



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102013019740-8 A2

(22) Data do Depósito: 02/08/2013

(43) Data da Publicação: 29/03/2016
(RPI 2360)



(54) **Título:** INOCULANTE BACTERIANO INCORPORANDO BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO NA FORMA DE FIBRAS E/OU PARTÍCULAS EM MICRO OU NANOESCALA PRODUZIDAS ATRAVÉS DE ELECTROSPINNING/ELECTROSPRAYING

(51) **Int. Cl.:** A01C 1/06

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, TECNANO PESQUISAS E SERVIÇOS LTDA, FUNDAÇÃO AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL - FAPERGS

(72) **Inventor(es):** PATRICIA HELENA LUCAS PRANKE, CLÁUDIO EDUARDO FARIAS NUNES PEREIRA, ENILSON LUIZ SACCOL SÁ

(57) **Resumo:** INOCULANTE BACTERIANO INCORPORANDO BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO NA FORMA DE FIBRAS E/OU PARTÍCULAS EM MICRO OU NANOESCALA PRODUZIDAS ATRAVÉS DE ELECTROSPINNING A presente invenção relaciona-se a inoculante bacteriano incorporando bactérias fixadoras de nitrogênio em veículo polimérico na forma de fibras e/ ou cápsulas em micro ou nanoescala produzidas através de electrospinning ou e/ectrospraying. /ELECTROSPRAYING



INOCULANTE BACTERIANO INCORPORANDO BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO NA
FORMA DE FIBRAS E/ OU PARTÍCULAS EM MICRO OU NANOESCALA PRODUZIDAS
ATRAVÉS DE ELECTROSPINNING/ ELECTROSPRAYING

5 **Campo da invenção**

A invenção presente relaciona-se a inoculante bacteriano incorporando bactérias fixadoras de nitrogênio em veículo polimérico na forma de fibras e/ ou partículas em micro ou nanoescala produzidas através de *electrospinning* ou *electrospraying*.

10 **Antecedentes da Invenção**

A partir da década de 90, o tratamento de sementes vem se localizando no topo da indústria sementeira, em função das preocupações relativas à segurança no trabalho e proteção do meio ambiente, bem como pela semeadura de precisão, uma vez que o processo serve para melhorar a plantabilidade das sementes. Esse fato faz esta tecnologia ser altamente eficiente na proteção das sementes, ao combinar fungicidas com inseticidas (ingredientes ativos) em uma camada, ou filme, feito de polímero líquido adesivo (figura 1). A semente está recoberta com fungicidas, inseticidas, herbicidas, nutrientes, materiais hidrofóbicos e outros aditivos. Considera-se o investimento mais efetivo na implantação e uma lavoura.

Além do tratamento de sementes, a inoculação bacteriana é essencial para a boa germinação e vigor da plântula emergente de leguminosas. Trata-se a inoculação bacteriana de um veículo na forma de pó, como a turfa, ou líquida, no caso do inoculante líquido polimérico, contendo bactérias fixadoras de nitrogênio simbióticas na raiz da planta, o qual será aplicado sobre o tegumento da semente. O nitrogênio é essencial para o crescimento da plântula de leguminosa após a germinação da semente. Por outro lado, é bem conhecido o fato que os fungicidas e solventes orgânicos, entre outros produtos presentes no tratamento de sementes, prejudicam as bactérias benéficas à planta, de modo que inibem o seu crescimento, reduzindo o seu efeito benéfico.

Assim, a aplicação simultânea de tratamento de sementes e inoculação

bacteriana é um desafio para a indústria de pesticidas atualmente. Além da proteção contra os produtos químicos presentes no tratamento de semente, a inoculação com sucesso depende da liberação das bactérias em um tempo ideal, rapidamente nas primeiras 48 horas da plantação para permitir a formação do nódulo junto à raiz, e da preservação da vida da bactéria junto à semente, no solo, depois da plantação. Essas duas características não são providas eficazmente pelas formulações de inoculantes bacterianos existentes no momento do mercado. Assim, as formulações líquidas apresentam vantagens tecnológicas sobre as formulações em pó, especialmente no quesito facilidade de aplicação, ainda são insuficientes para a proteção da bactéria no solo e preservação do vigor da plântula.

Entre as inovações da indústria atual, destacam-se formulações de revestimento polimérico aplicadas na semente no caso do tratamento de sementes. Aplicações de inoculantes bacterianos na forma de filmes poliméricos aplicados eletrostaticamente, secando rapidamente na aplicação, não existem atualmente, e seriam altamente desejáveis pelas razões expostas. O material escolhido para ser empregado como suporte para a produção de inoculantes não deve conter substâncias tóxicas ao microrganismo, deve servir como meio nutritivo para o crescimento e a sobrevivência da bactéria durante o armazenamento, além de ser de fácil obtenção, mantendo constantes suas características. O revestimento contendo bactérias deve, idealmente, permitir a troca de gases da semente em germinação e, quando associado a tratamento de sementes, proteger as bactérias dos patógenos do solo e dos agentes tóxicos empregados no tratamento.

Electrospinning e *electrospraying* são técnicas inovadoras para a produção de fibras ou partículas em micro ou nanoescala. Estes métodos se caracterizam por empregar um campo elétrico de alta voltagem entre dois eletrodos, onde uma solução polimérica é adicionada, gerando mudanças em suas propriedades físico-químicas que levam a produção de fibras ou partículas diminutas que emanam de uma seringa e são projetadas em direção a um coletor eletrizado. Uma importante vantagem do *electrospinning* é a capacidade

de formação de fibras muito finas de poucos nanômetros e de grande superfície, gerando polímeros com melhores propriedades mecânicas.

Essa capacidade de produção de fibras ou partículas em micro ou nanoescala é desejável para a incorporação de elementos vivos como bactérias, pois
5 permite a troca de gases e sua respiração, a partir da diferença de volume livre entre as moléculas dos diferentes polímeros selecionados. Além disso, o polímero consegue controlar a umidade do ambiente peri-tegumento da semente, a partir de sua hidrofiliçidade ou hidrofobicidade e da espessura do revestimento.

10 Atualmente, a incoportação de bactérias em nanofibras em aplicações farmacêuticas ou alimentares são descritas na literatura, mas desconhece-se a incorporação de bactérias fixadoras de nitrogênio na raiz de plantas nos moldes da presente invenção. Como até hoje não existem trabalhos sobre o uso dessa técnica em rizóbios utilizados para a produção de inoculantes
15 comerciais de leguminosas, o uso de *electrospinning* ou *electrospraying* em bactérias de interesse agrícola mostra-se como um campo de estudo inovador. Tradicionalmente foi utilizada a turfa, material de origem vegetal, parcialmente decomposto, encontrada geralmente em regiões pantanosas, como inoculante bacteriano, contudo, o agricultor hoje dá preferência às fórmulas líquidas ou
20 géis, devido à praticidade de uso, de modo de aplicação e maior uniformidade do produto, que hoje correspondem ao maior mercado. Uma aplicação de polímero sólido, como a sugerida nessa patente é um avanço em relação aos inoculantes líquidos, pois é garantida melhor adesão ao tegumento da semente e menor podridão por excesso de água.

25 Em relação aos inoculantes líquidos, poliméricos existentes no mercado, usam-se desde polímeros naturais (casca de arroz ou sabugo, celulose etc.) ou, preferencialmente, sintéticos. A poli (vinil pirrolidona) (PVP) pode ligar-se a compostos tóxicos presentes nos exudatos que são gerados durante a inoculação e a germinação da semente, favorecendo uma melhor aderência
30 das células com as sementes. Diversos trabalhos têm relatado aumento significativo na sobrevivência do rizóbio com a incorporação de PVP ao

inoculante. Alguns autores desenvolveram inoculantes à base de géis polimerizados de poliacrilamida, alginato e goma xantana. Esses materiais apresentam maior estabilidade proporcionando maior sobrevivência da bactéria em períodos mais longos de armazenamento. Como desvantagens, citam-se o

5 custo de aplicação, não tolerância ao calor e a não proteção contra os pesticidas usados no tratamento de sementes.

Assim como os inoculante líquidos, os inoculantes em forma de géis apresentam um desempenho fraco em condições tropicais, fato que tem ocorrido com frequência no Brasil, por exemplo, no centro-oeste; desse modo,

10 protetores de células contra estresses são um fator limitante ao bom desempenho em campo.

Formulações inovadoras empregando nanotecnologia, visando permitir a sobrevivência em condições de estresse, como temperaturas elevadas do solo e baixa umidade, que ocorrem, com frequência, na época da semeadura, bem

15 como a proteção contra outros produtos prejudiciais utilizados no tratamento de sementes, como os fungicidas, inseticidas, é desejável. Como citado, uma formulação sólida também é vantajosa, conforme sugerido nessa patente.

No âmbito patentário, foram localizados alguns documentos relevantes que serão descritos a seguir, no contexto de uso de nanotecnologia ou técnicas de

20 nanotecnologia em aplicações de controle de pragas, insetos ou agricultura em geral.

Relacionadas com nanotecnologia no Brasil.

- PI 0414163-6, intitulado: "método de produção de nanofibras a partir de uma solução de polímero usando fiação eletrostática, e, dispositivo para realizar o

25 mesmo", publicada em 08/09/2004.

- PI 0703280-3, intitulada: "processo de obtenção de nanofibras de nanocompósitos esfoliados de poliamida 6,6 com nanoargila por eletrofiação e nanofibras obtidas", publicada em 04/10/2007.

- PI 0516328-5, intitulada: "método para a preparação de uma rede de

30 nanofibras", publicada em 03/11/2005.

- PI 0408535-3, intitulada: "nanoestruturas de carbono e processo para a

produção de nanotubos, nanofibras e nanoestruturas a base de carbono”, publicada em 22/03/2004.

5 - PI 0317205-8, intitulada: “composições de nanofibras de carbono e oligômeros macrocíclicos polimerizados eletricamente condutores, processo para prepará-las e artigo moldado destas”, deposita em 19/12/2003.

- PI 9710708-5, intitulada: “nanofibras com alta área de superfície”, publicada em 13/05/1997.

10 - PI 0611827-5, intitulada: “métodos, sistemas e materiais de fabricação de nanopartícula”, publicada por: “The University of North Carolina at Chapel Hill (US), North Carolina State University (US) e Liquid Technologies Inc. (US)” em 19/06/2006.

15 - PI 0902080, compreendendo: “... Uma estrutura composta de micro e/ou nanofibras, tramadas na forma de um tecido e/ou não tecido por meio de eletrofiação de um sistema polimérico como solução... Contêm incorporados nos mesmos agentes ativos com forte ação bactericida, bacteriostática e fungicida na forma de nanopartículas metálicas e enzimas proteolíticas como componentes ativos incorporados nas mesmas que atuam no desbridamento dos tecidos desvitalizados. A presente invenção também descreve um curativo inteligente que usa a referida membrana”, publicada por “USP; FAPESP”.

20 - PI 0902050, compreendendo: “Apresenta o produto nanopartículas biodegradáveis sensíveis à variações de temperatura e/ou pH... São usadas para a encapsulação de moléculas ativas, visando sua posterior liberação em um meio específico sob um estímulo também específico..., se o ativo for de aplicação em emulsões ou dispersões de uso cosmético, alimentício ou agroquímico, e o estímulo pode ser a variação de temperatura, ou de pH, ou ambos simultaneamente. Para concretizar um produto, a molécula de interesse a ser nanoencapsulada deve ser solubilizada, dispersa ou emulsionada na solução obtida da solubilização do copolímero de bloco no solvente desejado”, publicada por “USP; Instituto de Pesquisas Tecnológicas”.

30 - PI 0705599-4, compreendendo: “nanopartículas para encapsulação de ingredientes ativos, processo para sua obtenção, composição compreendendo

nanopartículas”, publicada por “Universidade Federal de Santa Catarina (BR/SC)” em 19/04/2007.

NACIONAIS

5 - PI 0520470-4 intitulado "superabsorventes, nanofibras não-trançadas acabadas com os mesmos e seus usos", em nome de Schill + Seilacher Aktiengesellschaft (DE), publicada em 23/12/2005;

- PI 0611827-5 intitulado "métodos, sistemas e materiais de fabricação de nanopartícula", em nome de "The University Of North Carolina At Chapei Hill" (US), North Carolina State University (US) e Liquid Technologies Inc. (US),
10 publicada em 19/06/2006;- PI 0801545-7 intitulado "nanopartículas preparadas à base de ceras naturais da amazónia. processo de obtenção, composição e aplicações das nanopartículas", em nome de Betina Giehl Zanetti Ramos (BR/SC), publicada em 07/05/2008;

- PI 0705599-4 intitulado "nanopartículas para encapsulação de ingredientes
15 ativos, processo para sua obtenção, composição compreendendo nanopartículas" em nome de Universidade Federal de Santa Catarina (BR/SC), publicada em 19/04/2007;

Não foram encontradas patentes nacionais com o foco da presente invenção, ou seja, uso de nanofibras ou microfibras geradas por eletrofiação com fins de
20 uso como inoculante bacteriano.

INTERNACIONAIS:

Existem diversas patentes de uso de fibras de *electrospinning* ou *electropraying* para fins de uso como curativos ou substitutos cutâneos e com propriedades antimicrobianas, ou antibiofilme.

25 Em relação a matrizes de nanofibras contendo bactérias foram encontradas as seguintes, sem se encontrar uso de nanofibras com fim de uso como inoculante bacteriano fixador de nitrogênio em planta, motivador da presente invenção. Ainda há inúmeras descrições de hidrogéis como inoculantes bacterianos para fins de lavoura, nenhum em micro ou nanoescala produzido a partir de
30 electrospinning ou electropraying.

As patentes mais relacionadas com a presente invenção são, mas com uso de

microorganismos distintos e focos de aplicação diferenciados são as seguintes:

- WO nº 051607, depositada em 2010, compreendendo: “uma preparação de concentrado de substâncias biologicamente ativas dispersíveis em água para aplicação em agricultura em escala nanométrica, de partículas insolúveis em água ou de água que são aplicáveis como ingredientes ativos de defensivos agrícolas”, depositada por “Oxiten Ind. e Com. S.A. O foco são dispersíveis em água em nanoescala de agroquímicos, sem relação direta com bactérias.

- Patente dos Estados Unidos nº 0153077, de David Henry (Morigny-Champigny, FR), depositada em 26/06/2008 e intitulada “substrates for immobilizing cells and tissues and methods of use thereof”. São descritos substratos para imobilizar células e tecidos e métodos de utilização dos mesmos. Um substrato para imobilizar células ou tecido, compreendendo: a. uma rede de nanofibras, e b. um substrato de base constituído por um substrato não tecido ou tecido poroso, onde o substrato de base compreende uma primeira superfície exterior, em que a rede de nanofibras é adjacente à primeira superfície exterior do substrato de base. Apesar de citar inúmeros elementos biológicos incluindo feromônio, as descrições se referem apenas a aplicações médico-biológicas.

- Patente dos Estados Unidos no. 0061496, depositado em 2009, por Jonathan Charles Kuhn e Eyal Zussman, intitulada “Encapsulation of bacteria and viruses in electrospun fibers”. Consiste em um método de preservação de organismos na forma viável, compreendendo uso de microorganismos em suspensão numa solução de polímero usada como pré-mistura de *electrospinning*; de modo a formar fibras com um diâmetro não superior a cerca de 5 µm, no qual os organismos distintos são encapsulados em forma viável. As referidas bactérias compreendem *Escherichia coli* ou *Staphylococcus albus*, ou um vírus selecionado a partir dos grupos de vírus bacterianos também pode ser usado. Os referidos vírus de bactérias são cultivadas em *E. coli*. O foco da patente são aplicações médicas. O tipo de microorganismo e aplicação diferenciam da presente patente.

Outra patente trata-se da patente dos Estados Unidos, "Electrospun polymer

fibers comprising particles of bacteria-containing hydrogels”, depositada por Philipps-Universitat Marburg (Marburg, DE) nos Estados Unidos em 2012, sob número 0107900. Trata-se a invenção de fibras de polímeros que compreendem bactérias incorporadas por *electrospinning* sob a forma de

5 partículas de hidrogel. As bactérias que se localizam nessas partículas de hidrogel ou das fibras poliméricas de *electrospinning* são capazes de sobreviver durante um longo período de tempo, sem o fornecimento de água ou de meios de cultura de células e são simultaneamente protegidas contra o efeito danoso de solventes orgânicos.

10 As bactérias aprisionadas em nanofibras são liberadas a qualquer momento através do contato com a água ou sob condições de cultura normais. O foco da patente é sugerido para aplicações em tratamento de esgoto, proteção ambiental (controle de poluição da água), o setor agrícola e alimentar, farmácia, fermentação, e da indústria da construção, mas a descrição de exemplos

15 restringe a proteção ambiental e tratamento de resíduos. Os hidrogéis compreendem poli (vinil álcool), poli (óxido de etileno), polietilenoimina, poli (vinil pirrolidona), ácido poliacrílico, metil-celulose, hidroxipropil-celulose, poliacrilamida, amido ou acetato de celulose parcialmente saponificado, em cada caso, sob a forma de ligações cruzadas. As bactérias imobilizadas nas

20 partículas de hidrogel foram coli (E.) coli e Micrococcus (M.) luteus.

Descrição detalhada da invenção

A presente invenção descreve um inoculante bacteriano incorporando bactérias fixadoras de nitrogênio em veículo polimérico na forma de fibras e/ ou

25 partículas em micro ou nanoescala produzidas através de *electrospinning* ou *electrospraying*.

Muitos compostos estão sendo testados para a formação de nanofibras por *electrospinning* ou *electrospraying* no intuito de incorporar bactérias. Citam-se uso de polímeros sintéticos como poli (álcool vinílico), poli (óxido de etileno), poli (vinil pirrolidona), poliacrilatos (como acrilatos e metacrilatos de

30 hidroxialquila), poliuretanos, poliuréis e poliésteres. Biopolímeros podem ser copolimerizados e submetidos ao *electrospinning* ou *electrospraying* em

associação com os primeiros, citando-se: como quitosana, alginato, derivados de celulose ou amidos, entre outros.

Como propriedades desejadas, busca-se um polímero solúvel em solvente não tóxico, de preferência em solução aquosa, que seja capaz de produzir fibras ou partículas quando submetido ao aparelho eletrostático. Dentre os polímeros sintéticos citados, destaca-se o uso de álcool polivinílico (PVA), com o qual é possível produzir fibras com alto rendimento usando solução, emulsão ou dispersão aquosa, como meio de dissolução. Ele ainda se caracteriza por ser um polímero biodegradável formado através da saponificação de polivinil éster com solução de soda cáustica. Possui excelentes propriedades físicas, como viscosidade, formação de filme, emulsificante, poder dispersante, força adesiva e flexibilidade.

Pela presença dessas características, estudos sobre a utilização deste polímero na imobilização de bactérias de interesse econômico apresentam-se como uma alternativa inovadora e ecologicamente sustentável. Vários trabalhos científicos foram realizados em outras áreas do conhecimento, mas não com fins de uso como inoculante bacteriano de uso agrícola, a idéia que se deseja proteger com a presente patente. Além disso, não havia sido provada a eficiência dessa técnica para a aplicação proposta. Isso porque o encapsulamento das bactérias proporcionado pelas nanofibras de PVA através da técnica de *electrospinning* pode gerar maior proteção ao microrganismo, auxiliando na manutenção de teores de umidade e faixas de temperatura mais favoráveis à sobrevivência microbiana. Estudos prévios verificaram que a sobrevivência de rizóbios da espécie *Bradyrhizobium japonicum*, utilizada em inoculantes comerciais na cultura da soja, é estendida quando imobilizados em PVA. Por ter componentes hidrofílicos, o polímero aumenta a absorção de água, disponibilizando-a para a bactéria e assim minimizando o efeito da dessecação celular.

Deste modo, foram realizados experimentos para avaliar a sobrevivência de rizóbios quando encapsulados em nanofibras de PVA através da utilização do método de *electrospinning* em sementes de soja, bem como a indução de

nodulação dos rizóbios em plântulas de soja originadas de sementes tratadas com a mesma metodologia (exemplos I e II).

A invenção presente relaciona-se a inoculante bacteriano incorporando bactérias fixadoras de nitrogênio em veículo polimérico na forma de fibras e/ ou partículas em micro ou nanoescala produzidas através de *electrospinning* ou *electrospraying*. Não se restringe aos microorganismos testados, mas a qualquer microorganismo capaz de fixar nutrientes em raízes de plantas.

Processo de Obtenção das micro/ nanofibras e micro/ partículas

Electrospinning e *electrospraying* são técnicas eletrohidrodinâmicas versáteis que usam alta tensão, com diferenças de potenciais de até 100 kV, no desenvolvimento de nanofibras e/ou partículas em escala nano ou micrométrica e que permitem o encapsulamento de ativos de interesse em vários tipos de indústrias. A técnica permite o desenvolvimento de blendas poliméricas (mistura de 2 ou mais polímeros), filmes poliméricos de escala nanométrica (20 nm, por exemplo) e espessuras tão pequenas quanto 100 nm, ou menores. Permite a incorporação de ativos em polímeros, elastômeros e aditivação com corantes, conservantes, cargas, bloqueadores UV ou outros aditivos em uma mesma formulação. Os aditivos em escala diminuta permitem a obtenção de novos materiais com características singulares, melhor e mais efetiva distribuição de cargas, com mais resistência, tolerância ao calor ou radiação, assim como encapsulamento de fármacos e com sua liberação controlada.

As micro/nanofibras e as micro/partículas são obtidas pelo método de *electrospinning/electrospraying*. O método funciona pelo princípio eletrostático, onde são processados polímeros fundidos ou soluções de polímeros. Esses polímeros são posicionados entre eletrodos, os quais são ligados à alta tensão, da ordem de dezenas de milhares de volts (figura 3). A solução dispensada numa seringa forma um cone (cone de Taylor) na ponta de uma seringa que, devido ao campo de alta tensão, colapsa sob a forma de um fio ou pulveriza-se como spray, em direção ao eletrodo oposto, onde se deposita no coletor.

Este processo origina uma fibra ou partícula de dimensões pequenas, até nanométrica, que durante um processo contínuo produz micro/nanofibras ou

micro/ partículas. Além da forma comum apresentada na figura ilustrativa, podem ser aplicados anéis extratores ou agulhas coaxiais no processo. Um ou mais polímeros podem ser usados simultaneamente ou em agulhas distintas, com o uso de solventes e cosolventes, aquosos ou orgânicos, também incorporando uma fase oleosa. Assim, uma emulsão pode substituir a solução polimérica, assim como uma dispersão. A fase oleosa pode se tratar de um óleo vegetal ou mineral, ou uma fase orgânica na forma de dois líquidos imiscíveis. Cargas minerais comuns, como micronutrientes, sílica, negro-de-fumo, titânio, argila e outros, podem ser aditivadas na matriz de micro/nanofibras ou micro/partículas. Excipientes como usados em formulações farmacêuticas podem ser usadas como espessantes, modificadores de viscosidade, antiespumantes, secantes, micronutrientes, conservantes e demais.

As fibras ou partículas podem ser observadas na microscopia óptica ou de transmissão eletrônica (MET), assim como sua forma pode ser observada na microscopia de microscopia eletrônica (MEV). A presença do ativo encapsulado pode ser demonstrada por uma técnica calorimétrica (TGA ou DSC), ou técnica do tipo HPLC, espectrofotometria de absorvância UV-Vis ou cromatografia gasosa.

Particularmente, a solução, dispersão ou emulsão polimérica usada como pré-mistura na presente invenção se trata de uma cultura bacteriana misturada com um polímero sintético, ou natural, especialmente selecionado entre os polímeros poli (vinil álcool - PVA), poli (vinil pirrolidona- PVP), poli (óxido de etileno-PEO), poli (hidroxi etil acrilato ou metacrilato), alginato de sódio, derivados de celulose, quitosana e outros. Além do caldo de cultura, um inoculante bacteriano comercial (exemplo 2) pode ser usado na mistura com o polímero como pré-mistura para o *electrospinning* ou *electrospraying*. Protetores celulares diversos podem ser usados com aditivos da pré-mistura. O solvente utilizado é preferencialmente uma solução aquosa.

Especificamente, a presente invenção utiliza o método do *electrospinning/electrospraying* como método de obtenção do referido

inoculante bacteriano para fins agrícolas, cujo veículo é um revestimento de polímeros incorporando pesticida encapsulado em micro ou nanoescala, obtidos por *electrospinning* ou *electrospraying*, na forma de micro-nanofibras e/ou micro/partículas.

- 5 Micro/nanofibras lisas com diâmetros entre 50 nm a alguns poucos micra e partículas com diâmetros de até 20 micrômetros são obtidas pela técnica de *electrospinning/electrospraying*, dependendo da composição polimérica, distância entre agulha e coletor e voltagem aplicada, entre outros parâmetros que são do conhecimento dos versados no ramo.

10 Descrição dos Anexos

Figura 1. Sementes de soja com revestimento polimérico.

- Figura 2.** Número de nódulos presentes em raízes de plântulas de soja ao longo de 30 dias em cujas sementes foram inoculados rizóbios, sem ou com encapsulamento por nanofibras de álcool polivinílico (PVA). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) entre os tratamentos (CV=21,01%).

Figura 3. Demonstra a técnica de *electrospinning* e *electrospraying*. A Figura 3 mostra o processo de *electrospinning/ elecrospray* com as seguintes partes:

- A. Extremidade do Capilar. Local onde é ejetada a solução do polímero
- 20 B. Solução de Polímero
- C: Formação de Nanofibra
- D: Aplicação de Alta Voltagem
- E: Nanofibra Coletada
- F: Coletor. Local onde é depositado o produto final

- 25 Os estudos em laboratório e campo revelaram a viabilidade da técnica inovadora apresentada.

Exemplos

Experimento 1

- 30 Foi realizado um experimento para avaliar a possibilidade de uso de nanofibras gerada por *electrospinning* como inoculante bacteriano a partir de meio de cultura bacteriano de rizóbio. Os inoculantes são produtos contendo bactérias

que promovem a fixação de nitrogênio (N₂) em raízes de plantas leguminosas. A estirpe de *Bradirizhobium japonicum*, testada (SEMIA 5079), cresceram bem em um caldo em meio de cultura levedura-glicerol (YGB) até atingir populações maiores do que 2x10⁹ UFC mL⁻¹ (Unidades Formadoras de Colônias por ml),
5 cerca de cinco dias após a inoculação, quando aproximou-se da fase estacionária de crescimento. Células no meio YGB foram centrifugadas e re-suspendidas em glicerol com solução salina.

A concentração de células foi medida por meio da escala de McFarland, até alcançar 1x10⁹ UFC mL⁻¹. A sobrevivência da bactéria e o pH de todas as
10 culturas foram avaliados antes e depois de passar pelo processo de *electrospinning*. As bactérias em solução salina de glicerol foram dispersas em solução de 16% de PVA estéril 1:1 (v: v), homogeneizados e usada como pré-mistura que foi submetida ao processo de *electrospinning*. A tensão aplicada foi ajustada para cerca de 20 kV. Todos os experimentos foram realizados dentro
15 de um fluxo laminar, sob condições assépticas, para minimizar a contaminação. Bactérias viáveis foram contadas por dissolução de 1 g de formulação sólida em 99 ml de solução salina (0,85% de NaCl, pH 7,0) para efetuar a solução de série decimal e inoculação em placas de petri com meio de ágar vermelho congo levedura -Manitol (CR-YMA). As placas foram incubadas a 28 ± 2 ° C e
20 as colônias produzidas foram contadas após sete dias. As nanofibras foram analisadas após 16 e 24 h após o processo de *electrospinning*. Houve uma redução da ordem de um logaritmo de células viáveis depois de passar pelo processo de *electrospinning*: 9,44x 10⁸ UFC.mL⁻¹ (antes do processo ES) para 6,66x 10⁷ UFC.mL⁻¹. Embora menor essa contagem ainda é suficiente para uso
25 com fins de inoculante bacteriano. Concluindo, as bactérias foram encapsuladas em nanofibras poliméricas por *electrospinning* com sucesso, mantendo a sua viabilidade em níveis relativamente altos.

Experimento 2:

Foi realizado um experimento para avaliar a eficácia de um inoculante
30 bacteriano contendo rizóbio produzido através de *electrospinning* em sementes de soja. Os objetivos do estudo foram avaliar a sobrevivência dos rizóbios em

nanofibras de PVA em semente de soja ao longo do tempo de armazenamento e na presença de fungicida e verificar e nodulação de plântulas de soja. No primeiro experimento, a diferença não foi significativa no tempo zero e após 24h, após 48h, verificou-se uma concentração bacteriana quando se aplicou nanofibras de PVA. O fungicida diminuiu a viabilidade dos microrganismos mesmo na presença de nanofibras. Em casa de vegetação, entre o 15º e o 20º dia verificou-se aumento significativo no número de nódulos em ambos os tratamentos, entretanto, essa diferença não foi observada entre o 20º e o 30º dia nas plântulas com e sem a aplicação de nanofibras (figura 2). Desse modo, a técnica de *electrospinning* auxilia na sobrevivência dessas bactérias mesmo após 48h de armazenamento. O fungicida atua negativamente sob os rizóbios, mesmo quando encapsulados. A degradação de PVA auxilia no crescimento dos rizóbios devido à liberação controlada dos microrganismos no meio, minimizando seu estresse ambiental. Quando os rizóbios são encapsulados por *electrospinning*, o número de nódulos tende a aumentar ao longo dos dias, o que não ocorre com o uso dos inoculantes comerciais usuais.

Deve ficar evidente aos conhecedores da técnica que a presente invenção pode ser configurada de muitas outras formas específicas sem apartar-se do espírito ou do escopo da invenção, particularmente, o uso de outros polímeros e bactérias fixadoras de nitrogênio na raiz de plantas deve ser contemplada. Portanto, os exemplos e configurações presentes devem ser considerados como ilustrativos e não restritivos, e a invenção não deve ser limitada aos detalhes fornecidos neste documento, mas podem ser modificados dentro do escopo e equivalência das reivindicações apresentadas.

Reivindicações

1. INOCULANTE BACTERIANO INCORPORANDO BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO NA FORMA DE FIBRAS E/ OU PARTÍCULAS EM MICRO OU NANOESCALA PRODUZIDAS ATRAVÉS DE ELECTROSPINNING/ELECTROSPRAYING, **caracterizado** pelo inoculante incorporar bactérias fixadoras de nitrogênio e ser um veículo polimérico na forma de fibras e/ou cápsulas em micro ou nanoescala produzidas através de *electrospinning* ou *electrospraying*.
2. INOCULANTE BACTERIANO INCORPORANDO BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO NA FORMA DE FIBRAS E/ OU PARTÍCULAS EM MICRO OU NANOESCALA PRODUZIDAS ATRAVÉS DE ELECTROSPINNING/ELECTROSPRAYING de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelas bactérias fixadoras de nitrogênio serem rizóbio ou *Azospirillum brasilense*.
3. INOCULANTE BACTERIANO INCORPORANDO BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO NA FORMA DE FIBRAS E/ OU PARTÍCULAS EM MICRO OU NANOESCALA PRODUZIDAS ATRAVÉS DE ELECTROSPINNING/ELECTROSPRAYING de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** por conter uma pré-mistura submetida ao processo de *electrospinning* ou *electrospraying*.
4. INOCULANTE BACTERIANO INCORPORANDO BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO NA FORMA DE FIBRAS E/ OU PARTÍCULAS EM MICRO OU NANOESCALA PRODUZIDAS ATRAVÉS DE ELECTROSPINNING/ELECTROSPRAYING de acordo com as reivindicações 1 e 2, **caracterizado** pela pré-mistura incorporar caldo de cultura com bactérias fixadoras de nitrogênio.
5. INOCULANTE BACTERIANO INCORPORANDO BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO NA FORMA DE FIBRAS E/ OU PARTÍCULAS EM MICRO OU NANOESCALA PRODUZIDAS ATRAVÉS DE ELECTROSPINNING/ELECTROSPRAYING de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo caldo de cultura ser associado a uma solução polimérica contida em veículo polimérico.

6. INOCULANTE BACTERIANO INCORPORANDO BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO NA FORMA DE FIBRAS E/ OU PARTÍCULAS EM MICRO OU NANOESCALA PRODUZIDAS ATRAVÉS DE ELECTROSPINNING/ ELECTROSPRAYING de acordo com as reivindicações 1 e 5, **caracterizado**
- 5 pelo veículo polimérico ser em escala reduzida e direcionado para fixação de nitrogênio na raiz de plantas.

Anexos

Figuras



Figura 1

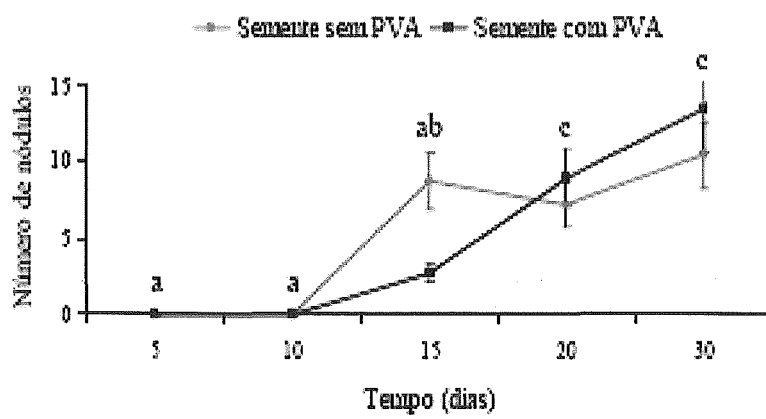


Figura 2

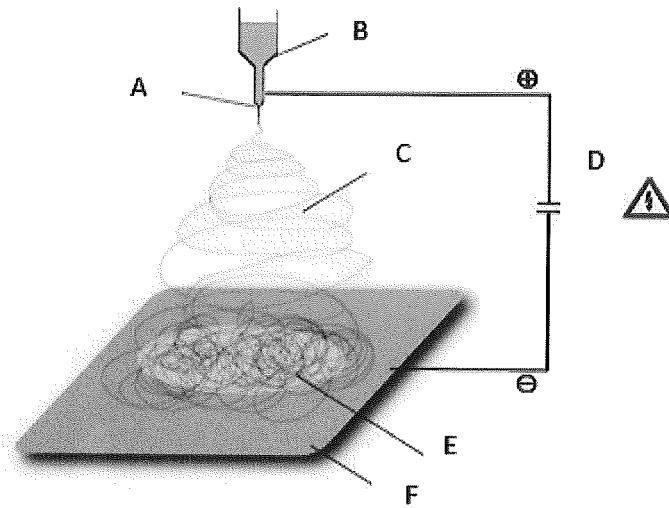


Figura 3

Resumo

INOCULANTE BACTERIANO INCORPORANDO BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO NA
FORMA DE FIBRAS E/ OU PARTÍCULAS EM MICRO OU NANOESCALA PRODUZIDAS
ATRAVÉS DE ELECTROSPINNING/ ELECTROSPRAYING

- 5 A presente invenção relaciona-se a inoculante bacteriano incorporando bactérias fixadoras de nitrogênio em veículo polimérico na forma de fibras e/ ou cápsulas em micro ou nanoescala produzidas através de *electrospinning* ou *electrospraying*.