajaikaew, N. Kurantowicz, P. Potiyaraj, W. Pasanphan. pH-responsive chitosan nanoparticles for controlled-release nitrogen fertilizer: Template-tampering free radical graft copolymerization under energetic radiation study. *European Polymer Journal*. 2024;203.
159. B. Kaith, R. Jindal, M. Kumari, M. Kaur. Biodegradable-stimuli sensitive xanthan gum based hydrogel: evaluation of antibacterial activity and controlled agro-chemical release. *Reactive and Functional Polymers*. 2017;120:1-13.

160. J. Jiang, A. T. Poortinga, Y. Liao, T. Kamperman, C. H. Venner, C. W. Visser. High-Throughput Fabrication of Size-Controlled Pickering Emulsions, Colloidosomes, and Air-Coated Particles via Clog-Free Jetting of Suspensions. *Advanced Materials*. 2023;35(13).
161. A. P. Felizatti, R. M. Manzano, I. M. W. Rodrigues, M. F. D. F. da Silva, J. B. Fernandes, M. R. Forim. Encapsulation of *B. bassiana* in Biopolymers: Improving Microbiology of Insect Pest Control. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12.
162. S. Wintzheimer, L. Luthardt, K. L. A. Cao, I. Imaz, D. Maspoch, T. Ogi, A. Bück, D. P. Debecker, M. Faustini, K. Mandel. Multifunctional, Hybrid Materials Design via Spray-Drying: Much more than Just Drying. *Advanced Materials*. 2023;35(47).
163. D. R. Antunes, M. M. Forini, É. R. Biscalchim, P. H. Lima, L. A. Cavalcante, M. C. Teixeira Filho, D. K. Tripathi, J. P. Caballero, R. Grillo. Polysaccharide-based sustainable hydrogel spheres for controlled release of agricultural inputs. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024:135202.
164. H. Malektaj, A. D. Drozdov, J. deClaville Christiansen. Mechanical properties of alginate hydrogels cross-linked with multivalent cations. *Polymers*. 2023;15(14):3012.
165. E.-R. Kenawy, M. Sakran. Controlled release formulations of agrochemicals from calcium alginate. *Industrial & engineering chemistry research*. 1996;35(10):3726-3729.
166. B. Tomadoni, M. F. Salcedo, A. Y. Mansilla, C. Casalongué, V. A. Alvarez. Macroporous alginate-based hydrogels to control soil substrate moisture: Effect on lettuce plants under drought stress. *European polymer journal*. 2020;137:109953.
167. L. Cao, W. Lu, A. Mata, K. Nishinari, Y. Fang. Egg-box model-based gelation of alginate and pectin: A review. *Carbohydrate polymers*. 2020;242:116389.
168. G. Auriemma, P. Russo, P. Del Gaudio, C. A. García-González, M. Landín, R. P. Aquino. Technologies and formulation design of polysaccharide-based hydrogels for drug delivery. *Molecules*. 2020;25(14):3156.
169. S. Gholamian, M. Nourani, N. Bakhshi. Formation and characterization of calcium alginate hydrogel beads filled with cumin seeds essential oil. *Food Chemistry*. 2021;338:128143.
170. B. Muthumari, B. V. Kumar, M. Kavitha, J. K. J. P. Kumar, N. Arumugam, M. J. Basu. Optimization of sodium alginate-galactoxyloglucan blended hydrogel beads through ionotropic gelation method. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023;242:124630.

171. P. F. Almeida, A. Almeida. Cross-linked alginate–gelatine beads: a new matrix for controlled release of pindolol. *Journal of controlled release*. 2004;97(3):431-439.
172. L. Wang, M. Muhammed. Synthesis of zinc oxide nanoparticles with controlled morphology. *Journal of Materials Chemistry*. 1999;9(11):2871-2878.
173. K. B. Baharudin, N. Abdullah, D. Derawi. Effect of calcination temperature on the physicochemical properties of zinc oxide nanoparticles synthesized by coprecipitation. *Materials Research Express*. 2018;5(12):125018.
174. D. Salama, S. Osman, M. Abd El-Aziz, M. Abd Elwahed, E. Shaaban. Effect of zinc oxide nanoparticles on the growth, genomic DNA, production and the quality of common dry bean (*Phaseolus vulgaris*). *Biocatal Agric Biotechnol* 18: 101083. 2019.
175. H. Faiz, A. Zuberi, S. Nazir, M. Rauf, N. Younus. Zinc oxide, zinc sulfate and zinc oxide nanoparticles as source of dietary zinc: comparative effects on growth and hematological indices of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *International Journal of Agriculture and Biology*. 2015;17(3).
176. K. Suganthi, K. Harish, N. M. Nair, P. Swaminathan. Formulation and optimization of a zinc oxide nanoparticle ink for printed electronics applications. *Flexible and Printed Electronics*. 2018;3(1):015001.
177. E. Keleş Güner, R. Akkaş, A. Özer. Synthesis of zinc sulfate hydroxide trihydrate by chemical precipitation and its transformation to zinc oxide. *Chemical Engineering Communications*. 2022;209(9):1203-1213.
178. D. Ramimoghadam, M. Z. B. Hussein, Y. H. Taufiq-Yap. The effect of sodium dodecyl sulfate (SDS) and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) on the properties of ZnO synthesized by hydrothermal method. *International journal of molecular sciences*. 2012;13(10):13275-13293.
179. P. Li, Y. Wei, H. Liu, X.-k. Wang. Growth of well-defined ZnO microparticles with additives from aqueous solution. *Journal of Solid State Chemistry*. 2005;178(3):855-860.
180. S. S. Adamu, H. A. Umaru, H. O. Albert, A. L. Muhammad. The effect of green synthesized zinc oxide nanoparticles using *Allium cepa* extracts on triton X-100 induced hyperlipidemia in rats. *International Journal of Nutrition Sciences*. 2023;8(1):36-46.
181. S. Fibach-Paldi, S. Burdman, Y. Okon. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters*. 2012;326(2):99-108.

182. P. Saranraj, A. R. M. Al-Tawaha, P. Sivasakthivelan, A. R. M. Al-Tawaha, K. Amala, D. Thangadurai, J. Sangeetha. Azospirillum Bioinoculant Technology: Past To Current Knowledge And Future Prospects. *Organic Farming for Sustainable Development*. 2022;51-76.
183. J. J. TARRAND, N. R. KRIEG. *AZ08pirillturn* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and. *Canadian journal of microbiology*. 1978;129(57):225.
184. F. Cassán, A. Coniglio, G. López, R. Molina, S. Nieves, C. L. N. de Carlan, F. Donadio, D. Torres, S. Rosas, F. O. Pedrosa. Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. *Biology and Fertility of Soils*. 2020;56:461-479.
185. M. H. El-Katatny, M. M. Idres. Effects of single and combined inoculations with *Azospirillum brasilense* and *Trichoderma harzianum* on seedling growth or yield parameters of wheat (*Triticum vulgare* L., Giza 168) and corn (*Zea mays* L., hybrid 310). *Journal of plant nutrition*. 2014;37(12):1913-1936.
186. A. Jalal, C. E. d. S. Oliveira, H. B. Fernandes, F. S. Galindo, E. C. d. Silva, G. C. Fernandes, T. A. R. Nogueira, P. H. G. De Carvalho, V. R. Balbino, B. H. d. Lima. Diazotrophic bacteria is an alternative strategy for increasing grain biofortification, yield and zinc use efficiency of maize. *Plants*. 2022;11(9):1125.
187. F. S. Galindo, J. L. M. Bellotte, J. M. K. Santini, S. Buzetti, P. A. L. Rosa, A. Jalal, M. C. M. Teixeira Filho. Zinc use efficiency of maize-wheat cropping after inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*. 2021;120(2):205-221.
188. J. Kumpiene, A. Lagerkvist, C. Maurice. Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments—a review. *Waste management*. 2008;28(1):215-225.
189. F. Nadeem, S. Abbas, F. Waseem, N. Ali, R. Mahmood, S. Bibi, L. Deng, R. Wang, Y. Zhong, X. Li. Phosphorus (P) and Zinc (Zn) nutrition constraints: A perspective of linking soil application with plant regulations. *Environmental and Experimental Botany*. 2024:105875.
190. A. Suganya, A. Saravanan, N. Manivannan. Role of zinc nutrition for increasing zinc availability, uptake, yield, and quality of maize (*Zea mays* L.) grains: An overview. *Commun Soil Sci Plant Anal*. 2020;51(15):2001-2021.

191. A. Aditya, S. Chattopadhyay, D. Jha, H. K. Gautam, S. Maiti, M. Ganguli. Zinc oxide nanoparticles dispersed in ionic liquids show high antimicrobial efficacy to skin-specific bacteria. *ACS applied materials & interfaces*. 2018;10(18):15401-15411.
192. N. V. Jadhav, A. I. Prasad, A. Kumar, R. Mishra, S. Dhara, K. Babu, C. Prajapat, N. Misra, R. Ningthoujam, B. Pandey. Synthesis of oleic acid functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles and studying their interaction with tumor cells for potential hyperthermia applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013;108:158-168.
193. R. Grillo, J. Gallo, D. G. Stroppa, E. Carbó-Argibay, R. Lima, L. F. Fraceto, M. Bañobre-López. Sub-micrometer magnetic nanocomposites: insights into the effect of magnetic nanoparticles interactions on the optimization of SAR and MRI performance. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2016;8(39):25777-25787.
194. E. V. R. Campos, J. L. d. Oliveira, C. M. G. da Silva, M. Pascoli, T. Pasquoto, R. Lima, P. Abhilash, L. Fernandes Fraceto. Polymeric and solid lipid nanoparticles for sustained release of carbendazim and tebuconazole in agricultural applications. *Scientific reports*. 2015;5(1):13809.
195. M. Hungria, G. O'hara, J. Zilli, R. Araujo, R. Deaker, J. Howieson. Isolation and growth of rhizobia. *Working with rhizobia: Australian Centre for International Agricultural Research*; 2016. p. 39-60.
196. D. Yano, D. Attili, M. Gatti, S. Eguchi, U. Oliveira. *Técnicas de microbiologia em controle de qualidade*. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia" André Tosello. 1991.
197. W. Schmidell, U. de Almeida Lima, W. Borzani, E. Aquarone. *Biotechnologia industrial-vol. 2: Engenharia bioquímica*: Editora Blucher; 2001.
198. E. Gurgur, S. Oluyamo, A. Adetuyi, O. Omotunde, A. Okoronkwo. Green synthesis of zinc oxide nanoparticles and zinc oxide–silver, zinc oxide–copper nanocomposites using *Bridelia ferruginea* as biotemplate. *SN Applied Sciences*. 2020;2(5):911.
199. I. Elhamdi, H. Souissi, O. Taktak, J. Elghoul, S. Kammoun, E. Dhahri, B. F. Costa. Experimental and modeling study of ZnO: Ni nanoparticles for near-infrared light emitting diodes. *RSC advances*. 2022;12(21):13074-13086.
200. N. Kiomarsipour, R. S. Razavi. Characterization and optical property of ZnO nano-, submicro-and microrods synthesized by hydrothermal method on a large-scale. *Superlattices and Microstructures*. 2012;52(4):704-710.

201. M. U. Sumaya, K. H. Maria, F. Toma, M. Zubair, M. Chowdhury. Effect of stabilizer content in different solvents on the synthesis of ZnO nanoparticles using the chemical precipitation method. *Heliyon*. 2023;9(10).
202. H. Shi, S. Huang, J. He, L. Han, W. Zhang, Q. Zhong. 1-Laurin-3-palmitin as a novel matrix of solid lipid particles: Higher loading capacity of thymol and better stability of dispersions than those of glyceryl monostearate and glyceryl tripalmitate. *Nanomaterials*. 2019;9(4):489.
203. S. Zhang, X. Chen, J. Yu, B. Hong, Q. Lei, W. Fang. Hydrophobic fractal surface from glycerol tripalmitate and the effects on C6 glioma cell growth. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016;142:377-384.
204. D. R. Antunes. Preparo e caracterização de nanocarreadores lipídicos híbridos visando a liberação controlada do herbicida atrazina. 2020.
205. M. Mahdavi, M. B. Ahmad, M. J. Haron, F. Namvar, B. Nadi, M. Z. A. Rahman, J. Amin. Synthesis, surface modification and characterisation of biocompatible magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Molecules*. 2013;18(7):7533-7548.
206. F. D. Cassán, C. Penna, C. M. Creus, D. Radovancich, E. Monteleone, I. G. de Salamone, L. Di Salvo, I. Mentel, J. García, M. del Carmen Pasarello Mayans. Protocol for the quality control of *Azospirillum* spp. inoculants. *Handbook for Azospirillum: technical issues and protocols*. 2015:487-499.
207. I. Mallé, A. Kassogué, A. H. Babana, C. OLIVEIRA-PAIVA, I. MARRIEL. A Malian native *Azospirillum* sp. Az6-based biofertilizer improves growth and yield of both rice (*Oryza sativa* L.) and maize (*Zea mays* L.). *African Journal of Microbiology Research* 2020;287-293.
208. D. Rueda, G. Valencia, N. Soria, B. B. Rueda, B. Manjunatha, R. R. Kundapur, M. Selvanayagam. Effect of *Azospirillum* spp. and *Azotobacter* spp. on the growth and yield of strawberry (*Fragaria vesca*) in hydroponic system under different nitrogen levels. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2016;6(1):048-054.
209. R. S. A. Nobrega, F. Moreira, J. Siqueira, A. Lima. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 2004;28:269-279.
210. I. V. Borisov, A. V. Schelud'ko, L. P. Petrova, E. I. Katsy. Changes in *Azospirillum brasilense* motility and the effect of wheat seedling exudates. *Microbiological Research*. 2009;164(5):578-587.

211. F. Salcedo, C. M. Pereyra, A. Arruebarrena Di Palma, L. Lamattina, C. M. Creus. Methods for studying biofilms in *Azospirillum* and other PGPRs. Handbook for *Azospirillum*: Technical issues and protocols: Springer; 2015. p. 199-229.
212. A. A. Kamnev, Y. A. Dyatlova, O. A. Kenzhegulov, A. A. Vladimirova, P. V. Mamchenkova, A. V. Tugarova. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic analyses of microbiological samples and biogenic selenium nanoparticles of microbial origin: Sample preparation effects. *Molecules*. 2021;26(4):1146.
213. S. Bajpai, S. Sharma. Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca<sup>2+</sup> and Ba<sup>2+</sup> ions. *Reactive and functional polymers*. 2004;59(2):129-140.
214. R. S. Özakar, E. Özakar. The effect of polymer amount and crosslinker ratio in polymeric hydrogel beads on characterization. *Journal of Research in Pharmacy*. 2021;25(5).
215. L. Li, J. Zhao, Y. Sun, F. Yu, J. Ma. Ionically cross-linked sodium alginate/ $\kappa$ -carrageenan double-network gel beads with low-swelling, enhanced mechanical properties, and excellent adsorption performance. *Chemical Engineering Journal*. 2019;372:1091-1103.
216. M. Pulat, D. Ozukaya. Preparation and Characterization of Na-Alginate Hydrogel Beads. *The Eurasia Proceedings of Science Technology Engineering and Mathematics*. 2019;6:32-38.
217. L. R. Shivakumara, T. Demappa. Synthesis and swelling behavior of sodium alginate/poly (vinyl alcohol) hydrogels. *Turkish journal of pharmaceutical sciences*. 2019;16(3):252.
218. S. M. Ibrahim, F. I. Abou El Fadl, A. A. El-Naggar. Preparation and characterization of crosslinked alginate–CMC beads for controlled release of nitrate salt. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2014;299:1531-1537.
219. J. Li, Y. Wu, J. He, Y. Huang. A new insight to the effect of calcium concentration on gelation process and physical properties of alginate films. *Journal of Materials Science*. 2016;51:5791-5801.
220. N. Saigal, S. Baboota, A. Ahuja, J. Ali. Microcrystalline cellulose as a versatile excipient in drug research. *Journal of Young Pharmacists*. 2009;1(1):6.
221. M. Hoque, R. P. Babu, C. McDonagh, S. Jaiswal, B. K. Tiwari, J. P. Kerry, S. Pathania. Pectin/sodium alginate-based active film integrated with microcrystalline

cellulose and geraniol for food packaging applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024;271:132414.

222. T. Lindström, C. Soremark. Flocculation of cellulosic dispersions with alginates in the presence of divalent metal ions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1976;55(1):69-72.

223. T. Pongjanyakul. Characterization of microcrystalline cellulose loaded diclofenac calcium alginate gel beads in vitro. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007;62(7):493-498.

224. M. Li, T. Elder, G. Buschle-Diller. Alginate-based polysaccharide beads for cationic contaminant sorption from water. *Polymer bulletin*. 2017;74:1267-1281.

225. D. S. Naidu, M. J. John. Effect of clay nanofillers on the mechanical and water vapor permeability properties of xylan–alginate films. *Polymers*. 2020;12(10):2279.

226. L. Chabane, O. Bouras. Experimental design approach in optimizing the sorption properties of a new generation of reinforced porous hybrid beads. *Arabian Journal of Chemistry*. 2020;13(8):6461-6471.

227. J. Zhou, Q. Sun. Sodium alginate/modified bentonite composite bead adsorptive removal of norfloxacin: static and dynamic adsorption. *Polymers*. 2022;14(19):3984.

228. T. Li, R. Li, Z. Ma, A. Yang, C. Jiao, J. Wang, editors. Preparation of cellulose/sodium alginate/sepiolite porous microspheres and their adsorption properties for methylene blue. *Journal of Physics: Conference Series*; 2021: IOP Publishing.

229. A. Oussalah, A. Boukerroui. Alginate-bentonite beads for efficient adsorption of methylene blue dye. *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration*. 2020;5(2):31.

230. E. Baigorria, L. Cano, L. Sanchez, V. Alvarez, R. Ollier. Bentonite-composite polyvinyl alcohol/alginate hydrogel beads: preparation, characterization and their use as arsenic removal devices. *Environ Nanotechnol Monit Manage* 14: 100364. 2020.

231. V. Erukhimovitch, M. Huleihil, M. Huleihel. Identification of contaminated cells with viruses, bacteria, or fungi by Fourier transform infrared microspectroscopy. *Journal of Spectroscopy*. 2013;2013(1):317458.

232. K. Zhang, Y. Xu, X. Hua, H. Han, J. Wang, J. Wang, Y. Liu, Z. Liu. An intensified degradation of phenanthrene with macroporous alginate–lignin beads immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical engineering journal*. 2008;41(3):251-257.

233. D. Jain, D. Bar-Shalom. Alginate drug delivery systems: application in context of pharmaceutical and biomedical research. *Drug development and industrial pharmacy*. 2014;40(12):1576-1584.
234. P. A. I. Fernando, A. J. Kennedy, K. Pokrzywinski, J. Jernberg, T. Thornell, G. George, G. K. Kosgei, Y. Wang, K. J. Coyne. Development of alginate beads for precise environmental release applications: A design of experiment based approach and analysis. *Journal of Environmental Management*. 2024;351:119872.
235. U. Prüsse, L. Bilancetti, M. Bučko, B. Bugarski, J. Bukowski, P. Gemeiner, D. Lewińska, V. Manojlovic, B. Massart, C. Nastruzzi. Comparison of different technologies for alginate beads production. *Chemical Papers*. 2008;62:364-374.
236. B. Lupo, A. Maestro, J. M. Gutiérrez, C. González. Characterization of alginate beads with encapsulated cocoa extract to prepare functional food: Comparison of two gelation mechanisms. *Food Hydrocolloids*. 2015;49:25-34.
237. Y. Wang, T. Cao, J. Ko, Y. Shen, W. Zong, K. Sheng, W. Cao, S. Sun, L. Cai, Y. L. Zhou. Dissolvable polyacrylamide beads for high-throughput droplet DNA barcoding. *Advanced Science*. 2020;7(8):1903463.
238. S. H. Yeom, A. J. Daugulis, S. H. Lee. Bioremediation of phenol-contaminated water and soil using magnetic polymer beads. *Process Biochemistry*. 2010;45(9):1582-1586.
239. P. Yan, W. Lan, J. Xie. Modification on sodium alginate for food preservation: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2023:104217.
240. N. Nezamdoost-Sani, M. A. Khaledabad, S. Amiri, A. M. Khaneghah. Alginate and derivatives hydrogels in encapsulation of probiotic bacteria: An updated review. *Food Bioscience*. 2023;52:102433.
241. K. Chen, G. Yu, F. He, Q. Zhou, D. Xiao, J. Li, Y. Feng. A pH-responsive emulsion stabilized by alginate-grafted anisotropic silica and its application in the controlled release of  $\lambda$ -cyhalothrin. *Carbohydrate polymers*. 2017;176:203-213.
242. Y. He, Z. Wu, L. Tu, Y. Han, G. Zhang, C. Li. Encapsulation and characterization of slow-release microbial fertilizer from the composites of bentonite and alginate. *Applied Clay Science*. 2015;109:68-75.
243. K. Bastawde. Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1992;8:353-368.
244. E. A. Rennie, H. V. Scheller. Xylan biosynthesis. *Current opinion in biotechnology*. 2014;26:100-107.

245. H. Matsui, K. Ushida, K. Miyazaki, Y. Kojima. Use of ratio of digested xylan to digested cellulose (X/C) as an index of fiber digestion in plant cell-wall material by ruminal microorganisms. *Animal feed science and technology*. 1998;71(3-4):207-215.
246. K. L. Harding, V. M. Aguayo, P. Webb. Hidden hunger in South Asia: a review of recent trends and persistent challenges. *Public health nutrition*. 2018;21(4):785-795.
247. N. M. Lowe. The global challenge of hidden hunger: perspectives from the field. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2021;80(3):283-289.
248. M. G. Mallikarjuna, N. Thirunavukkarasu, R. Sharma, K. Shiriga, F. Hossain, J. S. Bhat, A. C. Mithra, S. S. Marla, K. M. Manjaiah, A. Rao. Comparative transcriptome analysis of iron and zinc deficiency in maize (*Zea mays* L.). *Plants*. 2020;9(12):1812.
249. B. Jarausch-Wehrheim, B. Mocquot, M. Mench. Absorption and translocation of sludge-borne zinc in field-grown maize (*Zea mays* L.). *European Journal of Agronomy*. 1999;11(1):23-33.
250. V. L. R. Pullagurala, I. O. Adisa, S. Rawat, B. Kim, A. C. Barrios, I. A. Medina-Velo, J. A. Hernandez-Viezcas, J. R. Peralta-Videa, J. L. Gardea-Torresdey. Finding the conditions for the beneficial use of ZnO nanoparticles towards plants-A review. *Environmental Pollution*. 2018;241:1175-1181.
251. D. Van Der Straeten, N. K. Bhullar, H. De Steur, W. Gruissem, D. MacKenzie, W. Pfeiffer, M. Qaim, I. Slamet-Loedin, S. Strobbe, J. Tohme. Multiplying the efficiency and impact of biofortification through metabolic engineering. *Nature communications*. 2020;11(1):5203.
252. A. Jalal, M. C. M. T. Filho, E. C. da Silva, C. E. da Silva Oliveira, L. A. Freitas, V. do Nascimento. Plant growth-promoting bacteria and nitrogen fixing bacteria: sustainability of non-legume crops. *Nitrogen Fixing Bacteria: Sustainable Growth of Non-legumes*: Springer; 2022. p. 233-275.
253. R. Nitu, K. Rajinder, K. Sukhminderjit. Zinc solubilizing bacteria to augment soil fertility—A comprehensive review. *Int J Agricult Sci Vet Med*. 2020;8:38-44.
254. K. L. Rana, D. Kour, T. Kaur, R. Devi, A. N. Yadav, N. Yadav, H. S. Dhaliwal, A. K. Saxena. Endophytic microbes: biodiversity, plant growth-promoting mechanisms and potential applications for agricultural sustainability. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2020;113:1075-1107.
255. M. Hungria, R. A. Ribeiro, M. A. Nogueira. Draft genome sequences of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6, commercially used in inoculants for

- grasses and legumes in Brazil. *Genome Announcements*. 2018;6(20):10.1128/genomea.00393-00318.
256. H. Brito-Vega, D. Espinosa-Victoria, J. M. Salaya-Domínguez, E. Gómez-Méndez. The soil biota: importance in agroforestry and agricultural systems. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 2013;16(3):445-453.
257. G. S. Guimarães, A. B. L. Rondina, M. S. Santos, M. A. Nogueira, M. Hungria. Pointing out opportunities to increase grassland pastures productivity via microbial inoculants: Attending the society's demands for meat production with sustainability. *Agronomy*. 2022;12(8):1748.
258. I. Naz, H. Ahmad, S. N. Khokhar, K. Khan, A. H. Shah. Impact of zinc solubilizing bacteria on zinc contents of wheat. *Am Euras J Agric Environ Sci*. 2016;16:449-454.
259. M. K. Lima-Tenório, L. P. Karas, F. Furmam-Cherobim, E. Guerlinguer, A. F. Rubira, M. B. R. Steffens, C. W. Galvão, E. T. Tenório-Neto, R. M. Etto. Encapsulation of Plant Growth-Promoting Bacteria with Gum Arabic Hydrogels: A Potential System for Sustainable Agriculture. *Journal of Polymers and the Environment*. 2024:1-11.
260. H. Cantarella, J. Quaggio, D. Mattos Jr, R. Boaretto, B. Van Raij. *Boletim 100: Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo*. Campinas: Instituto Agronômico de Campinas. 2022.
261. M. Latha, K. Kurienthomas. Zinc-alginate beads for the controlled release of rifampici. *Oriental Journal of Chemistry*. 2018;34(1):428.
262. P. Russo, S. Morello, A. Pinto, P. Del Gaudio, G. Auriemma, R. P. Aquino. Zinc and calcium cations combination in the production of floating alginate beads as prednisolone delivery systems. *Molecules*. 2020;25(5):1140.
263. R. Grillo, N. Z. P. dos Santos, C. R. Maruyama, A. H. Rosa, R. de Lima, L. F. Fraceto. Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsules as carrier systems for herbicides: physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. *Journal of hazardous materials*. 2012;231:1-9.
264. R. López-Cabeza, M. Kah, R. Grillo, Z. Bílková, J. Hofman. Is centrifugal ultrafiltration a robust method for determining encapsulation efficiency of pesticide nanoformulations? *Nanoscale*. 2021;13(10):5410-5418.
265. J. Rojas-Padilla, L. E. De-Bashan, F. I. Parra-Cota, J. Rocha-Estrada, S. de Los Santos-Villalobos. Microencapsulation of *Bacillus* strains for improving wheat (*Triticum turgidum* Subsp. *durum*) growth and development. *Plants*. 2022;11(21):2920.

266. A. Shoaib, H. Shafique, A. Anwar, S. Javed, B. Malik, S. Mehnaz. Iron-Supplemented Alginate Beads of *Pseudomonas chlororaphis* Improves Charcoal Rot Disease Resistance and the Productivity in Tomato Plants. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2024;1-24.
267. T.-H. Anderson, K. H. Domsch. Ratios of microbial biomass carbon to total organic carbon in arable soils. *Soil biology and biochemistry*. 1989;21(4):471-479.
268. E. E. da Silva, P. H. S. de Azevedo, H. De-Polli. Determinação da respiração basal (RBS) e quociente metabólico do solo (qCO<sub>2</sub>). *Comunicado Técnico 99: Embrapa*. 2007.
269. M. M. Pour, R. Saberi-Riseh, K. Esmaeilzadeh-Salestani, R. Mohammadinejad, E. Loit. Evaluation of *Bacillus velezensis* for biological control of *rhizoctonia solani* in bean by alginate/gelatin encapsulation supplemented with nanoparticles. 2021.
270. A. Mendyk, R. Jachowicz. Unified methodology of neural analysis in decision support systems built for pharmaceutical technology. *Expert Systems with Applications*. 2007;32(4):1124-1131.
271. J. C. Cruz, I. A. PEREIRA FILHO, R. C. Alvarenga, M. Gontijo Neto, J. H. M. Viana, M. F. de Oliveira, D. P. Santana. *Manejo da cultura do milho*. Embrapa. 2006.
272. J. C. Cruz, D. Karam, M. A. R. Monteiro, P. C. Magalhães, E. M. Marcio Antonio Resende Monteiro. *A cultura do milho*. Embrapa. 2008.
273. C. S. Demétrio, D. Fornasieri Filho, J. O. Cazetta, D. A. Cazetta. Performance of maize hybrids submitted to different row spacing and population densities. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2008;43:1691-1697.
274. P. C. Magalhães, F. O. DURAES, N. P. CARNEIRO, E. PAIVA. *Fisiologia do milho*. Embrapa. 2002.
275. E. Malavolta, G. C. Vitti, S. d. Oliveira. *Avaliação do estado nutricional das plantas; princípios e aplicações*. 1989.
276. D. Yuan, J. C. Jacquier, E. D. O'Riordan. Entrapment of proteins and peptides in chitosan-polyphosphoric acid hydrogel beads: A new approach to achieve both high entrapment efficiency and controlled in vitro release. *Food chemistry*. 2018;239:1200-1209.
277. P. Yun, S. Devahastin, N. Chiewchan. Microstructures of encapsulates and their relations with encapsulation efficiency and controlled release of bioactive constituents: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2021;20(2):1768-1799.

278. S. Takka, A. Gürel. Evaluation of chitosan/alginate beads using experimental design: formulation and in vitro characterization. *Aaps Pharmscitech*. 2010;11:460-466.
279. A. B. Cesari, N. S. Paulucci, E. I. Yslas, M. S. Dardanelli. 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):10145-10164.
280. J. V. C. Macedo, M. M. Abe, P. B. Sanvezzo, R. Grillo, M. C. Branciforti, M. Brienzo. Xylan-starch-based bioplastic formulation and xylan influence on the physicochemical and biodegradability properties. *Polymer Bulletin*. 2023;80(7):8067-8092.
281. P. Nooeaid, K. Cha-aim, P. Chuysinuan, C. Pengsuk, T. Thanyacharoern, S. Sophonputtanaphoca, S. Techasakul. Nutrient controlled release behaviors and plant growth of NPK encapsulated hydroxyapatite/alginate biocomposite toward agricultural and environmental sustainability. *Materials Research Express*. 2024;11(3):035310.
282. H. Wang, T. Xue, S. Wang, X. Jia, S. Cao, B. Niu, R. Guo, H. Yan. Preparation, characterization and food packaging application of nano ZnO@ Xylan/quaternized xylan/polyvinyl alcohol composite films. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022;215:635-645.
283. E.-S. Chan. Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. *Carbohydrate polymers*. 2011;84(4):1267-1275.
284. J. S. Lal, D. Radha, K. Devaky. Design and synthesis of chitosan/alginate/zinc oxide nanocomposite hydrogel beads as carrier for metformin hydrochloride. *Journal of Molecular Structure*. 2024;1317:139092.
285. M. Islam, A. Javed, Z. U. Rahman, Y. O. Al-Ghamdi, S. A. Khan. Antibacterial composite films of oxidized alginate-chitosan-ZnO anchored Cu nanoparticles for the degradation of organic pollutants. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024;278:134764.
286. A. López-Córdoba, L. Deladino, M. Martino. Corn starch-calcium alginate matrices for the simultaneous carrying of zinc and yerba mate antioxidants. *LWT-Food Science and Technology*. 2014;59(2):641-648.
287. C. Larosa, M. Salerno, J. S. de Lima, R. M. Meri, M. F. da Silva, L. B. de Carvalho, A. Converti. Characterisation of bare and tannase-loaded calcium alginate

beads by microscopic, thermogravimetric, FTIR and XRD analyses. *International journal of biological macromolecules*. 2018;115:900-906.

288. H. Cheng, C. Ford, F. J. Kolpak, Q. Wu. Preparation and characterization of xylan derivatives and their blends. *Journal of Polymers and the Environment*. 2018;26:4114-4123.

289. J. K. Kurian, G. R. Nair, Y. Garipey, V. Orsat, M. Lefsrud, V. Yaylayan, G. V. Raghavan. Comparative evaluation of steam-assisted treatments of biomass components and sweet sorghum bagasse. *Biofuels*. 2015;6(1-2):87-99.

290. Z. K. Shinwari, M. Maaza. The study of structural, physical and electrochemical activity of ZnO nanoparticles synthesized by green natural extracts of *Sageretia thea*. *Archivos De Medicina*. 2017;3(2):9.

291. S. K. Bajpai, N. Chand, V. Chaurasia. Nano zinc oxide-loaded calcium alginate films with potential antibacterial properties. *Food and Bioprocess Technology*. 2012;5:1871-1881.

292. T. G. Mayerhöfer, S. Pahlow, J. Popp. The Bouguer-Beer-Lambert law: Shining light on the obscure. *ChemPhysChem*. 2020;21(18):2029-2046.

293. D. F. Swinehart. The beer-lambert law. *Journal of chemical education*. 1962;39(7):333.

294. E. E. da Silva, P. H. S. de Azevedo, H. De-Polli. Determinação da respiração basal (RBS) e quociente metabólico do solo (qCO<sub>2</sub>). 2007.

295. E. E. KONRAD, D. Castilhos. Atividade microbiana em um planossolo após a adição de resíduos de curtume. *Current Agricultural Science and Technology*. 2001;7(2).

296. S. J. Chapman, C. D. Campbell, R. R. Artz. Assessing CLPPs Using MicroResp<sup>TM</sup>: a comparison with Biolog and multi-SIR. *Journal of Soils and Sediments*. 2007;7:406-410.

297. G. Kaschuk, O. Alberton, M. Hungria. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. *Soil Biology and Biochemistry*. 2010;42(1):1-13.

298. G. D. C. VIEIRA, D.D. & CASTILHOS, R.M.V. Atributos microbianos do solo após a adição de lodo anaeróbio da estação de tratamento de efluentes de parboilização do arroz. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 2011;35:543-550.

299. J. Whitaker, Ostle, N., Nottingham, A. T., Ccahuana, A., Salinas, N., Bardgett, R. D., McNamara, N. P. . Microbial community composition explains soil respiration

- responses to changing carbon inputs along an Amazon-to-Amazon elevation gradient. *Journal of Ecology*. 2014;102(4):1058-1071.
300. A. Chaudhary, A. Hussain, A. Shehzadi, M. Manzoor, M. Shahbaz, B. Deepanraj. Production of ethanol from xylan by indigenous xylanolytic and ethanologenic bacteria isolated from fruit wastes. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*. 2023;57:103216.
301. W. Pan, R. Bolton, E. Lundquist, L. Hiller, editors. Portable rhizotron and color scanner system for monitoring root development. *Root Demographics and Their Efficiencies in Sustainable Agriculture, Grasslands and Forest Ecosystems: Proceedings of the 5th Symposium of the International Society of Root Research, held 14–18 July 1996 at Madren Conference Center, Clemson University, Clemson, South Carolina, USA; 1998: Springer.*
302. B. Martínez-Cano, C. J. Mendoza-Meneses, J. F. García-Trejo, G. Macías-Bobadilla, H. Aguirre-Becerra, G. M. Soto-Zarazúa, A. A. Feregrino-Pérez. Review and perspectives of the use of alginate as a polymer matrix for microorganisms applied in agro-industry. *Molecules*. 2022;27(13):4248.
303. J. Siepmann, N. A. Peppas. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced drug delivery reviews*. 2012;64:163-174.
304. G. Lamberti, I. Galdi, A. A. Barba. Controlled release from hydrogel-based solid matrices. A model accounting for water up-take, swelling and erosion. *International journal of pharmaceutics*. 2011;407(1-2):78-86.
305. D. Ensco, H. Hopfenberg, V. Stannett. Effect of particle size on the mechanism controlling n-hexane sorption in glassy polystyrene microspheres. *Polymer*. 1977;18(8):793-800.
306. P. L. Ritger, N. A. Peppas. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of controlled release*. 1987;5(1):37-42.
307. P. K. Goteti, L. D. A. Emmanuel, S. Desai, M. H. A. Shaik. Prospective zinc solubilising bacteria for enhanced nutrient uptake and growth promotion in maize (*Zea mays* L.). *International journal of microbiology*. 2013;2013(1):869697.
308. A. d. L. Moreno, J. F. Kusdra, A. A. Picazevicz. Rhizobacteria inoculation in maize associated with nitrogen and zinc fertilization at sowing. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 2021;25:96-100.

309. M. Z. Mumtaz, M. Ahmad, M. Jamil, T. Hussain. Zinc solubilizing *Bacillus* spp. potential candidates for biofortification in maize. *Microbiological research*. 2017;202:51-60.
310. N. Gupta, H. Ram, B. Kumar. Mechanism of Zinc absorption in plants: uptake, transport, translocation and accumulation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2016;15:89-109.
311. N. Natasha, M. Shahid, I. Bibi, J. Iqbal, S. Khalid, B. Murtaza, H. F. Bakhat, A. B. U. Farooq, M. Amjad, H. M. Hammad. Zinc in soil-plant-human system: A data-analysis review. *Science of the Total Environment*. 2022;808:152024.
312. B. J. Alloway. Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans. *Environmental geochemistry and health*. 2009;31(5):537-548.
313. F. Masood, S. Ahmad, A. Malik. Role of rhizobacterial bacilli in zinc solubilization. *Microbial biofertilizers and micronutrient availability: the role of zinc in agriculture and human health*. 2022:361-377.
314. R. P. John, R. Tyagi, S. Brar, R. Surampalli, D. Prévost. Bio-encapsulation of microbial cells for targeted agricultural delivery. *Critical reviews in biotechnology*. 2011;31(3):211-226.
315. N. C. Martins, A. Avellan, S. Rodrigues, D. Salvador, S. M. Rodrigues, T. Trindade. Composites of biopolymers and ZnO NPs for controlled release of zinc in agricultural soils and timed delivery for maize. *ACS Applied Nano Materials*. 2020;3(3):2134-2148.
316. J. T. Knijnenburg, P. Kasemsiri, K. Amornrantanaworn, S. Suwanree, W. Iamamornphan, P. Chindapasirt, K. Jetsrisuparb. Entrapment of nano-ZnO into alginate/polyvinyl alcohol beads with different crosslinking ions for fertilizer applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;181:349-356.
317. S. C. Motshekga, S. S. Ray, A. Maity. Synthesis and characterization of alginate beads encapsulated zinc oxide nanoparticles for bacteria disinfection in water. *Journal of colloid and interface science*. 2018;512:686-692.
318. S. Vahidhabanu, D. Karuppasamy, A. I. Adeogun, B. R. Babu. Impregnation of zinc oxide modified clay over alginate beads: a novel material for the effective removal of congo red from wastewater. *RSC advances*. 2017;7(10):5669-5678.
320. D. Feng, B. Bai, H. Wang, Y. Suo. Enhanced mechanical stability and sensitive swelling performance of chitosan/yeast hybrid hydrogel beads. *New Journal of Chemistry*. 2016;40(4):3350-3362.

321. M. Vemmer, M. Schumann, W. Beitzel-Heineke, B. W. French, S. Vidal, A. V. Patel. Development of a CO<sub>2</sub>-releasing coformulation based on starch, *Saccharomyces cerevisiae* and *Beauveria bassiana* attractive towards western corn rootworm larvae. *Pest management science*. 2016;72(11):2136-2145.
322. M. F. Seleiman, A. Ahmad, T. S. Alshahrani. Integrative effects of zinc nanoparticle and PGRs to mitigate salt stress in maize. *Agronomy*. 2023;13(6):1655.
323. M. Hungria, J. Z. Barbosa, A. B. L. Rondina, M. A. Nogueira. Improving maize sustainability with partial replacement of N fertilizers by inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Agronomy Journal*. 2022;114(5):2969-2980.
324. A. Baran. Assessment of zinc content and mobility in maize. *Ecological Chemistry and Engineering A*. 2012;19(7):699-706.
325. C. Gabaldón-Leal, H. Webber, M. E. Otegui, G. A. Slafer, R. Ordóñez, T. Gaiser, I. Lorite, M. Ruiz-Ramos, F. Ewert. Modelling the impact of heat stress on maize yield formation. *Field Crops Research*. 2016;198:226-237.
326. Z. Li, S. H. Howell. Heat stress responses and thermotolerance in maize. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(2):948.
327. E. Hawkins, Fricker, T. E., Challinor, A. J., Ferro, C. A., Ho, C. K., & Osborne, T. M. Increasing influence of heat stress on French maize yields from the 1960s to the 2030s. *Change biology*. 2013;19(3):937-947.
328. C. A. Neyra, J. Döbereiner. Nitrogen fixation in grasses. *Advances in Agronomy*. 1977;29:1-38.
329. D. o. E. Transforming our world: the 2030 Agenda for Sustainable Development. United Nations: New York, NY, USA. 2015.