



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA ELISA STEFANI VERCELHEZE

**REVESTIMENTOS BIODEGRADÁVEIS PARA APLICAÇÃO
EM SEMENTES DE MILHO**

Londrina
2017

ANA ELISA STEFANI VERCELHEZE

**REVESTIMENTOS BIODEGRADÁVEIS PARA APLICAÇÃO
EM SEMENTES DE MILHO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientação: Prof^ª. Dra. Suzana Mali de Oliveira
Co-orientação: Prof. Dr. André Luiz M. de Oliveira

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

VERCELHEZE, Ana Elisa Stefani Vercelheze.

Revestimentos Biodegradáveis para Aplicação em sementes de Milho / Ana Elisa Stefani Vercelheze VERCELHEZE. - Londrina, 2017.

160 f. : il.

Orientador: Suzana Mali de Oliveira MALI.

Coorientador: André Luiz M. Oliveira OLIVEIRA.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Polímeros Biodegradáveis, Revestimentos, Bactéria Promotora do Crescimento Vegetal. - Tese. I. MALI, Suzana Mali de Oliveira. II. OLIVEIRA, André Luiz M. Oliveira. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

ANA ELISA STEFANI VERCELHEZE

**REVESTIMENTOS BIODEGRADÁVEIS PARA APLICAÇÃO EM
SEMENTES DE MILHO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^ª. Dra. Suzana Mali de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^ª. Dra. Ana Paula Bilck
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^ª. Dra. Gizilene Maria de Carvalho
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^ª. Dra. Patrícia Salomão Garcia
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPr

Londrina, 07 de julho de 2017

DEDICATÓRIA

A minha mãe, hoje e sempre!

Bruno, com muito amor!

Raul, de forma inesperada!

AGRADECIMENTOS

Em muitos momentos perdi a fé, deixei de acreditar e até me revoltei com os acontecimentos da vida. Contudo, lá estava aquela chama que acalma, ampara e tudo provê. Obrigada a Deus, aos mestres espirituais e aos anjos guardiões por me auxiliarem nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me fazer entender que tudo valeu a pena.

Nosso amor nasceu da poesia de um samba na padaria, aquele dia chorava o violão, de um olhar, uma conversa, ou então. Bruno, em tão pouco tempo, já superamos tantas coisas juntos, muitos momentos felizes, muitos tristes, momentos de conquistas e de perdas! Meu amor, amigo e companheiro obrigada por tudo!

Você, que sem nenhum aviso chegou de forma inesperada, e eu sem entender nada, fiquei perdida, confusa e com muito medo. Ao contrário de muitas mães, minha primeira reação não foi de alegria. Contudo, da mesma forma que você foi crescendo e tomando conta do meu ventre, devagarinho também, foi ocupando um lugar em meu coração! Raul, dizem que certas coisas acontecem no momento certo, quanto a isso, eu não tenho resposta, talvez eu tenha muito a aprender com você, meu filho!

A minha orientadora professora Suzana Mali de Oliveira, não tenho palavras para expressar minha gratidão, pela paciência, por saber conduzir este trabalho, pelas orientações, correções, por compreender meu excesso de trabalho, pelas palavras de conforto e confiança nos momentos mais difíceis. Meu muito OBRIGADA!

Ao meu co-orientador Professor André Luiz Martinez de Oliveira pela orientação, disponibilidade, sugestões e correções indispensáveis ao longo deste trabalho.

Odair, pela colaboração nas análises agronômicas, por sanar minhas dúvidas mais simples com toda paciência e respeito.

Karina, pela disponibilidade e colaboração nas análises de viabilidade dos microrganismos, sempre ajudando com muito bom humor.

As minhas estagiárias Vitória e Ana Clara, pelo carinho, amizade e acima de tudo pelo grande esforço e comprometimento para o término deste trabalho.

Aos docentes do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia pelos ensinamentos valiosos durante todo o curso.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (CCE/UEL): Nelson Janeiro Rodriguez, Sérgio Nascimento Evangelista, Sandra Aparecida, Elda e colegas de laboratório pela amizade, colaboração e auxílio.

Gustavo, meu eterno, único e verdadeiro amigo!

Ao SENAI - Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial pela dispensa em horas, que me possibilitou a realização deste trabalho.

A todos que contribuíram de alguma forma com este trabalho, Obrigada!

Por entre milhos e tomates
teorias e tantos contrastes
a criação de um revestimento
cujo o amor é a matéria prima e o sentimento
o vetor, propulsor que alimenta
o espírito criativo e toda a vida
e se fazendo a partir de tudo em que se acredita.

Bruno Nielsen Venancio

VERCELHEZE, Ana Elisa Stefani. **Revestimentos biodegradáveis para aplicação em sementes de milho**. 2017. 160 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

O emprego de sementes de alta qualidade influencia diretamente na produtividade agrícola, e dentre as alternativas disponíveis para o tratamento de sementes, o uso de revestimentos com polímeros biodegradáveis é uma técnica muito promissora, pois fornece proteção às sementes contra agentes externos além de serem atóxicos. O presente trabalho teve como objetivo geral produzir revestimentos biodegradáveis elaborados com amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico para a aplicação em sementes de milho e caracterizá-los quanto as suas propriedades físico-químicas, mecânicas, microestrutura e comportamento agrônomico. Os revestimentos foram elaborados utilizando delineamento de misturas ternárias simplex-centróide composto por 10 experimentos. Em uma primeira etapa foram produzidos filmes empregando-se a técnica de *casting*, com diferentes proporções de amido (0 – 3,0 g/100 g formulação), gelatina (0 – 3,0 g/100 g formulação) e álcool polivinílico (0 - 3,0 g/100 g formulação), com a concentração de glicerol fixada em 20 g/100g polímero e de nanoargilas sódica não modificada em 0,2 g/100 g de polímero. Os filmes obtidos neste trabalho tiveram a aparência de um plástico transparente, além de se apresentaram contínuos, homogêneos e com bom aspecto visual, com espessura variando entre 0,11 e 0,13 mm. Os filmes elaborados com os polímeros puros apresentaram os maiores valores de capacidade de absorção de água, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água, e as misturas ternárias (contendo os três polímeros em mistura) foram as que apresentaram os menores valores para estas propriedades. Os espectros de FT-IR dos filmes produzidos neste trabalho com os polímeros puros apresentaram as suas respectivas bandas características com maior intensidade que nas misturas binárias e ternárias. Em seguida, as mesmas formulações estudadas para o preparo dos filmes foram empregadas para o revestimento de dois genótipos de sementes de milho. O processo de revestimento estabelecido neste estudo foi eficiente, pois a maioria das sementes revestidas apresentaram-se contínuas, homogêneas e com boa manuseabilidade. Somente as sementes revestidas com a mistura binária de amido e álcool polivinílico (AM1.5AP1.5) apresentaram-se deficientes quanto a esses parâmetros. A massa média da semente controle (sem revestimento) foi de 0,211 g e a massa média das sementes revestidas variou entre 0,210 e 0,300 g e os resultados de densidade das sementes sem revestimentos foi de 0,741 g/cm³ e das sementes revestidas variou de 0,653 a 0,704 g/cm³, podendo observar que os revestimentos empregados não afetaram os parâmetros de massa e densidade das sementes. As formulações empregadas como revestimentos nas sementes de milho não interferiram no processo de germinação. Ao contrário, as formulações AM3.0 (amido puro), GL3.0 (gelatina pura), AP3.0 (álcool polivinílico puro) e AM1.5GL1.5 (mistura binária amido e gelatina) favoreceram o processo de germinação, com porcentagens de germinação de 90, 90, 89 e 91 %, respectivamente, quando comparadas com a amostra Controle que apresentou porcentagem de 86 % para o genótipo 2B5874X da Dow Agro Sciences. Resultados semelhantes foram encontrados para os genótipos de milho P30F53H da Dupont. Diante dos resultados obtidos, a amostra AM1.5GL1.5, mistura binária entre amido e gelatina, foi selecionada para dar continuidade ao trabalho com a inoculação de uma suspensão bacteriana contendo uma concentração de 10⁶ – 10⁹ células de *A. brasilense* Ab-V5. Ao final de 15 dias, foi possível observar que o revestimento promoveu incremento na viabilidade do microrganismo, se mostrando como uma alternativa para a veiculação deste microrganismo,

considerado uma bactéria promotora do crescimento vegetal. Foi possível o desenvolvimento de formulações para o recobrimento de sementes de interesse agrícola, como as sementes de milho empregadas nesse estudo, utilizando materiais biodegradáveis, atóxicos, de grande disponibilidade e baixo custo, que no geral não afetaram o processo de germinação das sementes, podendo ainda ser carreadores de nutrientes e promotores de crescimento para a planta, visando uma maior produtividade agrícola sem causar danos ao ecossistema.

Palavras Chave: Agricultura Sustentável. Biopolímeros. Gelatina. Amido de Mandioca. Álcool Polivinílico.

VERCELHEZE, Ana Elisa Stefani. **Biodegradable coatings for use in corn seeds**. 2017. 160 pp. Thesis (Doctor Degree in Biotechnology) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

The use of high quality seeds influences directly the agricultural productivity, and among the alternatives available for the treatment of seeds, the use of coatings is a very promising technique since it provides protection against external agents for seeds. Among the materials used for the preparation of seed coatings are the biodegradable polymers, which are inert and allow the carrying of several compounds beneficial for plant growth. Thus, this study aimed to produce biodegradable coatings based on cassava starch, gelatin and polyvinyl alcohol for use in corn seed and to characterize them in terms of their physical, chemical, mechanical, microstructural and agronomic behavior. The coatings were developed using a simplex-centroid design of ternary mixtures consisting of 10 experiments. In a first step, the films were produced by casting employing different proportions of starch (0 - 3.0 g / 100 g formulation), gelatin (0 - 3.0 g / 100 g formulation) and polyvinyl alcohol (0 to 3.0 g / 100 g formulation), with the glycerol concentration fixed at 20 g / 100 g polymer and nanoclays at 0,2 g/100 g polymer. In general, the films obtained in this work had the appearance of a transparent plastic, which had a continuous, homogeneous and good visual appearance, and the film thickness varied between 0.11 and 0.13 mm. The films based on the pure polymers showed the highest values of water absorption capacity, solubility and water vapor permeability, and the ternary mixtures (containing the three polymers) showed the lower values for these properties. The FT-IR spectra of the films produced in this work with pure polymers presented their characteristics bands with greater intensity than in binary or ternary mixtures, indicative of the interactions between them. Then, the same formulations studied for the preparation of films were used to coat two genotypes of corn seeds. The coating process established in this study was efficient because most of the coated seeds showed up continuous, homogeneous and with good maneuverability. Only the seeds coated with the binary mixture of starch and polyvinyl alcohol (AM1.5AP1.5) presented themselves as disabled to these parameters. The seed average mass of control sample (uncoated) was 0.211 g and average mass of the coated seeds ranged between 0.210 and 0.300 g, the density of the uncoated seeds was 0.741 g / cm³ and the density of coated seeds ranged from 0.653 to 0.704 g / cm³ and, in general, it was observed that the employed coatings did not affect significantly the mass and density of the seeds. In general, the formulations used as coatings on corn seeds did not affect the germination process. In contrast, formulations AM3.0 (pure starch), GL3.0 (pure gelatin), AP3.0 (pure polyvinyl alcohol) and AM1.5GL1.5 (binary mixture of starch and gelatin) favor the germination process with germination percentages of 90, 90, 89 and 91%, respectively, compared to the uncoated sample (control), which showed a percentage of 86% for genotype 2B5874X Dow Agro Sciences. Similar results were found for P30F53H corn genotypes of Dupont. Considering the obtained results, the sample AM1.5GL1.5 (binary mixture between starch and gelatin) was selected to continue the work by inoculating a bacterial suspension containing a concentration of 10⁶ - 10⁹ cells of *A. brasilense* Ab-V5. At the end of 15 days, it was possible to observe that the coating promoted an increase in the viability of this microorganism, showing itself as an alternative for the propagation of this microorganism, considered a plant growth-promoting bacteria. It was possible to develop formulations for seeds coatings of agricultural interest, such as corn seeds used in this study, using biodegradable materials, which is inert and has high availability and low cost, which in

general did not affect the seed germination process, and may also be carriers of nutrients and growth promoters for the plant, aiming for an increase in agricultural productivity without causing damage to the ecosystem.

Key words: Sustainable agriculture. Biopolymers. Gelatin. Cassava starch. Polyvinyl alcohol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Estádios vegetativos e reprodutivos da planta de milho	25
Figura 02 - Anatomia e morfologia do grão de milho	27
Figura 03 - Tipos de milho e as proporções do endosperma farináceo e vítreo	28
Figura 04 - Classificação dos Polímeros Biodegradáveis	36
Figura 05 - Estrutura da amilose e amilopectina.....	38
Figura 06 - Esquema das regiões amorfas e cristalinas de um grânulo de amido.....	39
Figura 07 - Propriedades físicas do PVA em função do seu grau de hidrólise e massa molecular	42
Figura 08 - Esquema da síntese do PVA hidrolisado	43
Figura 09 - Estrutura da montmorilonita.....	47
Figura 10 - Esquema dos diferentes tipos de compostos resultante da interação de polímeros e nanoargilas.....	48
Figura 11 - Fluxograma do processo de obtenção das formulações empregadas como revestimentos em sementes de milho	54
Figura 12 - Processo de revestimento das sementes de milho	59
Figura 13 - Filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico empregados como revestimentos biodegradáveis em sementes de milho	66
Figura 14 - Gráfico de contorno para os resultados de umidade dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico	70
Figura 15 - Gráfico de contorno para os resultados de solubilidade dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico	72
Figura 16 - Gráfico de contorno para os resultados de PermA dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico.....	77
Figura 17 - Microscopia eletrônica de varredura (superfície) dos filmes produzidos	78
Figura 18 - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier dos filmes produzidos	80
Figura 19 - Difrátogramas dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico	82
Figura 20 - Curvas de TGA dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico	83
Figura 21 - Gráfico de contorno para os resultados de resistência máxima à tração (RMT) dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico	86

Figura 22 - Resultado do teste de adesão nas sementes de milho com e sem revestimento contendo amido em sua formulação	89
Figura 23 - Microscopia eletrônica de varredura das sementes de milho	91
Figura 24 - Microscopia eletrônica de varredura das sementes de milho	92
Figura 25 - Microscopia eletrônica de varredura das sementes de milho	93
Figura 26 - Gráfico de contorno para os resultados de germinação dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Estádios vegetativos e reprodutivo da planta de milho	23
Tabela 02 - Composição das soluções filmogênicas empregadas para o preparo dos revestimentos segundo o delineamento simplex-centróide para misturas ternárias	53
Tabela 03 - Resultado da avaliação subjetiva nos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico	64
Tabela 04 - Resultados de espessura e pH dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico	67
Tabela 05 - Resultados de umidade dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico.....	69
Tabela 06 - Resultados de solubilidade dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico.....	71
Tabela 07 - Resultados da capacidade de absorção de água em diferentes tempos (1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos)	74
Tabela 08 - Resultados de permeabilidade ao vapor de água dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico.....	75
Tabela 09 - Resultados de T_{max} e T_{90} dos filmes produzidos neste trabalho	84
Tabela 10 - Resistência máxima à tração (RMT) dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico	85
Tabela 11 - Análise subjetiva das sementes de milho revestidas	88
Tabela 12 - Densidade, distribuição de massa e teor de água nas sementes de milho com e sem revestimentos.....	94
Tabela 13 - Ensaio de germinação das sementes de milho (2B5874X da Dow AgroSciences) com e sem revestimento.....	96
Tabela 14 - Ensaio de germinação das sementes de milho (P30F53H da Dupont) com e sem revestimento	97
Tabela 15 - Resultado da viabilidade do microrganismo <i>Azospirillum brasilense</i> AbV5 ao longo do tempo de armazenamento	102

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo Geral	20
2.2	Objetivos Específicos	20
3	REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1	Características Gerais da Cultura do Milho.....	21
3.1.2	Sementes de Milho	26
3.2	Revestimentos para Sementes.....	29
3.2.1	Fatores de Influência no Desenvolvimento de Revestimentos para Sementes.....	33
3.3	Revestimentos Biodegradáveis Para Aplicação em Sementes	35
3.3.1	Amido de Mandioca	38
3.3.2	Álcool Polivinílico.....	41
3.3.3	Gelatina.....	44
3.3.4	Aditivos Empregados na Elaboração de Revestimentos Biodegradáveis.....	45
3.4	Uso de Revestimentos para a Veiculação de Microrganismos.....	48
4	MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1	Materiais	52
4.2	Produção dos Revestimentos	52
4.3	Caracterização dos Filmes	54
4.3.1	Avaliação Subjetiva	54
4.3.2	Espessura	55
4.3.3	Análise de pH das Soluções Filmogênicas	55
4.3.4	Umidade.....	55
4.3.5	Solubilidade	55
4.3.6	Capacidade de Absorção de Água	56
4.3.7	Permeabilidade ao Vapor de água	56

4.3.8	Microscopia Eletrônica de Varredura	57
4.3.9	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)	57
4.3.10	Difração de raios-X.....	58
4.3.11	Análise Termogravimétrica (TGA)	58
4.3.12	Propriedades Mecânicas	58
4.4	Aplicação dos Revestimentos nas Sementes de Milho	59
4.5	Análises Realizadas nas Sementes de Milho	59
4.5.1	Avaliação Subjetiva	59
4.5.2	Teste de Adesão dos Revestimentos.....	60
4.5.3	Densidade Aparente.....	60
4.5.4	Distribuição de Massa.....	60
4.5.5	Determinação do Teor de Água	60
4.5.6	Teste de Germinação	61
4.5.7	Microscopia Eletrônica de Varredura	61
4.6	Inoculação dos Microrganismos no Revestimento	61
4.6.1	Processo de esterilização da Solução Fimogênica.....	61
4.6.2	Adição do Microrganismo ao Revestimento das Sementes.....	62
4.6.3	Avaliação de Viabilidade Microbiana	62
4.7	Análise Estatística.....	63
5	RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	64
5.1	Caracterização dos Filmes	64
5.1.1	Análise Subjetiva	64
5.1.2	Espessura, pH e umidade dos filmes	67
5.1.3	Solubilidade	70
5.1.4	Capacidade de Absorção de Água (CCA)	73
5.1.5	Permeabilidade ao vapor de água (PermA)	75
5.1.6	Microscopia Eletrônica de Varredura	78
5.1.7	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	79
5.1.8	Difração de raios – X.....	81
5.1.9	Análise Termogravimétrica (TGA)	83
5.1.10	Propriedades Mecânicas	85
5.2	Resultados das Análises Realizadas nas Sementes de Milho	87
5.2.1	Análise Subjetiva	87

5.2.2	Adesão dos Revestimentos	89
5.2.3	Microscopia Eletrônica de Varredura	90
5.2.4	Densidade, Distribuição de Massa e Teor de Água	93
5.2.5	Testes de Germinação das Sementes	95
5.3	Estudo da Viabilidade do <i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i> ABV5	100
6	CONCLUSÃO	103
	REFERÊNCIAS	105
	ANEXOS	
	I – Patente	127
	II – Artigo	138

Esta tese está apresentada no formato convencional, contendo Introdução, Objetivos, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusão e Referências.

Estão apresentados em anexo uma Patente que foi depositada em janeiro de 2017, resultado deste trabalho, e um artigo que foi concluído e será enviado para publicação no periódico Industrial Crops and Products.

1 INTRODUÇÃO

A agricultura é tão antiga quanto a humanidade, tendo seu início no Oriente Médio há pelo menos 10.000 anos a.C. (ULUKAN, 2008), sendo uma das principais formas de subsistência (KIRCHMANN; THORVALDSSON, 2000). Com o passar do tempo, a domesticação de algumas espécies de plantas proporcionou maior disponibilidade de alimentos e, conseqüentemente, o desenvolvimento da agricultura em grande escala (KAREIVA et al., 2007).

Com o desenvolvimento e a difusão da agricultura em diferentes regiões do mundo, somados ao advento da Revolução Industrial, houve o crescimento da população e da economia ligada à produção de alimentos (BELLWOOD, 2001). A prática da agricultura inicialmente era conduzida de forma rudimentar, sem o uso de insumos químicos e maquinarias pesadas com tração mecânica, havia integração entre agricultura e pecuária e o agricultor produzia sua própria semente e insumos necessários (EHLERS, 1999).

Porém, com as mudanças na taxa de crescimento da população mundial durante o século XIX, foram necessários maiores avanços na agricultura, na indústria, saúde e nas condições sanitárias (NEBEL; WRIGHT, 1993). A população mundial ultrapassou a marca de 7,0 bilhões de habitantes, e estima-se que em 2030 a população mundial alcançará o número de 8,5 bilhões, 9,7 bilhões em 2050 e 11 bilhões em 2100 (ONU, 2015). Diante disso, a agricultura tem sido uma preocupação por gerações com o intuito de sustentar o crescimento das populações humanas (ROSEGRANT; CLINE 2003).

Dentro deste contexto, foi notável a expansão da produção agrícola nas últimas quatro décadas. O forte investimento em uma agricultura baseada em ciência permitiu um grande avanço no desenvolvimento de sistemas produtivos agropecuários, que responderam a contextos, nacionais e internacionais, cada vez mais dinâmicos e competitivos (EMBRAPA, 2014). A agricultura moderna é caracterizada pela busca constante do aumento da produtividade das culturas agrícolas por meio da utilização da mecanização, irrigação, adubação química e aplicação de defensivos agrícolas, aliadas ao melhoramento dos genótipos vegetais (ZILLI et al., 2003).

Em contrapartida, o avanço no setor agrícola levou a um quadro de intensa degradação ambiental, com a perda de recursos não renováveis e da biodiversidade (SHIKI, 1997). De acordo com a FAO (2011), o solo é um dos sistemas mais afetados, pois as práticas agrícolas causam erosão hídrica e eólica, perda de matéria orgânica, compactação superficial, salinização, perda de nutrientes e poluição. Estima-se que 25 % do solo do planeta estejam

degradados, 8 % moderadamente degradados, 36 % estáveis ou levemente degradados e 10 % em recuperação.

Desta forma, para se garantir a sustentabilidade futura da agricultura, frente às mudanças climáticas e à intensificação de estresses bióticos e abióticos previstos para as próximas décadas, são necessários avanços em diversos campos do conhecimento científico e tecnológico, visando racionalizar o uso de recursos naturais como a água e solo e na preservação da biodiversidade (EMBRAPA, 2014). Assim, a agricultura moderna tem exigido dos diferentes segmentos mudanças profundas no sentido de racionalização do processo produtivo, objetivando minimizar o impacto no meio ambiente (COSTA et al., 1997). Dentre essas tecnologias, a utilização de sementes de alta qualidade tem destaque por influenciar diretamente a produtividade agrícola, haja vista que dela depende a maximização da ação dos demais insumos (UTINO; PETERS, 2006).

Neste sentido, a produção de sementes de alta qualidade genética, fisiológica, física e sanitária é um grande desafio visando o aumento da produtividade (NASCIMENTO, 2004). Para tal fim, diferentes tipos de tratamentos de sementes têm sido desenvolvidos, visando um melhor estabelecimento de plântulas no campo. Dentre estes tratamentos pode-se citar o condicionamento osmótico e o tratamento contra microrganismos (NASCIMENTO, 2000), o uso de sementes híbridas (CRUZ; PEREIRA FILHO; QUEIROZ, 2015) e transgênicas (WAQUIL et al., 2011) e o emprego de técnicas de recobrimento (BAUDET; PERES, 2004). Este último se destaca por ser uma técnica eficaz de tratamento na pré - semeadura, pelo fato de dar proteção às sementes contra agentes externos, possibilitar o fornecimento de nutrientes, oxigênio, reguladores de crescimento, proteção fitossanitária, herbicidas e também por permitir uma semeadura de precisão em cultivos com plantio direto (SAMPAIO; SAMPAIO, 1994).

Diferentes compostos podem ser empregados na elaboração de revestimentos para aplicação em sementes de interesse agrícola, com destaque os polímeros biodegradáveis, por serem atóxicos, biodegradáveis, possuir alta capacidade de absorção de água, baixo custo e, na sua maioria, provenientes de fontes renováveis (BRITO et al., 2011). O desenvolvimento de novos materiais para a produção de revestimentos de sementes pode ser útil, pois resulta na obtenção de um veículo inerte para a incorporação de diferentes compostos de interesse às sementes, se tornando uma alternativa viável para uma agricultura sustentável. Este trabalho se insere neste contexto, por meio da produção de revestimentos biodegradáveis à base de amido de mandioca, gelatina, álcool polivinílico para a aplicação em sementes de milho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar revestimentos biodegradáveis à base de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico para aplicação em sementes de milho.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- desenvolver revestimentos biodegradáveis por *casting* empregado delineamento experimental de misturas simplex-centróide com 10 experimentos;
- caracterizar os revestimentos biodegradáveis produzidos quanto à aparência, propriedades mecânicas, propriedades de barreira, solubilidade, pH, microestrutura e propriedades térmicas;
- definir o melhor método de aplicar o recobrimento às sementes e avaliar a eficácia da adesão dos revestimentos nas sementes de milho;
- avaliar o comportamento agrônômico e a qualidade fisiológica de sementes de milho com e sem revestimentos por meio de testes de germinação;
- determinar a melhor forma de incorporação do *Azospirillum brasilense* Ab-V5 aos revestimentos e determinar seu tempo de sobrevivência nas formulações de revestimentos produzidas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA CULTURA DO MILHO

Um dos grandes desafios da agricultura moderna é produzir alimentos com boa qualidade e em quantidade suficiente para alimentar a população mundial, sem degradar o solo e o ecossistema. Estima-se que deverá haver um aumento entre 70 - 100 % na produção mundial de alimentos até 2050 para atender a demanda por alimentos gerada pelo crescimento populacional (KASHYAP; XIANG; HEIDEN, 2015).

Diante disso, o Brasil se destaca pois possui terras férteis, com aproximadamente 388 milhões de hectares de terras agricultáveis e de alta produtividade além de clima propício. Ainda, o Brasil é um dos principais produtores e fornecedores de alimentos do mundo. Em 2015 o agronegócio respondeu por 23 % do Produto Interno Bruto (PIB), 42 % das exportações e 37 % dos empregos gerados no país (MAPA, 2015). A produção de grãos no Brasil é de 208,8 milhões de toneladas, superando a produção de 2013/14 que foi de 193,62 milhões de toneladas. Este crescimento se deve principalmente ao ganho de produtividade do milho segunda safra, registrado em quase todos os estados produtores, principalmente nos do Centro-Oeste e no Paraná. Com 54 milhões de toneladas, um aumento de 11,6 % a mais que em 2013/2014. Com relação ao último levantamento, houve um acréscimo de 2,5 milhões de toneladas (CONAB, 2015).

Isso se dá devido a utilização de novas tecnologias na área agrícola, visando uma alta produtividade e com mínimo impacto no ambiente. Assim, o emprego de sementes de alta qualidade tem destaque por influenciar diretamente a produtividade agrícola (UTINO; PETERS, 2006). O milho é uma das principais culturas, com grande importância econômica e social no mundo. A cultura encontra-se amplamente disseminada no Brasil, fato este relacionado tanto à sua multiplicidade de uso nas propriedades rurais quanto à tradição de cultivo deste cereal pelos agricultores brasileiros (PAIVA, 2011).

O milho é uma gramínea da família das *Poaceas*, do gênero *Zea* e da espécie *Zea mays* L. (LIMA, 2007), é uma cultura amplamente difundida, devido à facilidade de adaptação aos diferentes ecossistemas (EMBRAPA MILHO e SORGO, 2008). Sua origem tem sido investigada e há relatos de que o seu centro de origem seja o México (MACNEISH; EUBANCKS, 2000).

O fornecimento de milho se dá para a alimentação humana sob diversas formas de grãos secos e verdes. No caso de grãos verdes para consumo *in natura*, pode ser consumido

cozido ou assado, processado para fazer curau, pamonha e suco e, ainda, como ingrediente para fabricação de bolos, biscoitos, sorvetes e uma série de outros tipos de alimentos (PEREIRA FILHO, 2002). Possui vasta aplicação nas indústrias processadoras de alimentos e para a exportação, com grande importância para a economia de nosso país. Ainda, na alimentação animal, representa a maior parte do consumo desse cereal, com cerca de 70 % em escala mundial (DUARTE, 2006).

Com o aumento gradativo do nível tecnológico para a produção de milho, adubação, defensivos, tratamentos culturais e híbridos, deve-se, mediante a essas tecnologias, entender a importância e as fases críticas desta cultura, podendo planejar melhor a época de semeadura para os diferentes tipos de híbridos, assim como suas necessidades, maximizando o potencial produtivo (WEISMANN, 2008). Assim, para um eficiente manejo de irrigação, de nutrientes e de outras práticas culturais é de fundamental importância o conhecimento das diferentes fases de crescimento do milho com suas diferentes demandas (MAGALHÃES; DURÃES, 2006). O milho é uma planta com metabolismo fotossintético C₄, que possui processos que otimizam a absorção de CO₂, bem como a utilização de nitrogênio e água. Não apresenta saturação luminicamente, sendo que há uma estreita relação entre o rendimento da cultura e sua capacidade de aproveitamento da capacidade de energia solar (BLACKMAN; HUDGSON, 1957 apud BORGES, 2006).

De acordo com Borges (2006), pode ocorrer equívocos de interpretação ao avaliar o ciclo da planta de milho baseando-se somente na sua idade, que normalmente é expressa em dias após plantio (DAP) ou em dias após emergência (DAE). O ciclo da cultura pode ser dividido em estádios distintos de desenvolvimento, baseados na ocorrência de eventos fisiológicos. No cultivo do milho é necessário que a planta apresente condições adequadas de interceptação de radiação solar, a qual é função direta da população e da distribuição de plantas na área. A cultura apresenta ciclo vegetativo variável, abrangendo desde genótipos precoces, onde a polinização pode ocorrer 30 dias após a emergência (DAE), até mesmo aqueles cujo ciclo vital pode alcançar 300 DAE, ou seja, ciclo mais tardio. No Brasil, o milho apresenta ciclo vegetativo variando entre 110 a 180 DAE, em função da caracterização dos genótipos conforme os ciclos vegetativos (FANCELLI; DOURADO NETO, 2000).

O período de crescimento e desenvolvimento do milho é limitado pela água, temperatura e radiação solar. A cultura do milho necessita que esses índices atinjam níveis considerados ótimos, para que o seu potencial genético de produção se expresse ao máximo. A temperatura ideal para o desenvolvimento do milho, da emergência à floração, está compreendida entre 24 e 30 °C. O milho é uma cultura muito exigente em água.

Entretanto, pode ser cultivado em regiões onde as precipitações vão desde 250 mm até 5000 mm anuais, sendo que a quantidade de água consumida pela planta, durante seu ciclo está em torno de 600 mm. A radiação solar é um dos parâmetros de extrema importância para a planta. Grande parte da matéria seca do milho, cerca de 90 %, provém da fixação de CO₂ pelo processo fotossintético. Uma redução de 30 % a 40 % da intensidade luminosa, por períodos prolongados, atrasa a maturação dos grãos ou pode acarretar até mesmo queda na produção (CRUZ et al., 2010).

A fenologia das plantas tem diversas aplicações importantes no campo da agricultura, a do milho tem recebido atenção e estudos continuados. Durante as últimas décadas do Século XX, a escala fenológica foi descrita por Hanway (1963, 1966). No Brasil, Fancelli (1986) fez adaptações à clássica escala de Hanway, onde acrescentou a duração média dos intervalos entre os estádios da cultura, considerando uma ampla faixa de genótipos e climas brasileiros (BERGAMASCHI; MATZENAUER, 2014). As plantas de milho acompanham um mesmo padrão de desenvolvimento, contudo, os intervalos de tempo específico entre os estádios e o número total de folhas desenvolvidas podem variar conforme a cultivar empregada, ano agrícola e local. O sistema de identificação empregado divide o desenvolvimento da planta em vegetativo (V) e reprodutivo (R), conforme observado na Tabela 1 (MAGALHÃES; DURÃES, 2006).

Tabela 01- Estádios vegetativos e reprodutivos da planta de milho.

Estádios Vegetativos	Estádios Reprodutivos
VE, emergência	R1, Embonecamento
V1, 1ª folha desenvolvida	R2, Bolha d'água
V2, 2ª folha desenvolvida	R3, Leitoso
V3, 3ª folha desenvolvida	R4, Pastoso
V4, 4ª folha desenvolvida	R5, Formação de dente
V(n), nª folha desenvolvida	R6, Maturidade Fisiológica
VT, pendoamento	-----

Fonte: MAGALHÃES; DURÃES, 2006. Subdivisões dos estádios vegetativos: V1, V2, V3 até V(n); em que (n) representa a última folha emitida antes do pendoamento (Vt).

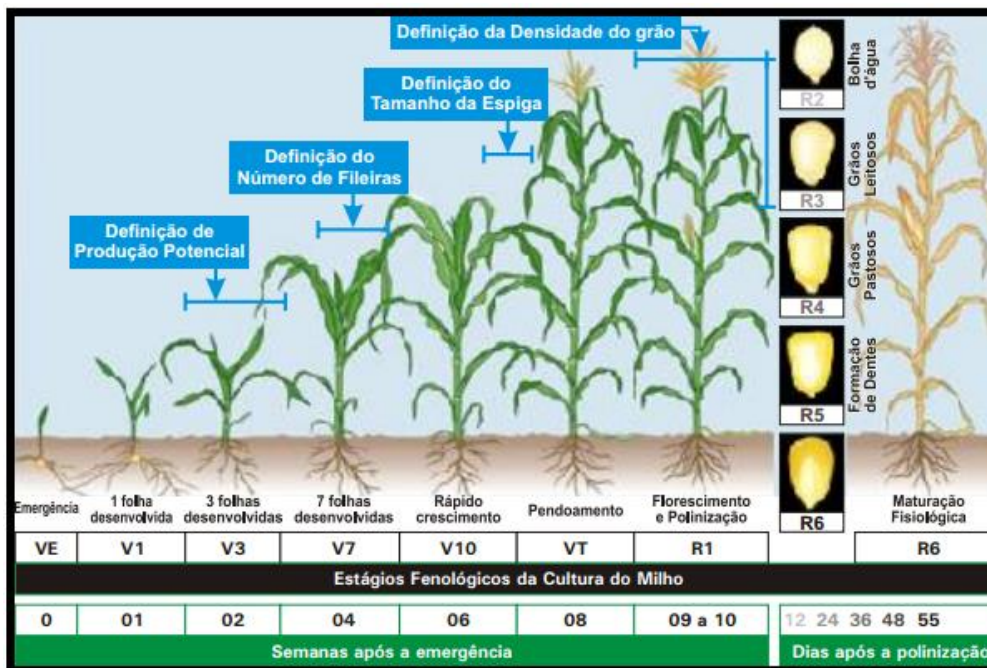
De forma geral, os estádios vegetativos e reprodutivos da planta de milho estão descritos abaixo (WEISMANN, 2008):

- A fase da germinação e emergência é uma das mais importantes para o sucesso da lavoura de milho, pois é nela que se determina o fator de rendimento, que é o número de plantas por hectare. A emergência ocorre entre 4 e 5 dias após sementeira.
- O estágio V3, observa-se a formação de três folhas completamente desenvolvidas que ocorre aproximadamente duas semanas após a emergência e o estágio V5 é caracterizado por cinco folhas completamente desenvolvidas, de forma microscópica, a iniciação do pendão na extremidade do caule, logo abaixo da superfície do solo.
- No estágio V6 verificam-se seis a oito folhas desenvolvidas, conhecida como estágio do “cartucho”, em que o ponto de crescimento e o pendão já estão acima do nível do solo e o colmo estão iniciando um período de alongação acelerada. O estágio V8 se caracteriza pela queda das primeiras folhas e a planta define o número de fileiras de grãos nas espigas.
- No estágio V9 a V10 todo nó da planta tem potencial para produzir uma espiga, exceto os últimos 6 a 8 nós abaixo do pendão. Nesse estágio, ocorre alta taxa de desenvolvimento de órgãos florais. O Estádio 12 é descrito como um dos mais críticos, pois se define os números de óvulos e tamanho da espiga, estendendo-se até o V17.
- VT pendoamento caracteriza-se quando o último ramo do pendão está completamente visível e os cabelos não tenham ainda emergido da espiga. A emissão do pendão acontece dois a quatro dias antes da exposição dos cabelos. De 10 a 12 dias após o aparecimento do pendão, cerca de 70 % das espigas apresentam exposição dos cabelos.
- Estádio R1 se dá no momento em que os cabelos estão fora da espiga, inicia-se o estágio de embonecamento. A polinização ocorre quando o grão de pólen liberado é capturado por um dos estilos-estigmas. O número de óvulos que será fertilizado é determinado nesse estágio.
- Estádio R2 se define pela coloração branca dos grãos, pois o endosperma nesta fase é basicamente um líquido e sua composição é de açúcares. No estágio R3 o grão passa a ser leitoso, e a planta define a densidade dos grãos. O estágio R4 ocorre a acumulação de amido. Estádio R5 é caracterizado pelo aparecimento

de uma concavidade na parte superior do grão, comumente designada de dente, sendo a fase de transição do estado pastoso para o farináceo.

- Estádio R6 é o estágio de maturação fisiológica, onde todos os grãos na espiga alcançam o máximo de peso seco e vigor. A Figura 01 mostra os estádios de desenvolvimento da cultura de milho.

Figura 01 - Estádios vegetativos e reprodutivos da planta de milho.



Fonte: Adaptado de FANCELLI, 1986 apud WEISMANN, 2008.

No Brasil, a produção de milho tem sido caracterizada pelo cultivo em duas épocas (EMBRAPA MILHO e SORGO, 2008). A época de semeadura mais adequada é aquela que faz coincidir o período de floração com os dias mais longos do ano e a etapa de enchimento de grãos com o período de temperaturas mais elevadas e alta disponibilidade de radiação solar. No Sul do Brasil, o milho geralmente é plantado de agosto a setembro e, à medida que se caminha para os estados do Centro-Oeste e Sudeste, a época de semeadura na safra varia de outubro a novembro. Por ser plantado no final da época normal, no Estado do Paraná o milho safrinha pode ter sua produtividade bastante afetada pelas limitações de água, radiação solar e temperatura em estágios avançados de desenvolvimento (CRUZ et al., 2010).

Do ponto de vista nutricional, a planta de milho é exigente quanto aos níveis de adubação, com ganhos crescentes em produtividade (BORGES, 2006). Sendo que o aumento

da produtividade está diretamente vinculado à maximização da exploração do ambiente, que ocorre de forma mais efetiva quanto há uniformidade entre as plantas dentro da cultura. Dessa forma, a uniformidade de emergência de plântulas e o seu crescimento inicial nas lavouras comerciais é algo fundamental para que a competição entre as plantas seja equilibrada e todas tenham a mesma capacidade de uso dos recursos como luz, água e nutrientes (MONDO, 2009).

As altas exigências nutricionais da cultura de milho estão diretamente ligadas com sua produtividade, o milho possui alto requerimento por nitrogênio, potássio, seguindo-se cálcio, magnésio e fósforo. Com relação aos micronutrientes, as quantidades requeridas pelas plantas são baixas. Para uma produtividade de 9 t de grãos/ha, são extraídos: 2.100 g de ferro, 340 g de manganês, 400 g de zinco, 170 g de boro, 110 g de cobre e, 9 g de molibdênio. Porém, a deficiência de um deles pode ter tanto efeito na desorganização de processos metabólicos como na redução da produtividade (COELHO, 2006).

Diante do exposto acima, pode-se descrever que a cultura do milho, por sua versatilidade, adapta-se a diferentes sistemas de cultivo. Embora apresente alto potencial de produção, o rendimento de milho, no Brasil, ainda é muito baixo. Levando, ainda, em consideração a qualidade e o potencial da semente de milho disponível, com predominância dos híbridos simples, verifica-se que é fundamental um aperfeiçoamento dos sistemas de produção para que esses materiais possam expressar ao máximo seu potencial genético, alcançando altas produtividades em sistema de produção sustentáveis (CRUZ et al., 2010).

3.1.2 Semente de Milho

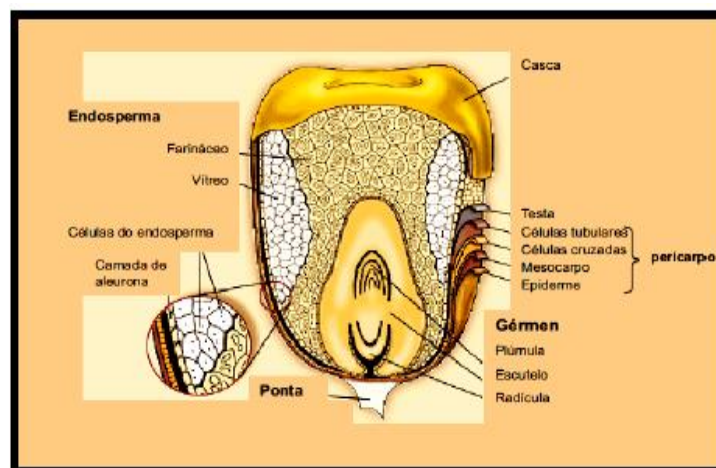
O termo semente é empregado, em geral, para designar o conjunto formado por um esporófito jovem, o embrião, um tecido de reserva alimentar, o endosperma e um envoltório protetor. O embrião, juntamente com as estruturas que o rodeiam, constitui a unidade de dispersão, ou diásporo, que tanto pode ser uma semente, um fruto ou, ainda, uma estrutura mais complexa. Logo, a semente constitui a unidade reprodutiva das espermatófitas, cuja função se relaciona com a dispersão e a sobrevivência das espécies (BELTRANI; PAOLI, 2006).

A semente é o principal insumo de uma lavoura, e sua escolha está diretamente ligada ao sucesso da cultura. Aspectos relacionados às características da cultivar, como o potencial produtivo, resistência a doenças, adequação ao sistema de produção e às condições edafoclimáticas deverão ser levados em consideração. Na safra 2013/14, foi

disponibilizado 467 cultivares de milho, sendo 253 cultivares transgênicas e 214 cultivares convencionais. Pela primeira vez, o número de cultivares transgênicas é maior do que o das cultivares convencionais (CRUZ; PEREIRA FILHO; QUEIROZ, 2015).

O grão de milho é composto por endosperma, embrião e pericarpo (Figura 02). O pericarpo representa 5 % do peso do grão, possui baixos teores de amido e proteína sendo rico em fibras. O embrião representa 11 % do peso do grão, apresenta alto teor de lipídios e proteína e pouca quantidade de amido. O endosperma, que representa mais de 80 % do grão, é constituído principalmente de amido (CORRÊA, 2001). O grão de milho pode apresenta cores bastante variadas, como branca, amarelada e vermelha conforme a espécie (PAES et al., 2006).

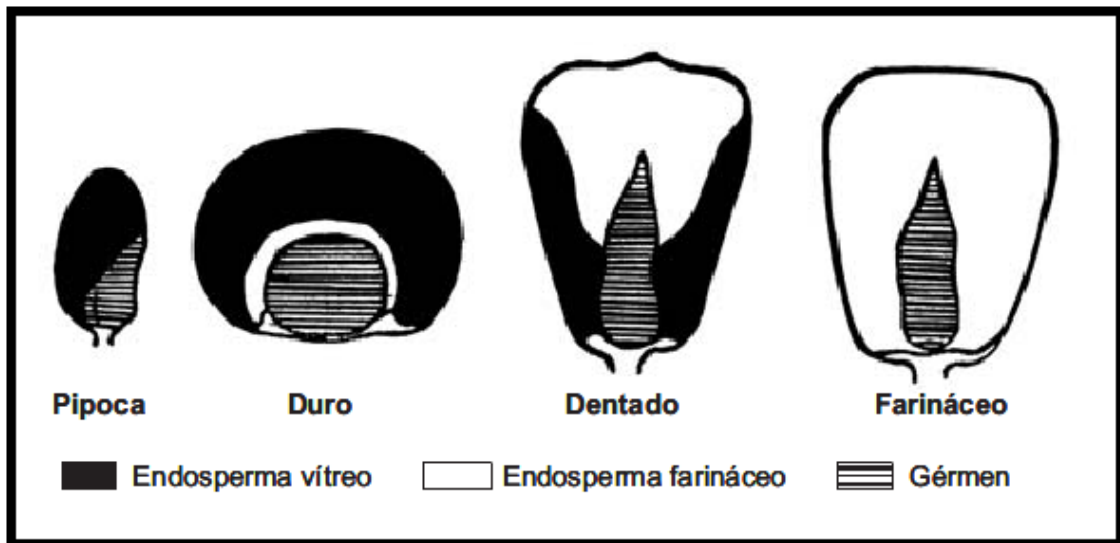
Figura 02 - Anatomia e morfologia do grão de milho.



Fonte: PAES et al., 2006.

A crescente demanda por milho obrigou as empresas produtoras de sementes desenvolverem cultivares que atendessem às exigências do mercado consumidor (PEREIRA FILHO; CRUZ; GAMA, 2002). O milho fisiologicamente maduro é classificado de acordo com a textura e aspecto do endosperma do grão (Figura 03). Podem ser descritos como farináceo, dentado, duro, pipoca e doce. O milho duro é o tipo produzido na maior parte do Brasil, enquanto que em países de clima temperado predomina a produção do milho dentado (PAES et al., 2006).

Figura 03 - Tipos de milho e as proporções do endosperma farináceo e vítreo.



Fonte: Adaptado de PAES et al. (2006).

É desejável para as sementes de milho a uniformidade de forma e tamanho para facilitar tratamentos químicos e a semeadura. Porém, existe grande variação na uniformidade das sementes na própria espiga, quanto à forma e o tamanho (AGUILERA et al., 2000). Para uniformizar e facilitar a semeadura, as sementes de milho são classificadas, quanto à forma, em redondas e chatas, as quais são separadas em diversos tamanhos e comprimentos (PEREIRA FILHO; CRUZ, 2015). Contudo, há uma resistência por parte do agricultor no uso de sementes redondas e daquelas de menor tamanho por compreenderem que essas não possuem potencial germinativo, além de apresentarem menor desempenho no campo (MARTINELLI-SENEME; ZANOTTO; NAKAGAWA, 2001).

Estas características influenciam diretamente no número de sementes plantadas, na qual é determinada pela população final desejada. No cálculo de sementes, são incluídos 20 % a mais, para compensar perdas relacionadas à porcentagem de emergência, ao ataque de pragas e doenças, bem como a danos mecânicos e déficit hídrico (CRUZ; PEREIRA FILHO, 2002).

Desta forma, com a busca permanente de incrementos na produtividade e redução dos custos de produção, o revestimento de sementes adquire maior importância, pois é uma técnica que se apresenta com grande potencial para solucionar problemas fundamentais como a proteção das sementes contra ataques de insetos e patógenos, fatores edafoclimáticos adversos, disponibilidade de oxigênio, adição de reguladores de crescimento e/ou aplicação localizada de herbicidas e, sobretudo, permitir semeadura de precisão nos cultivos problemáticos de instalação direta no campo (GIMÉNEZ; SAMPAIO; SAMPAIO, 1994).

Assim, uma das metas que se busca com o revestimento é modificar o tamanho, a forma e densidade da semente (SILVA, 1997) tornando-a mais uniforme em função do aumento do tamanho, da massa e, ou modificando a forma das mesmas, fazendo com que estas fluam mais facilmente em uma semeadora de precisão (SILVA; NAKAGAWA, 1998).

Diante do exposto acima, a crescente modernização da agricultura brasileira tem exigido dos diferentes segmentos mudanças profundas no sentido de racionalização do processo produtivo. Dentre os insumos do setor agrícola, a semente de alta qualidade ocupa papel fundamental em todo sistema de produção que vise à otimização de padrões quantitativos e qualitativos (COSTA et al., 2001). Vale ressaltar que em um sistema moderno de produção de sementes, o emprego de métodos eficientes e rápidos é de importância vital na tomada de decisões na época de semeadura, na colheita, no beneficiamento e durante o armazenamento. Desse modo, fica evidente que a determinação da qualidade da semente se constitui em desafio histórico na busca de métodos que atendam, entre outros critérios, as questões relativas à precisão e à rapidez (COSTA et al., 2007).

3.2 REVESTIMENTO PARA SEMENTES

Diferentes tipos de tratamentos têm sido desenvolvidos objetivando um maior desempenho das sementes em campo. Estes tratamentos permitem uma maior segurança no manuseio das sementes, um melhor controle de microrganismos, uma maior e mais rápida germinação, uma emergência mais uniforme, e uma melhor distribuição das sementes (NASCIMENTO, 2000). Deste modo, o tratamento de sementes é caracterizado como a aplicação de processos e substâncias que preservem ou aperfeiçoem o seu desempenho, permitindo que as culturas expressem todo seu potencial genético (MENTEM; MORAES, 2010).

O tratamento de sementes é a prática mais antiga utilizada na proteção de plantas. Sua origem foi relatada no século XVIII com o uso de salmoura para controlar pragas em cereais (NEERGAARD, 1977). Inicialmente, essa técnica foi empregada pelos chineses para evitar que sementes de arroz flutuassem. O revestimento, como tecnologia de proteção, desenvolveu-se para melhorar a precisão de plantio, modificando o tamanho e o formato de sementes irregulares e para desta maneira aumentar a plantabilidade das mesmas sem afetar o seu poder germinativo (KARAM; MAGALHÃES; PADILHA, 2007).

Dentre os diferentes métodos empregados para preservar a qualidade das sementes, a aplicação de revestimentos, ou peliculização, permite acondicionar e influir favoravelmente sobre a semente, o solo ou a superfície comum a ambos (SCOTT, 1989). O revestimento de sementes consiste na deposição de uma camada fina e uniforme de um polímero à superfície da semente, permitindo a modificação ou não da forma e tamanho da semente (SILVA et al., 2002).

O benefício desejado ao recobrir sementes é fornecer uma unidade de semente autossuficiente, com melhora de um microambiente para germinação e desenvolvimento das plântulas (HATHCOCK et al., 1984). A utilização de sementes revestidas possibilita a redução dos custos de produção de mudas, diminuindo o consumo de sementes e facilita a mecanização da semeadura, além de proporcionar melhorias na sanidade das sementes e no estabelecimento das plântulas por meio da incorporação de nutrientes, reguladores de crescimento e outros agroquímicos. A resposta a esses materiais de recobrimento depende muito das características de cada tipo de semente, como também dos materiais utilizados para o revestimento (SILVA et al., 2002).

Uma típica solução de revestimento é constituída por um polímero, um plastificante, um solvente e em alguns casos, um pigmento (COSTA, 2003). Contudo, detalhes específicos da metodologia empregada na elaboração de revestimentos para sementes são geralmente segredos comerciais, estando disponíveis apenas descrições gerais. No entanto, o desenvolvimento de uma formulação adequada inclui a seleção correta da base polimérica, da formulação apropriada, da intensidade de mistura e de um balanceamento entre as partes do sistema, das quais pode-se citar a semente, o material polimérico, o método de trabalho, o tempo de secagem e a duração do tratamento (BAUDET; PERES, 2004).

A eficiência dos revestimentos depende principalmente do controle da capacidade molhante da solução usada (PARK, 1999). Os revestimentos deverão espalhar-se uniformemente na superfície do material. Após a secagem, os revestimentos deverão ter uma durabilidade adequada. Uma boa escolha da formulação das soluções é essencial para a manutenção do revestimento sobre os produtos (PINHEIRO et al., 2010). Desta forma, estruturas poliméricas de cadeia longa são requeridas para formar filmes com apropriada força de coesão, sendo, esta influenciada pela estrutura química do polímero, do solvente empregado e modo de aplicação (GUILBERT; BIQUET, 1995).

Vale ressaltar ainda, que devido à dificuldade em medir certas propriedades dos revestimentos após a sua aplicação, é necessário que essas propriedades sejam determinadas antes da aplicação do mesmo. Para isso, esses revestimentos são preparados por secagem do

solvente em placas, e as suas propriedades de transporte, mecânicas e térmicas, solubilidade, cor e opacidade são determinadas. O potencial dos revestimentos é essencialmente baseado numa combinação de propriedades, tais como: barreira ao vapor de água, oxigênio, dióxido de carbono e cor, que permite que este tipo de aplicações aumente e melhore o tempo de armazenamento (PINHEIRO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2009).

Uma das características desejáveis aos materiais de revestimento é a ausência de fitotoxicidade (HILL, 1999). Portanto, a escolha da matriz polimérica é de extrema importância no desenvolvimento de formulações adequadas para aplicação em revestimentos de sementes. Neste sentido, os polímeros biodegradáveis têm sido relatados por alguns autores como materiais com grande potencial e, dentre os materiais relatados para esta finalidade estão a gelatina, a quitosana, a goma arábica, o amido de milho, a carboximetilcelulose, o álcool polivinílico e o alginato de sódio (CONCEIÇÃO FILHO et al., 1998; TANADA-PALMU et al., 2005; CONCEIÇÃO; VIEIRA, 2008; ZIANE; URSÚA; MATÉ, 2010).

Além da escolha da matriz polimérica para a produção de formulações de revestimentos de sementes, vários componentes podem ser empregados para melhorar seu desempenho em campo, como agentes de enchimento (SILVA et al., 1997), nutrientes, como aminoácidos (LUDWIG et al., 2011), ácidos húmicos, e ainda, a incorporação de bactérias diazotróficas (CONCEIÇÃO et al., 2008), e dentre os produtos empregados no tratamento químico de sementes, os fungicidas, inseticidas, herbicidas e reguladores de crescimento, como os que, conjuntamente, formam a bateria de agroquímicos disponíveis para proteção das culturas e manutenção de seu potencial de produção (AZEVEDO, 2001). Ainda, visando melhorar as características químicas, físicas e propriedades mecânicas desses materiais, pode-se incorporar nanoargilas, que apresentam algumas vantagens, dentre as quais, origem natural, abundância, elevada capacidade de absorção de água e baixo custo (SILVA et al., 2009) e o uso de bactérias promotora do crescimento vegetal (PAUL et al., 1993; SIVAKUMAR; PARTHASARTHI; LAKSHMIPRIYA, 2014; CARRASCO-ESPINOSA et al., 2105)

Oliveira et al. (2009) relataram que o uso de revestimento em sementes pode ser associado ao tratamento químico e biológico, produzindo, em consequência, um impacto mínimo sobre o meio ambiente. Mas observaram que uma característica importante e necessária aos revestimentos é que estes não afetem negativamente o processo de germinação e vigor das sementes.

Tonkin (1979), estudando o efeito do revestimento de sementes sobre o estabelecimento das plântulas de cenoura, cebola, alface e beterraba açucareira, concluiu que,

com o uso de sementes recobertas, pode-se conseguir populações com altas taxas de emergência e com mínima utilização de mão de obra.

Conceição Filho et al. (1998), investigaram o recobrimento de sementes de soja com amido de milho em combinação com os fertilizantes fosfato de monoamônio e cloreto de potássio, e concluíram que, nas condições utilizadas, as sementes recobertas preservaram o poder germinativo apresentado pelas sementes nuas.

Por outro lado, Pereira, Oliveira e Evangelista (2005) avaliaram a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de milho de dois híbridos, submetidas a tratamentos fitossanitários, em associação com os polímeros comerciais, durante seis meses de armazenamento. Os autores concluíram que o revestimento não afetou a qualidade fisiológica de sementes de milho, nem a ação do fungicida, porém ressaltaram que a interação polímero e tratamento químico, pode provocar algum efeito prejudicial na velocidade de emergência das plântulas.

O emprego de fungicidas com polímeros também foi estudado por Ludwig et al. (2011), os pesquisadores observaram que a aplicação do aminoácido isolado afeta positivamente a germinação das sementes de soja, porém quando combinado com fungicida e os polímeros comerciais (Polyseed CF[®] + Colorseed[®]) não observou-se melhoras no desempenho das sementes de soja. Entretanto, nos estudos realizados por Arsego et al. (2006) empregando uma solução de recobrimento com ácido giberélico, fungicidas e álcool polivinílico sobre sementes de arroz, observaram que o uso do PVA proporcionou a obtenção de sementes adequadamente recobertas e com boa aparência, e bom desempenho na germinação.

Resultados positivos em relação a germinação também foram encontrados por Oliveira et al. (2009), os autores relataram que o emprego de revestimentos de alginato de sódio e carboximetilcelulose sobre sementes de feijão manteve a umidade das sementes, o que pode ter favorecido a germinação. Do mesmo modo, Ziane, Ursúa e Maté (2010) relataram que o emprego de revestimento de quitosana não afetou negativamente a germinação de sementes de alcachofra, ao contrário, em algumas condições, a germinação foi favorecida.

De forma geral, no tratamento químico de sementes de algodão (LIMA et al., 2003b), feijão (CLEMENTE et al., 2003), soja (LIMA et al., 2003c) e tomate (LIMA et al., 2003a), a adição de revestimentos poliméricos não prejudicou a ação dos fungicidas associados às sementes ou ao solo, além de propiciar incremento na germinação de sementes.

3.2.1 Fatores de Influência no Desenvolvimento de Revestimentos para Sementes

A utilização de sementes com alta qualidade genética, fisiológica, física e sanitária é um dos fatores importantes no sucesso de estabelecimento das culturas. A qualidade fisiológica das sementes é caracterizada, principalmente, pela sua germinação, vigor e longevidade (FRANÇA NETO; KRZYZANOWSKI; HENNING, 2010). A água é um dos fatores externos que mais influenciam o processo de germinação das sementes. Da absorção de água resulta a reidratação dos tecidos, com a consequente intensificação da respiração e de todas as demais atividades metabólicas que culminam com o fornecimento de energia e de nutrientes necessários para a retomada do crescimento do eixo embrionário. O oxigênio é também fator fundamental para o processo germinativo, pois participa da degradação das substâncias de reserva da semente para o fornecimento de nutrientes e energia para o desenvolvimento do eixo embrionário (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

De acordo com Ferreira et al. (2015), o revestimento de sementes age como uma barreira física, que pode retardar a absorção de água e oxigênio para o início da germinação, o que pode levar a uma menor velocidade de germinação e emergência de plântulas, e uma redução do potencial germinativo das sementes. Esta barreira física pode restringir a embebição, no entanto protege a semente contra a entrada abrupta de água, que é capaz de causar danos aos tecidos (DERRÉ et al., 2013). Portanto, o polímero ideal deve ser obrigatoriamente solúvel em água e permitir a embebição das sementes (WEST, 1983). De acordo com Gorim e Asch (2012), sementes revestidas com materiais hidrofílicos podem aumentar a quantidade de água disponível para a germinação e o desenvolvimento das sementes.

A solubilidade dos revestimentos fornece informações sobre a sua integridade em sistemas aquosos e indica qual a sua resistência à água. Além disso, pode fornecer uma indicação sobre a biodegradabilidade do material, que é uma característica importante relacionada com sua aplicação (GNANASAMBADAM; HETTIARACHCHY; COLEMAN, 1997). Os revestimentos empregados devem ser solúveis e permeáveis ao vapor de água e os gases para que não afetem negativamente o processo de germinação da mesma, e conforme descrito por Martinelli-Seneme et al. (2004), o tipo de material de revestimento e sua espessura podem afetar ou não a permeabilidade à água e às trocas gasosas, a velocidade de germinação e, conseqüentemente, os resultados de alguns testes de vigor.

Além da sua capacidade de manter a embebição de água nas sementes e a permeabilidade aos gases, outro fator a ser considerado é a conservação destas sementes

revestidas. A conservação de sementes é intimamente dependente do seu grau de umidade, o qual tende a entrar em equilíbrio com a umidade relativa de armazenamento. Desta forma, a característica de higroscopicidade do material de revestimento afeta diretamente o potencial de conservação da semente. Se os materiais empregados no revestimento forem altamente higroscópicos, o revestimento pode funcionar como ponte, absorvendo a umidade do ambiente e transferindo para a semente. Por outro lado, se a semente tiver alto grau de umidade, a camada de revestimento funciona como barreira à transferência de umidade para o ambiente, dificultando as trocas gasosas, mesmo que os materiais de revestimento não sejam higroscópicos. Com isso, a semente revestida demora a atingir novo equilíbrio higroscópico quando é exposta em ambientes com umidades relativas diferentes (SILVA, 1997).

Outra característica que deve ser observada no desenvolvimento de revestimentos para sementes são a espessura e a uniformidade. Porém, poucos estudos tratam do problema da uniformidade dos revestimentos entre partículas e nenhum explora a questão da uniformidade individual, pois de certo modo, a medida da uniformidade dos revestimentos dentro de uma partícula é muito difícil de monitorar e há a necessidade do desenvolvimento de tecnologias nessa área (MARONGA, 1998). Para equilibrar este quadro, as condições operacionais devem ser otimizadas para cada tipo de material empregado e o monitoramento da espessura e da uniformidade dos revestimentos é fundamental para assegurar a adequação do processo (COSTA, 2003).

A luz é considerada um fator ambiental de fundamental importância no controle da germinação (BORGES; RENA, 1993). No processo de germinação ocorrem uma série de reações químicas e cada uma delas apresenta determinadas exigências quanto à luz (MACHADO et al., 2002). Em muitas espécies a presença de luz favorece a germinação das sementes, enquanto em outras, o comportamento germinativo das sementes é melhor na ausência da mesma (MONDO et al., 2008). Deste modo, a opacidade de um revestimento é um indicador da quantidade de luz que o atravessa. Quanto maior o valor de opacidade, menor será a quantidade de luz que atravessa o filme, podendo esta barreira ser importante para controlar a incidência de luz nos produtos (PINHEIRO et al., 2010).

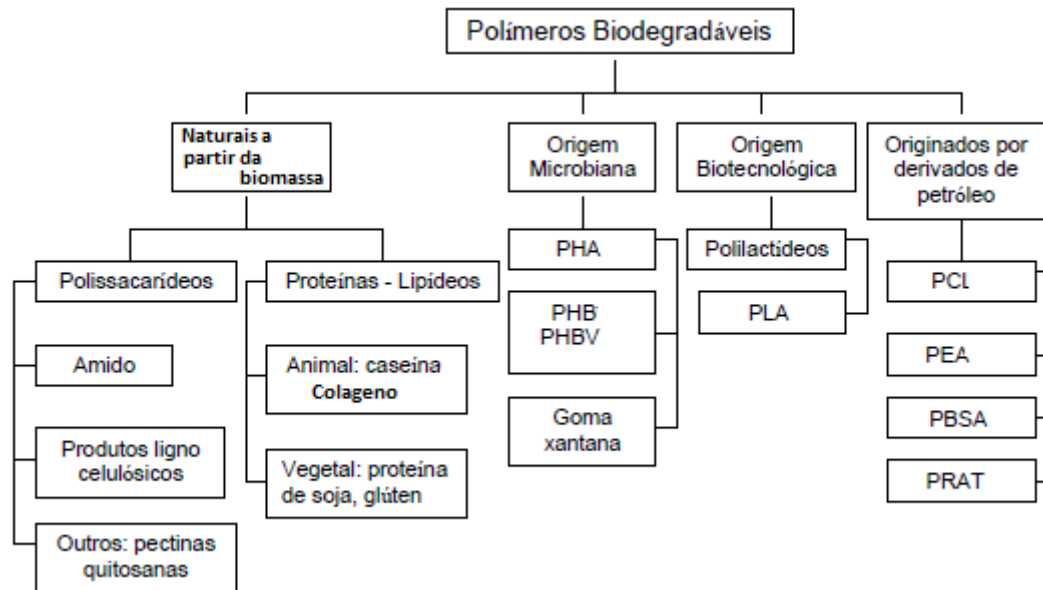
Assim, as características citadas acima são de extrema importância no desenvolvimento de revestimentos para aplicação em sementes de interesse agrícola. Historicamente, o obstáculo primário à germinação das sementes revestidas é a limitação das trocas gasosas entre a semente e o ambiente externo. Os revestimentos não devem retardar a taxa de germinação ou reduzir o percentual padrão apresentado pelas sementes não revestidas. Uma vez que o revestimento age como uma barreira para a difusão do oxigênio, a germinação

pode ser afetada (SACHS et al., 1981). Portanto, visando superar estes problemas a tendência é a utilização de produtos biodegradáveis, que além de serem atóxicas, possibilitam o carregamento de uma série de compostos benéficos para o crescimento das plantas, mas com baixa toxicidade quando comparadas à outros tratamentos químicos empregados na agricultura (KASHYAP; XIANG; HEIDEN, 2015). Ainda, as características higroscópicas dos polímeros empregados (CUQ et al., 1996), associados a transparência (OLIVEIRA, et al., 1996) e opacidade podem influenciar de forma positiva nos parâmetros associados à germinação.

3.3 REVESTIMENTOS BIODEGRADÁVEIS PARA APLICAÇÃO EM SEMENTES

Os polímeros são macromoléculas formadas a partir de unidades estruturais menores (monômeros), na qual o número de unidades estruturais repetidas é chamado grau de polimerização. Os átomos dessas moléculas estão ligados entre si através de ligações covalentes (MANO, 2000).

Os materiais biodegradáveis são considerados de grande importância e podem ser entendidos como um material que, quando descartado é decomposto por bactérias ou outros agentes biológicos e ambientais num curto espaço de tempo, sendo que tal possibilidade vai ao encontro às tendências mundiais de preservação do meio ambiente (HENCH, 2000). De forma geral, os polímeros biodegradáveis são classificados em quatro grupos, de acordo com sua origem (Figura 04). Os polímeros oriundos de fonte renovável, como os de origem agrícola, microbiana e biotecnológica, são classificados como biopolímeros.

Figura 04- Classificação dos Polímeros Biodegradáveis

Fonte: Adaptado de AVÉROUS; BOQUILLON, 2004.

Ao escolher uma composição de revestimento adequada para um determinado tipo de produto, há uma série de critérios que devem ser considerados. A eficácia dos revestimentos depende, numa primeira fase, do controle da capacidade molhante, de modo a garantir uma superfície uniformemente revestida (CASARIEGO et al., 2008).

Desta forma, em relação ao preparo de revestimentos biodegradáveis é necessário empregar pelo menos um componente capaz de formar uma matriz adequada, continua, coesa e aderente (GUILBERT; BIQUET, 1995). Para tal fim, diferentes componentes são utilizados, cada qual com sua finalidade específica. Os polímeros de fontes renováveis derivados de plantas em larga escala têm ganhado espaço, dos quais se destaca as proteínas e os polissacarídeos (PRADELLA, 2006). Os polissacarídeos mais empregados na fabricação de filmes e revestimentos são amido, celulose, alginatos, pectinas, quitosanas e algumas gomas (LAROTONDA, 2002; THARANATHAN, 2003). Com destaque ao amido, que pode ser obtido de diferentes fontes e tem sido empregado, puro e em misturas, em diferentes trabalhos com resultados bastante promissores (MALI et al., 2004; 2005; 2006; MULLER et al., 2008; 2009; MALI et al., 2010; MELO et al., 2011; GARCIA et al., 2011; FARIA; VERCELHEZE; MALI, 2012).

A gelatina é uma proteína de origem animal obtida do colágeno por hidrólise ácida ou básica, no Brasil é produzida em abundância, a baixo custo e com propriedades funcionais

adequadas para a fabricação de filmes (CARVALHO, 1997). O álcool polivinílico é um polímero sintético, hidrofílico, biodegradável, não tóxico, biocompatível com outros polímeros e que apresenta boa capacidade de formação de filmes, além de excelente compatibilidade com amido e gelatina (MORAES et al., 2008).

As nanoargilas têm sido empregadas em materiais à base de amido uma vez que, além de manter a biodegradabilidade atuam como reforço mecânico (CYRAS et al, 2008). Por fim, pode-se ainda empregar bactérias que promovam o crescimento vegetal visando estimular o crescimento das plantas por diversas maneiras, como por exemplo, a capacidade de fixação biológica de nitrogênio (HUERGO et al., 2008).

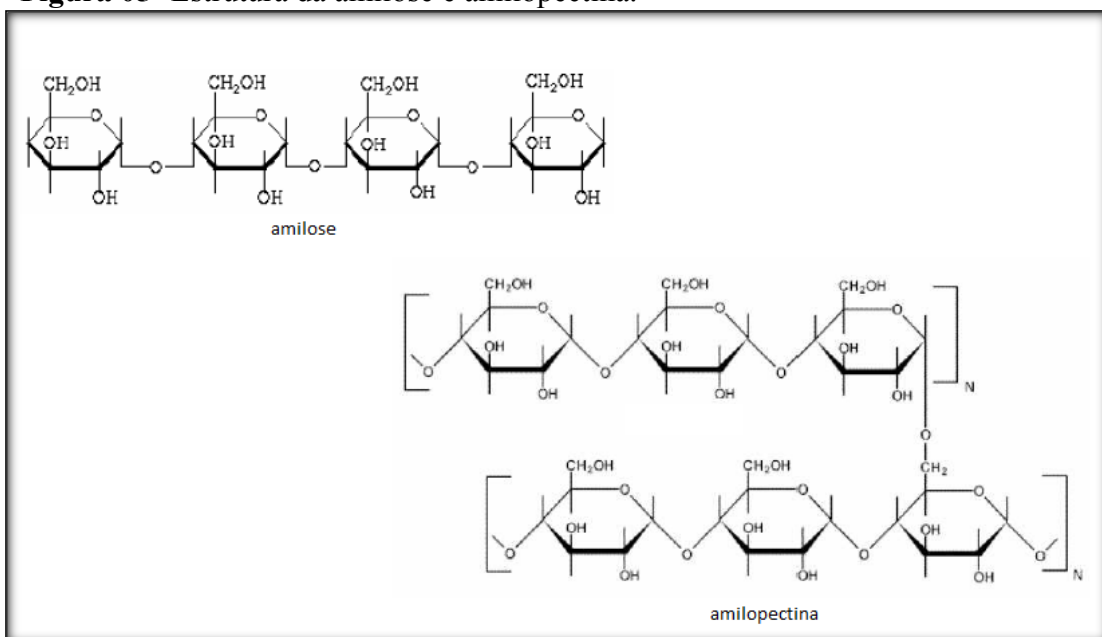
Neste trabalho empregou-se a mistura de três polímeros biodegradáveis, amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico, empregando-se glicerol como plastificante, a nanoargila sódica (Cloisite[®] Na⁺) como aditivo, com a adição da bactéria promotora do crescimento vegetal *Azospirillum brasilense* Ab-V5 para obtenção de um revestimento a ser aplicado em sementes de milho. As misturas de amido de mandioca e gelatina já foram estudadas para a produção de filmes e revestimentos biodegradáveis com diferentes aplicações (ARVANITTOYANNIS et al., 1997; ARVANITTOYANNIS; NAKAYAMA; VEIGA-SANTOS et al., 2007; AL-HASSAN; NORZIAH, 2012; TONGDEESOONTORN et al., 2012; FAKHOURI et al., 2013), misturas de amido de mandioca e álcool polivinílico também têm sido relatadas na literatura (TUDORACHI et al., 2000; JAYASEKARA et al., 2004; RAJ; SOMASHEKAR, 2004; HAN; CHEN; XU, 2009; FARIA; VERCELHEZE; MALI, 2012; RAJ; ZANELA et al., 2015) e como materiais de reforço o uso de amido e nanoargila (CHUNG et al., 2010; FARIA; VERCELHEZE; MALI, 2012), ainda a incorporação de bactérias promotora do crescimento vegetal (CONCEIÇÃO et al., 2009). Porém não há relatos na literatura com o emprego da mistura ternária de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico incorporados de nanoargila associados da bactéria *Azospirillum brasilense* Ab-V5 para a produção de filmes e/ou revestimentos biodegradáveis a serem aplicados em sementes.

3.3.1 Amido de Mandioca

O amido é um polissacarídeo de reserva energética de cereais, tubérculos, algumas leguminosas e frutas. Pode ser encontrado abundantemente na natureza graças ao cultivo extensivo e intensivo de cereais e tubérculos. É totalmente biodegradável, atóxico, de fonte renovável e tem custo relativamente baixo quando comparado a outros polímeros biodegradáveis e sintéticos (DA RÓZ, 2003). É considerado como um produto de grande potencial devido à versatilidade de uso na alimentação humana e animal e aplicabilidade na indústria. A exploração deste potencial depende do conhecimento de suas propriedades quanto à estrutura, forma, absorção de água, solubilidade, inchamento e viscosidade (CEREDA et al., 2002).

O amido é uma mistura de dois polímeros de glicose estruturalmente diferentes: amilose e amilopectina (Figura 05). A amilose formada por uma cadeia predominantemente linear de unidades de α -D-glicose unidas por ligações glicosídicas α (1-4), e apresenta estrutura helicoidal, estabilizada por ligações de hidrogênio entre os grupamentos hidroxila das moléculas de glicose. A amilopectina consiste em longas cadeias compostas por unidades de D-glicose unidas entre si por ligações α -1,4 -glicosídicas, com pontos de ramificação que ocorrem a cada 20 a 25 unidades de glicose, com ligações entre o carbono número 1 de uma unidade de glicose e o carbono número 6 de outra unidade (ligação α -1,6 -glicosídica) (ELLIS et al., 1989).

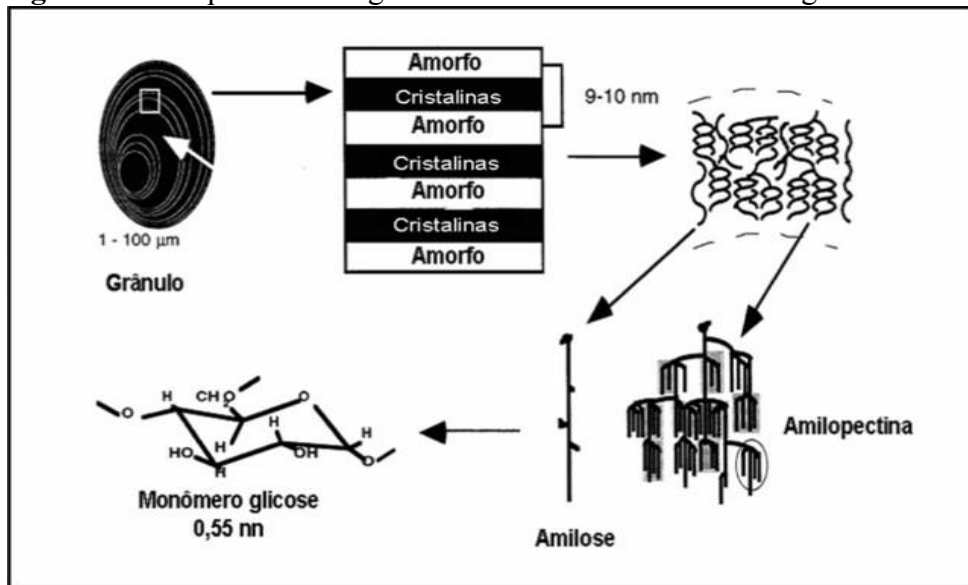
Figura 05- Estrutura da amilose e amilopectina.



Fonte: Adaptado de PRADELLA (2006).

Os amidos nativos se apresentam na forma de grânulos (1 a 100 μm) onde as cadeias de amilose e amilopectina se organizam de forma concêntrica, com regiões amorfas (menos organizadas) e cristalinas (mais organizadas) alternadas (Figura 06), apresentando entre 15 e 45 % de cristalinidade. A região cristalina (lamela cristalina) é constituída pelas cadeias laterais da amilopectina, enquanto os pontos de ramificação e a amilose são os principais componentes da região amorfa (lamela amorfa). A cristalinidade dos grânulos é descrita principalmente em função das duplas hélices formadas pelas ramificações da amilopectina. As áreas cristalinas do amido mantêm a estrutura do grânulo, controlam o seu comportamento na água, tornando-o relativamente resistente ao ataque enzimático e químico (ROCHA; DEMIATE; FRANCO, 2008).

Figura 06 – Esquema das regiões amorfas e cristalinas de um grânulo de amido.



Fonte: (Adaptado de BULÉON et al., 1998).

As cadeias de amilopectina dentro dos grânulos estão radialmente arranjadas com seus grupos terminais não redutores em direção à superfície e estas são organizadas alternando áreas cristalinas e amorfas. A molécula de amilopectina consiste de uma cadeia principal C, que carrega o grupo redutor e várias cadeias ramificadas A e B, as cadeias de uma ou mais moléculas interligam-se, formando duplas hélices (CEREDA et al., 2002).

O amido tem propriedades de gelatinização, fusão, gelificação e retrogradação. O aquecimento de suspensões de amido com excesso de água causa uma transição irreversível denominada gelatinização, que é definida como o colapso das ordenações moleculares dentro do grânulo de amido, com quebra das ligações de hidrogênio entre as cadeias de amilose e

amilopectina, com concomitantes mudanças irreversíveis nas suas propriedades, assim como inchamento do grânulo, fusão cristalina, perda da birrefringência, desenvolvimento da viscosidade e solubilização do amido (JAROWENKO, 1971).

A gelificação ocorre quando, após a gelatinização, submete-se a pasta viscoelástica amorfa ao resfriamento e armazenamento. A turbidez aumenta, assim como a viscosidade e a rigidez, formando-se um gel opaco. A retrogradação é um processo no qual, acima da temperatura de transição vítrea, as cadeias do amido amorfo independente do teor de água, começam a se reassociar em um estado mais ordenado (VAN SOEST, 1997).

A aplicação do amido na produção de filmes se baseia nas propriedades químicas, físicas e funcionais da amilose para formar géis e na sua capacidade para formar filmes. As moléculas de amilose em solução, devido à sua linearidade, tendem a se orientar paralelamente, aproximando-se o suficiente para que se formem ligações de hidrogênio entre hidroxilas de polímeros adjacentes. Como resultado, a afinidade do polímero por água é reduzida, favorecendo a formação de pastas opacas e filmes resistentes (WURZBURG, 1986).

Dependendo da fonte botânica, a grande maioria dos amidos nativos contém 20 a 30 % de amilose e 70 a 80 % de amilopectina, o que confere características específicas ao amido (CEREDA et al., 2002). O amido de mandioca nativo possui um sabor suave e pasta clara, com cerca de 18 % de amilose e 82 % de amilopectina (GALLANT et al., 1997). A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é um dos tubérculos mais cultivados no mundo, sendo o Brasil um dos principais países produtores. Em 2014, o país produziu 24 milhões de toneladas de mandioca numa área de 1,9 milhões de ha, e os principais produtores foram os estados do Pará, Bahia, Paraná, Santa Catarina, São Paulo e Mato Grosso. No mesmo ano, o Paraná foi o maior produtor de amido de mandioca do país, concentrando 70 % da produção nacional, atingindo 333,3 mil toneladas produzidas (ABAM, 2015).

O amido de mandioca vem sendo bastante estudado para a produção de materiais biodegradáveis (MALI et al., 2004; 2005; 2006; MULLER et al., 2008; 2009; MALI et al., 2010; MELO et al., 2011; GARCIA et al., 2011; FARIA; VERCELHEZE; MALI, 2012; VERCELHEZE et al., 2012, 2013; DEBIAGI; MARIM; MALI, 2015). As suas boas propriedades formadoras de filmes, aliadas ao baixo custo e elevada disponibilidade, fazem do amido de mandioca uma alternativa viável para a produção de revestimentos a serem aplicados em sementes, que precisam ter bom desempenho aliado ao baixo custo.

Contudo, os filmes produzidos somente com amido são quebradiços, devido à alta força intermolecular, possuem baixa resistência mecânica e apresentam alta sensibilidade à umidade, o que os tornam insatisfatórios para algumas aplicações (TÁPIA-BLÁCIDO et al.,

2004). Desta forma, para obtenção de produtos com melhores características físicas, mecânicas e aceitação comercial, o amido deve ser modificado ou misturado a outros polímeros para melhorar suas propriedades (HALLEY, 2005).

3.3.2 Álcool Polivinílico

A mistura do amido com outros polímeros sintéticos biodegradáveis é um dos seguimentos de grande importância para o desenvolvimento de novos materiais (TEIXEIRA, 2007). Diante disso, estudos vêm sendo realizados com blendas de amido e álcool polivinílico visando melhorar suas propriedades de barreira e mecânicas (SHI et al., 2008; FARIA; VERCELHEZE; MALI, 2012; TAVARES, 2013; BRANDELERO; ALMEIDA; ALFARO, 2015).

O álcool polivinílico (PVA) é a resina sintética, solúvel em água e biodegradável produzida em maior volume no mundo. Foi obtido pela primeira vez em 1924, por Herrman e Haehnel, pela hidrólise do poli (acetato de vinila), que é a forma de obtenção comercial utilizada até hoje. Em 1961, Staudinger estudou a transformação reversível entre o poli (álcool vinílico) e o poli (acetato de vinila) por meio das reações de esterificação e saponificação (MARTEN, 1985).

As propriedades básicas do álcool polivinílico dependem da massa molecular e do grau de hidrólise, conforme observado na Figura 07. A relação entre o percentual de hidroxilas e o número inicial de radicais acetato no polímero final representa o grau de hidrólise (GH) do PVA e as propriedades do polímero são influenciadas por este parâmetro (TANG; ALAVI, 2011).

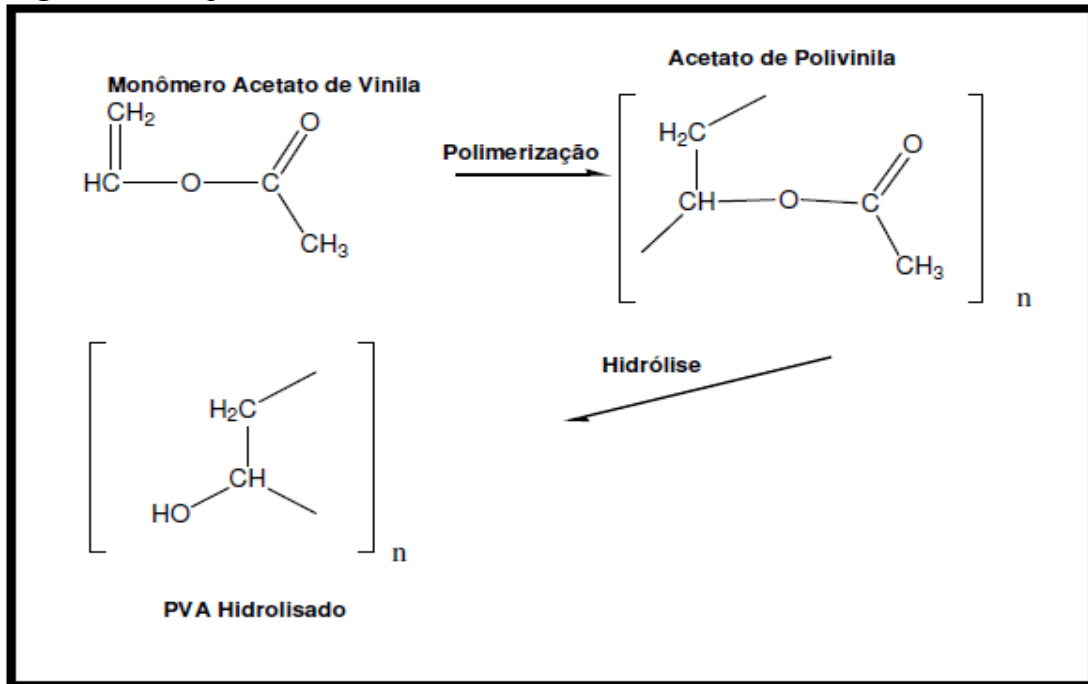
Figura 07 - Propriedades físicas do PVA em função do seu grau de hidrólise e massa molecular.



Fonte: TANG; ALAVI (2011).

Industrialmente são produzidos diversos tipos de PVA, com diferentes graus de hidrólise (GH) e graus de polimerização (GP). Quanto ao GH, são classificados em parcialmente hidrolisados (acima de 88 %) ou altamente hidrolisados (98-99 %), e quanto ao grau de polimerização, em muito baixa viscosidade (viscosidade = 3 - 4 cP; GP = 150 - 300), baixa viscosidade (viscosidade = 5 - 6 cP; GP = 350 - 650), média viscosidade (viscosidade = 22 - 30 cP; GP = 1000 - 1500) e alta viscosidade (viscosidade = 45 - 72 cP; GP = 1600 - 2200) (ARANHA; LUCAS, 2001). O álcool polivinílico (PVA) apresenta uma estrutura química relativamente simples com grupos hidroxilas laterais (PEPPAS, 2000), conforme observado na Figura 08 o esquema da síntese do PVA hidrolisado.

Figura 08 - Esquema da síntese do PVA hidrolisado.



Fonte: Adaptado de MANO (1985).

O PVA tem sido utilizado em um grande número de aplicações industriais, e apresenta elevada resistência mecânica, propriedade de adesão, alta resistência à tração e compressão, boa flexibilidade, barreira ao oxigênio, aromas, óleos e solventes, e elevada compatibilidade com a matriz polimérica de amido. As boas propriedades de barreira a gases do PVA são devidas a sua estrutura cristalina monoclinica pequena e densamente empacotada (AKCELRUD, 2007).

É um dos poucos polímeros semicristalinos solúveis em água com boas características interfaciais e mecânicas. O PVA tem sido usado em processamento de papel e fibras e como estabilizante de emulsão, além de ser importante como matéria-prima para filmes. Uma característica importante deste composto é a degradabilidade e não toxicidade (MARTEN, 1985). No entanto, um fator que afeta seu uso é o custo elevado quando comparado a outros polímeros petroquímicos convencionais, como o polietileno e o polipropileno (TANG; ALAVI, 2011). Assim, o uso do PVA em blendas com outros polímeros biodegradáveis e de menor custo, como o amido, é uma alternativa viável para diminuir seus custos, possibilitando seu emprego em novos nichos de mercado, como a produção de revestimentos para aplicação em sementes.

3.3.3 Gelatina

Entre os polímeros naturais, as proteínas também se destacam e têm sido consideradas bastante promissoras para elaboração de biofilmes (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010), como a gelatina (FAKHOURI et al., 2007; CARVALHO; GROSSO, 2006; SOBRAL et al., 2001), proteína miofibrilar do peixe (ZAVAREZE et al., 2012; MONTERREY-QUINTERO; SOBRAL, 1998), soro de leite (AVENA-BUSTILLOS; KROCHTA, 1993; CHEN, 1995; FLANAGAN; GUNNING; FITZGERALD, 2003;), proteínas de amendoim (LIU; TELLEZ-GARAY; CASTELL-PEREZ, 2004), proteína de soja (ROCHA et al., 2014; CIANNAMEA et al., 2011), zeína (CORRÊA; LOPES FILHO, 2009), entre outras.

A gelatina é uma proteína de origem animal, obtida do colágeno por hidrólise ácida ou básica, sendo produzida em abundância no Brasil, a baixo custo e com propriedades funcionais adequadas para a fabricação de filmes e revestimentos comestíveis (FAKHOURI et al., 2007), apresenta propriedade de formar géis termo reversíveis após ser aquecida, solubilizada e resfriada. O mecanismo de formação envolve interligações iônicas entre grupamentos amínicos e carboxila dos aminoácidos, com a ajuda de ligações de hidrogênio (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009). Além disso, é uma proteína anfotérica com ponto isoelétrico (pI) entre 5 e 9 dependendo da matéria-prima e do método da manufatura (BAILEY; LIGHT, 1989). É incolor ou ligeiramente amarela, inodora, solúvel em água quente, glicerol e ácido acético e insolúvel em solventes orgânicos (BUDAVARI, 1996). Apresenta também a capacidade de formar uma estrutura em tripla-hélice específica não observada em polímeros sintéticos (esta estrutura é formada em soluções a baixas temperaturas) e apresenta estado vítreo em 205 - 210 °C, sendo resistente ao calor (KOZLOV; BURDYGINA, 1983).

A gelatina difere de outros hidrocolóides por ser uma proteína totalmente digerível, possui em sua composição quase todos os aminoácidos essenciais, com exceção do triptofano (POPPE, 1987). Contudo, a quantidade de cada tipo de aminoácido encontrado na gelatina é variável, pois depende dos processos utilizados para sua obtenção e da matéria-prima empregada (STEVENS, 1992).

A obtenção industrial de gelatina solúvel envolve a hidrólise controlada através de tratamento ácido ou alcalino, da matéria-prima utilizada, seguido de desnaturação térmica. Deste processo se obtém os diferentes tipos de gelatina, com diferentes aplicabilidades em função da necessidade do mercado consumidor (BORDIGNON, 2010). As gelatinas obtidas

por tratamento ácido são designadas do tipo A, enquanto que as do tipo B são as obtidas por tratamento alcalino (GENNADIOS et al., 1994).

A qualidade da gelatina depende, em grande parte, de suas propriedades reológicas, sobretudo a viscosidade e capacidade de formação de gel (TAVAKOLIPOUR, 2011), sendo comercializada de acordo com sua força de geleificação (LOPES, 1976). Neste sentido, a gelatina pode ser aplicada como clarificante de bebidas (GASS, 2001), agente espessante em iogurtes e na confecção de cápsulas medicamentosas (IGOE, 1983), em molhos e sopas instantâneas, estabilizante de sorvetes, queijos e saladas de frutas (MCWILLIAMS, 2001) e ainda serem empregadas na elaboração de filmes e revestimentos, devido a sua abundância e biodegradabilidade (JONGJAREONRAK et al., 2006), ausência de cor e sabor e, fácil dissolução (TAVAKOLIPOUR, 2011) ressaltando ainda, seu fácil manuseio e valores elevados de resistência à tração (FAKHOURI, 2003; BERTAN, 2005).

De acordo com Sampaio e Sampaio (1994), o principal objetivo do uso de revestimentos é o de melhorar o comportamento da semente, tanto do ponto de vista fisiológico, como econômico. Além do uso de polímeros biodegradáveis é possível adicionar outros componentes nas formulações de revestimentos visando melhorar as propriedades físicas, químicas e mecânicas. Portanto, o emprego de misturas poliméricas biodegradáveis associadas de aditivos vem como uma alternativa viável no desenvolvimento de uma agricultura sustentável, pois visa utilizar materiais de baixo custo, de fontes renováveis, atóxicos e, com boas propriedades para o desenvolvimento de revestimentos biodegradáveis para aplicação em sementes.

3.3.4 Aditivos Empregados na Elaboração de Revestimentos Biodegradáveis

As propriedades e aplicações de revestimentos poliméricos biodegradáveis dependem das suas propriedades mecânicas e de barreira, e alguns aditivos podem ser empregados para melhorar o desempenho destes materiais em relação a estas propriedades.

Dentre os aditivos mais empregados estão os plastificantes, e a sua adição é necessária para melhorar as propriedades mecânicas de filmes plásticos produzidos a partir de amido puro ou em misturas (MALI et al., 2005). Os plastificantes reduzem as forças intermoleculares e aumentam a mobilidade das cadeias poliméricas, com diminuição de possíveis descontinuidades e zonas quebradiças. Levam a um decréscimo da temperatura de transição vítrea (T_g), isto é, favorecem a transição do material de um estado vítreo,

caracterizado por uma menor mobilidade molecular entre as cadeias do polímero e por uma maior rigidez, para um estado borrachento ou gomoso, de maior mobilidade molecular e flexibilidade. O decréscimo da Tg se reflete nas propriedades mecânicas: pode-se perceber um decréscimo da força na perfuração e tração e o aumento da deformação dos filmes nesta situação (GONTARD; GUILBERT; CUQ, 1993).

Na realidade, os plastificantes influenciam todas as propriedades funcionais dos filmes, não só as propriedades mecânicas. A permeabilidade ao vapor de água tende a aumentar com o incremento do teor de plastificantes hidrofílicos, como é o caso dos polióis. De acordo com McHugh e Krochta (1994), o aumento do teor de plastificante leva ao aumento da permeabilidade aos gases de filmes hidrofílicos, ou seja, o plastificante interage com as moléculas do biopolímero, aumentando a mobilidade e diminuindo a densidade entre as suas moléculas, facilitando a transmissão dos gases através do material.

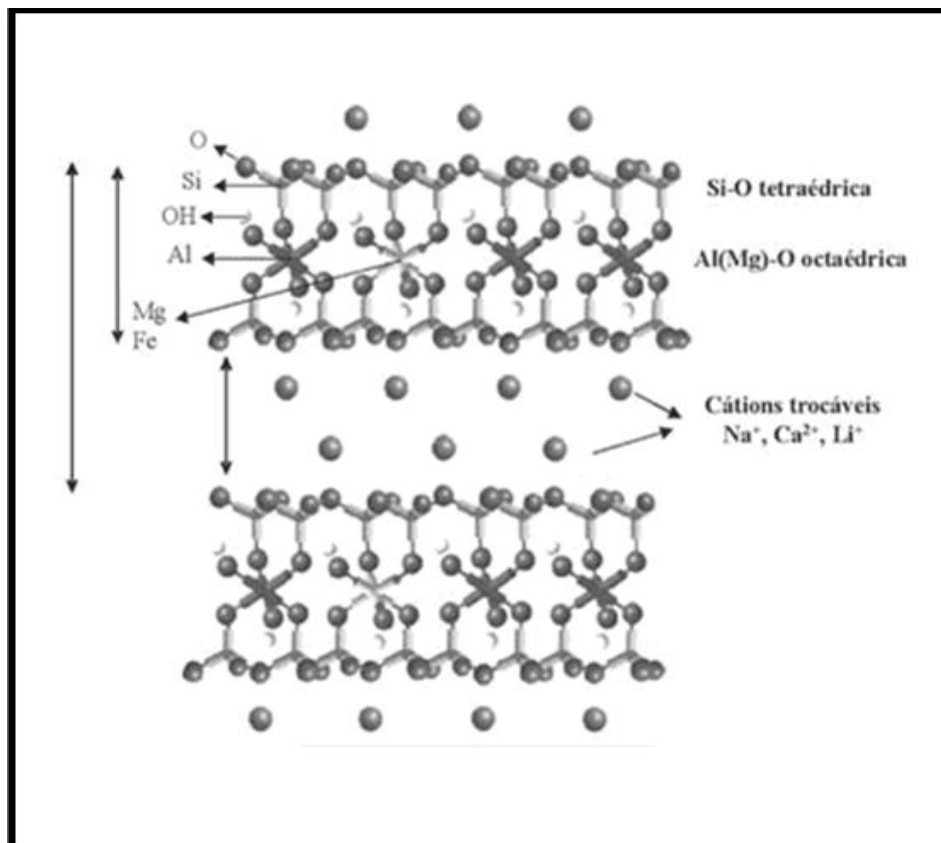
Dentre os plastificantes mais utilizados em filmes de amido estão os polióis, sendo o glicerol o mais empregado. O glicerol é um composto orgânico, de baixa massa molar, compatível com o amido e outros biopolímeros, que apresenta comprovada ação positiva sobre as propriedades mecânicas dos filmes produzidos a base de amido (MALI et al., 2004; 2005; 2006). A proporção adequada entre polímero e glicerol depende do tipo de polímero empregado e, de acordo com os dados de literatura, são necessários em torno de 20-25 g de glicerol/100 g de polímero biodegradável (MALI et al, 2004).

Outro grupo de compostos que têm sido relatados como aditivos em materiais biodegradáveis são as nanoargilas. As nanoargilas são compostas predominantemente pelo argilomineral montmorilonita (55-70 %), do grupo das esmectitas, e são conhecidas pelo nome genérico de bentonitas (GARCIA, 2003). A montmorilonita possui partículas com tamanhos que podem variar de 2-0,1 μm , podendo apresentar formato de placas ou lâminas. Pertencem ao grupo dos filossilicatos, cujas placas são caracterizadas por unidades estruturais constituídas por uma folha de tetraedros de sílica, ligados pelos oxigênios localizados nos vértices da base, e uma folha de octaedros de alumina ligados pelas faces laterais (ALEXANDRE; DUBOIS, 2000). É possível observar ainda, que na estrutura da montmorilonita podem ocorrer substituições nas camadas tetraédricas trocáveis como Na^+ , Ca^{2+} , Li^+ , fixos eletrostaticamente. Essas substituições são conhecidas como isomórficas, pois não causam distorção na estrutura das lamelas, por serem todos esses átomos de tamanhos similares (COELHO et al., 2007). Estas informações podem ser visualizadas na Figura 09.

As principais características da montmorilonita como material de reforço em matrizes poliméricas são: sua procedência natural (originárias da alteração de cinzas

vulcânicas), grande capacidade de inchamento, troca iônica e elevada rigidez (RAY; OKAMOTO, 2003). Além disso, as camadas de montmorilonita possuem espessura inferior ao comprimento de onda de luz visível, não desviam a luz, sendo então transparentes, resistentes a solventes e altas temperaturas (WEISS et al., 2006). As argilas são materiais versáteis, encontrados em abundância na natureza, que apresentam granulometria extremamente fina, sendo atóxicas e de baixo custo (ALBANEZ, 2008). Devido a suas propriedades funcionais como barreira a gases, estabilidade térmica, propriedades mecânicas e transparência, tem sido muito estudadas para a produção de novos materiais (CHIVRAC et al., 2008).

Figura 09 - Estrutura da montmorilonita.

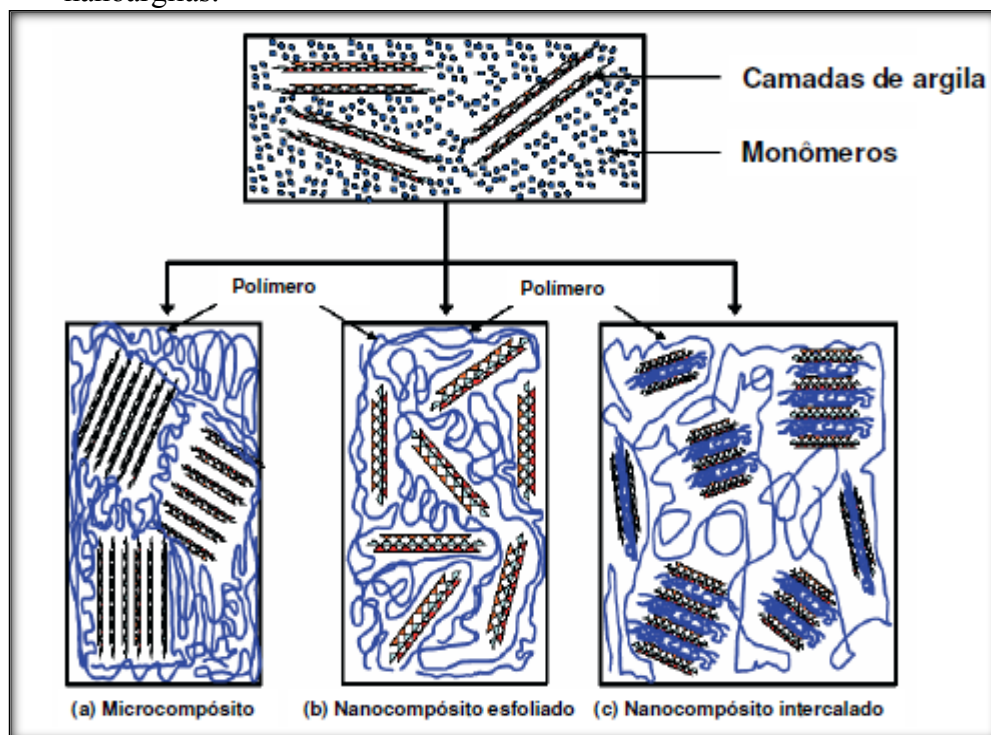


Fonte: PAIVA; MORALEZ; GUIMARÃES, (2006).

Nanocompósitos são materiais híbridos em que ao menos um de seus componentes está na escala nanométrica, e dependendo da natureza dos componentes usados (silicato, cátion orgânico e tipo de polímero), juntamente com o método de preparação, é possível obter-se três tipos de nanocompósitos, conforme Figura 10. Quando as moléculas de um polímero penetram no espaço interlamelar aumentando a distância entre as lamelas, porém

mantendo a ordenação das mesmas, tem-se um nanocompósito intercalado. Entretanto, se a interação entre o polímero e as lamelas for intensa, a ponto de separá-las individualmente, deixando-as dispersas na matriz polimérica, o material adquirido é classificado como esfoliado. No caso de pouca interação entre o polímero e a argila, não havendo penetração do polímero nas galerias do silicato, obtém-se um microcompósito (ALEXANDRE; DUBOIS, 2000). Vários trabalhos incorporando nanoargila a filmes de amido tem sido reportados visando a melhoria das propriedades mecânicas e de barreira (PARK et al., 2002; PARK et al., 2003; WILHELM et al., 2003; KAMPEERAPPUN et al., 2007; SILVA et al., 2009; CHUNG et al., 2010; FARIA; VERCELHEZE; MALI, 2012).

Figura 10 - Esquema dos diferentes tipos de compostos resultante da interação de polímeros e nanoargilas.



Fonte: Adaptado de BOURBIGOT et al., (2004).

3.4 Uso de Revestimentos para a Veiculação de Microrganismos

De acordo com Oliveira et al. (2014), uma das alternativas concretas à diminuição da dependência da agricultura brasileira por fertilizantes minerais e por agroquímicos é a ampliação da oferta de insumos biológicos de alta eficiência, e o emprego de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCVs) pode auxiliar no encontro da sustentabilidade dos sistemas agrícolas, pois são produzidas e atuam sob baixa demanda de energia.

Dentre os mecanismos de promoção do crescimento vegetal por estes microrganismos pode-se destacar a fixação biológica de nitrogênio (FBN), a produção de fitormônios (auxinas, citocininas, giberelinas, etileno), a solubilização de fosfatos; ou, ainda, mecanismos indiretos, como o controle biológico de fitopatógenos e insetos, aumento da resistência a estresses bióticos e abióticos, além de outros mecanismos (OLIVEIRA et al., 2014; HUNGRIA, 2011).

Esses microrganismos vivem no solo e a principal porta de entrada para a colonização bacteriana nas plantas é através das fissuras de raiz, mas podem ocorrer também por feridas causadas por fitopatógenos microbianos, nematoides e tratos culturais ou pelos estômatos (HARDOIM et al., 2008).

As bactérias do grupo *Rhizobiaceae* são as mais citadas e exploradas quando se trata de crescimento vegetal (BASHAN; BASHAN, 2005). Contudo, uma variedade de bactérias podem ser consideradas BPCV, como por exemplo, *Acetobacter*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, com ênfase do presente estudo às do gênero *Azospirillum* (HAYAT et al., 2010).

As bactérias do gênero *Azospirillum* abrangem um grupo de BPCVs de vida livre que é encontrado em quase todos os lugares da terra, e que dentre os mecanismos exercidos por estes microrganismos estão a FBN e produção de fitormônios (HUNGRIA, 2011). Seu isolamento se deu com o uso de meios semissólidos sem nitrogênio. No caso de *Azospirillum*, o crescimento é dependente de fixação de N_2 e ocorre em regiões do meio de cultura onde a taxa de difusão de O_2 está em equilíbrio com a taxa de respiração das bactérias e após a película ser formada, a mesma vai se deslocando até a superfície do gradiente de oxigênio, devido ao fenômeno de aerotaxia (DÖBEREINER et al., 1995).

Esses microrganismos colonizam tanto o interior quanto a superfície das raízes de várias gramíneas e cereais (DÖBEREINER; BALDANI, 1982). De acordo Victoria e Lovell (1994), esse fator pode estar relacionado com a baixa especificidade em relação à planta hospedeira, que permite ao microrganismo utilizar uma variedade de ácidos orgânicos e aromáticos e ainda açúcares e aminoácidos disponíveis na rizosfera (HARTMANN; ZIMEER, 1994).

As bactérias do gênero *Azospirillum* são microrganismos heterotróficos capazes de fixar o nitrogênio atmosférico (N_2) em condições micro aeróbicas (ROPER; LADHA, 1995). São bactérias gram-negativas, com formato de bastonete e uniflageladas (QUADROS, 2009). A fonte de carbono preferenciais são ácidos orgânicos como o malato (BALDANI et al., 1997a) e as fontes de nitrogênio principais são amônia, nitrato, nitrito, aminoácidos e nitrogênio molecular (TRENTINI, 2010). Apresentam ainda vários mecanismos de proteção

como a produção de poli (β -hidroxibutirato) e melanina, e na formação de cistos, visando sua sobrevivência em condições desfavoráveis (DEL GALLO; FENDIRIK, 1994).

Os mecanismos de ação das espécies de *Azospirillum* ainda não foram totalmente elucidados (HARTMANN; ZIMMER, 1994). Contudo, sua capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico é possível graças à ação do complexo enzimático dinitrogenase, que é capaz de romper a tripla ligação do N_2 e reduzi-lo a amônia, a mesma forma obtida no processo industrial (HUNGRIA et al., 2007). Além da FBN, o *Azospirillum* produz componentes como o ácido indol-acético (AIA), giberilinas e citocininas que estimulam o crescimento das raízes de diversas espécies de plantas (TIEN et al., 1979). Nesse sentido, pesquisas vem demonstrando que o *Azospirillum* estimula o crescimento e a produtividade de várias espécies de plantas com grande relevância agrônômica (BASHAN et al., 2004).

A associação positiva entre o *Azospirillum* e gramíneas foi demonstrada em diversos estudos resultando na maioria dos casos um aumento na produção das plantas inoculadas (PENOT et al., 1992; OKON LABANDERA-GONZALEZ, 1994; BASHAN; HOLGUIN, 1997; STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000; BASHAN et al., 2004; HUNGRIA et al., 2010; DARTORA et al., 2013).

Normalmente a inoculação com *Azospirillum* é feita com a aplicação do produto sólido (como turfa) ou líquido nas sementes (HUNGRIA, 2011). Todavia, uma das formas de atingir altas produções é o emprego de novas tecnologias. Diante disso, o desenvolvimento de novos produtos é fundamental para aumentar a produtividade da lavoura por hectare (POTAFOS, 1995).

Nesse sentido, a imobilização de microrganismos em matrizes poliméricas é uma técnica nova e que vem crescendo nas últimas décadas (LEBEAU; ROBERT, 2006; MORENO-GARRIDO 2008). Esta técnica é bastante promissora pois possibilita o fornecimento ininterrupto de nutrientes aos microrganismos e confere proteção contra o estresse ambiental (de-BASHAN et al., 2004; de-BASHAN; BASHAN, 2010; COVARRUBIAS et al., 2012).

Porém, na literatura são relatados poucos trabalhos sobre a veiculação desses microrganismos em revestimentos de sementes, no trabalho desenvolvido por Conceição et al. (2008), foi verificado que o recobrimento de sementes se mostra como opção de inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas, da espécie *Herbaspirillum seropedicae* (Z67), pois garante a sobrevivência dessas bactérias, no recobrimento, até a emissão das raízes pelas plantas. Do mesmo modo que a adição de ácidos húmicos, bactérias e o uso conjunto desses estimularam o crescimento vegetal.

Em 2009, Conceição e colaboradores utilizaram sementes de milho UENF 506-8 e recobriram estas sementes com uma mistura de calcário, meio de cultura semissólido, água e a estirpe *H. seropedicae* Z67 BR 11175 e, avaliaram a qualidade fisiológica das sementes recobertas e a sobrevivência das células bacterianas sob armazenamento. Os autores verificaram que o recobrimento das sementes não alterou a perda natural da qualidade fisiológica das sementes durante o armazenamento. Ainda, nos tratamentos onde foi utilizado o recobrimento contendo as bactérias foi detectada a presença das células bacterianas nas raízes das plântulas oriundas de sementes armazenadas por até 60 dias.

Diante do exposto acima, tendo em vista os custos econômicos e ambientais decorrentes do uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos e o fato de que o Brasil importa em média 73 % do nitrogênio empregado na agricultura (HUNGRIA, 2011), se faz necessário o estudo de alternativas que visem uma agricultura sustentável como o uso de BPCVs, visando auxiliar na sustentabilidade dos sistemas agrícolas e, ainda o desenvolvimento de novas formulações visando o aumento na produtividade dos grãos, dentre esses, o milho.

Este trabalho se insere neste contexto, contribuindo com um estudo de desenvolvimento e caracterização de diferentes formulações de revestimentos biodegradáveis e de baixo custo, e a sua influência sobre a germinação de sementes de milho, assim como, a incorporação do microrganismo da espécie *Azospirillum brasilense* Ab-V5, considerado uma BPCV, a estes revestimentos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Para a produção das matrizes poliméricas empregadas como revestimento em sementes de milho foram utilizados amido de mandioca da marca Yoki Alimentos S.A. (Paranavaí-PR), gelatina puríssima (BIOTEC – São Paulo-SP) com força de gel – “Bloom” de 150 – 220 g, álcool polivinílico (Reagen) com grau de hidrólise de 86,5-89,5 % e nanoargila sódica não modificada (Cloisite[®] Na⁺ - Southern Clay, Estados Unidos). As sementes empregadas no estudo foram de milho híbrido 2B5874X da Dow Agro Sciences e, P30F53H da Dupont. O microrganismo empregado foi o *Azospirillum brasilense* estirpe Ab-V5 registrado no MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para uso como inoculante comercial.

4.2 PRODUÇÃO DOS REVESTIMENTOS

Foi empregado um delineamento experimental de misturas simplex-centróide com 10 experimentos para avaliar o efeito do emprego dos diferentes polímeros nas propriedades dos revestimentos produzidos. Os polímeros empregados foram amido (X₁), gelatina (X₂) e álcool polivinílico (X₃). Em todos os experimentos foram utilizados os mesmos procedimentos de preparo, variando-se apenas os componentes das soluções filmogênicas, que foram preparadas sempre com 3 % (m/v) de polímero puro ou das misturas dos polímeros testados, conforme estabelecido no delineamento experimental (Tabela 02).

Tabela 02- Composição das soluções filmogênicas empregadas para o preparo dos revestimentos segundo o delineamento simplex-centróide para misturas ternárias.

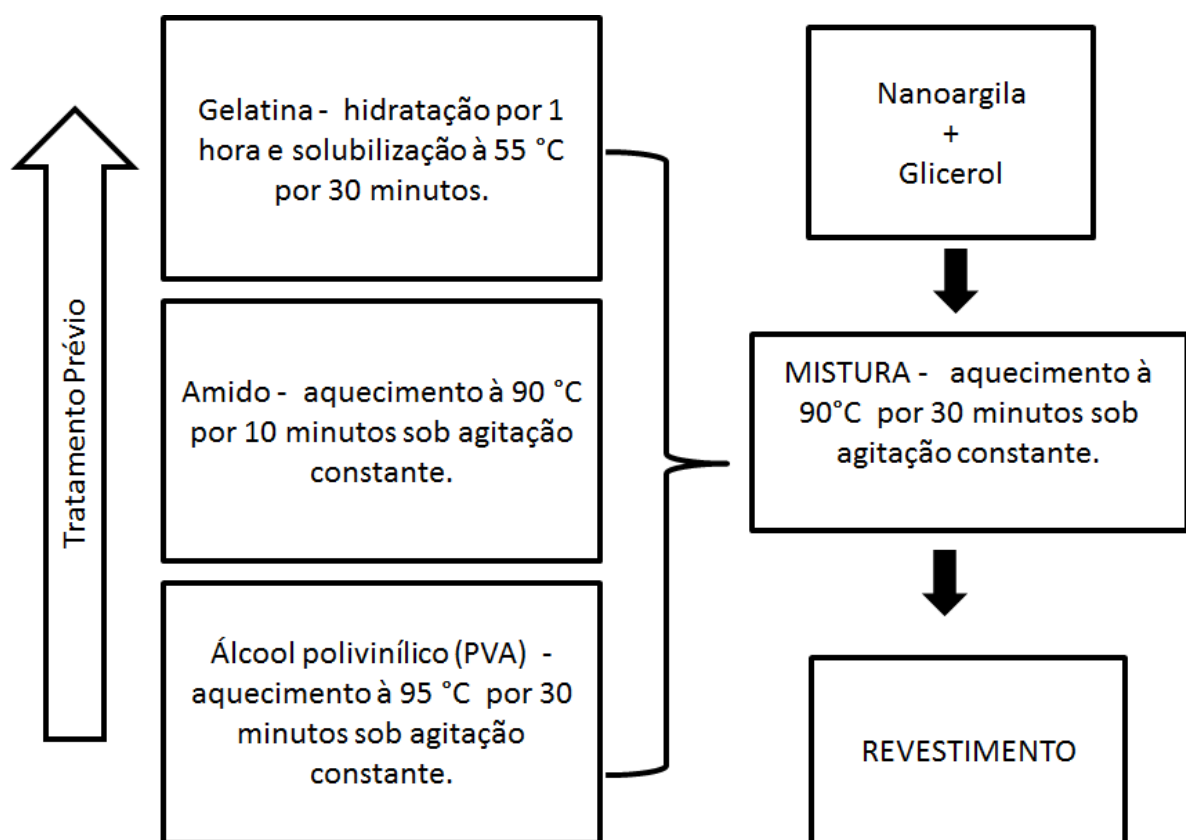
Formulação	Componentes Originais*			Valores codificados		
	X ₁	X ₂	X ₃	X' ₁	X' ₂	X' ₃
	Amido	Gelatina	PVA	Amido	Gelatina	PVA
AM3.0	3	0	0	1	0	0
GL3.0	0	3	0	0	1	0
AP3.0	0	0	3	0	0	1
AM1.5GL1.5	1,5	1,5	0	0,5	0,5	0
AM1.5AP1.5	1,5	0	1,5	0,5	0	0,5
GL1.5AP1.5	0	1,5	1,5	0	0,5	0,5
AM2.0GL0.5AP0.5	2,00	0,5	0,5	0,6667	0,1667	0,1667
AM0.5GL2.0AP0.5	0,50	2,00	0,50	0,1667	0,6667	0,1667
AM0.5GL0.5AP2.0	0,50	0,50	2,00	0,1667	0,1667	0,6667
AM1.0GL1.0AP1.0	1,00	1,00	1,00	0,3333	0,3333	0,3333

* (g/ 100 g sólidos). AM3.0 (amido 3 - g/ 100 g sólidos), GL3.0 (gelatina 3- g/ 100 g sólidos), AP3.0 (álcool polivinílico 3- g/ 100 g sólidos), AM1.5GL1.5 (amido 1,5 e gelatina 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM1.5AP1.5 (amido 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), GL1.5AP1.5 (gelatina 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM2.0GL0.5AP0.5 (amido 2, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 0,5- g/ 100 g sólidos), AM0.5GL2.0AP0.5 (amido 0,5, gelatina 2 e álcool polivinílico 0,5 - g/ 100 g sólidos), AM0.5GL0.5AP2.0 (amido 0,5, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 2 - g/ 100 g sólidos), AM1.0GL1.0AP1.0 (amido 1, gelatina 1 e álcool polivinílico 1 - g/ 100 g sólidos).

Os revestimentos foram produzidos conforme fluxograma apresentado na Figura 11. Inicialmente a gelatina foi hidratada em água destilada à temperatura ambiente por 1 hora e após foi solubilizada à 55 °C por 30 minutos. O álcool polivinílico (PVA) foi aquecido à 95 °C por 30 minutos sob agitação constante e o amido de mandioca foi aquecido à 90 °C por 10 minutos. Por fim, foram misturados todos os componentes da formulação, com agitação contínua em Banho Maria (Marconi MA 127) à 90 °C por 30 minutos até obtenção de uma mistura homogênea. Em todas as formulações empregou-se 20 g de glicerol/100 g de polímero como plastificante e, 0,2 g de nanoargila/100 g de polímero, previamente hidratada

por 1 hora. Para que se pudesse fazer a caracterização dos revestimentos, estes foram produzidos no formato de filmes, isto é, 20g das respectivas soluções filmogênicas foram aplicadas em um suporte (placas de acrílico), e foram secas à 30 °C em estufa com circulação de ar (Marconi MA 035) por 24 horas. Todos os filmes foram condicionados sob umidade relativa (UR) de 58 - 60 % em estufa incubadora tipo B.O.D (Marconi MA 415) contendo solução saturada de brometo de sódio à 25 °C antes de serem caracterizadas.

Figura 11- Fluxograma do processo de obtenção das formulações empregadas como revestimentos em sementes de milho.



4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

4.3.1 Avaliação Subjetiva

Na avaliação subjetiva foram observadas as seguintes características: Continuidade: ausência de rupturas, fraturas, após secagem; Homogeneidade: ausência de partículas insolúveis ou visíveis a olho nu, ou zonas de opacidade ou cores diferenciadas; Manuseabilidade: possibilidade de ser manuseado sem riscos de ruptura (RIGO, 2006). Os

filmes foram classificados de acordo com um padrão definido como: ● ● ● ● excelente ● ●
● bom ● ● deficiente.

4.3.2 Espessura

A espessura foi determinada conforme Monterrey e Sobral (1999). Fixou-se a massa da solução filmogênica adicionada nas placas de acrílico, e a espessura foi medida com o auxílio de um micrômetro manual (Mitutoyo, Japão). Foram avaliados 05 pontos diferentes do filme, sendo um no centro e os outros quatro pontos no perímetro.

4.3.3 Análise de pH das Soluções Filmogênicas

Diluiu-se 1,0 g de cada formulação (Tabela 02) em 9,0 mL de água destilada, e a mistura foi mantida em repouso por uma hora. As determinações de pH foram realizadas em potenciômetro (Digimed DM20) sob temperatura ambiente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.3.4 Umidade

A umidade dos filmes produzidos foi determinada conforme a metodologia proposta pelas Normas Analíticas do IAL para cereais e amiláceos (1985). Onde foram cortados 3 corpos de prova (20 x 20 mm) de cada formulação, pesados em balança analítica (Marte AY220), em seguida as amostras foram secas em estufa de circulação de ar (Marconi MA 035) á 105 °C até peso constante.

4.3.5 Solubilidade

Amostras dos filmes (20 x 20 mm) previamente secas foram mergulhadas em erlenmeyers de 100 mL contendo 80 mL de água destilada e agitados lentamente por 4 e 24 horas a 25 °C em incubadora orbital. Após este período, as amostras foram removidas e secas em estufa com circulação e renovação de ar (60 °C por 24 horas) para determinar a massa do material que não foi solubilizado (peso final). A solubilidade foi expressa pela porcentagem de material seco solubilizado (GONTARD; GULIBERT; CUQ, 1992). As análises foram realizadas em triplicata.

4.3.6 Capacidade de Absorção de Água

A capacidade de absorção de água das amostras foi determinada conforme norma ABNT NBR NM ISSO 535 (1999). Amostras com aproximadamente 20 x 20 mm, foram pesadas e submersas em 100 mL de água destilada, sob temperatura ambiente. Os corpos de prova foram colocados em contato com a água por diferentes tempos (1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos), depois o excesso de água foi retirado com papel toalha e as mesmas foram pesadas para avaliar o incremento da massa. Os ensaios foram realizados em triplicata. A capacidade de absorção de água foi calculada como a porcentagem de água absorvida por amostra.

4.3.7 Permeabilidade ao Vapor de água

A permeabilidade ao vapor de água foi determinada pelo método gravimétrico de acordo com a ASTM E-96-00 (2000) sob temperatura de 25 °C. Corpos de prova de cada amostra foram fixados na abertura circular (60 mm) da cápsula de permeabilidade, com o emprego de graxa de silicone, para garantir que a migração de umidade ocorresse exclusivamente através do revestimento. Os ensaios de cada formulação foram feitos em três diferentes gradientes (Δ) de umidade relativa (UR): ($\Delta = 0-33$ % UR) - com a cápsula de permeabilidade preenchida com cloreto de cálcio anidro (0 % UR) e o dessecador contendo solução saturada de cloreto de magnésio (33 % UR); ($\Delta = 33-64$ % UR) - com a cápsula de permeabilidade preenchida com cloreto de magnésio (33 % UR) e o dessecador contendo solução saturada de nitrato de sódio (64 % UR) e ($\Delta = 64-90$ % UR) – com a cápsula de permeabilidade preenchida com solução saturada de nitrato de sódio (64 % UR) e dessecador contendo solução saturada de cloreto de bário (90 % UR). As cápsulas foram pesadas após 4 h de estabilização do sistema, com posteriores pesagens a cada 3 horas por um período total de 48 horas. O ganho de massa de cada cápsula foi plotado em função do tempo, e da reta obtida por regressão linear foi determinado o coeficiente angular e calculada a taxa de permeabilidade ao vapor de água ($TPermA$) através da Equação 1:

$$TPermA = \frac{g}{t * A} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde, g/t é o coeficiente angular da reta (regressão linear) e A é a área de permeação (m^2) da cápsula. Em seguida, a permeabilidade ao vapor de água ($PermA$) foi calculada utilizando a equação:

A permeabilidade foi calculada de acordo com a Equação (2):

$$PermA = \frac{(TPermA * e)}{\left(Ps \times \left(\frac{URd - URc}{100} \right) \right)} \text{Equação 2}$$

Onde $PermA$ é a permeabilidade ao vapor de água ($g/msPa$), a $TPermA$ é a taxa de permeabilidade ao vapor de água (g/m^2s), e é a espessura do filme, Ps é a pressão de saturação do vapor de água sob $25\text{ }^\circ\text{C}$, URd e URc são as umidades relativas no dessecador e na cápsula, respectivamente. As análises foram realizadas em duplicata.

4.3.8 Microscopia Eletrônica de Varredura

As imagens da superfície dos filmes foram obtidas no Laboratório de Microscopia e Microanálise da UEL, por meio de um microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200 (Oregon – EUA). As amostras foram secas em estufa de circulação de ar (Marconi MA 035) a $60\text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas e, mantidas em dessecadores contendo cloreto de cálcio anidro por 1 semana. Em seguida, as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro e as imagens foram realizadas empregando-se uma voltagem de aceleração de 20 kV.

4.3.9 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

As amostras foram secas em estufa com circulação e renovação de ar (Marconi, MA 035) a $60\text{ }^\circ\text{C}$ por 12 h. Realizaram-se os espectros de FT-IR em espectrofotômetro de infravermelho Varian (modelo 640-IR, São Paulo – SP- Brasil) acoplado de suporte ATR, abrangendo a faixa espectral de 4.000 a $700\text{ }cm^{-1}$, com resolução de $4\text{ }cm^{-1}$ e 100 varreduras de cada amostra.

4.3.10 Difração de raios-X

Os difratogramas dos revestimentos produzidos foram obtidos utilizando-se um difratômetro de Raios-X (X'Pert-Philips). As condições de análise foram: (I) voltagem e corrente: 40 kV e 40 mA, respectivamente; (II) faixa de varredura: 2θ de 2 a 60° ; (III) passo: $0,1^\circ$ e (IV) velocidade $1^\circ/\text{min}$, dotado de monocromador de feixe secundário de grafite.

4.3.11 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica foi realizada em um analisador (TGA 50 - Shimadzu), em uma atmosfera de nitrogênio (50 mL min^{-1}). As amostras foram aquecidas de 30 à 600°C , com uma taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$. A partir das curvas de porcentagem de massa em função da temperatura foram calculados os parâmetros de T_{max} (temperatura de degradação na taxa de perda máxima) e T_{90} (temperatura onde a amostra mantém 90 % da sua massa residual).

4.3.12 Propriedades Mecânicas

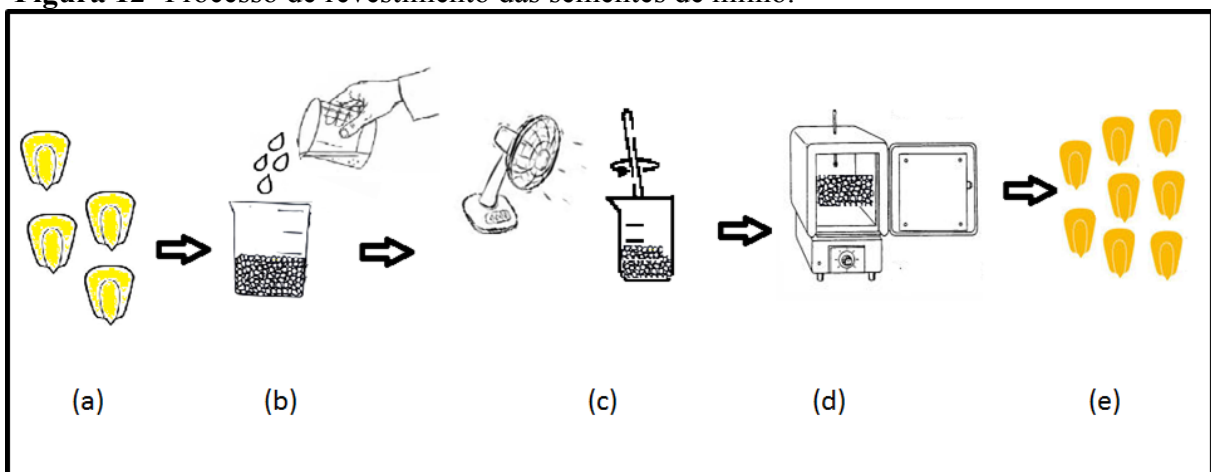
As propriedades mecânicas de tração foram analisadas conforme o Norma D 882-95 da *American Society for Testing and Materials* (ASTM, 1995) utilizando-se um texturômetro Brookfield - modelo CT3. Antes da realização dos ensaios mecânicos, os corpos de prova foram condicionados em uma estufa incubadora tipo B.O.D (Marconi MA 415) por 84 horas a 25°C sob umidade relativa de 58 %. Os corpos de prova foram selecionados de acordo com a espessura, permitindo uma variação de no máximo 10 %. Para determinação das espessuras foi utilizado um micrômetro manual (Mitutoyo, Japão). Para o ensaio de tração foram utilizados sete corpos de prova ($25 \times 50 \text{ mm}$) de cada formulação, que foram fixados nas garras de tração do equipamento a uma distância de 30 mm e velocidade de 2 mm/s. Os valores de resistência máxima a tração (RMT) foram calculados a partir das curvas de força *versus* deformação obtidas.

4.4 APLICAÇÃO DOS REVESTIMENTOS NAS SEMENTES DE MILHO

Além de serem produzidos filmes em suportes, os revestimentos foram aplicados sobre as sementes de milho. Os ensaios de revestimentos das sementes de milho foram conduzidos em condições de laboratório e, em temperatura ambiente. Em um recipiente de plástico foram adicionadas 100 gramas de sementes de milho, na sequência adicionou-se 10 mL de cada solução de revestimento (Tabela 02), e a mistura foi homogeneizada por 15 minutos sob ventilação constante. Posteriormente, as sementes revestidas foram acondicionadas em estufa B.O.D (Marconi MA 415) por 24 horas à 25 °C até completa secagem conforme representado na Figura 12. Foram testadas todas as formulações apresentadas na Tabela 02 e todos os testes foram realizados em triplicatas.

As sementes revestidas foram condicionadas sob umidade relativa (UR) de 58 - 60 % em estufa incubadora tipo B.O.D (Marconi MA 415) contendo solução saturada de brometo de sódio à 25 °C antes de serem caracterizadas.

Figura 12- Processo de revestimento das sementes de milho.



(a) Sementes de milho sem revestimento; (b) Aplicação do revestimento; (c) Processo de homogeneização e secagem; (d) Processo de secagem final; (e) Sementes de milho revestidas.

4.5 ANÁLISES REALIZADAS NAS SEMENTES DE MILHO

4.5.1 Avaliação Subjetiva

A avaliação subjetiva realizada nas sementes foi padronizada e alguns parâmetros determinados da seguinte forma: Homogeneidade: ausência de partículas insolúveis ou

visíveis a olho nu, ou zonas de opacidade ou cores diferenciadas; Continuidade: sementes revestidas totalmente recobertas com a matriz polimérica após secagem; Manuseabilidade: possibilidade de ser manuseado sem riscos de remoção do revestimento nas sementes. As sementes foram classificadas de acordo com um padrão definido como: ●●●● excelente ●●● bom ●● deficiente.

4.5.2 Teste de Adesão dos Revestimentos

O teste de adesão foi realizado nas formulações que continham amido em sua composição (AM3.0, AM1.5GL1.5, AM1.5AP1.5, AM2.0GL0.5AP0.5, AM0.5GL2.0AP0.5, AM0.5GL0.5AP2.0 e AM1.0GL1.0AP1.0). Foram pesados 10 g de sementes de milho com e sem revestimentos, após imersos em solução de lugol por 30 segundos. A confirmação da adesão da matriz polimérica nas sementes estudadas foi avaliada de forma visual através da observação de mudança de coloração nas superfícies das sementes de milho. Todos os testes foram realizados em triplicata e registrados com fotos.

4.5.3 Densidade Aparente

A densidade das sementes foi determinada através do cálculo da relação peso/volume com método adaptado de Silva e Marcos Filho (1982), onde as sementes de milho com e sem revestimento foram pesadas com auxílio de uma proveta de 30 mL em balança analítica (Marte AY220). A análise de densidade consistiu na medida direta da massa das sementes, dividida pelo seu volume, obtendo o resultado em g/cm^3 . Os testes foram realizados em quintuplicata.

4.5.4 Distribuição de Massa

Foram pesadas individualmente 100 sementes de milho com e sem revestimentos em balança analítica (Marte AY220), permitindo a análise da distribuição de massa.

4.5.5 Determinação do Teor de Água

O teor de água das sementes foi determinado de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992). Foram pesados em balança analítica (Marte AY220) 10 g de

sementes de milho com e sem revestimentos e, secos em estufa de circulação de ar (Marconi MA 035) à 105 °C por 24 horas. As sementes foram retiradas da estufa, resfriadas em dessecador e pesadas novamente, obtendo-se o seu peso seco. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem.

4.5.6 Teste de Germinação

O teste padrão de germinação foi efetuado de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992). Foram empregadas quatro repetições de 50 sementes, distribuídas sobre duas folhas de papel Germitex[®] umedecido com água destilada autoclavada equivalente a três vezes o peso do papel. Após a sementeira, recobriu-se com uma terceira folha para fazer os rolos, que na sequência foram colocados em um germinador (DeLeo–Porto Alegre-RS) regulado a 25 °C. A contagem do número de plântulas normais, anormais e, que não germinaram foi realizado no quarto e sétimo dia. A porcentagem de germinação no 7º dia foi determinada contabilizando-se as plântulas normais apenas. Os resultados foram expressos em porcentagem.

4.5.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

As imagens das sementes de milho com e sem revestimentos foram obtidas no Laboratório de Microscopia da UEL, através de um microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200 (Oregon – EUA). As amostras foram secas em estufa de circulação de ar (Marconi MA 035) a 35 °C por 24 horas e, mantidas em dessecadores contendo cloreto de cálcio anidro por 1 semana. Em seguida, as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro e as imagens foram realizadas empregando-se uma voltagem de aceleração de 20 kV.

4.6. INOCULAÇÃO DO MICRORGANISMO NO REVESTIMENTO

4.6.1 Processo de Esterilização da Solução Filmogênica

Após obtenção das respectivas formulações e caracterização das mesmas e, diante dos resultados obtidos, a amostra AM1.5GL1.5, produzida com a mistura binária de amido e gelatina, foi selecionada para dar continuidade ao trabalho. Dessa forma, a formulação selecionada foi esterilizada em autoclave por 15 minutos, à temperatura de 121 °C e pressão

de 1 atm, após resfriamento adicionou-se de forma estéril a suspensão bacteriana contendo o microrganismo *Azospirillum brasilense* Ab-V5.

4.6.2 Adição do Microrganismo ao Revestimento das Sementes

Uma suspensão bacteriana foi preparada em meio descrito por Oliveira et al. (2014), contendo uma concentração de 10^8 células de *A. brasilense* Ab-V5, e foram obtidos quatro tratamentos variando-se a forma de inoculação das sementes, conforme Quadro 01.

Quadro 01- Tratamentos utilizados para estudo da viabilidade do microrganismo.

Tratamento	Modo de preparo
T1	Tratamento controle, sem a semente, contendo a solução de revestimento puro (AM1.5GL1.5) autoclavada e inoculada com microrganismo.
T2	Semente não revestida, apenas inoculada com a suspensão bacteriana do microrganismo.
T3	Solução de revestimento puro (AM1.5GL1.5) autoclavada e inoculada com microrganismo e, em seguida, empregada para revestir as sementes.
T4	Semente inoculada com a suspensão bacteriana do microrganismo e, em seguida, revestida com a solução do revestimento puro.

Após o preparo dos diferentes tratamentos, as sementes foram previamente secas em temperatura ambiente, dentro da cabine de fluxo laminar e, em seguida, 100 g de cada tratamento foram acondicionados em placas de Petri estéreis descartáveis, vedadas com filme plástico e armazenadas em temperatura ambiente ao abrigo de luz para posterior avaliação da manutenção da viabilidade das células microbianas (0, 0,25, 1, 6, 10 e 15 dias).

4.6.3 Avaliação de Viabilidade Microbiana

Para avaliação da viabilidade do *A. brasilense* Ab-V5 foram utilizados 100 g de cada tratamento (Quadro 1), que foram adicionados em um erlenmeyer contendo 100 mL de solução salina (0,9 % m/v) e Twen 80 (0,1 % v/v) estéreis, e mantidos sob agitação constante em agitadora orbital a 250 rpm por 30 minutos. Os tratamentos foram feitos em triplicata e

avaliados em cinco tempos (0, 0,25, 1, 6, 10 e 15 dias) após o preparo. Em cada tempo de cultivo, foram determinadas a viabilidade celular de *A. brasilense* Ab-V5. A avaliação da viabilidade celular foi realizada através da contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) pelo método da gota (Drop Plate).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise de alguns dos resultados de caracterização dos revestimentos foram obtidos modelos matemáticos cúbicos (Equação 3) empregando-se o software Statistica 7.0 (Statsoft, Oklahoma, USA):

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3 \text{ (Equação 3)}$$

onde Y é a variável dependente ou resposta, β_1 , β_2 , β_3 , β_{12} , β_{13} , β_{23} , e β_{123} são os parâmetros estimados para cada termo linear e de interação obtido nos modelos onde as variáveis foram amido de mandioca (X_1), gelatina (X_2), e PVA (X_3). Gráficos de contorno foram obtidos para a análise dos efeitos das variáveis estudadas.

Para as análises de microestrutura dos revestimentos (MEV, FT-IR, DRX e TGA) não foram construídos modelos matemáticos.

Os outros dados obtidos foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e teste de Tukey de comparação de médias ($p \leq 0,05$) empregando-se o software Statistica 7.0 (Statsoft, Oklahoma, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES

5.1.1 Análise Subjetiva

Os resultados da análise subjetiva, que incluem a continuidade, homogeneidade e manuseabilidade estão apresentados na Tabela 03.

Tabela 03 - Resultado da avaliação subjetiva nos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico.

Formulação	Continuidade	Homogeneidade	Manuseabilidade
AM3.0	● ● ●	● ● ●	● ●
GL3.0	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●
AP3.0	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●
AM1.5GL1.5	● ● ●	● ● ● ●	● ● ●
AM1.5AP1.5	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●
GL1.5AP1.5	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●
AM2.0GL0.5AP0.5	● ● ●	● ●	● ●
AM0.5GL2.0AP0.5	● ● ●	● ● ●	● ●
AM0.5GL0.5AP2.0	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ●
AM1.0GL1.0AP1.0	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ●

AM3.0 (amido 3 - g/ 100 g sólidos), GL3.0 (gelatina 3- g/ 100 g sólidos), AP3.0 (álcool polivinílico 3- g/ 100 g sólidos), AM1.5GL1.5 (amido 1,5 e gelatina 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM1.5AP1.5 (amido 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), GL1.5AP1.5 (gelatina 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM2.0GL0.5AP0.5 (amido 2, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 0,5- g/ 100 g sólidos), AM0.5GL2.0AP0.5 (amido 0,5, gelatina 2 e álcool polivinílico 0,5 - g/ 100 g sólidos), AM0.5GL0.5AP2.0 (amido 0,5, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 2 - g/ 100 g sólidos), AM1.0GL1.0AP1.0 (amido 1, gelatina 1 e álcool polivinílico 1 - g/ 100 g sólidos). Padrão empregado: ● ● ● ● excelente ● ● ● bom ● ● deficiente.

A funcionalidade e o comportamento dos revestimentos dependem principalmente das suas propriedades mecânicas e de transporte, que por sua vez dependem da composição do filme, do seu processo de formação e do método de aplicação no produto (PINHEIRO et al., 2010). Diante disso, a quantidade de sólidos adicionados à mistura (Tabela 02) e o modo de preparo que incluiu a homogeneidade, temperatura e tempo (Figura 11) foram de extrema

importância na elaboração das formulações empregadas como revestimentos biodegradáveis em sementes de interesse agrícola.

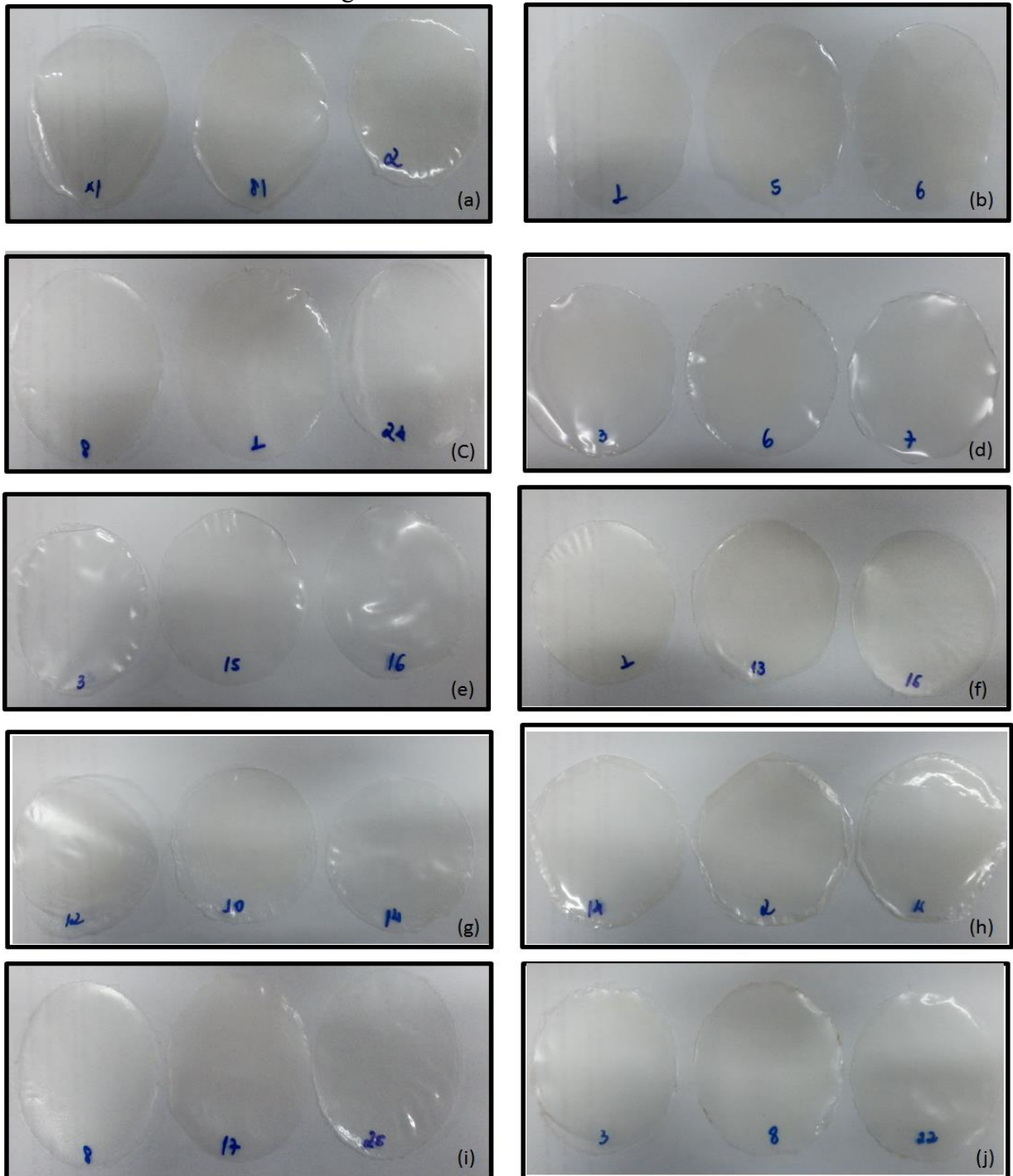
Conforme os resultados apresentados na Tabela 03, as condições de processo para o preparo dos revestimentos estabelecidas neste estudo, tais como a hidratação da gelatina (1 hora) e, a prévia solubilização do álcool polivinílico (PVA) e do amido de mandioca foram satisfatórias na elaboração das formulações obtidas, pois a maioria dos filmes apresentaram-se contínuos, sem ausência de rupturas e fraturas.

Em relação a homogeneidade, os filmes correspondentes à formulação AM2.0GL0.5AP0.5 foram classificados como deficientes pois apresentaram visualmente zonas opacas, este fato pode estar relacionado com a temperatura e o processo de homogeneização, ou seja, de alguma forma a interação entre os componentes da formulação influenciou negativamente na completa solubilização dos polímeros. No trabalho realizado por Rigo (2006), nos tratamentos elaborados com 50 % de amido modificado associado de 50 % de amido nativo também se observou filmes com zonas de opacidade, a autora atribui este fenômeno a diferença da temperatura de gelatinização dos dois tipos de amidos.

Em relação a manuseabilidade, somente as formulações AM3.0, AM2.0GL0.5AP0.5 e AM0.5GL2.0AP0.5 não apresentaram um bom desempenho, podendo ser rompidas quando manuseadas. Materiais a base de amido puro, como a formulação AM3.0, em geral são quebradiços e possuem baixa flexibilidade (BRITO et al., 2011), desta forma, necessita-se a introdução de aditivos a estes materiais no sentido de melhorar estas características (HALLEY, 2005; MALI et al., 2010; FARIA; VERCELHEZE; MALI 2012). Nas amostras AM2.0GL0.5AP0.5 e AM0.5GL2.0AP0.5 a baixa manuseabilidade foi atribuída ao momento em que as amostras eram retiradas do suporte (placas de acrílico), pois ocorria ruptura dos filmes.

No geral, os filmes produzidos a base de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico incorporados com nanoargilas, obtidos neste trabalho tiveram a aparência de um plástico transparente, além de se apresentaram contínuos, homogêneos e com bom aspecto visual, conforme visualizado na Figura 13.

Figura 13- Filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico empregados como revestimentos biodegradáveis em sementes de milho.



a)AM3.0 (amido 3 - g/ 100 g sólidos), b) GL3.0 (gelatina 3- g/ 100 g sólidos), c) AP3.0 (álcool polivinílico 3- g/ 100 g sólidos), d) AM1.5GL1.5 (amido 1,5 e gelatina 1,5 - g/ 100 g sólidos), e) AM1.5AP1.5 (amido 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), f) GL1.5AP1.5 (gelatina 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), g) AM2.0GL0.5AP0.5 (amido 2, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 0,5- g/ 100 g sólidos), h) AM0.5GL2.0AP0.5 (amido 0,5, gelatina 2 e álcool polivinílico 0,5 - g/ 100 g sólidos), i) AM0.5GL0.5AP2.0 (amido 0,5, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 2 - g/ 100 g sólidos), j) AM1.0GL1.0AP1.0 (amido 1, gelatina 1 e álcool polivinílico 1 - g/ 100 g sólidos).

5.1.2 Espessura, pH e umidade dos filmes

Os resultados de espessura e pH dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico estão apresentados na Tabela 04. Como estes resultados foram empregados apenas para se conhecer a espessura e o pH dos materiais não foi empregada a metodologia da superfície de resposta para a análise destes resultados.

Tabela 04- Resultados de espessura e pH dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico.

Formulações	Espessura (mm)	pH
AM3.0	0,11 ± 0,01 ^b	5,95 ± 0,057 ^{ab}
GL3.0	0,13 ± 0,01 ^a	5,57 ± 0,005 ^b
AP3.0	0,13 ± 0,01 ^a	5,69 ± 0,221 ^b
AM1.5GL1.5	0,13 ± 0,01 ^a	5,86 ± 0,112 ^{ab}
AM1.5AP1.5	0,13 ± 0,01 ^a	6,16 ± 0,199 ^a
GL1.5AP1.5	0,13 ± 0,01 ^a	5,75 ± 0,056 ^{ab}
AM2.0GL0.5AP0.5	0,13 ± 0,02 ^a	5,96 ± 0,011 ^{ab}
AM0.5GL2.0AP0.5	0,13 ± 0,01 ^a	5,86 ± 0,015 ^{ab}
AM0.5GL0.5AP2.0	0,13 ± 0,01 ^a	5,69 ± 0,245 ^b
AM1.0GL1.0AP1.0	0,13 ± 0,01 ^a	5,85 ± 0,005 ^{ab}

Média ± desvio padrão. Letras diferentes significam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias (teste de Tukey). AM3.0 (amido 3 - g/ 100 g sólidos), GL3.0 (gelatina 3- g/ 100 g sólidos), AP3.0 (álcool polivinílico 3- g/ 100 g sólidos), AM1.5GL1.5 (amido 1,5 e gelatina 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM1.5AP1.5 (amido 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), GL1.5AP1.5 (gelatina 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM2.0GL0.5AP0.5 (amido 2, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 0,5- g/ 100 g sólidos), AM0.5GL2.0AP0.5 (amido 0,5, gelatina 2 e álcool polivinílico 0,5 - g/ 100 g sólidos), AM0.5GL0.5AP2.0 (amido 0,5, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 2 - g/ 100 g sólidos), AM1.0GL1.0AP1.0 (amido 1, gelatina 1 e álcool polivinílico 1 - g/ 100 g sólidos).

De acordo com Sobral (2000) o controle da espessura dos filmes biodegradáveis é difícil, sobretudo nos processos de produção do tipo *casting*, devido a viscosidade das soluções e da formação de bolhas durante o preparo dos filmes. Ao contrário do que foi mencionado pelo autor, neste trabalho a espessura dos filmes variou entre 0,11 e 0,13 mm (Tabela 04), foi uma variação pequena e que confirma a processo de produção resultou em filmes homogêneos. Valores de espessura semelhantes (0,11 a 0,14 mm) foram encontrados

no trabalho desenvolvido por Melo (2010) em filmes elaborados pela técnica de *casting* com amido de mandioca puro e em misturas com goma xantana. Igualmente, no trabalho desenvolvido por Scheibe (2012), na elaboração de filmes com amido de mandioca se obteve um valor de espessura de 0,13 mm e, na formulação de amido de mandioca adicionada de fibras de sisal houve um aumento significativo nos valores de espessura para 0,26 mm.

Ao contrário dos resultados encontrados por Fakhouri et al. (2007) onde a espessura dos biofilmes foram menores, variando de 0,053 mm para as formulações compostas por gelatina e amido de trigo e 0,063 mm para as formulações compostas com gelatina e amido de batata.

O pH das soluções filmogênicas variou entre 5,57 (formulação GL3.0) e 6,16 (formulação AM1.5AP1.5) (Tabela 04) e pode-se perceber que também foi uma variação pequena. Estes valores estão em conformidade com a literatura, onde os valores de pH da gelatina têm sido reportados dentro da faixa de 3,8 a 5,0 para gelatinas processadas por pré-tratamento ácido e 4,7 a 7,5 para processadas por pré-tratamento alcalino (ALFARO, 2008). O valor de pH do álcool polivinílico varia conforme seu grau de hidrólise nas faixas de 5,0 e 7,0 (BRISCO, 2016). A maioria dos amidos nativos apresenta pH próximo da neutralidade (MARCON; AVANCINI; AMANTE, 2007).

Diante disso, pode-se observar que os valores de pH encontrados neste trabalho ficaram próximos da neutralidade, o que é uma característica interessante para os materiais produzidos, uma vez que podem servir como matriz polimérica para a imobilização de nutrientes e/ou microrganismos.

Os resultados de umidade dos filmes variaram de 13,11 a 24,71 % e estão apresentados na Tabela 05.

Tabela 05- Resultados de umidade dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico.

Formulações	Umidade (%)
AM3.0	13,74 ± 5,33
GL3.0	20,29 ± 3,04
AP3.0	23,87 ± 4,65
AM1.5GL1.5	24,71 ± 8,25
AM1.5AP1.5	16,01 ± 2,20
GL1.5AP1.5	24,63 ± 0,87
AM2.0GL0.5AP0.5	11,65 ± 4,31
AM0.5GL2.0AP0.5	16,03 ± 1,75
AM0.5GL0.5AP2.0	18,59 ± 3,83
AM1.0GL1.0AP1.0	13,11 ± 6,69

AM3.0 (amido 3 - g/ 100 g sólidos), GL3.0 (gelatina 3- g/ 100 g sólidos), AP3.0 (álcool polivinílico 3- g/ 100 g sólidos), AM1.5GL1.5 (amido 1,5 e gelatina 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM1.5AP1.5 (amido 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), GL1.5AP1.5 (gelatina 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM2.0GL0.5AP0.5 (amido 2, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 0,5- g/ 100 g sólidos), AM0.5GL2.0AP0.5 (amido 0,5, gelatina 2 e álcool polivinílico 0,5 - g/ 100 g sólidos), AM0.5GL0.5AP2.0 (amido 0,5, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 2 - g/ 100 g sólidos), AM1.0GL1.0AP1.0 (amido 1, gelatina 1 e álcool polivinílico 1 - g/ 100 g sólidos)

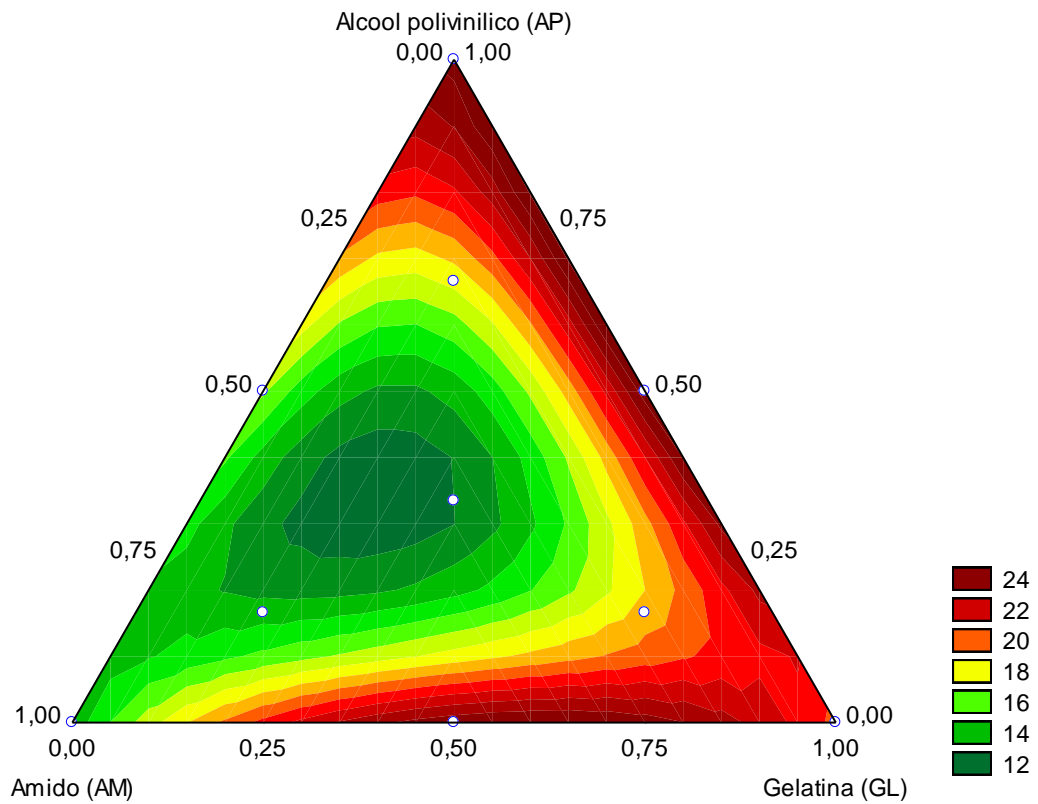
O modelo estatístico gerado para esta resposta está apresentado na Equação 4. O modelo gerado foi significativo ao nível de 10 % de significância ($p = 0,057$) e o coeficiente de correlação foi satisfatório ($R^2 = 0,94$).

$$\text{Umidade} = 13,33X_1^{**} + 19,69X_2^{**} + 24,44X_3^{**} + 28,78X_1X_2 - 10,85X_1X_3 + 10,16X_2X_3 - 282,09X_1X_2X_3^{***} \text{ (Equação 4)}$$

(** $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,01$)

Pode-se perceber por meio do modelo (Equação 4) que os efeitos lineares das três variáveis independentes foram positivos e significativos em nível de 5 % de significância para esta resposta, no entanto o maior efeito foi observado para a variável X_3 (álcool polivinílico). A interação ternária entre as três variáveis ($X_1X_2X_3$) apresentou efeito negativo e significativo em nível de 1 % de significância, ou seja, nas formulações onde foram empregadas misturas ternárias dos três polímeros a umidade foi menor, o que pode ser confirmado na Figura 14. Possivelmente, quando foi empregada a mistura ternária, a interação entre os três polímeros tenha sido favorecida em detrimento da interação polímero-água.

Figura 14 -Gráfico de contorno para os resultados de umidade dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico.



5.1.3 Solubilidade

Os resultados de solubilidade em água nos períodos de 4 e 24 horas dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico estão apresentados Tabela 06.

Tabela 06- Resultados de solubilidade dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico.

Formulações	Solubilidade 4 h (%)	Solubilidade 24 h (%)
AM3.0	27,22 ± 7,92	49,80 ± 1,67
GL3.0	28,75 ± 1,32	54,68 ± 4,61
AP3.0	61,65 ± 3,64	84,61 ± 0,95
AM1.5GL1.5	29,44 ± 2,44	45,27 ± 10,84
AM1.5AP1.5	24,49 ± 7,38	55,76 ± 4,72
GL1.5AP1.5	13,32 ± 4,24	40,88 ± 1,45
AM2.0GL0.5AP0.5	21,70 ± 9,06	51,34 ± 8,91
AM0.5GL2.0AP0.5	28,79 ± 0,19	56,29 ± 3,12
AM0.5GL0.5AP2.0	28,87 ± 8,53	64,39 ± 7,33
AM1.0GL1.0AP1.0	18,12 ± 3,61	45,47 ± 3,74

AM3.0 (amido 3 - g/ 100 g sólidos), GL3.0 (gelatina 3- g/ 100 g sólidos), AP3.0 (álcool polivinílico 3- g/ 100 g sólidos), AM1.5GL1.5 (amido 1,5 e gelatina 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM1.5AP1.5 (amido 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), GL1.5AP1.5 (gelatina 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM2.0GL0.5AP0.5 (amido 2, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 0,5- g/ 100 g sólidos), AM0.5GL2.0AP0.5 (amido 0,5, gelatina 2 e álcool polivinílico 0,5 - g/ 100 g sólidos), AM0.5GL0.5AP2.0 (amido 0,5, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 2 - g/ 100 g sólidos), AM1.0GL1.0AP1.0 (amido 1, gelatina 1 e álcool polivinílico 1 - g/ 100 g sólidos).

Os modelos estatísticos gerados para estas respostas estão descritos nas equações 5 e 6. O modelo para a solubilidade 4 h foi significativo em nível de 5 % de significância ($p = 0,0423$) e apresentou R^2 igual a 0,95, enquanto o modelo para solubilidade 24 h não foi significativo ($p = 0,1222$) e apresentou R^2 igual a 0,90.

$$\text{Solubilidade 4h} = 26,49X_1^{**} + 30,83X_2^{***} + 61,21X_3^{***} + 8,50X_1X_2 - 82,14X_1X_3^{**} - 124,26X_2X_3^{***} + 88,89X_1X_2X_3 \quad (\text{Equação 5})$$

(** $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,01$)

$$\text{Solubilidade 24h} = 49,52X_1^{***} + 56,66X_2^{***} + 85,12X_3^{***} - 24,49X_1X_2 - 45,32X_1X_3 - 110,08X_2X_3^{**} + 224,38X_1X_2X_3 \quad (\text{Equação 6})$$

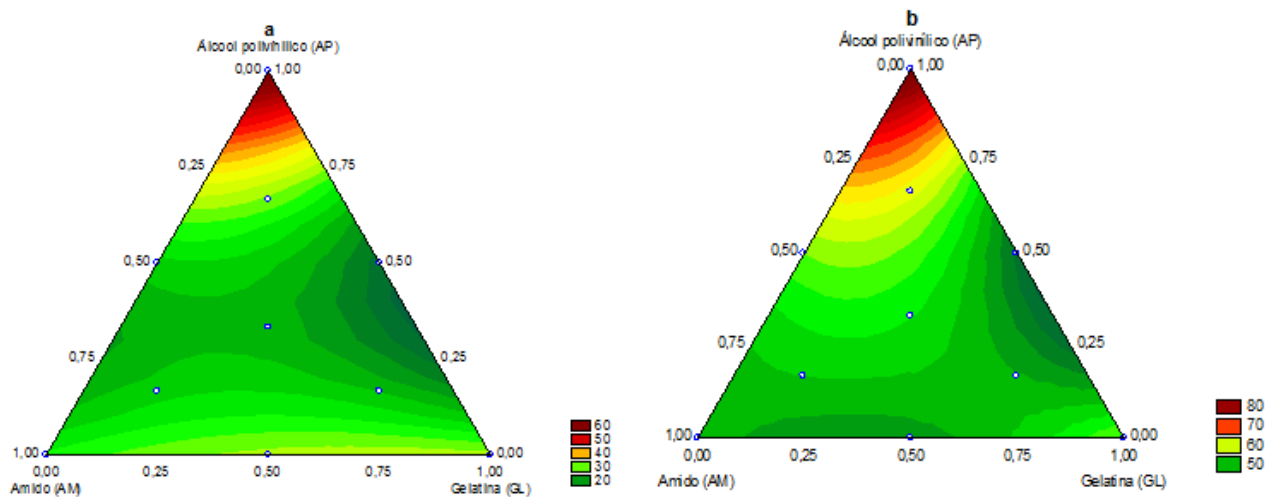
(** $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,01$)

Os efeitos lineares das três variáveis independentes foram positivos e significativos para as duas respostas de solubilidade (4 e 24 horas), e o maior efeito linear foi observado para a variável X_3 (álcool polivinílico) em ambos os casos, o que pode ser observado na Tabela 06 onde o filme que apresentou os maiores valores de solubilidade nos tempos de 4 e 24 h foi o AP3.0 (formulado apenas com o álcool polivinílico), com valores de 61,65 e 84,61 %, respectivamente.

Ainda, as interações X_1X_3 e X_2X_3 apresentaram um efeito negativo no tempo de 4 horas e, no tempo de 24 horas somente a interação X_2X_3 teve efeito significativo e negativo sobre a solubilidade (Tabela 06). Na Figura 15, observa-se que as solubilidades dos filmes em 4 e 24 horas apresentaram as mesmas tendências de resposta, e que os valores máximos de solubilidade foram obtidos para os filmes produzidos apenas com o álcool polivinílico (AP3.0).

Figura 15- Gráfico de contorno para os resultados de solubilidade dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico.

a) Solubilidade em água: 4 horas; b) Solubilidade em água: 24 horas.



A solubilidade em água dos biofilmes desenvolvidos por Fakhouri et al. (2007) variou de 24,38 % para os filmes elaborados com gelatina e amido de trigo a 30,20 % para os filmes elaborados com gelatina e amido de arroz, valores inferiores dos apresentados neste estudo. De acordo com os autores, esta propriedade direciona a aplicação do filme, e em alguns casos, a sua total solubilização em água pode ser benéfica.

Do mesmo modo, Gnanasambadam, Hettiarachchy e Coleman (1997), ressaltam que o conhecimento sobre a solubilidade dos revestimentos mostra qual é sua integridade em sistemas aquosos e indica qual a sua resistência à água. Assim, fornece indicações sobre a biodegradabilidade do material, que é uma propriedade importante relacionada com sua aplicação.

5.1.4 Capacidade de Absorção de Água (CAA)

Na Tabela 07 estão expressos os resultados da capacidade de absorção de água em diferentes tempos (1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos) dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico. Como a capacidade de absorção de água foi medida em diferentes tempos, optou-se por apresentar os resultados em uma tabela para facilitar a comparação entre as diferentes formulações.

Para todas as amostras a CAA aumentou significativamente com o aumento do tempo de análise (Tabela 07); em 1 minuto de análise a CAA variou de 128 % (misturas ternárias AM2.0GL0.5AP0.5 e AM0.5GL2.0AP0.5) a 274 % (formulação AP3.0). Após 30 min de análise, a CAA variou entre 284 % (mistura ternária AM1.0GL1.0AP1.0) e 740 % (AM3.0).

A formulação contendo apenas o álcool polivinílico (AP3.0) (Tabela 07) se desfez em pedaços pequenos após 5 minutos de ensaio, não sendo possível recolher o material para a pesagem. Esta formulação foi a que apresentou maior umidade e solubilidade como observado anteriormente. A solubilidade do álcool polivinílico é uma característica intrínseca do próprio material (SREEDHAR et al., 2005), sendo esta influenciada pelo grau de hidrólise. Neste trabalho foi empregado álcool polivinílico parcialmente hidrolisado (~88 % de hidrólise), e Segundo Tang e Alavi (2011), menores graus de hidrólise do álcool polivinílico levam a um aumento da sua solubilidade em água, o que pode estar

Tabela 07- Resultados da capacidade de absorção de água em diferentes tempos (1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos) dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico.^a

Formulações	Tempo (minutos)						
	1	5	10	15	20	25	30
AM3.0	182±16 ^B _e	234±6 ^{Cd}	227±5 ^{Bd}	328±1 ^{Bc}	325±4 ^{Bc}	579±11 ^{Ab}	740±29 ^A _a
GL3.0	142±51 ^B _d	130±8 ^{Dd}	233±2 ^{Bd}	383±3 ^{Bb}	444±69 ^A _b	395±8 ^{ABb}	507±10 ^C _a
AP3.0	274±74 ^A _b	502±109 ^A _a	ND	ND	ND	ND	ND
AM1.5GL1.5	142±14 ^B _c	305±35 ^{Bb}	317±80 ^A _b	446±40 ^A _a	491±18 ^A _a	500±37 ^{Aa}	597±37 ^B _a
AM1.5AP1.5	181±14 ^B _c	290±50 ^{Bb}	336±20 ^A _a	ND	ND	ND	ND
GL1.5AP1.5	224±10 ^A _c	317±16 ^{Bb}	368±48 ^A _b	458±90 ^A _a	457±12 ^A _a	451±32 ^{Aa}	467±29 ^C _a
AM2.0GL0.5AP0.5	128±32 ^C _c	122±90 ^{Dc}	126±60 ^C _c	128±50 ^D _c	285±38 ^B _b	394±40 ^{AB} _a	442±70 ^C _a
AM0.5GL2.0AP0.5	128±10 ^C _e	154±60 ^{Dd}	199±60 ^B _c	254±60 ^C _b	264±20 ^B _b	325±90 ^{Ba}	331±12 ^D _a
AM0.5GL0.5AP2.0	215±27 ^A _d	359±15 ^{Bb}	361±60 ^A _c	425±53 ^A _b	451±41 ^A _b	564±12 ^{Aa}	ND
AM1.0GL1.0AP1.0	187±27 ^B _b	156±50 ^{Db}	186±11 ^B _b	180±20 ^C _b	203±80 ^D _b	264±90 ^{Ca}	284±70 ^D _a

^a - Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). ^b - AM3.0 (amido 3 - g/ 100 g sólidos), GL3.0 (gelatina 3- g/ 100 g sólidos), AP3 (álcool polivinílico 3- g/ 100 g sólidos), AM1.5GL1.5 (amido 1,5 e gelatina 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM1.5AP1.5 (amido 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), GL1.5AP1.5 (gelatina 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM2.0GL0.5AP0.5 (amido 2, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 0,5- g/ 100 g sólidos), AM0.5GL2.0AP0.5 (amido 0,5, gelatina 2 e álcool polivinílico 0,5 - g/ 100 g sólidos), AM0.5GL0.5AP2.0 (amido 0,5, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 2 - g/ 100 g sólidos), AM1.0GL1.0AP1.0 (amido 1, gelatina 1 e álcool polivinílico 1 - g/ 100 g sólidos). * ND – Não Determinado.

Esta propriedade é bastante importante, pois a água é um dos fatores que mais influencia o processo de germinação das sementes, e de acordo com Carvalho e Nakagawa (2000), da absorção de água resulta a reidratação dos tecidos e a intensificação da respiração e

de todas as demais atividades metabólicas que culminam com o fornecimento de energia e de nutrientes necessários para a retomada do crescimento do eixo embrionário.

5.1.5 Permeabilidade ao vapor de água (PermA)

Os resultados de permeabilidade ao vapor de água dos filmes produzidos estão apresentados na Tabela 08.

Tabela 08- Resultados de permeabilidade ao vapor de água dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico.

Formulação	Permeabilidade ao vapor de água (g/msPa) x 10 ¹⁰		
	Δ (0-33 % UR)	Δ (33-64 % UR)	Δ (64-90 % UR)
AM3.0	3,45 ^a	3,85 ^a	4,72 ^b
GL3.0	1,75 ^b	2,92 ^b	6,00 ^a
AP3.0	2,68 ^a	4,88 ^a	5,10 ^{ab}
AM1.5GL1.5	1,90 ^b	2,35 ^b	4,23 ^b
AM1.5AP1.5	1,17 ^b	2,26 ^b	3,47 ^c
GL1.5AP1.5	1,13 ^b	2,04 ^b	3,20 ^c
AM2.0GL0.5AP0.5	2,71 ^a	4,65 ^a	5,75 ^a
AM0.5GL2.0AP0.5	2,04 ^a	4,18 ^a	5,15 ^{ab}
AM0.5GL0.5AP2.0	1,45 ^b	2,67 ^b	2,78 ^c
AM1.0GL1.0AP1.0	1,55 ^b	2,90 ^b	3,95 ^{bc}

Letras diferentes na mesma linha significam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias (teste de Tukey). AM3.0 (amido 3 - g/ 100 g sólidos), GL3.0 (gelatina 3- g/ 100 g sólidos), AP3.0 (álcool polivinílico 3- g/ 100 g sólidos), AM1.5GL1.5 (amido 1,5 e gelatina 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM1.5AP1.5 (amido 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), GL1.5AP1.5 (gelatina 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM2.0GL0.5AP0.5 (amido 2, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 0,5- g/ 100 g sólidos), AM0.5GL2.0AP0.5 (amido 0,5, gelatina 2 e álcool polivinílico 0,5 - g/ 100 g sólidos), AM0.5GL0.5AP2.0 (amido 0,5, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 2 - g/ 100 g sólidos), AM1.0GL1.0AP1.0 (amido 1, gelatina 1 e álcool polivinílico 1 - g/ 100 g sólidos).

A PermA foi medida em três gradientes de umidade relativa muito próximos, mas em diferentes faixas de valores absolutos, e pode-se perceber que os valores de permeabilidade foram menores na menor faixa de Δ UR (0 – 33 %), e aumentaram nas maiores faixas de Δ UR (33 – 64 %) e Δ UR (64 – 90 %) (Tabela 08). Tendência similar pode ser observada por alguns

autores, que relataram que quando se determina a permeabilidade ao vapor de água, com o aumento dos valores absolutos de UR há um aumento da permeabilidade ao vapor de água (SANTOS et al. 2010). De acordo com Bertuzzi et al. (2007), a permeabilidade ao vapor de água depende da solubilidade e do coeficiente de difusão do vapor de água através do filme, e estes parâmetros aumentam com o aumento dos valores absolutos das UR.

Os modelos matemáticos obtidos para a permeabilidade ao vapor de água nos diferentes gradientes de umidade relativa estão apresentados nas Equações 7, 8 e 9 abaixo. Nenhum dos modelos foi significativo em nível de 5% de significância, e os valores do coeficiente de determinação (R^2) foram de 0,90 para PermA (Δ 0-33 %, $p = 0,1226$), 0,67 para PermA (Δ 33-64 %, $p = 0,5300$) e 0,66 para PermA (Δ 64-90 %, $p = 0,5500$), e mesmo os modelos não se ajustando aos dados experimentais foram empregados para o estudo da tendência de resposta da PermA.

$$\text{PermA } (\Delta \text{ 0-33\%}) = 3,56X_1^{***} + 1,83X_2^{**} + 2,58X_3^{***} - 2,408X_1X_2 - 7,54X_1X_3 - 4,35X_2X_3 + 21,24X_1X_2X_3 \text{ (Equação 7)}$$

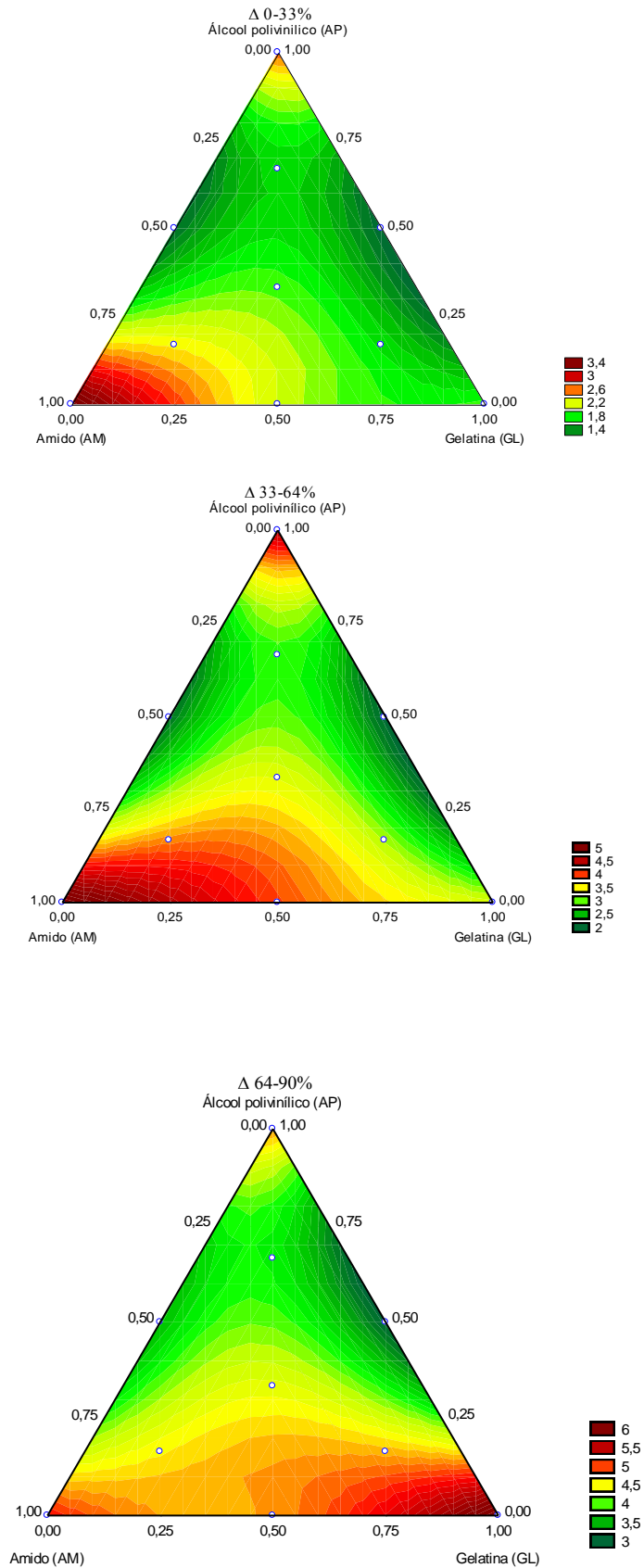
$$\text{PermA } (\Delta \text{ 33-64\%}) = 5,10X_1^{**} + 3,24X_2 + 4,43X_3^{**} - 0,168X_1X_2 - 1,84X_1X_3 - 1,31X_2X_3 + 0,84X_1X_2X_3^{***} \text{ (Equação 8)}$$

$$\text{PermA } (\Delta \text{ 64-90\%}) = 5,09X_1^{**} + 6,12X_2^{**} + 4,72X_3^{**} - 3,51X_1X_2 - 5,74X_1X_3 - 9,89X_2X_3 + 31,17X_1X_2X_3^{***} \text{ (Equação 9)}$$

(** $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,01$)

Observando-se os modelos, percebe-se que os efeitos das variáveis lineares foram os mais importantes, e influenciaram de forma positiva a PermA, e nos dois gradientes de Δ 0-33 % e Δ 33-64 %, o efeito do amido (X_1) foi mais importante, enquanto que para o gradiente Δ 64-90 %, o efeito da gelatina foi mais importante. Os resultados de PermA apresentam as mesmas tendências de resposta (Figura 16) que os resultados de solubilidade, onde as formulações com os polímeros puros foram as que apresentaram as maiores respostas.

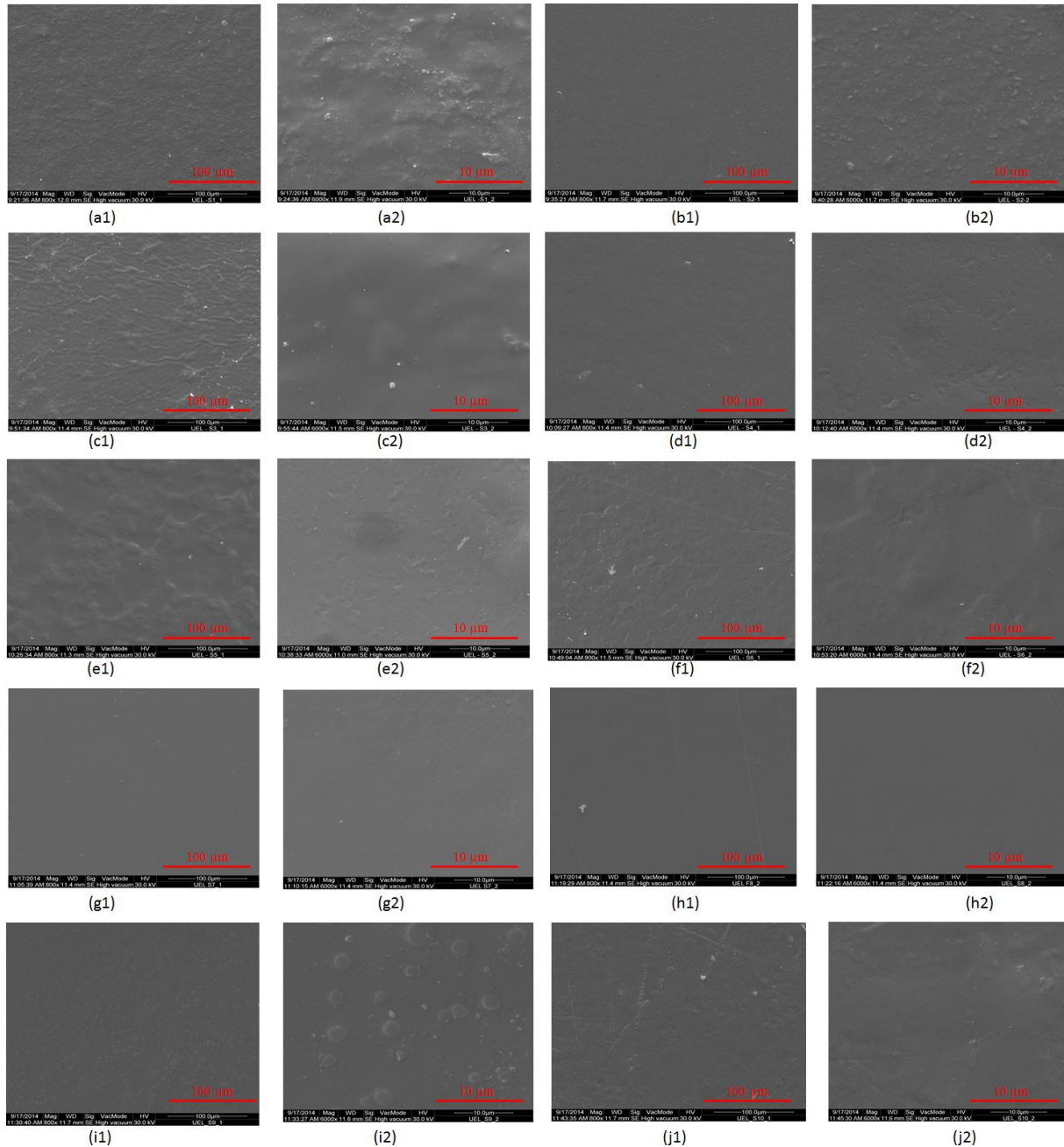
Figura 16- Gráfico de contorno para os resultados de PermA dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico.



5.1.6 Microscopia Eletrônica de Varredura

Na Figura 17 estão apresentadas as micrografias da superfície dos filmes produzidos.

Figura 17 - Microscopia eletrônica de varredura (superfície) dos filmes produzidos.



Aumento de 800 X e 6000 X – Respectivamente (a1 e a2) AM3.0 (amido 3 - g/ 100 g sólidos), (b1 e b2) GL3.0 (gelatina 3- g/ 100 g sólidos), (c1 e c2) AP3.0 (álcool polivinílico 3- g/ 100 g sólidos), (d1 e d2) AM1.5GL1.5 (amido 1,5 e gelatina 1,5 - g/ 100 g sólidos), (e1 e e2) AM1.5AP1.5 (amido 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), (f1 e f2) GL1.5AP1.5 (gelatina 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), (g1 e g2) AM2.0GL0.5AP0.5 (amido 2, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 0,5- g/ 100 g sólidos), (h1 e h2) AM0.5GL2.0AP0.5 (amido 0,5, gelatina 2 e álcool polivinílico 0,5 - g/ 100 g sólidos), (i1 e i2) AM0.5GL0.5AP2.0 (amido 0,5, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 2 - g/ 100 g sólidos), (j1 e j2) AM1.0GL1.0AP1.0 (amido 1, gelatina 1 e álcool polivinílico 1 - g/ 100 g sólidos).

De forma geral, as superfícies dos filmes se apresentaram homogêneas, sem poros ou rachaduras, mostrando eficiência no processo e produção. Pois o tratamento prévio e o processo de produção das formulações (Figura 11) contribuiu para este resultado. Observou-se somente alguns grânulos na superfície que podem indicar possível contaminação por sujidades presentes nas placas de Petri ou durante o preparo das amostras. Segundo Galdeano et al. (2013), uma matriz homogênea é um bom indicativo de integridade estrutural dos filmes e, conseqüentemente, de boas propriedades mecânicas e de permeabilidade.

5.1.7 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Na Figura 18 estão apresentados os espectros de FT-IR dos filmes produzidos neste trabalho. A banda centrada em 3450 cm^{-1} que foi observada para os filmes de amido puro (AM3.0) pode ser atribuída ao estiramento das ligações O-H (MELO et al., 2011), relacionada às ligações de hidrogênio estabelecidas entre as cadeias de amido. No filme produzido com álcool polivinílico puro (AP3.0) aparece uma banda discreta referente ao estiramento das ligações O-H em 3250 cm^{-1} , região também relatada por Han et al. (2009) para filmes de álcool polivinílico.

Os filmes produzidos com as misturas binárias ou ternárias apresentaram uma banda discreta em 3700 cm^{-1} , que pode ser atribuída a grupos O-H e N-H livres e ligados. Os grupamentos O-H no amido, O-H e N-H na gelatina, O-H no glicerol (plastificante) e O-H na água absorvida certamente são capazes de formar ligações de hidrogênio inter e intramoleculares com grupos C=O de parte dos aminoácidos (grupos peptídicos e carbonílicos) na estrutura da gelatina e do álcool polivinílico (SILVERSTEIN; BASSLER.; MORRIL, 1974).

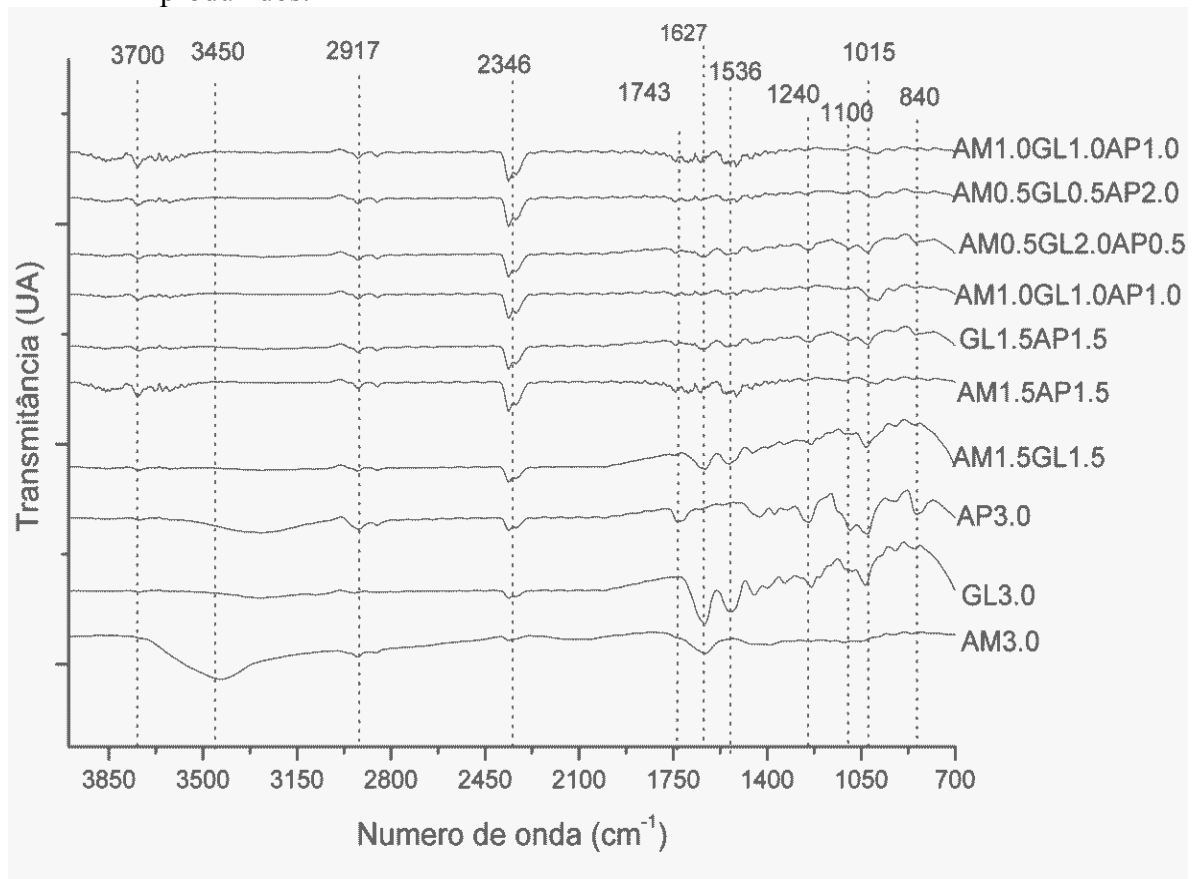
A banda situada em 2917 cm^{-1} se refere aos estiramentos de C-H de estruturas de grupos saturados de CH_2 e CH_3 (HAN et al., 2009) e também está presente em todas as amostras. No filme com álcool polivinílico puro (AP3.0) a banda em 1743 cm^{-1} (Figura 18) pode ser atribuída aos grupamentos carbonila presentes nos resíduos de acetato remanescentes na estrutura do polímero após a sua produção a partir da hidrólise do acetato de polivinila (JAYASEKARA et al., 2004).

No filme com álcool polivinílico puro (AP3.0) aparecem bandas entre 1240 e 1100 cm^{-1} , e estas bandas não aparecem ou aparecem com pequena intensidade nas misturas com o álcool polivinílico (Figura 18). Han et al. (2009) relatam que em filmes de álcool polivinílico

aparecem bandas entre 1200-1100 cm^{-1} , e que estão relacionadas às frações cristalinas do polímero, e que estas bandas podem desaparecer quando se altera a cristalinidade do material.

O filme produzido com a gelatina pura (GL3.0) apresentou bandas relacionadas com o estiramento C=O em 1627 cm^{-1} (amida I) e com deformação angular de N-H em 1530 cm^{-1} (amida II), e ainda, uma banda em aproximadamente 1240 cm^{-1} , que pode ser atribuída ao estiramento C-N e a banda vibracional de N-H (amida III) (BARRETO; PIRES; SOLDI, 2003), e estas bandas apareceram de forma discreta nas misturas binárias e ternárias contendo gelatina (Figura 18).

Figura 18-Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier dos filmes produzidos.



AM3.0 (amido 3 - g/ 100 g sólidos), GL3.0 (gelatina 3- g/ 100 g sólidos), AP3 (álcool polivinílico 3- g/ 100 g sólidos), AM1.5GL1.5 (amido 1,5 e gelatina 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM1.5AP1.5 (amido 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), GL1.5AP1.5 (gelatina 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM2.0GL0.5AP0.5 (amido 2, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 0,5- g/ 100 g sólidos), AM0.5GL2.0AP0.5 (amido 0,5, gelatina 2 e álcool polivinílico 0,5 - g/ 100 g sólidos), AM0.5GL0.5AP2.0 (amido 0,5, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 2 - g/ 100 g sólidos), AM1.0GL1.0AP1.0 (amido 1, gelatina 1 e álcool polivinílico 1 - g/ 100 g sólidos).

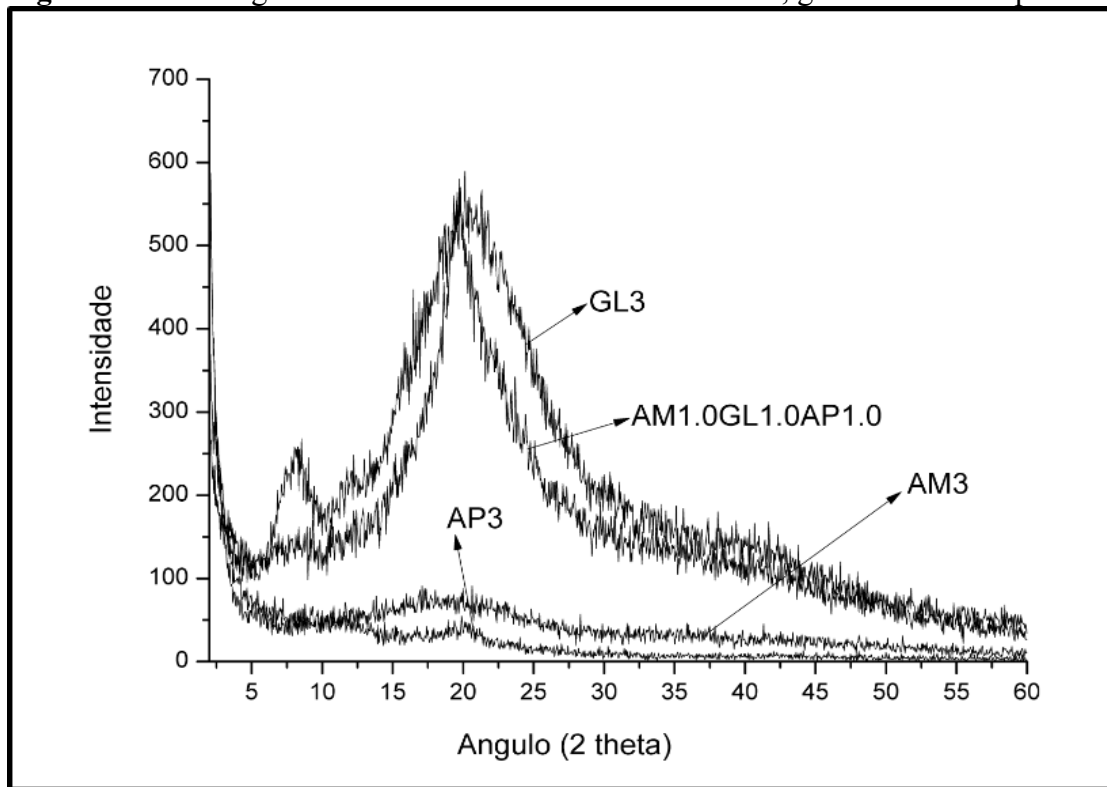
De forma geral, percebe-se que os espectros dos filmes obtidos com os polímeros puros apresentaram as suas respectivas bandas características com maior intensidade que nas misturas binárias e ternárias. De acordo com Han et al. (2009), amido e álcool polivinílico interagem através de ligações de hidrogênio entre grupamentos hidroxila presentes na estrutura dos dois polímeros. Moraes et al. (2008) relataram a capacidade de interação entre a gelatina e o álcool polivinílico. Zhong e Xia (2008) observaram a formação de ligações de hidrogênio entre os grupamentos hidroxila do amido e os grupamentos amínicos das proteínas.

5.1.8 Difração de Raios - X

Os difratogramas dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico incorporados de nanoargila estão apresentados na Figura 19. Foram apresentados apenas os resultados dos filmes puros e da mistura ternária contendo as mesmas proporções entre os três polímeros empregados. Os filmes produzidos com amido puro (AM3.0) e com álcool polivinílico puro (AP3.0) apresentaram um comportamento típico de materiais amorfs (Figura 19). Tanto o amido, quanto o álcool polivinílico, são polímeros semicristalinos, no entanto, o processamento térmico levou à desorganização das regiões cristalinas, gerando matrizes poliméricas amorfas.

O filme produzido com gelatina pura (GL3.0) apresentou dois picos, em $2\theta = 8^\circ$ e 20° (Figura 19). Estes resultados também foram observados por outros autores para filmes de gelatina, Yakimets et al. (2005; 2007) observaram pico em $2\theta=7-8^\circ$, enquanto Bergo e Sobral (2007) e Maria et al. (2008) observaram pico em $2\theta=20^\circ$. Pode-se perceber que na mistura ternária (AM1.0GL1.0AP1.0) apareceu apenas pico em $2\theta=20^\circ$, que foi o pico mais importante no difratograma do filme de gelatina pura.

Figura 19- Difratogramas dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico.



AM3.0 (amido 3 - g/ 100 g sólidos), GL3.0 (gelatina 3- g/ 100 g sólidos), AP3.0 (álcool polivinílico 3- g/ 100 g sólidos), AM1.0GL1.0AP1.0 (amido 1, gelatina 1 e álcool polivinílico 1 - g/ 100 g sólidos).

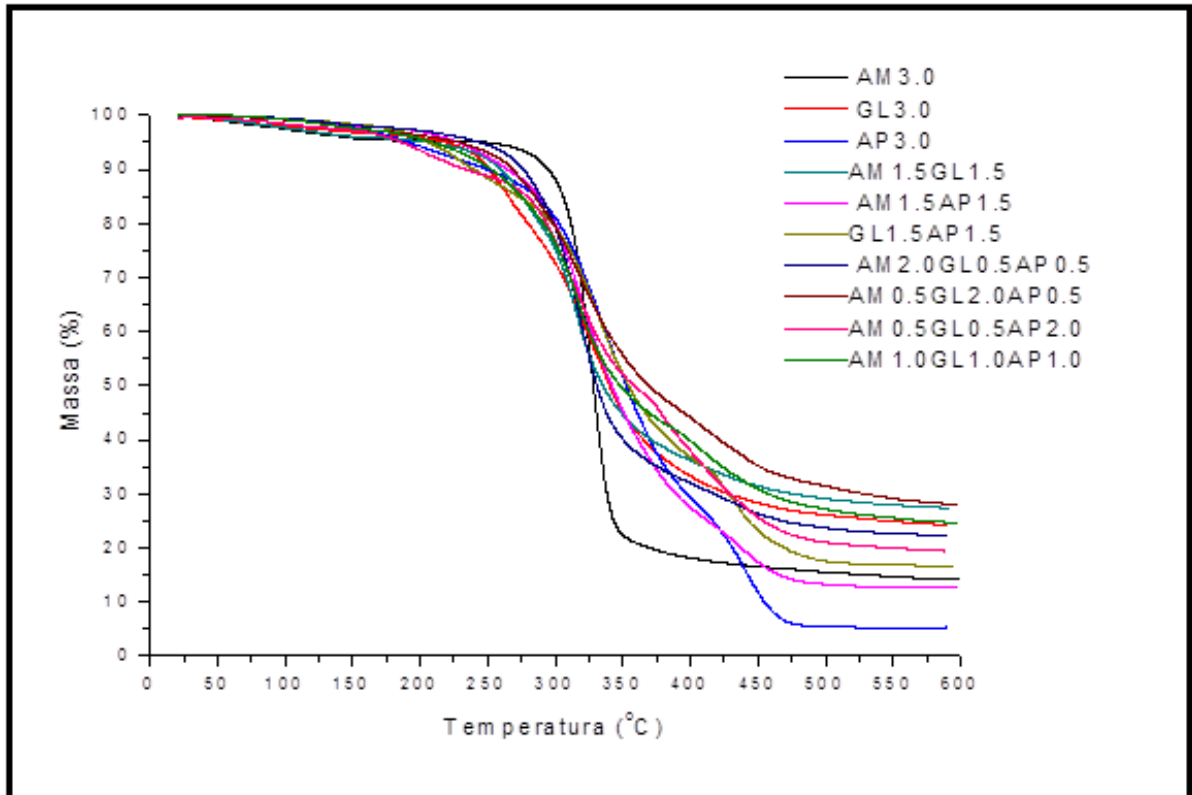
A MMT-Na (Closite[®]-Na) normalmente apresenta picos nos ângulo de $2\theta = 7,1^\circ$, $7,3^\circ$ e $7,96^\circ$ (CYRAS et al., 2008; CHUNG et al., 2010; MAJDZADEH-ARDAKANI et al., 2010; VERCELHEZE, 2011). Pode-se observar (Figura 19), que para todas as formulações produzidas com a nanoargila, não houve a formação de picos característicos próximos de $2\theta = 7,1^\circ$ e nem picos entre $2\theta = 4^\circ$ e $2\theta = 10^\circ$, sugerindo que houve esfoliação das lamelas da nanoargila na matriz polimérica. Provavelmente, o processo de produção das formulações favoreceu a esfoliação, já que os materiais foram homogeneizados e aquecidos separadamente (Figura 11) e após sofre nova homogeneização por mais 30 minutos sob Temperatura de 90°C . Além disso, a nanoargila foi hidratada separadamente por 1 hora antes de adicionada a mistura, ainda, o glicerol foi incorporado nas formulações na etapa final do processo.

Conforme descrito por Chung et al. (2010), quando se adiciona amido, nanoargila e água primeiramente, e se faz a plastificação em seguida, existe uma melhor dispersão das nanoargilas na matriz de amido. Ainda, Chaudhary (2008) descreve que a presença de água no sistema melhora a dispersão das nanoargilas na matriz polimérica.

5.1.9 Análise Termogravimétrica (TGA)

As curvas de TGA dos filmes elaborados com amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico estão apresentadas na Figura 20.

Figura 20 – Curvas de TGA dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico.



AM3.0 (amido 3 - g/ 100 g sólidos), GL3.0 (gelatina 3- g/ 100 g sólidos), AP3 (álcool polivinílico 3- g/ 100 g sólidos), AM1.5GL1.5 (amido 1,5 e gelatina 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM1.5AP1.5 (amido 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), GL1.5AP1.5 (gelatina 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM2.0GL0.5AP0.5 (amido 2, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 0,5- g/ 100 g sólidos), AM0.5GL2.0AP0.5 (amido 0,5, gelatina 2 e álcool polivinílico 0,5 - g/ 100 g sólidos), AM0.5GL0.5AP2.0 (amido 0,5, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 2 - g/ 100 g sólidos), AM1.0GL1.0AP1.0 (amido 1, gelatina 1 e álcool polivinílico 1 - g/ 100 g sólidos).

Os parâmetros de T_{max} (temperatura de degradação na taxa de perda máxima) e T_{90} (temperatura onde a amostra mantém 90% da sua massa residual) obtidos a partir destas curvas estão apresentados na Tabela 09. Todas as amostras apresentaram uma pequena perda de massa próxima de 100°C, o que pode ser explicado pela evaporação da água (Figura 20). O filme de amido puro apresentou T_{max} em 328°C (Tabela 09), e de acordo com Pelissari et al. (2009), a T_{max} de filmes de amido se localiza entre 250 e 350°C, e está relacionada à degradação térmica do amido.

Tabela 09- Resultados de T_{max} e T_{90} dos filmes produzidos neste trabalho.

Formulações	T_{max} (°C)	T_{90} (°C)
AM3.0	328	295
GL3.0	271; 331-348	253
AP3.0	342; 452	245
AM1.5GL1.5	280; 318	254
AM1.5AP1.5	318; 437	265
GL1.5AP1.5	331; 421-441	231
AM2.0GL0.5AP0.5	326	276
AM0.5GL2.0AP0.5	313-324; 403-446	260
AM0.5GL0.5AP2.0	311-335; 384	236
AM1.0GL1.0AP1.0	320; 412	249

AM3 (amido 3 - g/ 100 g sólidos), GL3 (gelatina 3- g/ 100 g sólidos), AP3 (álcool polivinílico 3- g/ 100 g sólidos), AM1.5GL1.5 (amido 1,5 e gelatina 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM1.5AP1.5 (amido 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), GL1.5AP1.5 (gelatina 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM2.0GL0.5AP0.5 (amido 2, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 0,5- g/ 100 g sólidos), AM0.5GL2.0AP0.5 (amido 0,5, gelatina 2 e álcool polivinílico 0,5 - g/ 100 g sólidos), AM0.5GL0.5AP2.0 (amido 0,5, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 2 - g/ 100 g sólidos), AM1.0GL1.0AP1.0 (amido 1, gelatina 1 e álcool polivinílico 1 - g/ 100 g sólidos).

Os filmes de gelatina pura (GL3.0) apresentaram perda de massa em duas regiões (271 °C e 331-348 °C) e, os filmes de álcool polivinílico puro (AP3.0) em 342 e 452 °C (Tabela 09), resultados estes que estão de acordo com os relatados por Chen et al. (2008), que observaram perda de massa entre 250 - 320 °C em filmes de gelatina, que foi associada à degradação térmica da gelatina, e perda de massa entre 200 - 300 °C, associada à degradação térmica do polímero, e entre 400 - 450 °C, relacionada à geração de co-produtos da degradação térmica do álcool polivinílico.

Todas as misturas binárias e ternárias apresentaram mais de uma região de perda de massa, em valores de temperatura intermediários aos observados para os filmes obtidos com os polímeros puros, exceto para a mistura ternária AM2.0GL0.5AP0.5 (Tabela 09), com maior proporção de amido, que apresentou uma única temperatura de máxima degradação, próxima da temperatura do filme de amido puro.

Observando-se os resultados da Tabela 09, pode-se perceber que entre os filmes produzidos com os polímeros puros, o maior valor de T_{90} foi observado para o filme de amido (AM3.0), indicativo de maior estabilidade térmica, e que os filmes produzidos com gelatina pura (GL3.0) e álcool polivinílico puro (AP3.0) apresentaram valores menores. Os filmes produzidos com a mistura binária de gelatina e álcool polivinílico (GL1.5AP1.5) e com a mistura ternária contendo uma baixa concentração de amido (AM0.5GL2.0AP0.5) apresentaram os menores valores de T_{90} . Todas as outras misturas ficaram com valores intermediários para este parâmetro.

5.1.10 Propriedades Mecânicas

Os resultados da resistência máxima à tração dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10-Resistência máxima à tração (RMT) dos filmes produzidos.

Formulação	RMT (MPa) (UR 60 %)
AM3.0	16,73 ± 6,76 ^{ab}
GL3.0	9,50 ± 2,85 ^b
AP3.0	10,94 ± 3,03 ^b
AM1.5GL1.5	9,57 ± 1,83 ^b
AM1.5AP1.5	8,20 ± 1,34 ^b
GL1.5AP1.5	13,43 ± 3,18 ^{ab}
AM2.0GL0.5AP0.5	13,55 ± 2,62 ^b
AM0.5GL2.0AP0.5	17,48 ± 1,95 ^a
AM0.5GL0.5AP2.0	10,71 ± 1,42 ^b
AM1.0GL1.0AP1.0	13,47 ± 1,26 ^b

Média ± desvio padrão. Letras diferentes significam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias (teste de Tukey). AM3.0 (amido 3 - g/ 100 g sólidos), GL3.0 (gelatina 3- g/ 100 g sólidos), AP3.0 (álcool polivinílico 3- g/ 100 g sólidos), AM1.5GL1.5 (amido 1,5 e gelatina 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM1.5AP1.5 (amido 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), GL1.5AP1.5 (gelatina 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM2.0GL0.5AP0.5 (amido 2, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 0,5- g/ 100 g sólidos), AM0.5GL2.0AP0.5 (amido 0,5, gelatina 2 e álcool polivinílico 0,5 - g/ 100 g sólidos), AM0.5GL0.5AP2.0 (amido 0,5, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 2 - g/ 100 g sólidos), AM1.0GL1.0AP1.0 (amido 1, gelatina 1 e álcool polivinílico 1 - g/ 100 g sólidos).

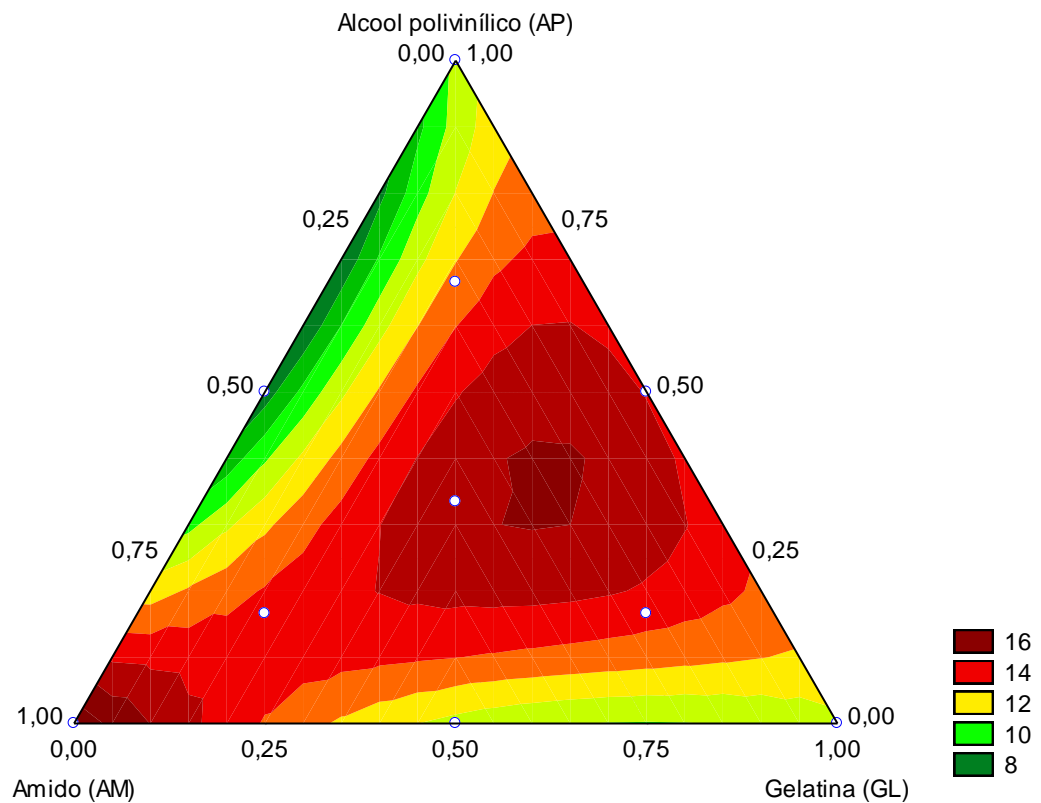
O modelo gerado a partir dos dados experimentais (Equação 10) não foi significativo ($p = 0,6738$) e apresentou um valor de R^2 baixo (0,7300), no entanto, foi indicativo das tendências de resposta da RMT em função das variações dos componentes nas formulações dos filmes.

$$\text{RMT} = 16,65X_1^{**} + 10,68X_2^{**} + 10,27X_3^{**} - 11,96X_1X_2 - 24,03X_1X_3 + 13,85X_2X_3 + 126,95X_1X_2X_3 \text{ (Equação 10)}$$

(** $p \leq 0,05$)

Os efeitos lineares das três variáveis independentes foram positivos e significativos para a RMT, mas o efeito da variável X_1 (amido) foi mais importante. Pode-se perceber uma tendência de máxima resposta nas formulações com maiores concentrações de amido e nas misturas entre amido e gelatina (Figura 21).

Figura 21- Gráfico de contorno para os resultados de resistência máxima à tração (RMT) dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico



Como os dados experimentais não se ajustaram ao modelo, foi feita também uma análise de comparação de médias (teste de Tukey, $p \leq 0,05$) para comparação dos resultados das diferentes formulações. Pode-se perceber que as formulações AM3.0 (formulada apenas com amido) e AM0.5GL2.0AP0.5 (mistura ternária) apresentaram valores de RMT significativamente maiores que as outras formulações, que apresentaram valores entre 8,20 e 13,55 MPa, mas que em função do elevado desvio-padrão não foram significativamente diferentes entre si (Tabela 10).

Os valores de resistência a tração encontrados neste trabalho foram menores que os encontrados por Fakhouri et al. (2007), trabalhando com filmes de gelatina e amido de trigo 104,62, e gelatina e amido de arroz 101,60 MPa. Próximos aos de Galdeano et al. (2008) 15 MPa elaborados com amido de aveia e glicerol.

No trabalho desenvolvido por Faria, Vercelheze e Mali (2012), a resistência máxima à tração dos filmes foi afetada pela adição de nanoargilas, que levaram ao aumento da RMT de 58 para a formulação elaborada com amido e álcool polivinílico para 269 MPa para os filmes elaborados com amido, álcool polivinílico e nanoargila.

As propriedades mecânicas de filmes dependem das interações entre os materiais empregados, ou seja, da força e do número de ligação intermoleculares entre as cadeias. Para manter a integridade do filme e sua propriedade de barreira em resistir ao estresse normal encontrado durante a aplicação é necessário alta resistência e valores de deformação ajustados (HENRIQUE, 2002). Os revestimentos devem apresentar boas propriedades de ruptura para adaptar-se as eventuais deformação relacionadas com sua aplicação (VICENTINI, 2003).

5.2 RESULTADOS DAS ANÁLISES REALIZADAS NAS SEMENTES DE MILHO

5.2.1 Análise Subjetiva

Os resultados de homogeneidade, continuidade e manuseabilidade nas sementes de milho após processo de revestimentos estão demonstrados na Tabela 11.

De forma geral, o processo de revestimento estabelecido neste estudo foi eficiente, pois as sementes revestidas apresentaram-se contínuas, ou seja, totalmente recobertas com a matriz polimérica após secagem. Contudo, as sementes revestidas com amido e álcool polivinílico (AM1.5AP1.5) foram classificadas como deficientes quanto a continuidade pois apresentou em sua superfície zonas sem revestimentos (Tabela 11). Este resultado está coerente com o teste de adesão realizados nas sementes revestidas (Figura 22). Segundo

Baudet e Peres (2004), o recobrimento de sementes consiste na deposição de uma camada fina e uniforme de uma matriz polimérica com adição ou não de um tratamento químico ou biológico na superfície da semente e, para que se tenha o resultado esperado, o polímero deverá recobrir toda a semente.

Para a avaliação da manuseabilidade as sementes de milho revestidas com as respectivas formulações foram manipuladas manualmente (uma média de 20 g de milho revestido foi atritada entre as palmas das mãos), neste parâmetro as amostras AM3.0 e AM1.5AP1.5 foram classificadas como boa e deficiente, respectivamente. Estas amostras quando manipuladas liberavam pequenos fragmentos de revestimentos, expondo a semente nua. As demais amostras se apresentaram com boa manuseabilidade (Tabela 11).

Tabela 11 - Análise subjetiva das sementes de milho revestidas.

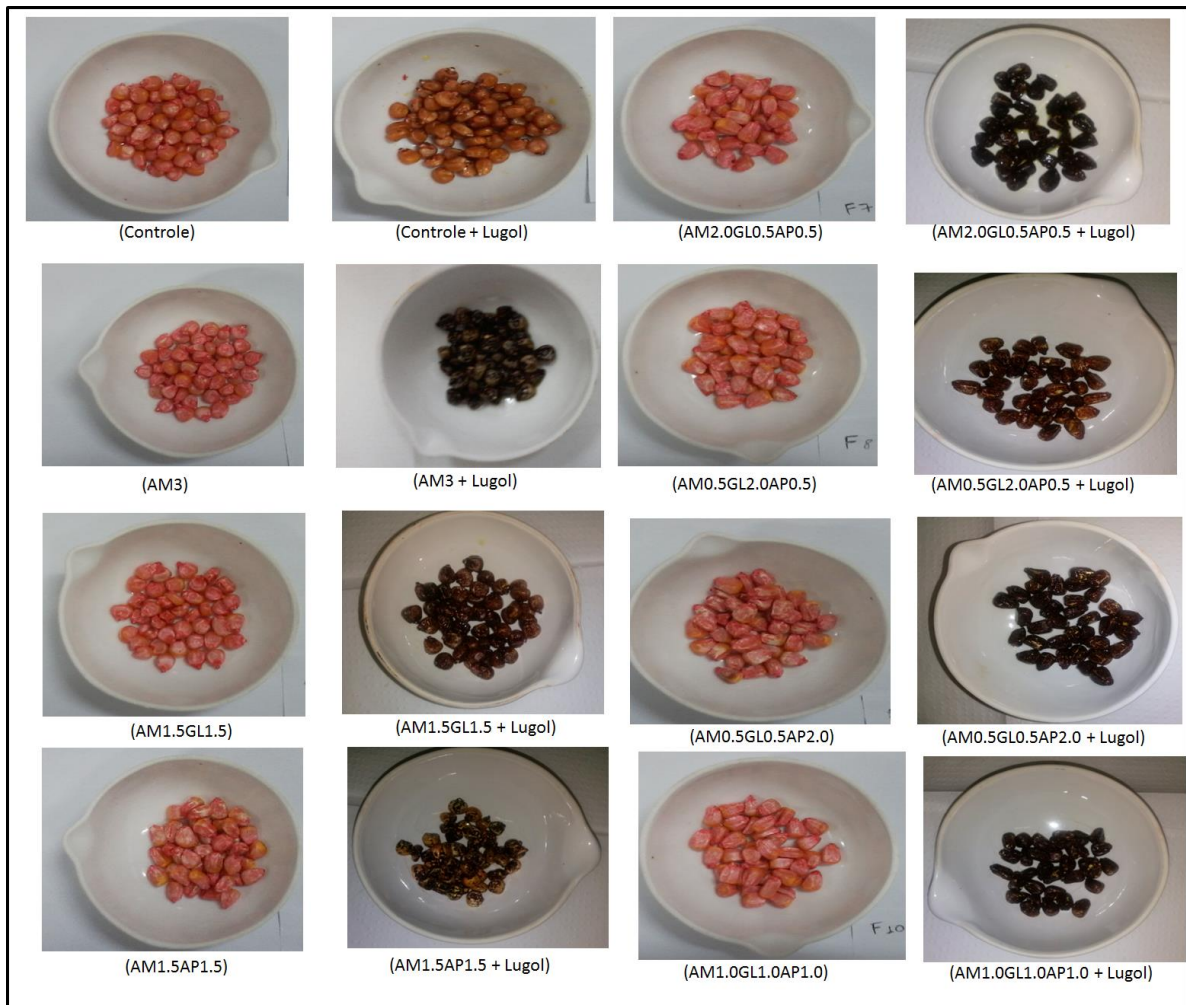
Semente de Milho Revestidas	Continuidade	Homogeneidade	Manuseabilidade
AM3.0	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ●
GL3.0	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●
AP3.0	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●
AM1.5GL1.5	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●
AM1.5AP1.5	● ●	● ● ● ●	● ●
GL1.5AP1.5	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●
AM2.0GL0.5AP0.5	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●
AM0.5GL2.0AP0.5	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●
AM0.5GL0.5AP2.0	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●
AM1.0GL1.0AP1.0	● ● ● ●	● ● ● ●	● ● ● ●

AM3.0 (amido 3 - g/ 100 g sólidos), GL3.0 (gelatina 3- g/ 100 g sólidos), AP3.0 (álcool polivinílico 3- g/ 100 g sólidos), AM1.5GL1.5 (amido 1,5 e gelatina 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM1.5AP1.5 (amido 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), GL1.5AP1.5 (gelatina 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM2.0GL0.5AP0.5 (amido 2, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 0,5- g/ 100 g sólidos), AM0.5GL2.0AP0.5 (amido 0,5, gelatina 2 e álcool polivinílico 0,5 - g/ 100 g sólidos), AM0.5GL0.5AP2.0 (amido 0,5, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 2 - g/ 100 g sólidos), AM1.0GL1.0AP1.0 (amido 1, gelatina 1 e álcool polivinílico 1 - g/ 100 g sólidos). Padrão empregado: ● ● ● ● excelente ● ● ● bom ● ● deficiente.

5.2.2 Adesão dos Revestimentos

O resultado do teste de adesão realizados nas sementes de milho com e sem revestimentos estão apresentados na Figura 22. Moléculas de alto peso molecular (como a amilose e a amilopectina) podem sofrer reações de complexação com o iodo, com formação de compostos coloridos (BOBBIO; BOBBIO, 1995). Desta forma, conforme observado na Figura 22, foi possível confirmar que somente a amostra AM1.5AP1.5 não teve sua superfície totalmente recoberta, ou seja, não apresentou mudança total de coloração. De acordo com Pinheiro et al. (2010), os revestimentos deverão molhar e espalhar-se uniformemente na superfície do material.

Figura 22 - Resultado do teste de adesão nas sementes de milho com e sem revestimento contendo amido em sua formulação.



Controle – semente sem revestimento; AM3.0 (amido 3 - g/ 100 g sólidos), AM1.5GL1.5 (amido 1,5 e gelatina 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM1.5AP1.5 (amido 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM2.0GL0.5AP0.5 (amido 2, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 0,5- g/ 100 g sólidos), AM0.5GL2.0AP0.5 (amido 0,5, gelatina 2 e álcool polivinílico 0,5 - g/ 100 g sólidos), AM0.5GL0.5AP2.0 (amido 0,5, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 2 - g/ 100 g sólidos), AM1.0GL1.0AP1.0 (amido 1, gelatina 1 e álcool polivinílico 1 - g/ 100 g sólidos).

Ainda, devido as formulações desenvolvidas terem diferentes concentrações de amido em sua composição foi possível observar que nas amostras com maior concentração de amido AM3.0 e AM2.0GL0.5AP0.5 a alteração na cor após imersão na solução de lugol foi mais evidente quando comparadas a amostra Controle (semente sem revestimento) (Figura 22).

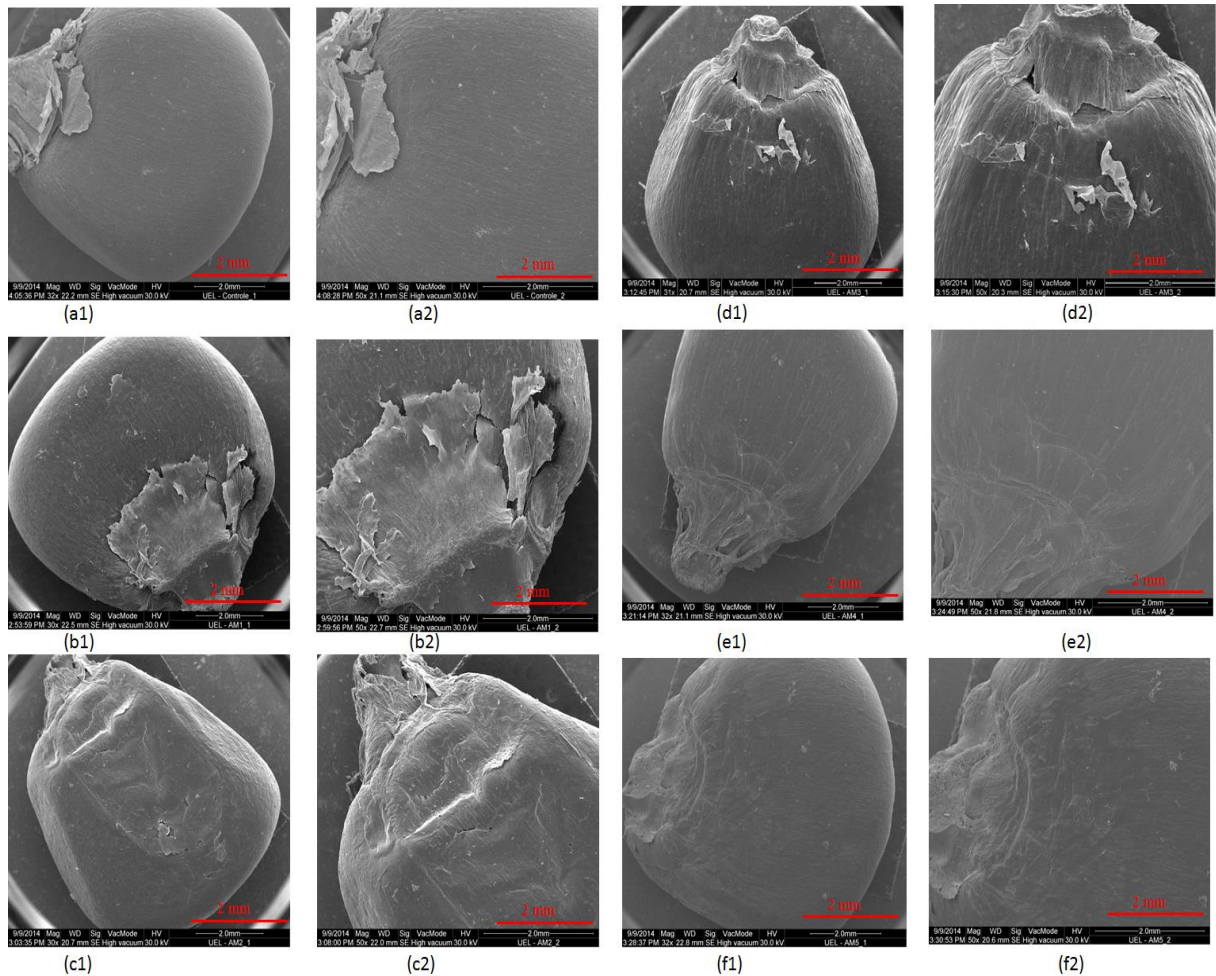
5.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Nas Figuras 23, 24 e 25 estão apresentadas as micrografias da superfície das sementes de milho com e sem revestimento, respectivamente. Na semente de milho sem revestimento (controle – Figura 23 a1 e a2) é possível observar uma superfície lisa e sem rugosidades, e se espera que estas características sejam preservadas após a aplicação do revestimento, para que não seja afetado o desempenho das semeadoras pela dificuldade em movimentar as sementes no depósito e também nos sistemas distribuidores, e a densidade de plantio (MANTOVANI et al., 1999).

De acordo com Silva e Nakagawa (1998), a integridade física do revestimento é uma propriedade importante. Após o processo de secagem, o revestimento não deve se desmanchar ou quebrar durante o transporte, manuseio e semeadura mecanizada. Na Figura 23 b1, c1, d1, e na Figura 24 h1 é possível observar pequenas rachaduras no revestimento nas superfícies das sementes, estas características não desejadas podem estar relacionadas com o processo de revestimento da semente, secagem e/ou manuseio. Contudo, vale ressaltar, que este comportamento não foi observado na análises subjetivas visuais e no teste de adesão.

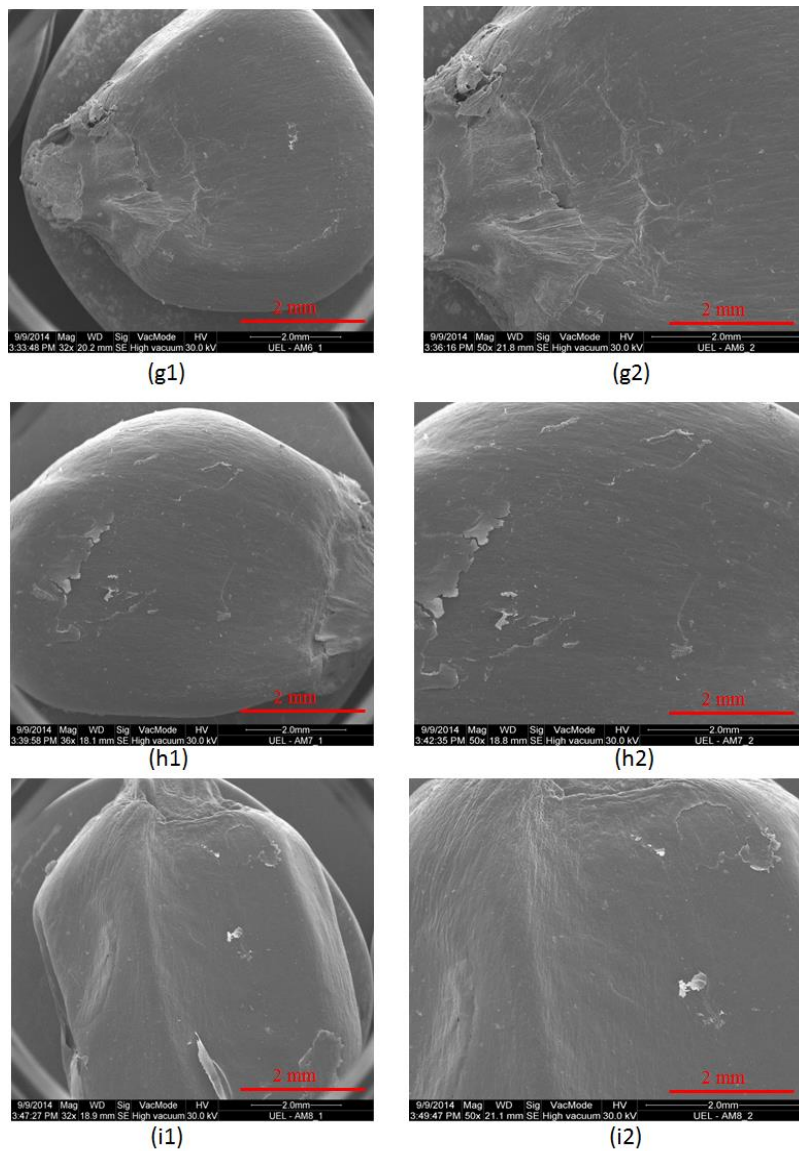
Entre todas as formulações testadas, a formulação AM1.5GL1.5 (Figura 23 e1 e e2) apresentou as melhores características de recobrimento, pois é possível observar uma superfície totalmente recoberta, lisa, sem rugosidade e pontos quebradiços. De forma geral, pode-se perceber que as formulações dos revestimentos formaram uma camada uniforme sobre as sementes de milho (Figuras 23, 24 e 25), exceto a formulação AM1.5AP1.5 (Figura 23 f1 e f2), que também não apresentou bons resultados no teste de adesão do revestimento (Figura 22) e na análise subjetiva foi classificada como deficiente quanto a continuidade por apresentar em sua superfície zonas sem revestimentos (Tabela 11).

Figura 23 - Microscopia eletrônica de varredura das sementes de milho revestidas com as formulações AM3.0, GL3.0, AP3.0, AM1.5GL1.5 e AM1.5AP1.5.



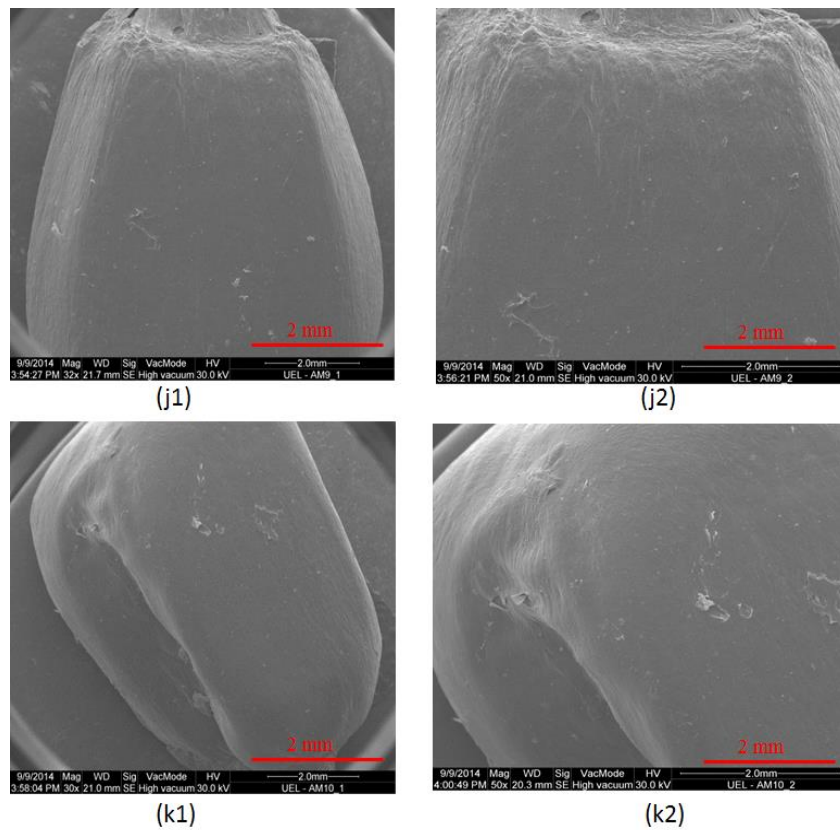
Aumento 32 X e 50 X Respectivamente – Semente sem revestimento (a1 e a2); Aumento 32 X e 50 X Respectivamente - AM3.0 (amido 3 - g/ 100 g sólidos) (b1 e b2); Aumento 30 X e 50 X Respectivamente-GL3.0 (gelatina 3- g/ 100 g sólidos) (c1 e c2); Aumento 31 X e 50 X Respectivamente - AP3.0 (álcool polivinílico 3- g/ 100 g sólidos) (d1 e d2); Aumento 32 X e 50 X Respectivamente - AM1.5GL1.5 (amido 1,5 e gelatina 1,5 - g/ 100 g sólidos) (e1 e e2); Aumento 32 X e 50 X Respectivamente - AM1.5AP1.5 (amido 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos) (f1 e f2).

Figura 24 - Microscopia eletrônica de varredura das sementes de milho revestidas com as formulações GL1.5AP1.5, AM2.0GL0.5AP0.5 e AM0.5GL2.0AP0.5.



Aumento 32 X e 50 X Respectivamente – GL1.5AP1.5 (gelatina 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos) (g1 e g2); Aumento 36 X e 50 X Respectivamente – AM2.0GL0.5AP0.5 (amido 2, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 0,5- g/ 100 g sólidos) (h1 e h2); Aumento 32 X e 50 X Respectivamente – AM0.5GL2.0AP0.5 (amido 0,5, gelatina 2 e álcool polivinílico 0,5 - g/ 100 g sólidos) (i1 e i2).

Figura 25 - Microscopia eletrônica de varredura das sementes de milho revestidas com as formulações AM0.5GL0.5AP2.0 e AM1.0GL1.0AP1.0.



Aumento 32 X e 50 X Respectivamente – AM0.5GL0.5AP2.0 (amido 0,5, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 2 - g/ 100 g sólidos) (j1 e j2); Aumento 30 X e 50 X Respectivamente – AM1.0GL1.0AP1.0 (amido 1, gelatina 1 e álcool polivinílico 1 - g/ 100 g sólidos) (k1 e k2).

5.2.4 Densidade, Distribuição de Massa e Teor de Água

Os resultados de densidade, distribuição de massa e teor de água nas sementes de milho com e sem revestimentos estão apresentados na Tabela 12. Como estes resultados foram empregados apenas para caracterizar as sementes e verificar a reprodutibilidade do processo de aplicação dos revestimentos, não foi feita análise estatística de superfície de resposta, apenas teste de comparação de médias (Teste de Tukey, $p \leq 0,05$) entre as amostras.

Tabela 12- Densidade, distribuição de massa e teor de água nas sementes de milho com e sem revestimentos.

Sementes de Milho	Densidade (g/cm ³)	Distribuição de massa (g)	Teor de água %
Controle	0,741 ± 0,012 ^a	0,211 ± 0,025 ^d	15,44 ± 0,264 ^b
AM3.0	0,701 ± 0,019 ^{ab}	0,210 ± 0,018 ^d	12,53 ± 1,101 ^d
GL3.0	0,693 ± 0,022 ^{ab}	0,222 ± 0,031 ^b	14,80 ± 0,175 ^b
AP3.0	0,674 ± 0,020 ^{bc}	0,219 ± 0,021 ^b	14,94 ± 0,278 ^b
AM1.5GL1.5	0,704 ± 0,019 ^{ab}	0,217 ± 0,019 ^b	13,23 ± 0,340 ^d
AM1.5AP1.5	0,683 ± 0,021 ^{bc}	0,214 ± 0,026 ^{bc}	18,01 ± 0,750 ^a
GL1.5AP1.5	0,681 ± 0,02 ^{bc}	0,213 ± 0,032 ^c	14,73 ± 0,275 ^d
AM2.0GL0.5AP0.5	0,670 ± 0,02 ^{bc}	0,299 ± 0,028 ^a	16,59 ± 0,313 ^b
AM0.5GL2.0AP0.5	0,654 ± 0,008 ^{cd}	0,294 ± 0,049 ^a	19,29 ± 0,641 ^a
AM0.5GL0.5AP2.0	0,659 ± 0,026 ^{cd}	0,300 ± 0,016 ^a	16,42 ± 0,511 ^b
AM1.0GL1.0AP1.0	0,653 ± 0,013 ^{cd}	0,300 ± 0,042 ^a	18,05 ± 0,628 ^a

Média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna significam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias (teste de Tukey). Controle (semente sem revestimento), AM3.0 (amido 3 - g/ 100 g sólidos), GL3.0 (gelatina 3- g/ 100 g sólidos), AP3.0 (álcool polivinílico 3- g/ 100 g sólidos), AM1.5GL1.5 (amido 1,5 e gelatina 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM1.5AP1.5 (amido 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), GL1.5AP1.5 (gelatina 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM2.0GL0.5AP0.5 (amido 2, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 0,5- g/ 100 g sólidos), AM0.5GL2.0AP0.5 (amido 0,5, gelatina 2 e álcool polivinílico 0,5 - g/ 100 g sólidos), AM0.5GL0.5AP2.0 (amido 0,5, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 2 - g/ 100 g sólidos), AM1.0GL1.0AP1.0 (amido 1, gelatina 1 e álcool polivinílico 1 - g/ 100 g sólidos).

A massa média da semente controle (sem revestimento) foi de 0,211 g e a massa média das sementes revestidas variou entre 0,210 e 0,300 g (Tabela 12), está característica pode ser atribuída a não uniformidade das sementes de milho encontradas no mercado (PEREIRA FILHO; CRUZ; GAMA, 2002), em uma mesma espiga de milho, ocorrem sementes de diferentes tamanhos e formas (VAUGHAN et al., 1976).

As sementes de milho são classificadas durante o beneficiamento quanto à forma e ao tamanho para padronizar e facilitar a semeadura (VON PINHO et al., 1995). Diante disso, a adequada distribuição das sementes influencia diretamente na produtividade das culturas (MARTINELLI-SENEME et al., 2000). Assim, é desejável que as sementes de milho tenham uma uniformidade quanto ao tamanho, massa e forma, visando facilitar a semeadura e aumentar os rendimentos de produção (AGUILERA et al., 2000). Deste modo, o emprego de

revestimento para aplicação em sementes pode ser uma alternativa para garantir esta uniformidade. Os revestimentos elaborados nesse trabalho não foram aplicados com o objetivo de mudar a forma das sementes, contudo, com a variação dos resultados encontrados (Tabela 12) faz-se necessário uma adequação na metodologia buscando melhorar estas características.

A densidade das sementes sem revestimentos foi de $0,741 \text{ g/cm}^3$ e das sementes revestidas variou de $0,653$ a $0,704 \text{ g/cm}^3$ e, de forma geral é possível observar que as soluções de revestimento empregadas não afetaram os parâmetros de densidade das sementes (Tabela 12). Materiais com densidades mais altas são empregados por máquinas semeadoras com alta velocidade de plantação, evitando que as sementes recobertas quiquem ao caírem no solo, enquanto que as sementes recobertas de densidades intermediárias podem ser utilizadas por semeadoras mais lentas (COSTA, 2003).

O teor máximo de umidade de sementes de milho recomendado para armazenagem é de 13 % conforme a Instrução Normativa MAPA N° 29/11. O teor de água das sementes pode interferir na maturação das sementes, no armazenamento e, teste de germinação, ou seja, influencia diretamente na sua qualidade fisiológica, por isso a sua determinação é fundamental. Também está diretamente ligada ao período ideal de colheita, a massa e a suscetibilidade a injúrias, congelamento, danos mecânicos e contaminação microbiológica (GRABE, 1989). Conforme observado na Tabela 12, o teor de água das sementes de milho sem revestimento foi de 15,44 % e das sementes revestidas com maior teor de água variou de 14,73 % para a amostra GL1.5AP1.5 e 19,29 % para amostra AM0.5GL2.0AP0.5, resultados superiores ao recomendado. Somente as amostras AM3.0 e AM1.5GL1.5 apresentaram valores adequados de teor de umidade, 12,53 e 13,23 %, respectivamente. Contudo, é possível constatar que os revestimentos empregados não contribuíram para o aumento da umidade nas sementes de milho, uma vez que as sementes controle também apresentaram elevada porcentagem de umidade (Tabela 12).

5.2.5 Testes de Germinação das Sementes

Os resultados dos ensaios de germinação das sementes de milho 2B5874X da Dow AgroSciences e, P30F53H da Dupont com e sem revestimento estão apresentados na Tabela 13 e 14 respectivamente. De forma geral, quando se compara os dados de germinação das sementes sem revestimento (Controle) e com revestimento, observa-se que a aplicação dos revestimentos não levou ao decréscimo da germinação para os dois tipos de genótipos

empregados (Tabelas 13 e 14), mas que os menores valores foram observados para as sementes revestidas com as misturas ternárias dos polímeros.

Tabela 13- Ensaio de germinação das sementes de milho (2B5874X da Dow AgroSciences) com e sem revestimento.

Formulação	Germinação %	Germinação %
	(4 dias)	(7 dias)
Controle	87 ± 7 ^a	86 ± 6 ^{ab}
AM3.0	83 ± 11 ^{ab}	90 ± 2 ^a
GL3.0	89 ± 7 ^a	90 ± 2 ^a
AP3.0	85 ± 10 ^{ab}	89 ± 1 ^{ab}
AM1.5GL1.5	84 ± 6 ^{ab}	91 ± 1 ^a
AM1.5AP1.5	78 ± 6 ^b	81 ± 6 ^b
GL1.5AP1.5	85 ± 7 ^{ab}	85 ± 8 ^{ab}
AM2.0GL0.5AP0.5	76 ± 3 ^b	85 ± 8 ^{ab}
AM0.5GL2.0AP0.5	85 ± 6 ^a	82 ± 2 ^b
AM0.5GL0.5AP2.0	87 ± 6 ^a	88 ± 4 ^{ab}
AM1.0GL1.0AP1.0	82 ± 5 ^b	82 ± 5 ^b

Média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna significam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias (teste de Tukey). Controle (semente sem revestimento), AM3.0 (amido 3 - g/ 100 g sólidos), GL3.0 (gelatina 3- g/ 100 g sólidos), AP3.0 (álcool polivinílico 3- g/ 100 g sólidos), AM1.5GL1.5 (amido 1,5 e gelatina 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM1.5AP1.5 (amido 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), GL1.5AP1.5 (gelatina 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM2.0GL0.5AP0.5 (amido 2, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 0,5- g/ 100 g sólidos), AM0.5GL2.0AP0.5 (amido 0,5, gelatina 2 e álcool polivinílico 0,5 - g/ 100 g sólidos), AM0.5GL0.5AP2.0 (amido 0,5, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 2 - g/ 100 g sólidos), AM1.0GL1.0AP1.0 (amido 1, gelatina 1 e álcool polivinílico 1 - g/ 100 g sólidos).

Tabela 14- Ensaio de germinação das sementes de milho (P30F53H da Dupont) com e sem revestimento.

Formulação	Germinação %	Germinação %
	(4 dias)	(7 dias)
Controle	87 ± 2 ^a	88 ± 8 ^a
AM3.0	89 ± 2 ^a	89 ± 2 ^a
GL3.0	82 ± 8 ^{ab}	82 ± 8 ^{ab}
AP3.0	86 ± 3 ^a	87 ± 4 ^a
AM1.5GL1.5	84 ± 5 ^{ab}	87 ± 4 ^a
AM1.5AP1.5	81 ± 7 ^{ab}	80 ± 6 ^b
GL1.5AP1.5	82 ± 7 ^{ab}	80 ± 7 ^b
AM2.0GL0.5AP0.5	85 ± 6 ^{ab}	84 ± 6 ^b
AM0.5GL2.0AP0.5	70 ± 4 ^b	71 ± 3 ^c
AM0.5GL0.5AP2.0	69 ± 4 ^b	65 ± 2 ^d
AM1.0GL1.0AP1.0	86 ± 3 ^a	86 ± 3 ^a

Média ± desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna significam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias (teste de Tukey). Controle (semente sem revestimento), AM3.0 (amido 3 - g/ 100 g sólidos), GL3.0 (gelatina 3- g/ 100 g sólidos), AP3.0 (álcool polivinílico 3- g/ 100 g sólidos), AM1.5GL1.5 (amido 1,5 e gelatina 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM1.5AP1.5 (amido 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), GL1.5AP1.5 (gelatina 1,5 e álcool polivinílico 1,5 - g/ 100 g sólidos), AM2.0GL0.5AP0.5 (amido 2, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 0,5- g/ 100 g sólidos), AM0.5GL2.0AP0.5 (amido 0,5, gelatina 2 e álcool polivinílico 0,5 - g/ 100 g sólidos), AM0.5GL0.5AP2.0 (amido 0,5, gelatina 0,5 e álcool polivinílico 2 - g/ 100 g sólidos), AM1.0GL1.0AP1.0 (amido 1, gelatina 1 e álcool polivinílico 1 - g/ 100 g sólidos).

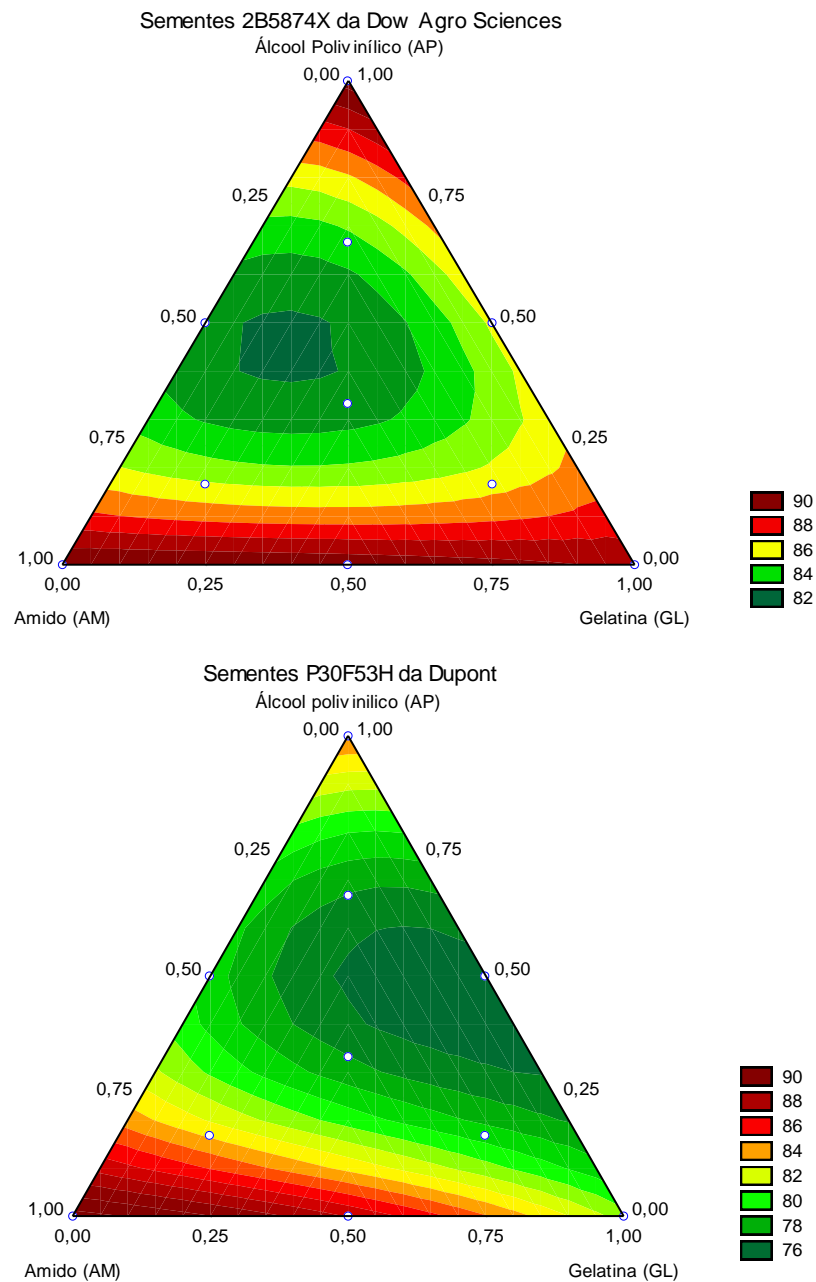
Os modelos matemáticos obtidos para a germinação dos dois diferentes genótipos de sementes estão apresentados nas Equações 11 e 12. Nenhum dos modelos foi significativo em nível de 5 % de significância, e os valores do coeficiente de determinação (R^2) foram de 0,70 para sementes da Dow AgroSciences ($p=0,4924$) e de 0,40 para as sementes Dupont ($p=0,8819$), e mesmo os modelos não se ajustando aos dados experimentais, estes foram empregados para o estudo da tendência de resposta da germinação em função das diferentes formulações de revestimento aplicadas às sementes. Para os dois genótipos de sementes (Equações 11 e 12), a germinação apresentou as mesmas tendências de respostas, com os efeitos lineares das variáveis X_1 , X_2 e X_3 positivos e significativos, e com valores muito próximos, tendo efeitos positivo também na interação X_1X_2 (Figura 26).

$$\text{Germinação (Dow AgroSciences)} = 89,95X_1^{**} + 88,77X_2^{**} + 90,40X_3^{**} + 1,45X_1X_2 - 31,27X_1X_3 - 17,64X_2X_3 - 55,06X_1X_2X_3 \text{ (Equação 11)}$$

$$\text{Germinação (DuPont)} = 90,41X_1^{**} + 80,50X_2^{**} + 84,05X_3^{**} + 5,83X_1X_2 - 35,07X_1X_3 - 26,88X_2X_3 - 49,76X_1X_2X_3 \text{ (Equação 12)}$$

(**p ≤ 0,05)

Figura 26- Gráfico de contorno para os resultados de germinação dos filmes de amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico



Normalmente a qualidade fisiológica das sementes é avaliada pelo teste de germinação, e para a obtenção de rendimentos de germinação elevados é imprescindível o uso correto de sementes de alta qualidade, que pode ser expressa por características como a pureza física, genética, qualidade sanitária e fisiológica. (MARCOS FILHO, 2005).

De acordo com os resultados de germinação expresso nas Tabelas 13 e 14 é possível verificar que, no geral, as formulações empregadas como revestimentos nas sementes de milho não interferiram no processo de germinação. Ao contrário, as formulações AM3.0, GL3.0, AP3.0 e AM1.5GL1.5 favoreceram o processo de germinação, com porcentagens de germinação de 90, 90, 89 e 91 %, respectivamente, quando comparadas com a amostra Controle que apresentou porcentagem de 86 % para o genótipo 2B5874X da Dow AgroSciences (Tabela 13). Resultados semelhantes foram encontrados para os genótipos de milho P30F53H da Dupont (Tabela 14). Estes resultados podem ser atribuídos às características destes revestimentos. Polímeros hidrofílicos absorvem água facilmente e, quando aplicados à semente, absorvem a água disponível ao redor do local de semeadura, formando um reservatório para a semente (PRADELLA et al., 1989), e neste trabalho, as formulações com melhor tendência de resultados de germinação foram as que apresentaram a maior capacidade de absorção de água.

Contudo, para o genótipo 2B5874X da Dow AgroSciences as formulações AM1.5AP1.5, AM0.5GL2.0AP0.5 e AM1.0GL1.0AP1.0 (Tabela 13) e para o genótipo P30F53H da Dupont as formulações AM1.5AP1.5, GL1.5AP1.5, AM0.5GL2.0AP0.5 e AM0.5GL0.5AP2.0 (Tabela 14) influenciaram negativamente a germinação das sementes, este parâmetro pode ser atribuído à deficiência no suprimento de água para as sementes, devido à barreira formada pelo revestimento. Vale ressaltar que o milho é uma cultura muito exigente em água (CRUZ et al., 2010), sendo a água muito importante durante todo o ciclo de vida da planta (PIANA et al., 1994), exercendo grande influência sobre o processo de germinação (CARVALHO; NAKAGAWA, 1983). Desta forma, pode-se dizer que as formulações que influenciaram de forma negativa no processo de germinação podem ter impedido o acesso da semente a água. Isso pode estar relacionado com a interação molecular entre os componentes destas formulações, pois as mesmas apresentaram os menores valores de solubilidade, capacidade de absorção e permeabilidade ao vapor de água.

No trabalho realizado por Silva (1997) com sementes de alface, foram empregados diferentes materiais de enchimento como areia fina e grossa, calcário fino e grosso, xaxim, serragem de pinho e de eucalipto e, como adesivo, foram usadas diversas colas à base de acetato de polivinila, croscarmelose e goma arábica. O autor observou um atraso na

germinação quando se empregou materiais com granulometria muito fina, isso foi atribuído à alta capacidade de retenção de água pelos poros do pélete, o que pode ter provocado uma redução das trocas gasosas entre as sementes e o ambiente externo.

Entretanto, no trabalho realizado por Conceição et al. (2008), os resultados de germinação das sementes recobertas mostraram que a inoculação da bactéria *H. seropedicae* Z67 e a adição de ácido húmico em sementes de milho recobertas com uma mistura de 70 % de calcário, 10 % de meio de cultura semissólido e 2,0 % de acetato de polivinila não afetaram a germinação das sementes quando comparadas ao Controle (semente nuas).

Conceição e Vieira (2008) avaliaram a resistência do recobrimento sobre o processo de germinação em sementes de milho utilizando diferentes proporções de acetato de polivinila (0,5, 1, 2, 3, 4 e 5 %), e verificaram que o número de plântulas normais obtidas no teste de germinação não foi afetada pelas proporções de polímero empregadas.

Ainda, nos estudos desenvolvidos por Mendonça, Carvalho e Ramos (2007) visando melhorar a rugosidade em sementes de milho superdoce foram empregados diferentes materiais de enchimento (calcários, caulim, carvão vegetal, areia, vermiculita, fubá de milho, farinha de trigo, polvilho de mandioca, amido de milho, celite e terra de diatomáceas), os autores constataram que o revestimento utilizado proporcionou homogeneidade de forma e tamanho às sementes, melhorou a vazão e a distribuição dos péletes na semeadura e não comprometeu a emergência de plântulas em campo após quatro meses de armazenamento.

O sucesso da produção agrícola dependerá, dentre outros aspectos, de um aceitável estabelecimento de plântulas no campo, fator este diretamente relacionado com a germinação das sementes (NASCIMENTO, 2002). Entretanto, diversos fatores poderão afetar a germinação e conseqüentemente a emergência das plântulas, como a temperatura, água e oxigênio (BORBA et al., 1995). Diante disso, o desafio de se obter sucesso no processo de revestimento de sementes é assegurar que os materiais empregados recubram toda a semente e permaneçam aderidos por toda a superfície, e ainda, que estes não interfiram no suprimento de oxigênio e água restringindo a germinação das sementes.

5.3 Estudo da Viabilidade do *Azospirillum brasilense* AbV5

Na Tabela 15 estão apresentados os dados da viabilidade do microrganismo *Azospirillum brasilense* AbV5 ao longo do tempo de armazenamento (0, 0,25, 1, 6, 10 e 15 dias). Comparando-se os quatro tratamentos testados, a partir do primeiro tempo de contagem e durante os 15 dias de armazenamento, o tratamento T1 (revestimento puro) apresentou os

maiores valores de contagem microbiana, e o tratamento T3 (sementes revestidas com o revestimento inoculado) a segunda maior contagem (Tabela 15).

Além disso, os resultados mostraram que o revestimento desenvolvido, quando empregado puro (tratamento T1) manteve a viabilidade do microrganismo adicionado ao longo dos 10 dias de armazenamento, mostrando um decréscimo significativo (teste de Tukey, $p \leq 0,05$) apenas aos 15 dias. No tratamento T3, houve um decréscimo significativo na contagem entre o tempo 0 (10^8 UFC.mL⁻¹) e o primeiro tempo ($2,10 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹) (Tabela 15), mas a partir deste tempo a viabilidade microbiana se manteve estável ao final dos 15 dias experimento (Tabela 15). Em contrapartida, os tratamentos T2 (da semente inoculada com o microrganismo sem a presença do revestimento) e o T4 (semente inoculada com a suspensão bacteriana do microrganismo e, em seguida, revestida com a solução do revestimento puro) apresentaram uma redução na contagem do microrganismo a partir da primeira contagem, e esse valor foi diminuindo significativamente até os 15 dias de contagem (Tabela 15).

A maior viabilidade dos microrganismos no tratamento T1 sugere que houve um efeito de toxicidade dos compostos adicionados às sementes (fungicidas e inseticidas comumente adicionados em sementes agrícolas comerciais), principalmente quando observada os valores de contagem imediatamente após o tratamento das sementes, com queda de aproximadamente 10 vezes nos valores de UFC logo na primeira contagem dos tratamentos T2, T3 e T4. Mesmo considerando esta queda inicial nos tratamentos onde os microrganismos foram adicionados às sementes, os resultados indicam que o revestimento polimérico desenvolvido foi capaz de proteger parcialmente as células contra a toxidez dos agroquímicos adicionados às sementes, uma vez que o decaimento da viabilidade foi menor nos tratamentos T3 e T4, em comparação ao tratamento T2 onde as sementes não receberam o revestimento polimérico.

Tabela 15 – Resultado da viabilidade do microrganismo *Azospirillum brasilense* AbV5 ao longo do tempo de armazenamento.

Tratamento	Contagem (Log UFC.mL ⁻¹)					
	Tempo (dias)					
	0	0,25	1	6	10	15
T1	8,00 ^{Ab}	8,11 ^{Aab}	8,15 ^{Aa}	8,17 ^{Aa}	8,10 ^{Aab}	7,68 ^{Ac}
T2	8,00 ^{Aa}	7,06 ^{Cbc}	7,05 ^{Cbc}	6,74 ^{Ccd}	6,64 ^{Cd}	6,51 ^{Cd}
T3	8,00 ^{Aa}	7,32 ^{Bbc}	7,29 ^{Bbc}	7,20 ^{Bbc}	7,15 ^{Bbc}	7,05 ^{Bc}
T4	8,00 ^{Aa}	6,85 ^{Dbc}	6,82 ^{Dbc}	6,65 ^{Cbc}	6,60 ^{Cbc}	6,56 ^{Cc}

Letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias (teste de Tukey). Letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias (teste de Tukey). T1 - Tratamento controle, sem a semente, contendo a solução de revestimento puro (AM1.5GL1.5) autoclavada e inoculada com microrganismo. T2 - Semente não revestida, apenas inoculada com a suspensão bacteriana do microrganismo. T3 - Solução de revestimento puro (AM1.5GL1.5) autoclavada e inoculada com microrganismo e, em seguida, empregada para revestir as sementes. T4 - Semente inoculada com a suspensão bacteriana do microrganismo e, em seguida, revestida com a solução do revestimento puro.

No trabalho desenvolvido por Marcelino et al. (2016), foi verificado que um biocompósito composto majoritariamente de amido de mandioca e fibras do bagaço de cana mostrou-se altamente promissor na manutenção da viabilidade celular do microrganismo *Azospirillum brasilense* AbV5, proporcionando a manutenção de uma densidade de 10^6 células/g ao final de 120 dias de monitoramento. Ainda, Amalraj et al. (2013), verificaram o efeito de suportes formulados com bases poliméricas de polivinilpirrolidona (PVP 30 K), carboximetilcelulose (CMC) e polissorbato 20 na estabilidade de bioinoculantes líquidos (*Bacillus megaterium* var. phosphaticum, *Azospirillum brasilense* e *Azotobacter chroococcum*), os autores observaram contagem de $5,6 \times 10^7$, $1,9 \times 10^8$ e $3,5 \times 10^7$ UFC ml⁻¹, respectivamente, após 480 dias de armazenamento à 30 °C.

O revestimento biodegradável empregado neste estudo (AM1.5GL1.5) se mostrou uma alternativa promissora para a veiculação de microrganismos benéficos em sementes de milho. Através destes resultados, foi confeccionada a Patente “*Revestimento polimérico para uso em sementes visando a veiculação de microrganismos benéficos ao crescimento da planta e outros insumos*” anexada ao final desta Tese, que foi depositada no INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial), sob o número de protocolo BR 10 2017 006046 2.

6 CONCLUSÃO

Os revestimentos biodegradáveis produzidos com amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico tiveram a aparência de um plástico transparente, além de se apresentaram contínuos, homogêneos e com bom aspecto visual. As condições do processo estabelecidas no estudo, como a quantidade de sólidos adicionados à mistura, o modo de preparo que incluiu a homogeneidade, temperatura e tempo, contribuíram para obtenção de revestimentos com características adequadas.

Os valores de pH encontrados neste trabalho ficaram próximos da neutralidade, o que é uma característica interessante para os materiais produzidos, uma vez que podem servir como matriz polimérica para a imobilização de nutrientes e/ou microrganismos.

A formulação que apresentou o maior valor de capacidade de absorção de água foi a amostra AM3.0, formulada apenas com amido, e por outro lado, a amostra que apresentou o menor valor de absorção de água foi a mistura ternária com as mesmas proporções de amido, gelatina e álcool polivinílico (AM1.0GL1.0AP1.0). As misturas ternárias também apresentaram os menores valores de umidade, solubilidade e permeabilidade ao vapor de água.

A amostra produzida com a mistura binária entre amido e gelatina (AM1.5GL1.5) apresentou valores elevados de capacidade de absorção de água, contudo, apresentou valores baixos de solubilidade, o que a torna uma formulação interessante para o revestimento de sementes, já que o filme intumescce, mas não se desfaz quando em contato com a água. Isso foi comprovado nos resultados de germinação das sementes de milho, onde as sementes revestidas com a formulação AM1.5GL1.5 tiveram o processo de germinação favorecido quando comparadas com a amostra controle (semente sem revestimento).

O processo de revestimento estabelecido neste estudo foi eficiente, pois as sementes revestidas apresentaram-se contínuas, ou seja, totalmente recobertas com a matriz polimérica após secagem, homogêneas e com boa manuseabilidade. De forma geral, pode-se perceber que as formulações dos revestimentos formaram uma camada uniforme sobre as sementes de milho, exceto a formulação AM1.5AP1.5 formulada com amido e álcool polivinílico, pois não apresentou bons resultados de adesão do revestimento e na análise subjetiva foi classificada como deficiente quanto a continuidade por apresentar em sua superfície zonas sem revestimentos e manuseabilidade, pois quando manipuladas liberava pequenos fragmentos de revestimentos, expondo a semente nua. Entre todas as formulações testadas a formulação

AM1.5GL1.5 apresentou as melhores características de recobrimento, pois foi possível observar uma superfície totalmente recoberta, lisa, sem rugosidade e pontos quebradiços.

Quando incorporou-se o microrganismo *Azospirillum brasilense* AbV5 aos revestimentos puros, e às sementes revestidas, os resultados de viabilidade celular mostraram que o revestimento desenvolvido promoveu a manutenção total da viabilidade após 15 dias de veiculação. A aplicação do revestimento sobre as sementes também foi capaz de proporcionar manutenção na viabilidade celular.

Foi possível então, através deste trabalho, o desenvolvimento de formulações para o recobrimento de sementes de interesse agrícola, como as sementes de milho empregadas nesse estudo, utilizando materiais biodegradáveis, inertes, de grande disponibilidade e baixo custo, que não afetaram o processo de germinação das sementes, podendo ainda ser carreadores de nutrientes e promotores de crescimento para a planta, visando uma maior produtividade agrícola sem causar danos em potencial ao ecossistema.

REFERÊNCIAS

- ABAM – Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca. Disponível em < <http://www.abam.org.br>>, acesso 15/12/2015.
- ABNT – Associação Brasileira de normas Técnicas. NBR NM ISO 535. **Papel e Cartão. Determinação da capacidade de absorção de água. Método de Cobb**, 1999.
- AGUILERA, L.A.; CARON, B.O.; CELLA, W.L.; JUNIOR, L. Qualidade fisiológica de sementes de milho em função da forma e do tratamento químico das sementes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 2, 2000.
- ALBANEZ; N. E. F. K; **Preparação e caracterização de nanocompósitos preparados com argilas esmectitas (bentonita), amido e sacarose**. 2008. 91f. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Escola Politécnica da Universidade de São Paulo; São Paulo.2008, 91 p.
- ALMARAJ, L. D.; VENKATESWARTIU, B.; SUSEELENDRA, D.; PRAVEN, K. G.; HASSAN, A. S. K.; MEENAKASHI, T.; SUTANA, U.; SRAVANI, P.; LAKSHMI, N. M. Effect of Polymeric Addtives, Ajudvants, Surfactants on Survival, Stability and Plant Growth Promoting Ability of Liquid Bioinoculants. **Journal of Plant Physiology of Pathology**, 1,2, 2013.
- ALEXANDRE, M.; DUBOIS, P. Polymer-layered silicate nanocomposites: preparation, properties and uses of a new class of materials. **Materials Science and Engineering**. v. 28, p. 1-63, 2000.
- ALFARO, A. T. **Otimização das condições de extração e caracterização da gelatina de pele de tilápia (*Oreochromis urolepis hornorum*)**. 130f. 2008. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.
- AL-HASSAN, A. A.; NORZIAH, M. H. Starch–gelatin edible films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 1, pag. 108–117, 2012.
- ARANHA, I. B.; LUCAS, E. F. Poli (álcool Vinílico) Modificado com cadeias hidrocarbônicas: Avaliação do Balanço Hidrófilo/Lipófilo. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 11, n. 4, pag. 174-181, 200.
- ARESGO, O.; BAUDET, L.; AMARAL, A. S.; HOLBIG, L.; PESKE, F. Recobrimento de Sementes de Arroz Irrigado com Ácido Giberélico, Fungicida e Polímero. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 28, n. 2, pag. 201-206, 2006.
- ARVANITTOYANNIS, I. et al. Edible films made from gelatin, soluble starch and polyols, Part 3. **Food Chemistry**, v. 60, n. 4, pag. 593–604, 1997.
- ARVANITTOYANNIS, I.; NAKAYAMA, A.; AIBA, S. Edible films made from hydroxypropyl starch and gelatin and plasticized by polyols and water. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, n. 2-3, pag. 105–119, 1998.

ASTM - Standard test methods for water vapor transmission of materials ASTM E 96-00, **Annual Book of ASTM Standards**. 04.06, 842, 2000.

ASTM D882-95. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. **Annual Books of ASTM Standards**, p. 182-188, 1995.

AVENA-BUSTILLOS, R. J.; KROCHTA, J. M. Water vapor permeability of caseinate-based edible films as affected by pH, calcium crosslinking and lipid content. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 4, pag. 904-907, 1993.

AVÉROUS, L.; BOQUILLON, N. Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviours. **Carbohydrate Polymers**. v. 56, pag. 111-122, 2004.

AZEVEDO, L. A. S. Paradigmas da proteção de plantas com fungicidas. In: AZEVEDO, L. A. S. (Ed.) **Proteção integrada de plantas com fungicidas**. 1 ed. São Paulo. pag.151-160. 2001.

BAILEY, A. J.; LIGHT, N.D. Genes, biosynthesis and degradation of collagen in Connective tissue in meat and meat products. **Elsevier Applied Science**. London and New York. 1989.

BALDANI, V. L. D, DÖBEREINER, J. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum spp.* **Soil Biology and Biochemistry**, v. 12, p. 433–439, 1980.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, n.5/6, p.911-922, 1997.

BARIL, M. B.; FRANCO, G. F.; VIANA, R. S.; ZANIN, S. M. W. Nanotecnologia aplicada aos cosméticos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.13, n.1, Jan. - Mar.2012

BARRETO P. L. M., PIRES, A. T. N.; SOLDI, V. Thermal degradation of edible films based on milk proteins and gelatin in inert atmosphere. **Journal of Polymer Degradation and Stability**. vol. 52, pag. 79 – 147, 2003.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum* – plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.103-121, 1997.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G; DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum*-plant relations physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p.521-577, 2004.

BAUDET, L.; PERES, W. Recobrimento de sementes. **Seed news**, Pelotas, v.8, n.1, pag.20-23, 2004.

BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. The State of the Art. In: BELGACEM, M. N.; GANDINI, A. **Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources**. Oxford: Elsevier, 2008.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. XLIV, vol. 1070, 2009.

BELLWOOD, D. P. Early agriculturalist population diasporas? Farming, languages, and genes. *Annual review of anthropology*, v. 30, pag. 181-207, 2001.

BLACKMAN, G. E.; HUDGSON, G. L. An analysis of the influence of plant density on the growth of *Vicia faba*. II. The significance of competition for light in relation to plant development in different densities. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, vol. 08, n, 23, pag. 195 – 219, 1957. In: BORGES, I. D. *Marcha de absorção de nutrientes e acúmulo de matéria em cultivares de milho*. Minas Gerais: UFLA, 2006.

BERGAMASCHI, H; MATZENAUER, R. *O Milho e o Clima*. Emater. Pag. 84. 2014.

BERGO, P. V. A.; SOBRAL, P. J. A. Effects of pasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. **Food Hydrocolloids**, vol. 21, n. 8, pag. 1285-1289, 2007.

BERTAN, L. C.; TANADA-PALMU, P. S.; SIANI, A. C.; GROSSO, C. R. F. Effect of fatty acids and ‘Brazilian elemi’ on composite films based on gelatin. **Food Hydrocolloids**, vol. 19, pag. 73-82, 2005.

BERTUZZI, M.A.; CASTRO VIDAURRE, E.F.; ARMADA, M.; GOTTIFREDI, J.C. Water vapor permeability of edible starch based films. **Journal of Food Engineering**, vol.80, pag. 972-978, 2007.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 2º Edição. São Paulo: Varela, 1995.

BORBA, S.; ANDRADE, R. V.; AZEVEDO, J. T. ANDREOLI, C., PURCINO, A. A. C. Germinação de Sementes de Diversos Genótipos de Milho Tropical (*Zea M4YS L.*) em Diferentes Temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 17, n. 2, pag.141-144, 1995.

BORDIGNON, A. C. **Caracterização da pele e da gelatina extraída de peles congeladas e salgadas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. 2010. 114 f. Dissertação (Mestre em Zootecnia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2010.

BORGES, E. E. L.; RENA, A. B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I.B.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. (Coord.). **Sementes florestais tropicais**. Brasília: Abrates, pag.83-135, 1993.

BORGES, I. D., *Marcha de absorção de nutrientes e acúmulo de matéria em cultivares de milho*. Minas Gerais: UFLA, 2006. 115p.Tese (Doutorado) – Programa de Pós- Graduação em Agronomia, área de concentração: Fitotecnia, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2006.

BOURBIGOT, S.; VANDERHART, D. L.; GILMAN, J. W.; BELLAYER, S.; STRETZ, H.; PAUL, D. R.. Solid state NMR characterization and flammability of styrene-acrylonitrile copolymer montmorillonite nanocomposite. **Polymer**; v. 45; p. 7627-7638; 2004.

BRANDELEROA, R. P. H.; ALMEIDA, F. M.; ALFARO, A. Microestrutura e Propriedades de Filmes de Amido-Álcool Polivinílico-Alginato Adicionados de Óleos Essenciais de Copaíba e Capim Limão. **Química Nova**. vol. 38, N. 7, pag. 910-916, 2015.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Regras para Análise de Sementes. Brasília: Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, pag. 365. 1992.

BRASIL, INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 29, DE 8 DE JUNHO DE 2011. Dispõe sobre os Requisitos Técnicos Obrigatórios ou Recomendados para Certificação de Unidades Armazenadoras em Ambiente Natural e o Regulamento de Avaliação da Conformidade das Unidades Armazenadoras. 2011.

BRISCO – Informativo Técnico: álcool polivinílico.

BRITO, G. F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E. M. MÉLO, T. J. A. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. **Materiais e Processos**. v. 6. pag. 127 – 139, 2011.

BUDAVARI, S.; O'NEIL, M.J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P.E.; KINNEARY, J.F. **The Merck Index, an encyclopedia of chemicals and drugs**, 19. ed., pag. 1741, 1996.

BULÉON, A.; COLONNA, P.; PLANCHOT, V.; BALL, S. Starch granules: structure and biosynthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 23, pag. 85- 112, 1998.

CARRASCO-ESPINOSA, K.; GARCÍA-CABRERA, R. I.; BEDOYA-LÓPEZ, A.; TRUJILLO- ROLDÁN, M. A.; VALDEZ-CRUZ, N. A. Positive effect of reduced aeration rate on growth and stereospecificity of DL-malic acid consumption by *Azospirillum brasilense*: improving the shelf-life of a liquid inoculant formulation. **J Biotechnol** 195:74–81, 2015

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill, 429p. 1983.

CARVALHO R.A. **Desenvolvimento e caracterização de biofilmes à base de gelatina**, Tese de Mestrado, FEA- UNICAMP, 1997.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4 ed. Jaboticabal: FUNEP, pag. 588, 2000.

CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. Efeito to Tratamento térmico e enzimático nas propriedades de filmes e gelatina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, vol. 26, n. 3, pag. 495-501, jul-set, 2006.

CASARIEGO, A.; SOUZA, B. W. S; VICENTE, A. A.; TEIXEIRA, J. A.; CRUZ, L.; DÍAZ, R. Chitosan coating surface properties as affected by plasticizer, surfactant and polymer concentrations in relation to surface properties of tomato and carrot. **Food Hydrocolloids**, v. 22, pag. 1452–1459. 2008.

CEREDA, M. P.; FRANCO, C. M. L.; DAIUTO, É. R.; DEMIATE, I. M.; CARVALHO, L. I. C. B.; LEONEL, M.; VILPOUX, O. F.; SARMENTO, S. B. S.; Propriedades gerais do amido. Série Culturas de Tubérculos Amiláceas Latino Americanas, v. 1. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. 204p.

CIANNAMEA E.M.; SAGUES M.F.; STEFANI P.M.; SAUMELL C.; RUSECKAITE R.A. 2011. **Películas basadas en concentrado de proteína de soja con potencial aplicación de hongos nematofagos**. ISAM/CONAMET 2011.

CHARALAMPOPOULUS, D.; PANDIELLA, S. S.; WEBB, C. Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts on the viability of potential probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions. **Int J Food Microbiol** 82:133–141, 2003.

CHEN, H. Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 11, pag. 2563-2583, 1995.

CHEN, C. H.; WANG, F. Y.; MAOA, C. F.; LIAO, W. T.; HSIEH, C. D. Studies of chitosan: Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol)/gelatin ternary blend films. **International Journal of Biological Macromolecules** 43, P. 37–42, 2008.

CHIVRAC, F.; GUEGUEN, O.; POLLET, E.; AHZI, S.; MAKRADI, A.; AVEROUS, L.; Micromechanical modeling and characterization of the effective properties in starchbased nano-biocomposites. **Acta Biomaterialia**, v. 4; p. 1707–1714; 2008.

CHUNG, H. J.; LIU, Q.; HOOVER, R. Effect of single and dual hydrothermal treatments on the crystalline structure, thermal properties, and nutritional fractions of pea, lentil, and navy bean starches. **Food Research International**, Amsterdam, v. 43, n. 2, p. 501-508, 2010.

CHUNG Y., ANSARI, S., ESTEVEZ, L., HAYRAPETYAN, S., GIANNELIS, E. P.; LAI, H. M. Preparation and properties of biodegradable starch–clay nanocomposites. **Carbohydrate Polymers**. v. 79, p. 391-96, 2010.

CLEMENTE, F. M. V. T.; OLIVEIRA, J. A.; ALVES, A. C. S.; GONÇALVES, S. M.; PEREIRA, S. P. Peliculização associada a doses de fungicidas na qualidade fisiológica de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: XIII Congresso Brasileiro de Sementes, 2003, Londrina. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.13, n.3, p. 223, 2003.

COELHO, A. M. **Nutrição e Adubação do Milho**. EMBRAPA. Sete Lagoas, MG. Dezembro, 2006.

COELHO, A. C. V.; SANTOS, P. S.; SANTOS, H. S. Argilas Especiais: Argilas quimicamente modificadas - uma revisão. **Química Nova**. v. 30, Nº. 5, p. 1282-1294, 2007.

CONAB - **Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira de grãos: Safra 2014/2015**. Brasília: CONAB, 2016.

CONCEIÇÃO FILHO, R. S.; BARROZO, M. A. S.; LIMAVERDE, J. R.; ATAIDE, C. H. The Use of Spouted Bed Fertilizer Coating Over Soybeans Seeds, Proc. World Congress on Particle Technology 3, Brighton, UK, July 6-9, 1998.

CONCEIÇÃO, M. P.; VIEIRA, H. D. Qualidade Fisiológica E Resistência Do Recobrimento De Sementes De Milho. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 30, n. 3, pag.048-053, 2008.

CONCEIÇÃO, M. P.; VIEIRA, H. D. CANELLAS, L. P.; MARQUES JUNIOR, R. B.; OLIVARES, F. L. Recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v.43, n.4, p.545-548, abr. 2008.

CORRÊA, C. E. S. Silagem de milho ou cana-de-açúcar e o efeito da textura do grão de milho no desempenho de vacas holandesas. 2001. 102 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2001.

CORRÊA, B. M.; LOPES FILHO, J. F. **Elaboração e Caracterização de Biofilmes à Base De Zeína**. VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica 27 a 30 de julho de 2009. Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, 2009.

COSTA, N. P.; FRANÇA-NETO, J.B.; PEREIRA, J.E.; MESQUITA, C.M.; KRZYZANOWSKI, F.C.; HENNING, A. A. Efeito de sementes verdes na qualidade fisiológica de semente de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.23, n.2, pag.102-107, 2001.

COSTA, M. A. **Peletização de Sementes de Brócolos em Leito de Jorro Cônico**. 243 f. Tese de Doutorado (Faculdade de Engenharia Química) - Engenharia Química. Unicamp – Campinas. 2003.

COVARRUBIAS, S. A; MORENO, D. B. M.; BASHAN, Y. Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae. **Appl Microbiol Biotechnol** 93:2669–2680, 2012.

CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; Manejo e Tratos Culturais para o Cultivo do Milho Verde. IN. PEREIRA FILHO, I. A. **O Cultivo do Milho Verde**. Embrapa Milho e Sorgo Sete Lagoas, MG. 2002.

CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; ALVARENGA, R. C.; GONTIJO NETO, M. M.; VIANA, J. H. M.; OLIVEIRA, M. F.; MATRANGOLO, W. J. R.; ALBUQUERQUE FILHO, M. R. **Cultivo do Milho**. 6 ed. EMBRAPA MILHO E SORGO, 2010.

CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; QUEIROZ, L. R. Milho – Cultivares para 2013/2014. **Informativo Técnico EMBRAPA**. 2015.

CUQ, B.; GONTARD, N.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Functional properties of myofibrillar protein-based biopackaging as affected by film thickness. **Journal of Food Science**, Chicago, v.61, n.3, pag.580-584, 1996.

CYRAS, V. P.; MANFREDI, L. B.; TON-THAT, M. T; VÁZQUEZ, A.; Physical and mechanical properties of thermoplastic starch/montmorillonite nanocomposites films. **Carbohydrate Polymer**. v.73, p.55-63, 2008.

DA RÓZ, A. L. O futuro dos plásticos: biodegradáveis e fotodegradáveis. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v.13, p. 4-5, 2003.

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V. F.; MARINI, D.; SANDER, G. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, vol.17 n.º.10 Campina Grande, 2013.

de-BASHAN, L. E.; HERNANDEZ, J. P.; MOREY, T.; BASHAN, Y. Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. **Water Res**, n.º.38, p. 466–474, 2004.

de-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. **Bioresource Technol**, n.º. 101, p.1611–1627, 2010.

DEBIAGI, F.; MARIM, B. M.; MALI, S. Properties of Cassava Bagasse and Polyvinyl Alcohol Biodegradable Foams. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 23, pag. 269-276, 2015.

DEL GALLO, M., FENDRIK, The rhizosphere and *Azospirillum*. In: Okon, Y. (Ed.). *Azospirillum plant association*. **CGC Critical Reviews in Plant Science**. Boca Raton. p. 57-75, 1994.

DERRÉ, L. O.; CUSTÓDIO, C. C.; AGOSTINI, E. A. T.; GUERRA, W.E.X. Obtenção das curvas de embebição de sementes revestidas e não revestidas de *Urochloa brizantha* e *Urochloa ruziziensis*. **Colloquium Agrariae**, v. 9, n. 2, pag. 103-111, jul./dez. 2013.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. Bases científicas para uma agricultura biológica. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.34, n.7, p.869-881, 1982.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Brasília, **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - CNPAB**,1995, 60 p.

DUAN, X.; BURRIS, J. S. Film coating impairs leaching of germination inhibitors in sugar beet seed. **Crop Science**, Madison, v. 37, n. 3, pag. 515-520, May/June 1997.

DUARTE, J. O. **A importância econômica do Milho**. EMBRAPA. 2006.

EHLERS, E. Agricultura sustentável: origens e perspectivas de um novo paradigma. **Guaíba: Agropecuária**. 2 ed. Livros da Terra: São Paulo, pag. 178, 1996.

ELLIS, R. P.; COCHRANE, M. P. DALE, M. F. B.; DUFFUS, C. M.; LYNN, A.; MORRISON, I. M.; PRENTICE, R. D. M.; SWANSTON, J. S.; TILLER, S. A. Starch Production and Industrial Use. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 77, pag. 289 -311, 1998.

EMPRAPA MILHO E SORGO. **Cultivo do milho**, 4ª ed., 2008. Disponível em: < Milho/CultivodoMilho_4ed/index.htm> . Acesso em: 20 de março de 2016.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **O Futuro do Desenvolvimento Tecnológico da Agricultura Brasileira: Visão 2014–2034**. pag. 01 – 53, 2014.

FAKHOURI, F. M. Efeito de coberturas comestíveis na vida útil de goiabas innatura (*Psidium guajava* L.) mantidas sob refrigeração. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 2, pag. 203-211, 2003.

FAKHOURI, M. F.; FONTES, L. C. B.; GONÇALVES, P. V. M.; MILANEZ, C. R.; STEEL, C. J.; COLLARES-QUEIROZ, F. P. Filmes e coberturas comestíveis compostas à base de amidos nativos e gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas Crimson. **Ciênc. Tecnol. Alimentos**, Campinas, vol. 27, n. 2, pag. 369-375, abr.-jun. 2007.

FAKHOURI, F. M. **Bioplásticos flexíveis e biodegradáveis à base de amido e gelatina**. 2009. 271 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

FAKHOURI, F. M. et al. Comparative study of processing methods for starch/gelatin films. **Carbohydrate polymers**, v. 95, n. 2, pag. 681–9, 2013.

FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. **Escassez e Degradação do solo e da água ameaçam segurança alimentar**. 2011.

FARIA, F O.; VERCEHEZE, A. E. S.; MALI, S. Propriedades Físicas de Filmes Biodegradáveis a Base de Amido de Mandioca, Álcool Polivinílico e Montmorilonita. **Química Nova**, vol. 35, N. 3, pag. 487-492, 2012.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Ecofisiologia e fenologia. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Produção de milho. Guaíba: Agropecuária, pag. 21 – 54, 2000.

FERNANDES, M. S.; ROSSIELLO, R. O. P. Mineral nitrogen in plant physiology and plant nutrition. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.14, p.111-148, 1995.

FERREIRA, V. F.; FERREIRA, T. F.; CARVALHO, R. A.; MAVAIEIE, D. P. R.; PEREIRA, D. S.; OLIVEIRA, J. A. Qualidade fisiológica de sementes revestidas de braquiária híbrida cv. Mulato II. **Revista Agro@ambiente**. v. 9, n. 2, pag. 161-166, abril-junho, 2015.

FLANAGAN, J.; GUNNING, Y.; FITZGERALD, R. J. Effect of crosslinking with transglutaminase on the heat stability and some functional characteristics of sodium caseinate. **Food Research International**, v. 36, n. 3, pag. 267-274, 2003.

FRANÇA NETO, J. B.; KRZYZANOWSKI, F. C.; HENNING, A. A. A Importância do Uso das Sementes de Soja de Alta Qualidade. **EMBRAPA**. n. 01, 2010.

GALDEANO, M.C.; WILHELM, A. E.; MALI, S.; GROSSMANN, M.V. E. Influence of thickness on properties of plasticized oat starch films. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56 n. 4, pag.637 – 644, 2013.

GALLANT, D. J.; BEWA, H.; BUY, Q. H.; BOUCHET, B.; SZYLIT, O.; SEALY, L. On ultrastructural and nutritional aspects of some tropical tuber starches. *Starch/ Starke*. vol. 34, pag. 255 – 262, 1997.

GANANASAMBANDAM, R.; HETTIARACHCHY, N. S.; COLEMAN, M. Mechanical and Barrier Properties of Rice Bran Films. **Journal of Food Science**. v. 62. pag.395-398. 1997.

GARCIA, P. S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F.; MALI, S.; DALL'ANTÔNIA, L.H.; BARRETO, W. J. Citric acid as multifunctional agent in blowing films of starch/PBAT. *Química Nova*, v. 34, pag. 1507-1510, 2011.

GASS, T. Petition for amending the National List of the USDA's National Organic Program. Washington, DC. 2001.

GENNADIOS A.; McHUGH T. H.; WELLER, C. L.; KROCHTA, J. M. Edible coatings and films based on proteins. In: KROCHTA, J. M.; BALDWIN, E. A.; NISPEROS- CARRIEDO, M. (eds). **Edible coatings and films to improve food quality**. Technomic Publishing Co, Inc. Lancaster USA, 1994.

GHADERI-FAR, F., GHEREKHLOO, J., ALIMAGHAM, M. Influence of Environmental Factors on Seed Germination and Seedling Emergence of Yellow Sweet Clover (*Melilotus officinalis*). *Planta Daninha*. 28, 463–469. 2010.

GIMÉNEZ SAMPAIO, T.; SAMPAIO, N.V. Recobrimento de sementes. **Informativo ABRATES**. Londrina, v.4, n.3, pag. 20-52, 1994.

GOMES, A. M. M. **Preparação, Caracterização e Avaliação da biodegradabilidade de Blendas de Amido/Quitosana/PVA**. 2008. 176 f. Tese (Doutor em Química Inorgânica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

GORIM, L.; ASCH, F. Effects of composition and share of seed coatings on the mobilization efficiency of cereal seeds during germination. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.198, n.2, pag. 81–91, 2012.

GRABE, D. F. Measurement of seed moisture. In: STANWOOD, P. C. and McDONALD, M. B (Eds). **Seed Moisture**. Madison: The Crop Science Society of America, pag. 69-92, 1989.

GUILBERT, S.; BIQUET, B. Películas y envolturas comestibles. IN: BUREAU, G.; MULTON, J. L. **Embalaje de los alimentps de gran consume**. Zaragoza (España): Editora Acríbia S. A. pag. 331 – 371, 1995.

GUIMARÃES, P. E. O.; CORRÊA, L. A. Densidade Real de Mil Grãos de Híbridos Precoces de Milho. EMBRAPA MILHO E SORGO, 1994.

HALLEY, P. F. Thermoplastic starch biodegradable polymers. In: Smith, R. *Biodegradable Polymers for Industrial Application*. Cambridge: Woodhead Publishing, 2005.

HAN, X.; CHEN, S.; HU, X. Controlled-release fertilizer encapsulated by starch/polyvinyl alcohol coating. **Desalination**, v. 240, n. 1-3, pag. 21–26, 2009.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v. 16, n 10, p. 463-471, 2008.

HARTMANN, A., ZIMMER, W. Physiology of *Azospirillum*. In: Okon, Y. (Ed.) *Azospirillum/Plant associations*. **CGC Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, USA. p.15-39, 1994.

HATHCOCK, A. L.; DERNOEDEN, P. H.; TURNER, T. R.; McINTOSH, M. S. Tall fescue and Kentucky bluegrass response to fertilizer and lime seed coatings. **Agronomy Journal, Madison**, v.76, n.3, pag.879-883, 1984.

HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U.; KHALID, R.; AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiology**, v. 60, p. 579-598, 2010.

HENCH, L. L.; POLAK, J. M. Third-Generation Biomedical Materials. **Science**, vol 295, pag. 1014 – 1017, 2002

HENRIQUE, C. M. **Caracterização de filmes de féculas modificadas de mandioca como subsídios para aplicação em pós colheita de hortícolas**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu – São Paulo, 2002.

HILL, H. J., Recent Developments in Seed Technology. **Journal of New Seeds**. p.105- 110, 1999.

HUERGO, L.F.; MONTEIRO, R.A.; BONATTO, A.C.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; CRUZ, L.M.; CHUBATSU, L.S.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología, Argentina, p.17-35. 2008.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283), 2007.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. Lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil** 331:413–425, 2010.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36 p.

IAL – Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3 edição., São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, v 1- Métodos Químicos e Físicos para Análises de Alimentos. pag. 533, 1985.

IGOE, R.S. **Dictionary of Food Ingredients**. Van Nostrand Reinhold. New York, USA.1983. JAYASEKARA, R. et al. Preparation, surface modification and characterisation of solution cast starch PVA blended films. **Polymer Testing**, v. 23, n. 1, pag. 17–27, 2004.

JONGJAREONRAK, A.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; PRODPRAN, T.; TANAKA, M. Characterization of edible films from skin gelatin of brown stripe red snapper and big eye snapper. **Food Hydrocolloids**, vol 20, pag. 492-501, 2006.

KAMPEERAPAPPUN, P., AHTONG, D., PENTRAKON, D., SRIKULKIT, K., Preparation of cassava starch/montmorillonite composite film. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 2, p 155-163, 2007.

KONNOVA, S. A.; BRYKOVA, O. S.; SACHKOVA, O. A.; EGORENKOVA, I. V.; IGNATOV, V. V. Protective role of the polysaccharide containing capsular components of *Azospirillum brasilense*. **Microbiology** 70:436–440, 2001.

KAREIVA, P. S.; WATTS, R.; MCDONALD, A.; BOUCHER, T. Domesticated nature: Shaping landscapes and ecosystems for human welfare. **Science**, v316, pag. 1866–1869, 2007.

KASHYAP, P. L.; XIANG, X.; HEIDEN, P. Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, pag. 36-51, 2015.

KIRCHMANN, H. A.; THORVALDSSON, G. Challenging targets for future agriculture. **European Journal of Agronomy**, v 12, pag. 145–161, 2000.

KOZLOV, P. V.; BURDYGINA, G.I. The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification. **Polymer**, vol. 24, pag. 651-666, 1983.

LAROTONDA, F. D. S.; MATSUI, K. N.; SOBRAL, P.J.A.; LAURINDO, J. B.; Hygroscopicity and water vapor permeability of Kraft paper impregnated with starch acetate. **Journal of Food Engineering**. v. 71, Nº 4, p. 394-402, 2005.

LEBEAU, T.; ROBERT, J. M. Biotechnology of immobilized micro algae: a culture technique for the future? In: Rao (ed) *Algal cultures, analogues of blooms and applications*. **Science Publishers**, Enfield, p. 801–837, 2006.

LIMA, L. B.; MASETTO, T. E.; CARVALHO, M. L. M.; OLIVEIRA, J. A. Tratamento de fungicidas e peliculização de sementes de tomate. In: XIII Congresso Brasileiro de Sementes, 2003, Londrina. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.13, n.3, p. 248, 2003a.

LIMA, L. B.; SILVA, P. A.; GUIMARÃES, R. M. OLIVEIRA, J. A. Peliculização e tratamento químico de sementes de algodão. In: XIII Congresso Brasileiro de Sementes, 2003, Londrina. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.13, n.3, p. 250, 2003b.

LIMA, L. B.; TRENTINI, P.; MACHADO, J. C.; OLIVEIRA, J. A. Tratamento químico de sementes de soja visando ao controle de *Phomopsis sojae* associado a semente e *Rhizoctonia solani* no solo. In: XIII Congresso Brasileiro de Sementes, 2003, Londrina. **Informativo ABRATES**, Londrina, v.13, n.3, p. 250, 2003c.

LIMA, T. G. **Consequências da Remoção do Limbo Foliar em Diferentes Estádios Reprodutivos da Cultura do Milho**. 60 f. 2007. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Agronomia com ênfase em Fitotecnia). Lavras, Minas Gerais, 2007.

LIU, C. C.; TELLEZ – GARAY, A. M.; CASTELL - PEREZ, M. E. Physical and mechanical properties of peanut protein film. **Lebensmittel Wissenschaft und-Tecnologie**, London, United Kingdom, vol 37. pag. 731 – 738, 2004.

LOPES, R. L. T. **Utilização de tarsos de aves para elaboração de gelatina comestível**.1976. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1976.

LUDWIG, M. P.; LUCCA FILHO, O. A.; BAUDET, L.; DUTRA, L. M. C.; AVELAR, S.A. G.; CRIZEL, R. L. Qualidade de Sementes de Soja Armazenadas Após Recobrimento com Aminoácido, Polímero, Fungicida e Inseticida. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 33, n. 3 p. 395 - 406, 2011.

MACHADO, C. F.; OLIVEIRA, J. A.; DAVIDE, A. C.; GUIMARÃES, R. M. Metodologia para a condução do teste de germinação em sementes de ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nicholson). **Revista Cerne**, Piracicaba, SP, v. 8, n. 2, p. 17-25, 2002.

MACNEISH, R. S.; EUBANKS, M. E. Comparative analysis of the Rio Balsas and Tehuacán models for the origins of maize. *Latin American Antiquity*. vol. 11, pag. 03 – 20, 2000.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. Aspectos Fisiológicos do Milho para o Consumo. IN. PEREIRA FILHO, I. A. **O Cultivo do Milho Verde**. Embrapa Milho e Sorgo Sete Lagoas, MG. 2002.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCÍA, M. A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Barrier, mechanical and optical proprieties of plasticized yam starch films. *Carbohydrate Polymers*. v. 56, pag. 129-135, 2004.

MALI, S.; SAKANAKA, L.S.; YAMASHITA, F.; GROSSMANN, M. V. E. Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect. *Carbohydrate Polymers*. v. 60, pag. 283-289, 2005.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; GARCÍA, M. A.; MARTINO, M. M.; ZARITZKY, N. E. Effects of controlled storage on thermal, mechanical and barrier properties of plasticized films from different starch sources. *J. Food Eng.*v. 55, pag. 453-460, 2006.

MALI, S.; DEBIAGI, A. F.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Starch, sugarcane bagasse fibre, and polyvinyl alcohol effects on extruded foam properties: A mixture design approach. *Industrial Crops and Products*. v. 32 pag. 353-359, 2010.

MANO, E. B. **Polímeros como materiais de engenharia**. 3º edição: São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2000.

MANTOVANI, E. C.; MANTOVANI, B. H. M.; CRUZ, I.; MEWES, W. L. C.; OLIVEIRA, A. C. Desempenho de dois Sistemas Distribuidores de Sementes Utilizados em Semeadoras de Milho. **Pesq. agropec. bras.** vol.34, no.1 Brasília Jan. 1999.

MAPA – **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Disponível em < <http://www.mapa.org.br>>. Acesso 15/03/2015.

MARCELINO, P. F. **Desenvolvimento de meios de cultivo e Formulações Inoculantes para *Azospirillum brasilense* AbV5**. Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina. 2012. 118 p.

MARCELINO, P. R. F.; MILANI, K. M. L.; MALI, S. SANTOS, O. J. A. P.; OLIVEIRA, A. L. M. Formulations of polymeric biodegradable low-cost foam by melt extrusion to deliver plant growth-promoting bacteria in agricultural systems. **Appl Microbiol Biotechnology**. 2016.

MARIA, T. M. C. et al. The effect of the degree of hydrolysis of the PVA and the plasticizer concentration on the color, opacity, and thermal and mechanical properties of films based on PVA and gelatin blends. **Journal of Food Engineering**, vol. 87, n. 2, pag. 191-199, 2008.

MARTEN, F. L. – “Vinyl alcohol polymers”, in: **Encyclopedia of Polymer Science and Engineering**, vol. 17, H. F. Mark, N. M. Bikales, C. G. Overberger & G. Menges (eds.), John-Wiley, New York, 1985.

MARTINS, I.M.G.; MAGINA, S.P.; OLIVEIRA, L.; FREIRE, C.S.R.; SILVESTRE, A.J.D.; PASCOAL-NETO, C.; GANDINI, A.; New biocomposites based on thermoplastic starch and bacterial cellulose Compos. **Sci. Technol.** vol. 69, pag 21 – 63, 2009.

MARCON, M. J. A; AVANCINI, S. R. P; AMANTE, E. R. **Propriedades Químicas e Tecnológicas do Amido de Mandioca e do Polvilho Azedo**. Florianópolis: Ed. UFSC, 2007.

MARONGA, S. **On the Optimization of the Fluidized Bed Particulate Coating Process**. Ph. D. Thesis, Royal Institute of Technology, Stockholm, pag. 70, 1998.

MARTINELLI–SENEME, A.; ZANOTTO, M. D.; NAKAGAWA, J. Efeitos da forma e do tamanho na qualidade de sementes de milho, cultivar AL-34. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 22, n. 1, pag. 232- 238, 2000.

MARSCHNER, H. *Mineral nutrition of higher plants*. 2. ed Institute of Plant Nutrition University of Hohenheim, Academic Press: Germany, 1995. 889 p.

MARTINELLI – SENEME, A.; MARTINS, C. C.; CASTRO, M. M.; NAKAGAWA, J.; CAVARIANI, C. Vigor evaluation of encapsulated tomato seed. **Revista Brasileira de sementes**. v.26, n.2, pag. 01-06, 2004.

McWILLIAMS, M. **Foods-Experimental Perspectives**. 4^a ed. Englewood Cliffs. New Jersey, USA. 2001.

MENDONÇA, E. A. F. **Revestimento de Sementes de Milho Super doce**. 78 f. 2003. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus De Jaboticabal. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal - UNESP, 2003.

MENDONÇA, E. A. F.; CARVALHO, N. M.; RAMOS, N. P. Revestimento de Sementes de Milho superdoce. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 29, nº 2, pag.68-79, 2007

MELO, C. P. **Produção e Caracterização de Filmes Biodegradáveis de Amido e Goma Xantana**. 2010. 110f. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina UEL. Londrina. 2010.

MELO, C. P. B. ; GROSSMANN, M. V. E. ; YAMASHITA, F.; YOUSSEF, E. Y.; DALL ANTÔNIA, L.H.; MALI, S.Effect of Manufacturing Process and Xanthan Gum Addition on the Properties of Cassava Starch Films. *Journal of Polymers and the Environment*, v. 19, pag. 739-749, 2011.

MENTEN, J. O.; MORAES, H. D. Tratamento de Sementes: Histórico, Tipos, Características e Benefícios. **Informativo Abrates**. vol. 20, n. 03, 2010.

McHUGH, T. H.; KROCHTA, J. M. Permeability properties of edible biofilms, in: J.M. Krochta, E. A. Baldwin, M. Nisperos-Carriedo, (eds). *Edible coatings and biofilms to improve food quality* (Technomic Publishing Co), Inc. Lancaster, USA, 1994.

MONDO, V. H. V; BRANCALION, P. H. S; CICERO, S. M; NOVEMBRE, A. D. da. L. C; NETO, D. D. Teste de germinação de sementes de *Parapiptadenia rigida* (BENTH.) BRENNAN. **Revista Brasileira de sementes**, Piracicaba, SP, v. 30, n. 2, pag. 177-183, 2008.

MONTERREY-QUINTERO, E.S.; SOBRAL, P.J.A. Preparo de proteínas miofibrilares de tilápia-do-nilo para a elaboração de biofilmes: solubilidade das proteínas em função do pH. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 16. 1998, Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pag. 2086-2089. 1998.

MONTERREY-QUINTERO, E. S.; SOBRAL, P. J. do A. Caracterização de propriedades mecânicas e óticas de biofilmes à base de proteínas miofibrilares de tilápiado-nilo usando uma metodologia de superfície-resposta. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 2, pag. 294-301, 1999.

MORAES, I.C.; SILVA, G.G.D.; CARVALHO, R. A. HABITANTE, A. M. Q. B.; BERGO, P. V. A.; SOBRAL, P. J. A. Influência do grau de hidrólise do poli (vinil álcool) nas propriedades físicas de filmes à base de blendas de gelatina e poli (vinil álcool) plastificados com glicerol. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, vol 28. pag. 738 – 745. 2008.

MORENO-GARRIDO, I. Microalgae immobilization: current techniques and uses. **Bioresource Technol**, nº 99, p.3949–3964, 2008.

MÜLLER, C.; YAMASHITA, F.; LAURINDO, J. B. Evaluation of effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. *Carbohydrate Polymer*. v. 72, pag. 82- 87. 2008.

MÜLLER, C.; YAMASHITA, F.; LAURINDO, J. B. Effect of cellulose fibers addition on the mechanical properties and water vapor barrier of starch-based films. *Food Hydrocolloids*. v. 23, pag. 1328-1333, 2009.

NASCIMENTO, W. M. Hortaliças: Tratamentos de sementes. **Seed News**, Pelotas, v.4, n.2, pag. 16-17, 2000.

NASCIMENTO, W. M.; ARAGÃO, F.A.S. Condicionamento osmótico de sementes de melão: absorção de água e germinação sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, vol.24, n.1, pag.153-157, 2002.

NASCIMENTO, W. M. Condicionamento Osmótico de Sementes de Hortaliças. **Circular Técnico EMBRAPA**. 2004.

NEBEL, B. J.; WRIGHT, R. T. *Environmental science: the way of world works*, 4a ed., Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall, pag. 630, 1993.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation **Soil Biology & Biochemistry**, v.26, p.1591-1601, 1994.

OLIVEIRA, L. M.; ALVES, R. M. V.; SARANTÓPOLOUS, C. I. G. L.; PADULA, M.; GARCIA, E. E. C.; COLTRO, L. **Ensaios para avaliação de embalagens plásticas flexíveis**. Campinas: Centro de tecnologia de embalagem – CETEA. pag. 219, 1996.

OLIVEIRA, J. M.; ANDRÉ FILHO, M.V.; CHAUD, M. M.; GONÇALVES, N.; ARANHA, J. R. LIMA JUNIOR. **Química Nova**, v 33, pag. 1385, 2010.

OLIVEIRA, A. F.; SOLDI, V. Preparação, Caracterização e Propriedades de Filmes Poliméricos com Potencial Aplicação no Recobrimento de Sementes. **Química Nova**, vol. 32, N. 7, pag. 1845-1849, 2009.

OLIVEIRA, B. M.; MELO FILHO, M.; AFONSO, J. C. A densidade e a evolução do densímetro. **Rev. Bras. Ensino Fís.** vol.35 no.1 São Paulo Jan./Mar. 2013.

OLIVEIRA, A. L. M.; MILANI, K. M. L.; SANTOS, O. J. A. P.; SILVA, M. B. Meio de Cultura para a produção de biomassa da bactéria promotora de crescimento vegetal *Azospirillum brasilense* com ala quantidade de exopolissacarídeo e polidroxibutirato, e método para preparação do meio. Patente: DIRPA-PQ 0006, 2014.

ONU – Organização das Nações Unidas. *World population prospects: the 2000 revision*. New York: United Nations Publications, 2015.

PAES, M. C. D. Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 6p. (Informe Técnico).

PAIVA; L. B.; MORALES; A. R.; GUIMARÃES; T. R. Propriedades Mecânicas de Nanocompósitos de Polipropileno e Montmorilonita Organofílica. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v. 16, Nº 2, p. 136-140, 2006.

PARK, H. J. Development of advanced edible coatings for fruits. **Trends Food. Sci. Tech**, v. 10, pag. 254–260. 1999.

PARK, J. K, CHANG, H. N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnol Advances**, N° 18, p.303-319, 2000.

PARK, H. M.; LI, X.; JIN, C.Z.; PARK, C.Y.; CHO, W.J.; HA, C.S.; Preparation and properties of biodegradable thermoplastic starch/clay hybrids; **Macromol Mater Eng**; v. 287 n° 8, p. 553–558; 2002.

PARK, H. W., LEE, W. K., PARK, C. Y., CHO, W. J., HA, C.S; Environmentally friendly polymer hybrids Part I mechanical, thermal, and barrier properties of thermoplastic starch/clay nanocomposites. **Journal of Materials Science**. v. 38, p. 909-915, 2003.

PENOT, I.; BERGES, N ; GUIGUENE, C.; FAGES, J. Characterization of *Azospirillum* associated with maize (*Zea mays* L.) in France using biochemical tests and plasmid profiles. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38, p.798-803, 1992.

PELLISSARI, F.M.; GROSSMANN, M.V.E.; YAMASHITA, F.; PINEDA, E.A.G. Antimicrobial, mechanical and barrier properties of cassava starch-chitosan films incorporated with oregano essential oil. **J. Ag. Food Chem**. v, 57, pag 7499- 7504, 2009.

PEPPAS, N.A, et. al, “Structure and Applications of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/Thawing Methods”. **Advanced in Polymer Science**, 153, p.38-65, 2000.

PEREIRA FILHO, I. A. **O Cultivo do Milho Verde**. Embrapa Milho e Sorgo Sete Lagoas, MG. 2002.

PEREIRA FILHO, I. A.; CRUZ, J. C.; GAMA, E. G. G. Cultivares de Milho para o Consumo Verde. IN. PEREIRA FILHO, I. A. **O Cultivo do Milho Verde**. Embrapa Milho e Sorgo Sete Lagoas, MG. 2002.

PEREIRA, C. E.; OLIVEIRA, J. A.; EVANGELISTA, J. R. E. Qualidade Fisiológica de sementes de Milho Tratadas associadas a polímeros durante o Armazenamento. **Ciência Agrotecnologia**. v. 29, n. 6, pag. 1201 – 1208, 2005.

PEREIRA FILHO, I. A.; CRUZ, J. C. Plantio, espaçamento, densidade, quantidade de semente. **EMBRAPA MILHO E SORGO**, 2015.

PIANA, Z. **Influências do tamanho da semente de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e nível de umidade do solo na germinação e no vigor**. 95 f. 1980. Dissertação (Mestrado) - Escola de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas. 1980.

PINHEIRO, A. C. A.; CERQUEIRA, M. A. A.; SOUZA, B. W. S. A.; MARTINS, J. T. A.; TEIXEIRA, J. A. A.; VICENTE, A. A. A. Utilização de Revestimento/filmes edíveis para aplicações alimentares. **Biocnologia**. v 18, pag 01 – 11, 2010.

PIONNER. Efeitos do nitrogênio: doses. **Revista Área Polo**, São Paulo, v. 5, n. 11, p. 12-6, 1995.

POPPE, J. Gelatin. In: Thickening and Gelling Agents for Food, New York: Ed. Alan Imeson, **Blackie Academia & Professional**, v. 7, pag. 144-168. 1987.

PRADELLA, D. Z. A.; POMPÉIA, S.L.; MARTINS, S.E. et al. Peletização de sementes em gel hidrofílico. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, vol.11, n.1/3, pag.43-52, 1989.

QUADROS, P. D. **Inoculação de *Azospirillum* spp. em sementes de genótipos de milho cultivados no Rio Grande do Sul**. 2009. 74 f. Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009. 74 p.

RAJ, B.; SOMASHEKAR, R. Structure-property relation in polyvinyl alcohol/starch composites. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 91, n. 1, pag. 630–635, 2004.

RATHORE, S.; DESAI, P. M.; VALERIA LIEW, C. V.; CHAN, W.; HENG, P.W. S. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**. N°116. p. 369 -381, 2013.

RENATA P. H. BRANDELEROA, R. P. H.; ALMEIDA, A. F.; ALFAROB, A. Microestrutura e Propriedades de filmes de amido-álcool polivinílico-alginato adicionados de óleos essenciais de copaíba e capim limão. **Quim. Nova**, Vol. 38, n. 7, pag. 910-916, 2015.

REIS JUNIOR, F. B. Inoculação de *Azospirillum* amazonense em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de ciências do Solo**, Viçosa, v 32. n 3, pag. 1139-1146, 2008.

RIGO, N. L. **Desenvolvimento e caracterização de filmes comestíveis**. 2006. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Erechim. 2006.

ROCHA, T. S.; DEMIATE, I. M.; FRANCO, C. M. L. Características estruturais e físico-químicas de amidos de mandioca salsa (*Arracacia xanthorrhiza*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 3, pag. 620-628, jul./set. 2008.

ROCHA, G. O.; GUIMARÃES, M.; FARIAS, C.; CARVALHO, W.; ASCHERI, J. L. R.; GALDEANO, M. C. Filmes Compostos Biodegradáveis a Base de Amido de Mandioca e Proteína de Soja. **Polímeros**, vol. 24, n. 5, pag. 587-595, 2014.

ROPER, M. M.; LADHA, J. K. Biological N₂ fixation by heterotrophic and phototrophic bacteria in association with straw. **Plant and Soil**, v.174, p. 211–224, 1995.

ROSEGRANT, M. W.; CLINE, S. C. Global food security, challenges and policies. **Science**, v. 302, pag. 1917-9, 2003.

SACHS, M.; CANTLIFFE, D.J.; NELL, T.A. Germination studies of clay-coated sweet pepper seeds. **Journal American Society Horticultural Science**, Alexandria, v.106, pag.385-389, 1981.

SAMPAIO, T. G.; SAMPAIO, N.V. Recobrimento de sementes. **Informativo ABRATES**, Brasília, v.4, n.3, pag.20-52 dez. 1994.

SANTOS, K. S. **Avaliação das propriedades finais dos nanocompósitos de polipropileno com diferentes argilas organofílicas**. Porto Alegre; Dissertação de Mestrado apresentado ao programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química; Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2007. 94 p.

SARMENTO, A. L. S. C. **Elaboração e Caracterização de Biofilmes a partir de Gelatina Reticulada**. Tese de Mestrado FEA- UNICAMP, 1999.

SCOTT, J. M. Seed Coatings and Treatments and their Effects on Plant Establishment. *Advances in Agronomy*, v42, pag. 43-83, 1989.

SILVA, W. R.; MARCOS FILHO, J. **Influência do Peso e do Tamanho das sementes de Milho sobre o desempenho no Campo**. Pesquisa Agropecuária Brasília, n 17, v 12, p. 1743-1750, 1982.

SILVA, J. B. C. **Avaliação de métodos e materiais para peletização de sementes**. 1997. Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1997. 197 p.

SILVA, J. B.C.; NAKAGAWA, J. **Metodologia para avaliação de materiais cimentantes para peletização de sementes**. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.16, n.1, pag. 31-37, 1998.

SILVA, J.B.C.; NAKAGAWA, J. **Confecção e avaliação de péletes de sementes de alface**, *Horticultura Brasileira*, v.16, n.2, pag.151-158, 1998.

SILVA, J. B. C.; SANTOS, P. E. C.; NASCIMENTO, W. M. **Desempenho de Sementes Peletizadas de Alface em Função do Material Cimentante e da Temperatura de Secagem dos Péletes**. *Hortic. Bras*, v20, n. 1, pag. 67-70, 2002.

SILVA; M. M. F; **Nanocompósitos Resultantes da Reação de Mineral Argiloso com Agentes Sililantes – Síntese, Caracterização e Aplicação**. 2007. 83p. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba-UFPB/ CCEN, Paraíba. 2007, 83 p.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. **Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos**. *Química Nova*. v. 32, Nº 3, p. 661-671, 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**, 3 ed., New York: John Wiley & Sons, 1974.

SHEIBE, A. S. **Produção e Caracterização de Embalagem Biodegradável de amido de mandioca e Fibras usando a Técnica de Tape – Casting**. 2012. 154 f. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina UFSC. Florianópolis. 2012.

SHI, R.; BI, J.; ZHANG, Z.; ZHU, A.; CHEN, D.; ZHOU, X.; ZHANG, L.; TIAN, W. **The effect of citric acid on the structural properties and cytotoxicity of polyvinyl alcohol/starch films when molding at high temperature**, *Carbohydrate Polymers*. v.74, pag. 763-770, 2008

SHIKI, S. Sistema agroalimentar no cerrado brasileiro. In: SHIKI, S.; SILVA, J.G. da; ORTEGA, A.C. (Org.). **Agricultura, meio ambiente e sustentabilidade do cerrado brasileiro**. Uberlândia: UFU, pag.135-166, 1997.

SOBRAL, P. J. do A. Influência da espessura sobre certas propriedades de biofilmes à base de proteínas miofibrilares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 6, pag. 1251-1259, 2000.

SOBRAL, P. J. do A.; OCUNO, D. Permeabilidade ao vapor de água de biofilmes à base de proteínas miofibrilares de carne. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 3, n. 3, pag. 11-16, 2000.

SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C.; HUBINGER, M. D.; ROQUES, M. A. *Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films*. **Food Hydrocolloids**, vol. 15, pag. 423-432, 2001.

SREEDHAR, B.; SAIRAM, M.; CHATTOPADHYAY, D. K.; SYAMALA RATHNAM, P. A.; MOHAN RAO, D. V. Thermal, mechanical and surface characterization of starch – poly (vinyl alcohol) blends and borax crosslinked films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 96, pag. 1313-1322, 2005.

STEVENS, P. V. Trace bio-organic constituents of gelatins: a review. *Food Australia*, vol. 44, pag. 320-324, 1992.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.487-506, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2004. 719 p.

TANADA-PALMU, P. S.; PROENÇA, P. S. P.; TRANI, P. E.; PASSOS, F. A.; GROSSO, C. R. F. Covering broccoli and parsley seeds with biodegradable films and coatings. **Bragantia**, Campinas, v.64, n.2, pag.291-297, 2005.

TANG, X.; ALAVI, S. Recent advances in starch, polyvinyl alcohol based polymer blends, nanocomposites and biodegradability. **Carbohydrate Polymers**. vol. 85, pag 1-16, 2011.

TAPIA-BLÁCIDO, D.; SOBRAL, P.J.; MENEGALLI, F.C. Development and characterization of biofilms based on Amaranth flour (*Amaranthus caudatus*). **Journal of Food Engineering**, vol.67, pag. 215-223, 2005.

TAVAKOLIPOUR, Hamid. Extraction and evaluation of gelatin from silver carp waste. **World Journal of Fish and Marine Sciences**., Sabzevar, v. 3, n. 1, p. 10-15, 2011.

TAVARES, M. A. **Amido, Álcool Polivinílico e Ácidos Carboxílicos na Produção de Biofilmes**. 45 f. Trabalho de Conclusão de Curso – TCC. (Universidade Tecnológica Federal do Paraná- UTFPR). Tecnologia em Processos Químicos. Apucarana, 2013.

TAYLOR, A.G., ALLEN, P.S, BENNETT, M.A., BRADFORD, K.J., BURRIS, J.S., AND MISRA, M.K, Seed Enhancements, **Seed Science Research**, v. 8, pag. 245-256, 1998.

TEIXEIRA, E. M. **Utilização de amido de mandioca na preparação de novos materiais termoplásticos**. 2007. 201 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Carlos, São Carlos. 2007.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Food Science and Technology**. v.14, p. 71-78, 2003.

TIEN, T. M.; GASKINS, M.H.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, p.1016-1024, 1979.

TOMLINSON, I. Doubling food production to feed the 9 billion : A critical perspective on a key discourse of food security in the UK. *J Rural Stud*. 29, 81–90. 2013.

TONGDEESOONTORN, W.; MAUER, L. J.; WONGRUONG, S.; SRIBURI, P.; RACHTANAPUN, P. Mechanical and physical properties of cassava starch-gelatin composite films. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 61, n.10, pag. 778-792, 2012.

TONKIN, J.H.B. Pelleting and other presowing treatments. **Advances of Seed Technology**, New York, v.4, pag.84-105, 1979.

TRENTINI, D. B. **Identificação dos alvos celulares das proteínas de tradução de sinal PII do diazotrófico de vida livre *Azospirillum amazoense***. 2010. 122 f. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010. 122 p.

TUDORACHI, N. et al. Testing of polyvinyl alcohol and starch mixtures as biodegradable polymeric materials. **Polymer Testing**, v. 19, n. 7, pag. 785–799, 2000.

ULUKAN, H. Agronomic Adaptation of Some Field Crops: A General Approach **J. Agronomy & Crop Science**, v 194, n. 3, pag. 169 – 179, 2008.

UTINO, S.; PETERS, V. J. Cultivo de arroz de terras altas no Estado de Mato Grosso. **Sistema de Produção**. n 7, 2006.

VAN SOEST, J. J. G.; Vliegenthart, J. F. G. Crystallinity in Starch plastics: consequence for materials proprieties. **Trends in Biotechnology**. v.15, pag. 208-213, 1997.

VAUGHAN, C. E.; GREGG, B. R.; DELOUCHE, J. C. Beneficiamento e manuseio de sementes. Brasília: **AGIPLAN**, Ministério da Agricultura, BID, pag. 195 p. 1976.

VEIGA-SANTOS, P. et al. Sucrose and inverted sugar as plasticizer. Effect on cassava starch–gelatin film mechanical properties, hydrophilicity and water activity. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, pag. 255–262, 2007.

VERCELHEZE, A. E. S.; FAKHOURI, F. M.; DALL'ANTÔNIA, L. H.; URBANO, A.; Y.; YAMASHITA, F.; MALI, S. Properties of baked foams based on cassava starch, sugarcane bagasse fibers and montmorillonite. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, pag. 1302-1310, 2012.

VERCELHEZE, A. E. S.; OLIVEIRA, A. L. M.; REZENDE, M. I.; O.; F.; MALI, S. Physical Properties, Photo- and Bio-degradation of Baked Foams Based on Cassava Starch, Sugarcane Bagasse Fibers and Montmorillonite. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, pag. 266-274, 2013.

VICENTINI, N.M. **Elaboração e caracterização de filmes comestíveis à base de fécula de mandioca para uso em pós-colheita**. Tese de Doutorado em Agronomia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2003.

VICTORIA, L.; LOVELL, G. Chemotaxis of *Azospirillum* species to aromatic compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, v 40, p. 705- 711, 1994.

VON PINHO, E. V. R.; SILVEIRA, J. F.; VIEIRA, M. G. G. C.; FRAGA, A. C. Influência do tamanho e do tratamento de semente de milho na preservação da qualidade durante o armazenamento e posterior comportamento no campo. **Ciência e Prática**, Lavras, v. 19, n. 1, pag. 30-36, 1995.

YAKIMETS, I.; WELLNER, N.; SMITH, A. C.; WILSON, R. H.; MITCHELL JUNIOR, E.. Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state. **Polymer**, vol. 46, n. 26, pag. 12577-12585, 2005.

YAKIMETS, I.; PAES, S. S.; WELLNER, N.; SMITH, A. C.; WILSON, R. H.; MITCHELL JUNIOR, E. Effect of water on the structural reorganization and properties of biopolymer films: a comparative study. **Biomacromolecules**. vol 8, pag. 1710- 1720, 2007.

WAQUIL, J. M.; MENDES, S. M.; VASCONCELOS, M. J.; PAIVA, E.; GUIMARÃES, C. T. Manejo de Milho Transgênico. In: CRUZ, J. C.; MAGALHÃES, P. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; MOREIRA, J. A. A. **O Produtor Pergunta a Embrapa Responde**. Pag. 01 – 16, 2011.

WEISS, J.; TAKHISTOV, P.; McCLEMENTS, D. J.; Functional Materials in Food Nanotechnology; **Journal of Food Science**; v. 71; n. 9; p. 107-116; 2006.

WEISMANN, M. **Fases de Desenvolvimento da Cultura de Milho**. Tecnologia e Produção: Milho Safrinha e Culturas de Inverno, 2008.

WEST, S.H. Polymers as moisture to maintain seed quality. **Crop Science**, Madison, WI, v.25, pag.91-94, 1983.

WILHELM, H.M.; SIERAKOWSKIA, M.R.; SOUZAB, G.P.; WYPYCHC, F.; Starch films reinforced with mineral clay. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 101–110, 2003.

WURZBURG, O. B. Cross-linked starches. In: WURZBURG, O. B. (ed.) **Modified starches: properties and uses**. Boca Raton: CRC Press, 1986. Cap. 3, pag. 41-53.

ZAVAREZE, E. R.; MELLO, S. L.; EL HALAL, A.; CAMPELLO, T.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Biodegradable films based on myofibrillar proteins of fish. **Braz. J. Food Technol.**, pag. 53-57, 2012.

ZIANI, K., URSÚA, B., MATÉ, J.I. Application of bioactive coatings based on chitosan for artichoke seed protection. **Crop Prot.** 29, 853–859, 2010.

ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade Microbiana como indicador da Qualidade do Solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília**, v. 20, n. 3, pag. 391-411, set./dez. 2003.

ZHONG, Q.P.; XIA, W.S. Physicochemical properties of edible and preservative films from chitosan/cassava starch/gelatine blend plasticized with glycerol. **Food Technology and Biotechnology**, vol. 46, n. 3, pag. 262-269, 2008.

ANEXO I



23/03/2017 870170019516
17:49



00.000.2.2.17.0208121.9

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2017 006046 2

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 78640489000153

Nacionalidade: Brasileira

Endereço: RODOVIA CELSO GARCIA CD, KM 380 S/N CAMPUS
UNIVERSITARIO

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86055-900

País: Brasil

Telefone: (043) 3371 5812

Fax: (043) 3371 5812

Email: aintecpi@uel.br

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)
Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):
REVESTIMENTO POLIMÉRICO PARA USO EM SEMENTES VISANDO A VEICULAÇÃO DE MICRORGANISMOS BENÉFICOS AO CRESCIMENTO DA PLANTA E OUTROS INSUMOS.
<p>Resumo: A presente invenção refere-se ao processo de produção de revestimento polimérico para sementes de importância agrícola para veiculação de microrganismos benéficos ao crescimento da planta e outros insumos, tais como nutrientes, bioestimulantes, protetores e outras substâncias de importância para a planta. A invenção aqui proposta descreve o uso de uma matriz polimérica obtida a partir de polímeros biodegradáveis, que será totalmente degradada pela ação de agentes físicos (umidade e temperatura) e de microrganismos do solo, sem deixar contaminantes no solo. Outra vantagem é que a composição proposta para o revestimento permite a incorporação de vários compostos ativos, além de manter a viabilidade de microrganismos promotores do crescimento vegetal por pelo menos 10 dias após sua aplicação sobre a semente. Não há inibição da germinação pelo revestimento.</p>

Inventor 1 de 4**Nome:** SUZANA MALI DE OLIVEIRA**CPF:** 57998523115**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Rua João Huss, 199, apto 602**Cidade:** Londrina**Estado:** PR**CEP:** 86050-490**País:** BRASIL**Telefone:** (43) 337 15812**Fax:****Email:** aintecpi@uel.br**Inventor 2 de 4****Nome:** ANDRÉ LUIZ MARTINEZ DE OLIVEIRA**CPF:** 44351780100**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Rua Caracas, 377, apto 403**Cidade:** Londrina**Estado:** PR**CEP:** 86050-070**País:** BRASIL**Telefone:** (43) 337 15812**Fax:****Email:** aintecpi@uel.br

Nome: ANA ELISA STEFANI VERCELHEZE

CPF: 02390834906

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Técnico de bioquímica e da biotecnologia

Endereço: Rua Serrado Amparo, 46

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86065-240

País: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Fax:

Email: aintecpi@uel.br

Inventor 4 de 4

Nome: ODAIR JOSÉ ANDRADE PAES DOS SANTOS

CPF: 00759312907

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Agrônomo e afins

Endereço: Rua Fortunato Moro, 77

Cidade: Londrina

Estado: PR

CEP: 86082-720

País: BRASIL

Telefone: (43) 337 15812

Fax:

Email: aintecpi@uel.br

REVESTIMENTO POLIMÉRICO PARA USO EM SEMENTES VISANDO A VEICULAÇÃO DE MICRORGANISMOS BENÉFICOS AO CRESCIMENTO DA PLANTA E OUTROS INSUMOS

Campo da Invenção

[001] A presente invenção refere-se ao processo de produção de revestimento polimérico para sementes de importância agrícola para veiculação de microrganismos benéficos ao crescimento da planta e outros insumos, tais como nutrientes, bioestimulantes, protetores e outras substâncias de importância para a planta. Este processo consiste na cobertura das sementes por uma matriz polimérica biodegradável que proporciona a estabilidade e viabilidade das células bacterianas imobilizadas nesta matriz, ou dos insumos a serem veiculados, como também sua liberação gradual ao longo do processo germinativo, aumentando a eficiência da inoculação e diminuindo a necessidade de aplicação de fertilizantes. Esta invenção situa-se no campo da biotecnologia, biomateriais, agronomia, microbiologia, ecologia e biologia.

Antecedentes da Invenção

[002] O aumento da população mundial ultrapassou a marca de 7,0 bilhões de habitantes, e prevê-se que alcançará em 2030 o número de 8,5 bilhões, 9,7 bilhões em 2050 e 11 bilhões em 2100 (ONU, 2015), e diante disso, a agricultura tem sido uma preocupação com o intuito de sustentar o crescimento das populações humanas. Dentro deste contexto, percebe-se um notável aumento a produção agrícola nas últimas quatro décadas, gerado pelo avanço da ciência, que permitiu o desenvolvimento de sistemas produtivos agropecuários cada vez mais dinâmicos e competitivos em nível nacional e internacional (EMBRAPA, 2014).

[003] Sendo assim, a agricultura moderna tem exigido dos diferentes segmentos mudanças profundas no sentido de racionalização do processo produtivo, objetivando minimizar o impacto no meio ambiente. Uma das alternativas concretas à diminuição da dependência da atividade agrícola por fertilizantes minerais e por agroquímicos consiste na ampliação da oferta de insumos biológicos de alta eficiência, como a tecnologia de inoculação de leguminosas com rizóbios e os microrganismos utilizados no controle biológico de pragas. Produtos comerciais contendo estes microrganismos são comumente denominados inoculantes ou biofertilizantes, e compreendem formulações contendo microrganismos vivos adicionados a um veículo inerte, recomendadas para aplicação sobre as sementes, superfície

vegetal ou solo. A utilização destes produtos objetiva a colonização da planta pelo microrganismo inoculado, para que os mecanismos microbianos de promoção do crescimento vegetal possam ser ativados.

[004] Inoculantes microbianos para uso agrícola representam uma tecnologia projetada para melhorar a produtividade dos agrossistemas no longo prazo, alinhada com os princípios da agricultura sustentável e da agroecologia, em oposição à utilização crescente de insumos industrializados. Sua recomendação de uso em cultivos comerciais vem ganhando espaço, bem como a gama de formulações comerciais disponíveis no mercado, apesar da maioria das formulações inoculantes comerciais não-rizobianas disponíveis serem preparadas com bactérias dos gêneros *Azospirillum* e *Bacillus*. Por outro lado, é também consenso que muitos dos produtos comercializados sofrem de baixa qualidade na formulação, resultando em heterogeneidade de resposta à inoculação, o que pode diminuir a confiança do setor produtivo nesta tecnologia. A máxima eficiência dos inoculantes comercializados nem sempre é obtida, e o desenvolvimento de novas formulações e novas estratégias de uso de biofertilizantes apresenta-se como necessidade para o aperfeiçoamento da tecnologia de inoculação.

[005] Novas estirpes de bactérias promotoras do crescimento são continuamente identificadas e descritas pela literatura, entretanto somente algumas destas novas estirpes alcança aplicação em inoculantes comerciais. Dentre as principais limitações que se encontram à uma aplicação mais ampla da tecnologia de inoculação com bactérias benéficas, está a necessidade de produção de biomassa contendo células bacterianas que se mantenham vivas e viáveis durante o período de armazenamento, e quando aplicadas sobre sementes e/ou solo. Em adição, a comercialização de sementes prontas para semeadura no solo, isto é, tratadas com agroquímicos e adicionadas de bactérias promotoras do crescimento vegetal, vem se apresentando como uma demanda crescente no mercado agrícola.

[006] A produção de sementes de alta qualidade genética, fisiológica, física e sanitária é um dos principais desafios da atualidade e para tal fim, diferentes tipos de tratamentos de sementes têm sido desenvolvidos, visando um melhor estabelecimento de plântulas no campo. Dentre estes tratamentos pode-se citar o condicionamento osmótico e o tratamento contra microrganismos (NASCIMENTO, 2000), o uso de sementes híbridas e transgênicas e o emprego de técnicas de revestimento (BAUDET. PERES, 2004), este último se destaca por ser uma técnica eficaz de tratamento na pré-semeadura, pelo fato de dar proteção às sementes contra agentes externos, possibilitar o fornecimento de nutrientes, oxigênio, reguladores de crescimento, proteção fitossanitária, herbicidas e também por permitir uma semeadura de precisão em cultivos com plantio direto (SAMPAIO; SAMPAIO, 1994).

[007] Com base no exposto acima, o desenvolvimento de novos materiais para a produção de revestimentos de sementes pode ser útil, pois resulta na obtenção de um veículo inerte para a incorporação de diferentes compostos de interesse às sementes, se tornando uma alternativa viável para uma agricultura sustentável. Este trabalho se insere neste contexto, através da produção de revestimentos biodegradáveis elaborados com amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico para a aplicação em sementes.

[008] Na patente PI 0004893-3, publicada em 2001 e reivindicada pela National Starch and Chemical investmente Holding Corporation (EUA), foi descrita a obtenção de revestimento para sementes de cereais, hortaliças, frutas e leguminosas, a partir da mistura de polímeros sintéticos, tais como copolímero de etileno e acetato de vinila, ou copolímero de acrilato de butila e acetato de vinila, ou terpolímero de acrilato de etila, acetonitrila e N-metitol acrilamida, ou ainda, terpolímero de metacrilato de metila, acrilato de butila e ácido metaacrílico. Esses revestimento têm o objetivo de auxiliar na germinação.

[009] Na invenção PI 0016537-9, publicada em 2003 e reivindicada pela empresa Kemira Growhow ou, com sede na Finlândia, foi desenvolvido um revestimento de semente para aperfeiçoar a eficiência de nutrientes de plantas durante o cultivo prematuro da planta, compreendendo um agente de fixação aquoso contendo um subproduto fluido de agricultura ou fermentação e um óleo emulsificado; e um pó fertilizante compreendendo nutrientes e traços de elementos requeridos pela planta e/ou outras substâncias que afetam o crescimento da planta. A invenção se refere a uma semente revestida tendo tal revestimento e a um método para revestir tais sementes.

[010] O documento PI 0518698-6 depositado em 2005 e publicado em 2008, reivindicado pela Syngenta Participations AG (CH), compreende monômeros aplicados a um material de propagação de planta raízes, tubérculos, bulbos e rizomas com características pesticidas e seu processo de obtenção, e muitos dos materiais empregados são sintéticos e não biodegradáveis.

[011] A patente PI 0708399-8 publicada em 2011 e reivindicada pela Bayer Cropscience LP, descreve a obtenção de revestimento à base de um aglutinante sintético (copolímero de etileno/acetato de vinila, ou homopolímero de acetato de vinila, ou copolímero de acrílico e acetato de vinila, ou vinilacrílico, ou acrílico, ou copolímero de etileno e cloreto de vinila, ou copolímero de éter vinílico e anidrido maléico), uma cera (natural, sintética, mineral ou vegetal), um pigmento e um estabilizante. Este revestimento tem o objetivo de veicular/aglutinar um ingrediente bioativo (inseticida ou fungicida) à semente.

[012] O documento PI 1102107-7 publicado em 2014 descreve um revestimento poroso aplicado a sementes e o processo de obtenção do mesmo, revestimento este composto por

farinha de trigo, fermento e material biodegradável, que vai fornecer à semente microambiente adequado para a sua germinação.

[013] A invenção PI 0205826-0 compreende um revestimento composto por um substrato celulósico impregnado por cera, onde a composição de cera é composta substancialmente de um substrato de celulose de hidrocarbonetos parafínicos, capaz de resistir a temperaturas baixas.

[014] Dentre as patentes depositadas em outros países, podemos descrever algumas, tais como a patente americana US 3947996 de 1976, que descreve a obtenção de um revestimento para diferentes tipos de sementes, contendo polímero insolúvel em água e álcool polivinílico, que fornece proteção à semente contra insetos, fungos e outros microrganismos, além de impedir a sua germinação prematura.

[015] Na patente US 4665648 de 1987, foram obtidos revestimentos à base de celulose e plastificantes, tais como os polietileno-glicóis e ésteres de ácidos graxos. Na patente US 5470581 de 1995, foi descrita a obtenção de revestimento aquoso à base de maltodextrina e polímero celulósico.

[016] Na patente US 5916029 de 1999 é descrita a formulação e o processo de obtenção de revestimento à base de carboidratos (goma arábica, e/ou sacarose, e/ou arabinogalactanas, e/ou metilcelulose), incorporado de bactérias promotoras do crescimento vegetal, tais como as do gênero *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, incluindo as espécies *R. meliloti*, *R. leguminosarum* biovar *trifolii*, *R. leguminosarum* biovar *viceae*, *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*, and *B. japonicum*.

[017] A patente US 6274162 de 2001 descreve a produção de revestimento de gelatina, ou hidroximetilcelulose, ou pela mistura de ambos os materiais, e com adição de outros aditivos, tais como, os plastificantes.

[018] Na patente US 6202346 reivindicada pela Pioneer Hi-Bred International Inc., Coating Machinery Systems Inc., está descrita a obtenção de um revestimento contendo um material particulado insolúvel (argila ou calcário) contendo um polímero solúvel em água, com objetivo de aumentar o volume de sementes para facilitar o seu plantio.

[019] Na invenção americana US 20040077498 de 2004 está descrito o preparo de revestimento de sementes à base de derivados de celulose (ftalato de acetato de celulose, ftalato de hidroxipropilcelulose, ftalato de hidroximetil celulose, ftalato de metilcelulose), ftalato de acetato de polivinila, polivinilpirrolidona e copolímero de poliviniltermaleico, alél de plastificantes e surfactantes, para a veiculação de inseticidas, bactericidas, pesticidas, fungicidas e hormônios.

[020] A patente americana US 7774978 de 2010 descreve a obtenção de revestimento para veiculação de compostos ativos empregando polímeros insolúveis em água após cura, tais como, polimetacrilato, polimetacrilato, dentre outros, além de derivados de celulose e outros aditivos naturais e sintéticos.

[021] Nas várias patentes de composição/preparo de revestimentos para sementes já existentes, a maioria traz o uso de polímeros sintéticos na sua composição, em contrapartida, esta invenção descreve o uso de uma matriz polimérica obtida a partir de polímeros biodegradáveis, que será totalmente degradada pela ação de agentes físicos (umidade e temperatura) e de microrganismos do solo, sem deixar contaminantes no solo.

[022] Outra vantagem é que a composição proposta para o revestimento permite a incorporação de vários compostos ativos, além de manter a viabilidade de microrganismos promotores do crescimento vegetal, tais como os da espécie *Azospirillum brasilense* Ab-V5 (registrado no Brasil para inoculantes comerciais) por pelo menos 10 dias após a sua aplicação sobre a semente. Não há inibição da germinação pelos revestimentos.

[023] O revestimento aqui descrito pode ser aplicado em diferentes tipos de sementes (leguminosas, cereais, frutas, ornamentais e hortaliças). A invenção traz em sua composição a mistura de três polímeros biodegradáveis: amido de mandioca, gelatina e álcool polivinílico, além da presença de glicerol e montmorilonila sódica (nanoargila). Não existem patentes, ou produtos no mercado, que apresentem esta mesma formulação.

Sumário da Invenção

[024] A presente invenção refere-se ao processo de produção de revestimento polimérico para sementes de importância agrícola para veiculação de microrganismos benéficos ao crescimento da planta e outros insumos, tais como nutrientes, bioestimulantes, protetores e outras substâncias de importância para a planta.

REIVINDICAÇÕES

1. REVESTIMENTO POLIMÉRICO PARA USO EM SEMENTES VISANDO A VEICULAÇÃO DE MICRORGANISMOS BENÉFICOS AO CRESCIMENTO DA PLANTA E OUTROS INSUMOS, caracterizado por ser um processo de revestimento polimérico para sementes de importância agrícola para veiculação de microrganismos benéficos ao crescimento da planta e outros insumos, tais como nutrientes, biostimulantes, protetores e outras substâncias de importância para a planta, e mantém esses microrganismos promotores do crescimento vegetal por pelo menos 10 dias após sua aplicação sobre a

semente; consiste na cobertura das sementes por uma matriz polimérica biodegradável que proporciona a estabilidade e viabilidade das células bacterianas imobilizadas nesta matriz, ou dos insumos a serem veiculados, como também sua liberação gradual ao longo do processo germinativo, aumentando a eficiência da inoculação e diminuindo a necessidade de aplicação de fertilizantes.

2. REVESTIMENTO POLIMÉRICO PARA USO EM SEMENTES VISANDO A VEICULAÇÃO DE MICRORGANISMOS BENÉFICOS AO CRESCIMENTO DA PLANTA E OUTROS INSUMOS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o revestimento aqui descrito poder ser aplicado em diferentes tipos de sementes como leguminosas, cereais, frutas, ornamentais e hortaliças.

3. REVESTIMENTO POLIMÉRICO PARA USO EM SEMENTES VISANDO A VEICULAÇÃO DE MICRORGANISMOS BENÉFICOS AO CRESCIMENTO DA PLANTA E OUTROS INSUMOS, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por, para a produção da matriz polimérica empregada como revestimento em sementes de interesse agrícola são utilizados 3 polímeros, o amido de mandioca, a gelatina e o álcool polivinílico (com grau de hidrólise de 85-88%), além de outros dois aditivos, o glicerol e a nanoargila sódica (montmorilonita); os revestimentos foram produzidos por *casting*, técnica em que uma solução filmogênica (3% m/v) é produzida em meio aquoso e colocada sobre a semente para desidratar; as proporções entre os polímeros no revestimento podem variar, e estão preferencialmente na seguinte faixa: amido de mandioca (0,01%-50%), gelatina (0,01%-50%) e álcool polivinílico (0,01%-33%), nanoargila sódica não modificada (montmorilonita) (0,2g/100g polímero) e glicerol (20g/100g polímero); inicialmente hidrata-se a gelatina em água destilada durante 1 hora em temperatura ambiente; após, a solução deve ser aquecida a 55°C por 30 minutos; paralelamente, o álcool polivinílico (PVA) deve ser dissolvido em água destilada e aquecido à 95°C por 30 minutos sob agitação constante; a solução de amido de mandioca é preparada utilizando-se o amido em água destilada, e a mistura deve ser aquecida à 90°C por 10 minutos; por fim, são misturadas todas as soluções preparadas, é feita a adição do glicerol e da nanoargila, o material deve ser agitado continuamente em Banho Maria à 90°C por 30 minutos até obtenção de uma mistura homogênea; posteriormente, cada formulação deve ser esterilizada em autoclave por 15 minutos, sob temperatura de 121°C e pressão de 1 atm, e resfriada até temperatura próxima de 20-25°C; em seguida, 1 Kg de sementes são misturadas a 100 mL de solução de revestimento, com homogeneização manual

ou mecânica por 15 minutos sob ventilação constante; as sementes revestidas devem ser secas por 24 horas à 25°C; nas formulações em que se emprega o microrganismo *Azospirillum brasilense* Ab-V5, após o preparo e autoclavagem (121°C-15 min) e resfriamento da solução filmogênica, deve ser adicionado 10 mL de meio de cultura contendo $2,0 \times 10^7$ células do microrganismo à 90 mL da solução filmogênica, processo este seguido de homogeneização manual, e revestimento das sementes, quando 100 mL desta solução são aplicados a 1 Kg de sementes, seguindo de homogeneização manual ou mecânica por 15 minutos sob ventilação constante; as sementes revestidas devem ser secas por 24 horas à 25°C.

ANEXO II

Development of biodegradable coating and its influence on germination of corn seeds

*Ana Elisa S. Vercelheze, André L. M. Oliveira and Suzana Mali**

Department of Biochemistry and Biotechnology, CCE, State University of Londrina, PO
BOX 6001, 86051-990, Londrina - PR, Brazil.

Abstract

The objectives of this work were to develop biodegradable coatings based on starch, gelatin and polyvinyl alcohol (PVA) and to characterize them according their microstructure and barrier properties, and also their influence on germination of corn seeds. Firstly, there were developed films using an experimental simplex-centroid mixture design with 10 experiments, employing different proportions of starch (0 - 3.0 g / 100 g formulation), gelatin (0 - 3.0 g / 100 g formulation) and PVA (0 to 3.0 g / 100 g formulation). The films based on the pure polymers showed the highest values of water absorption capacity, solubility and water vapor permeability, and the ternary mixtures (containing the three polymers) showed the lowest values. The same formulations studied for the preparation of films were used to coat two genotypes of corn seeds. The formulations obtained with pure polymers and with the binary mixture of starch and gelatin favor the germination when compared to the uncoated sample. The coatings developed in this work represent an alternative for coating of corn seeds, since most formulations did not interfere with the water supply and did not restrict seed germination.

Keywords: Cassava starch; Gelatin; Polyvinyl Alcohol; Seed Coating.

* To whom correspondence should be addressed: Tel: +55 43 3371-4270, Fax: +55 43 3371-4054, E-mail: smali@uel.br

1. Introduction

The global food production must increase by 70 - 100% by 2050 in order to feed the world in 2050, and to produce food to feed this increasing population will require from researchers an effort to develop new technologies to obtain sufficient quantity and quality of food without degrading the soil health and agro-ecosystem, ensuring the sustainability of agriculture (Kashyap, Xiang, Heiden, 2015; Tomlinson, 2013).

According to Pedrini et al. (2017), between the several strategies to increase the crop production the practice of coating seeds has been used almost a century. Seed coating consists in the application of exogenous materials to the surface of the natural seed coat, which permits the incorporation of several active compounds without changes on seeds shapes. Generally, the coatings are based on adhesive polymers causing a weight gain of

at most 2% (Avelar et al., 2012).

The use of biodegradable polymers in the development of seed coatings has some advantages, such as the possibility to reduce the use of synthetic materials and to result in non-toxic residues when these materials were in contact with soil. On the other hand, an important feature of the seed coatings is that they do not negatively affect the germination and vigor of the seeds (Oliveira et al., 2009).

There are some works reporting the use of biodegradable coatings on different seeds. Almeida et al. (2005) and Tanada-Palmu et al. (2005) reported that hydroxyethylcellulose and chitosan-gelatin coatings, respectively, did not affect the germination and vigor of broccoli seeds. Oliveira et al. (2009) reported that coatings based on carboxymethylcellulose and sodium alginate did not affect the germination capacity of bean seeds. Ziani et al. (2010) reported that coatings based on chitosan with the addition of an antifungal agent enhanced the germination and quality of artichoke seeds, and decreased the fungi contamination.

Starch, gelatin and polyvinyl alcohol are biodegradable polymers that has been largely studied for production of different biodegradable materials, but the ternary mixture of them was not yet described in literature to obtain seed coatings. The seed coating market had a global value estimated at US\$ 53.76 billion/year in 2014, and the use of this technology in developing countries can affect the global market for polymers, colourants, and bulking agents that are used in seed coating formulations, it is expected to reach US\$1.63 billion/year by 2020 (Pedrini et al., 2017).

Thus, the objectives of this work were to develop biodegradable coatings based on starch, gelatin and polyvinyl alcohol and to characterize these coatings according its microstructure and barrier properties, and also its influence on germination performance of corn seeds.

2. Material and Methods

2.1 Materials

Cassava starch was purchased from Yoki Alimentos SA (Brazil), pure gelatine with a gel strength of 150 - 220 g from Biotec (São Paulo - Brazil), polyvinyl alcohol (PVA) with a degree of hydrolysis of 85-88% from Reagen (Colombo – Brazil) and Na-montmorillonite (Closite® Na⁺) was purchased from Southern Clay Products (USA). The seeds used in the study were hybrid corn 2B5874X from Dow AgroSciences (Indiana – USA) and P30F53H from Dupont (Delaware – USA).

2.2 Methods

2.2.1 Coatings preparation

An experimental simplex-centroid mixture design with 10 experiments was employed to evaluate the effect of starch (X_1), gelatin (X_2) and PVA (X_3) on coatings

properties. In all experiments, the film-forming solutions were always prepared with 3% (m/v) of polymer (pure or in mixture), as established in the experimental design (Table 1).

The coatings were produced as follows: initially, the gelatin was hydrated in distilled water at room temperature for 1 h and then solubilized at 55°C for 30 min. PVA was heated at 95°C for 30 min under constant stirring and cassava starch was heated at 90°C for 10 min. Finally, the three polymers were mixed according the experimental design (Table 1) with continuous stirring at 90°C for 30 min until a homogeneous mixture was obtained. Glycerol (20 g/100 g polymer) and Na-montmorillonite (0.02 g/100 g polymer) were added and manually mixed to the filmogenic solutions. The pH of filmogenic solutions ranged from 5.57 to 6.16.

The corn seeds were coated with the filmogenic solutions using 10 mL of each formulation (Table 1) for each 100 g of seeds. The mixture was homogenized for 15 min under constant ventilation, and then the coated seeds were stored for 24 h at 25 °C until complete drying.

In order to characterize the coatings properties, there were produced films using the same formulations determined in the experimental design (Table 1), 20 g of the each filmogenic solution formulation was applied onto acrylic plates to dry in an air circulation oven (Marconi MA 035) at 30°C for 24 h. The formed films were removed from the plates and they were stored for 4 days at 25°C and 58% relative humidity before characterization.

2.2.2 Films characterization

2.2.2.1 Thickness

The thickness of the samples was determined using a Mitutoyo micrometer (Brazil) with a resolution of 10 micrometers. For each formulation was performed an arithmetic average of 5 points in 3 films samples.

2.2.2.2 Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy

Pulverized and dried samples were mixed with potassium bromide and compressed into tablets. FTIR analysis was performed using a Shimadzu-8400 FTIR instrument (Japan). Measurements were performed in triplicate, and 100 scans were run in the spectral range of 4000-400 cm^{-1} . The spectral resolution was 4 cm^{-1} .

2.2.2.3 Solubility in water

The solubility in water was defined as the dry matter content that was solubilized after 4 or 24 h of immersion in water at 25°C. Analyses were performed in triplicate as described by Gontard et al. (1992).

2.2.2.4 Water vapor permeability (WVP)

WVP was determined according to ASTM E96-00 (2000), using three different relative humidity (RH) gradients (0–33 %, 33–64 %, 64–90 %). The salt solutions (33 % - magnesium chloride, 64 % - sodium nitrate and 90 % - barium chloride) were prepared and held at 25°C. The coatings were fixed into the openings of cells containing a salt solution that provided a lower relative humidity (0 %, 33 % or 64 %, depending on the case) and placed in a hermetic chamber containing a salt solution that provided a higher relative humidity (33, 64 or 90 %, depending on the case). The chamber with the diffusion cells was kept at 25°C, and weight gain was recorded and plotted as a function of time. The slope of each line was calculated by linear regression ($r^2 > 0.99$), and the water vapor transmission rate (WVTR) was calculated from the slope of the straight line (g/s) divided by the transport area (m^2). WVP ($\text{g} \cdot \text{Pa}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-1}$) was calculated as $\text{WVP} = [\text{WVTR}/S (R_1 - R_2) \cdot D]$, where S is the saturation

vapour pressure of water (Pa) at the given temperature (25°C), R_1 is the RH inside the desiccator, R_2 is the RH inside the permeation cell, and D is the thickness of the film (m). All tests were conducted in triplicate.

2.2.2.5 Water absorption capacity (WAC)

Samples with 2 x 2 cm were weighed and submerged in 100 ml of distilled water, at room temperature. The specimens were placed in contact with the water at different times (1, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min), then the excess water was removed with paper towel and they were weighed to evaluate the mass increment at each time. The assays were performed in triplicate. The water absorption capacity was calculated as the percentage of water absorbed per sample.

2.2.2.6 Morphology of coated seeds

The seeds used in the analysis were the hybrid corn 2B5874X from Dow AgroSciences (Indiana – USA). The morphology of uncoated and coated seeds was observed by scanning electron microscopy employing a FEI Quanta 200 (Oregon – EUA) microscope. The seeds were dried in an air circulation oven (Marconi MA 035) at 35 °C for 24 h and kept in desiccators containing anhydrous calcium chloride for 1 week. The samples were then coated with a thin layer of gold and the images were taken using an acceleration voltage of 20 kV.

2.2.2.7 Germination tests

The germination testes were conducted according to the rules for seed testing (Brasil, 2009). Four replications of 50 seeds each were placed on two layers of germitex™ paper moistened with water equivalent to three times the substratum weight and germinated in a germinator (DeLeo - Brazil) at 25 °C. Seedling counts were performed at 7 days after

planting. The mean percentage of normal seedlings was calculated for each lot. Uncoated seed were employed as a control test.

2.2.2 Statistical analysis

For the analysis of some of the films and coating properties there were obtained cubic mathematical models (Equation 1) using Statistica 7.0 software (Statsoft, Oklahoma, USA):

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{123} X_1 X_2 X_3 \text{ (Equation 1)}$$

Where Y is the dependent variable or response, β_1 , β_2 , β_3 , β_{12} , β_{13} , β_{23} , and β_{123} are the estimated parameters for each linear and interaction term obtained from the models, in which the variables were cassava starch (X_1), gelatin (X_2), and PVA (X_3). Contour graphs were obtained for the analysis of the effects of the studied variables.

For FT-IR and SEM no mathematical models were constructed. WAC data were submitted to the Tukey's test for means comparison ($p \leq 0.05$) using software Statistica 7.0 (Statsoft, Oklahoma, USA).

3. Results and Discussion

All films formulations resulted in transparent films without pores or cracks, however, regarding to the handling, the formulations CS100, CS66.7GL16.7PVA16.7 and CS16.7GL66.7PVA16.7 were more brittle when compared to the other formulations. In general the films thicknesses ranged from 110 to 130 μm .

Figure 1 shows the FT-IR spectra of the films produced in this work. The band observed at 3450 cm^{-1} that was observed for the pure starch films (CS100) can be attributed to due to the O–H stretching of hydroxyl groups (Melo et al., 2011). In the films produced with

pure PVA (PVA100), a discrete band with respect to the stretching of O-H groups appears at 3250 cm^{-1} , a region also reported by Han et al. (2009) for PVA films.

Films produced with the binary or ternary mixtures presented a discrete band at 3700 cm^{-1} , which could be attributed to free and bounded O-H and N-H groups (Moraes et al., 2008). The O-H groups in starch, O-H and N-H groups in gelatin, O-H in glycerol (plasticizer) and O-H in adsorbed water are certainly capable of forming inter and intramolecular hydrogen bonds with C=O groups, which were present on aminoacids of gelatin or polyvinyl alcohol structures.

The band at 2917 cm^{-1} refers to C-H stretch of structures of saturated groups of CH_2 and CH_3 (Han et al., 2009) and was also present in all samples (Figure 1).

In the film with pure PVA (PVA100), appeared a band at 1743 cm^{-1} (Figure 1) that could be attributed to the carbonyl groups (C=O) present in the acetate residues remaining in the polymer structure after its production from the hydrolysis of polyvinyl acetate (Jayasekara et al., 2004). In this sample, other bands appear between 1240 and 1100 cm^{-1} , and these bands did not appear or appear with small intensity in the blends with the PVA (Figure 1). Han et al. (2009) report that bands of 1200 - 1100 cm^{-1} are related to the crystalline fractions of PVA, and that these bands may disappear when the crystallinity of the material changes, possibly the thermal processing of PVA during films production caused these changes on crystallinity of this polymer.

The film produced with pure gelatin (GL100) showed bands related to C=O stretching at 1627 cm^{-1} (amide I) and with angular deformation of N-H at 1530 cm^{-1} (amide II), and other one at 1240 cm^{-1} , which can be attributed to the C-N and the N-H stretch (amide III) vibrational band (Moraes et al., 2008; Yakimets et al., 2005), and these bands appeared discretely in the binary and ternary mixtures containing gelatin (Figure 1).

In general, it can be seen that the spectra of the films obtained with the pure polymers presented their respective characteristic bands with greater intensity than in the binary and ternary mixtures, indicative of the interactions between them. According to Han et al. (2009), starch and PVA interact through hydrogen bonds between hydroxyl groups present in the structure of the two polymers. Moraes et al. (2008) reported the interaction capacity between gelatin and PVA. Zhong and Xia (2008) observed the formation of hydrogen bonds between the hydroxyl groups of the starch and the amino groups of the proteins.

The results of solubility in water at 4 and 24 h were presented in Table 2, and the coefficient obtained from the mathematical model were presented in Table 3. The solubility (4 h) ranged from 13.32 to 61.65 %, and the higher value was obtained for PVA100 film, formulated with pure PVA. Solubility (24 h) values ranged from 40.88 to 84.61 %, and also the higher value was obtained for PVA100 film (Table 2).

The model obtained for solubility (4h) was significant at a 5% significance level ($p = 0.0423$) and presented a R^2 equal to 0.95, while the solubility (24h) model was not significant ($p = 0.1222$) and presented R^2 equal to 0.90 (Table 3).

The linear effects of the three independent variables cassava starch (X_1), gelatin (X_2), and PVA (X_3) were positive and significant for the two solubility responses (4 and 24 h), and the higher linear effect was observed for the variable X_3 (PVA) in both cases (Table 3). Furthermore, the binary interactions X_1X_3 and X_2X_3 had a negative effect on solubility (4 h) and only the interaction X_2X_3 had a significant and negative effect on the solubility (24 h) (Table 3). In Figure 2, it was observed that the solubility values at 4 and 24 h presented the same trend, with the higher values in the region of higher PVA content.

Fakhouri et al. (2007) reported that the solubility in water of biodegradable film based on gelatin and wheat starch was 24.38, and for films based on gelatin and rice starch was 30.20%, lower values than those presented in this study. According to the authors, this

property directs the application of the film, and in some cases, its total solubilization in water may be beneficial.

WVP was determined at three gradients of relative humidity (Δ RH), 0-33%, 33-64%, 64-90%, with different absolute values of RH (Table 2), and it can be observed that the WVP values of the films increased with the increase of the absolute values of RH. The same trend was observed by Müller et al. (2008) and Santos et al. (2013), which reported that WVP is controlled by the solubility coefficient of water in the films, and under higher absolute values of RH, this coefficient increases resulting in higher water permeation through the films. According to Bertuzzi et al. (2007), the permeability to water vapor depends on the solubility and diffusion coefficient of the water vapor through the film, and these parameters increase with the increase of the absolute values of the UR.

The mathematical models obtained for WVP in the different relative humidity gradients are presented in Table 3. The models were not significant at a 5% level of significance, and the coefficient of determination (R^2) values were 0.90 for WVP (Δ 0-33%, $p = 0.1266$), 0.67 for WVP (Δ 33-64%, $p = 0.5300$) and 0.66 for WVP (Δ 64-90%, $p = 0.5500$), and even models not fitting the experimental data they were used to study the WVP trend.

It was observed that the effects of the linear variables were the most important and positively influenced WVP response, and in the two gradients of Δ 0-33% and Δ 33-64%, the effect of starch (X_1) was more important, whereas for the Δ 64-90% gradient, the effect of gelatin (X_2) was more important. WVP results (Figure 3) presented the same trend observed for solubility results, the formulations with the pure polymers were the ones with the highest responses. In Table 4 were presented the results of the WAC at different times (1, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 min). For all samples, WAC increased significantly with increase of time (Table 4). After 1 min, WAC values ranged from 128% (ternary mixtures CS66.7GL16.7PVA16.7 and

CS16.7GL66.7PVA16.7) to 274% (formulation PVA100). After 30 min of analysis, the WAC varied between 284% (ternary mixture AM1.0GL1.0AP1.0) and 740% (CS100).

The formulation containing pure PVA (PVA100) (Table 4) was broken into small pieces after 5 min of assay, and it was not possible to collect the material for weighing. This formulation presented the highest moisture and solubility as previously observed (Table 2). The solubility of PVA is largely influenced by its degree of hydrolysis, and in this work we employed polyvinyl alcohol partially hydrolyzed (~ 88%), and according to Tang and Alavi (2011), PVA with lower degrees of hydrolysis has higher solubility than ones with higher degrees because of its lower crystallinity, which results in materials more susceptible to interaction with water. When this polymer has higher degrees of hydrolysis, the greater number of free hydroxyl groups increases the number of interactions (hydrogen bonds) carried out between the polymer chains, leaving less free hydroxyls to interact with the water, resulting in a decrease in their solubility.

The sample produced with the binary mixture of starch and gelatin (CS50GL50) showed high values of WAC at all times (Table 4), however, it presented low values of solubility, which makes it an interesting formulation for the coating of seeds, since the film swells, but does not dissolve when in contact with the water. According to Carvalho and Nakagawa (2000) and Ghadari-Far et al. (2010), water is one of the factors that most influences the seed germination process, thus a seed coating that provides a higher water content can enhance germination process of seeds.

In Figure 4 it can be observed the micrographs obtained by scanning electron microscopy of the uncoated and coated seeds. In uncoated seed (control - Figure 4) it was observed a smooth surface with no roughness, and it is expected that these characteristics will be preserved after the coating is applied. According to Silva and Nakagawa (1998), the physical integrity of the coating is an important property, after the drying process, the coating must not fall apart or break during transport, handling and mechanized seeding. In Figure 4 it

is possible to observe small cracks in the the seeds coated with GL100, PVA100, GL50PVA50, CS66.7GL16.7PVA16.7 and CS16.7GL66.7PVA16.7, which may be related to the seed coating drying process or handling. However, it is worth noting that these cracks were not observed in the visual analysis of the seeds.

In general, it can be seen that the other formulations of the coatings resulted in an uniform layer on the corn seeds surfaces (Figure 4), with completely coated and smooth surfaces, without roughness and brittle points.

The results of germination assays of Dow AgroSciences and Dupont corn seeds with and without coating are shown in Table 2. In general, when the germination (%) of uncoated (control) and coated seeds are compared it can be observed that the application of the coatings did not result in a decrease in germination (%) for the two types of genotypes used in this work (Table 2), but that the lowest values were observed for the seeds coated with the ternary mixtures of the polymers.

The coefficients of the mathematical models obtained for the germination of the genotypes of seeds are presented in Table 3. None of the models was significant at a 5% significance, and the coefficient of determination (R^2) were 0.70 for Dow AgroScience seeds ($p = 0.4924$) and 0.40 for Dupont seeds ($p = 0.8819$), but they were used to study the tendency of this response. For the two seed genotypes (Table 3), the germination presented the same response trends, the linear effects of the three independent variables cassava starch (X_1), gelatin (X_2), and PVA (X_3) were positive and significant.

For Dow AgroSciences genotype 2B5874X (Table 2), the formulations CS100, GL100, PVA100 and CS50GL50 favored the germination process, with percentages of germination of 90, 90, 89 and 91%, respectively, when compared with the control sample, which presented a 86% of germination. Similar results were found for Dupont P30F53H corn genotype (Table 2). These results can be attributed by the characteristics of these coatings

formulations. Hydrophilic polymers readily absorb water and, when applied to the seeds as coatings, they can absorb the available water around the sowing site, forming a reservoir for the seed (Pradella et al., 1989), and in this work, the formulations with a the better results of germination were the ones that presented the highest water absorption capacity.

Some coating formulations affected negatively the germination of the seeds, for the Dow Agro Sciences genotype, these formulations were CS50PVA50, CS16.7GL66.7PVA16.7 and CS33.3GL33.3PVA33.3 (Table 2) and for the Dupont genotype, these formulations were CS50PVA50, CS16.7GL66.7PVA16.7 and CS16.7GL16.7PVA66.7 (Table 2). This probably could be attributed to the deficiency in the water supply for the seeds, due to the barrier formed by the coating. It is worth noting that corn seed is crop that is very demanding in water, and water is very important throughout the plant life cycle, exerting a great influence on the germination (Cruz et al., 2010). Thus, it can be observed that the formulations that had a negative influence on the germination process could have prevented the access of water to the seed, and these samples presented the lowest values of solubility, water absorption capacity and water vapor permeability.

4 Conclusions

The biodegradable films produced with cassava starch, gelatin and PVA resulted in continuous and homogeneous materials, and the processing conditions established in the study, such as the amount of solids and the preparation method contributed to obtain coatings with suitable characteristics. The pH values of the filmogenic solutions found in this work were close to neutrality, which is an interesting feature for the materials produced, since they can serve as a polymeric matrix for the immobilization of nutrients or microorganisms.

The formulation that presented the highest value of water absorption capacity was the sample CS100, formulated with pure starch, and on the other hand, the sample that

presented the lowest water absorption value was the ternary mixture with the same proportions of starch, gelatin and PVA (CS33.3GL33.3PVA33.3). The ternary mixtures also presented the lowest values of solubility, water absorption capacities and water vapor permeabilities.

The sample produced with the binary mixture between starch and gelatin (CS50GL50) presented a combination of high values of water absorption capacity with low values of solubility, which makes it an interesting formulation for seed coating, since its use resulted in the swell of the coating, which did not dissolve in contact with water. This was confirmed by the results of germination of corn seeds coated with the CS50GL50 formulation, which presented higher germination values in both seeds genotypes tested in this work.

References

- Alexandre, S., Avelar, G., Sousa, F.V. De, Fiss, G., Baudet, L., Peske, S.T., 2012. The use of film coating on the performance of treated corn seed. *Rev. Bras. Sem.* 134, 186–192.
- Almeida, C., Rocha, S. C. S., Razer, L. F., 2005. Recobrimento polimérico, germinação e vigor de sementes de brócolos *Sci. Agric.* 62, 221-226.
- American Society For testing and Materials – ASTM, 2000. Standard test method for water vapor transmission of material – E96-00. Annual book of ASTM Standards. Philadelphia: ASTM.
- Bertuzzi, M.A., Castro Vidaurre, E.F., Armada, M., Gottifredi, J.C., 2007. Water vapor permeability of edible starch based films. *J Food Eng.* 80, 972-978.
- Brasil, 2009. Regras para análise de sementes. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009. 399p.
- Carvalho, N.M., Nakagawa, J., 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção, Jaboticabal: FUNEP.
- Fakhouri, F.M., Cristina, L., Fontes, B., Vieira, P., Gonçalves, D.M., Milanez, C.R., Steel, C.J., Collares-queiroz, F.P., 2007. Filmes e coberturas comestíveis compostas à base de amidos nativos e gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas Crimson the conservation and sensory acceptance of Crimson grapes. *Ciência Tecnol. Alim.* 27, 369–375.
- Ghaderi-Far, F., Gherekhloo, J., Alimagham, M., 2010. Influence of Environmental Factors on Seed Germination and Seedling Emergence of Yellow Sweet Clover (*Melilotus officinalis*). *Planta Daninha.* 28, 463–469. doi:10.1590/S0100-83582010000300002
- N. Gontard, N., Guilbert, S., Cuq J.L., 1992. Edible wheat gluten films: influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. *J Food Sci.* 57, 190.

- Lal, P., Xiang, X., Heiden, P., 2015. International Journal of Biological Macromolecules Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. International Journal of Biological Macromolecules. 77, 36–51. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.02.039
- Melo, C., Garcia, P.S., Grossmann, M.V.E., Yamashita, F., Dall'Antônia, L.H., Mali, S., 2011. Properties of extruded xanthan-starch-clay nanocomposite films. Braz. Arch. Biol. Techn. 54, 1223–1333. doi:10.1590/S1516-89132011000600019
- Oliveira, A. F., Soldi, V., Coelho, C.M.M., Miqueloto, A., Coimbra, J.L.M, 2009, Preparação, caracterização e propriedades de filmes poliméricos com potencial aplicação no recobrimento de sementes. Quim. Nova. 32, 1845-1849.
- Pedrini, S., Merritt, D.J., Stevens, J., Dixon, K., 2017. Seed Coating : Science or Marketing Spin ? Trends Plant Sci. 22, 106–116. doi:10.1016/j.tplants.2016.11.002
- Pradella, D. Z. A.; Pompéia, S.L.; Martins, S.E., 1989. Peletização de sementes em gel hidrofílico. Rev. Bras. Sem. 11, 43-52.
- Han, X., Chen, S., Hu, X., 2009. Controlled-release fertilizer encapsulated by starch/polyvinyl alcohol coating. Desalination. 240, 21–26. doi:10.1016/j.desal.2008.01.047
- Jayasekara, R., Harding, I., Bowater, I., Christie, G.B., Lonergan, G., 2004. Preparation, surface modification and characterisation of solution cast starch PVA blended films. Polymer Test. 23, 17–27. doi:10.1016/S0142-9418(03)00049-7
- Moraes, I., Silva, G., 2008. Influência do grau de hidrólise do poli (vinil álcool) nas propriedades físicas de filmes à base de blendas de gelatina e poli (vinil álcool) plastificados com glicerol. Ciência Tecnol. Alim. 738–745. doi:10.1590/S0101-20612008000300034
- Müller, C.M.O., Yamashita, F., Laurindo, J.B., 2008. Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. Carbohydr Polym. 72, 82–87. doi:10.1016/j.carbpol.2007.07.026
- Santos, R.A.L., Muller, C.M.O., Grossmann, M.V.E., Mali, S., Yamashita, F., 2014. Starch/poly (butylene adipate-co-terephthalate)/montmorillonite films produced by blow extrusion. Quim. Nova. 37, 937–942.
- Tanada-Palmu, P. S.; Proença, P. S. P.; Trani, P. E.; Passos, F. A.; Grosso, C. R. F., 2005. Recobrimento de sementes de brócolos e salsa com coberturas e filmes biodegradáveis. Bragantia. 4, 291-297.

- Tang, X., Alavi, S., 2011. Recent advances in starch, polyvinyl alcohol based polymer blends, nanocomposites and their biodegradability. *Carbohydr. Polym.* 85, 7–16. doi:10.1016/j.carbpol.2011.01.030
- Tomlinson, I., 2013. Doubling food production to feed the 9 billion : A critical perspective on a key discourse of food security in the UK. *J Rural Stud.* 29, 81–90. doi:10.1016/j.jrurstud.2011.09.001
- Yakimets, I., Wellner, N., Smith, A.C., Wilson, H., Farhat, I.Mitchell, J., 2005. Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state. *Polymer.* 46, 12577-12585.
- Zhong, Q.P., Xia, W.S., 2008. Physicochemical properties of edible and preservative films from chitosan/cassava starch/gelatin blend plasticized with glycerol. *Food Technol. Biotech.* 46, 262–269.
- Ziani, K., Ursúa, B., Maté, J.I., 2010. Application of bioactive coatings based on chitosan for artichoke seed protection. *Crop Prot.* 29, 853–859. doi:10.1016/j.cropro.2010.03.002

Figure Captions

Figure 1 – FTIR spectra of films samples.

Figure 2 – Contour plots of solubility of films samples.

Figure 3 – Contour plots of water vapor permeability of films samples.

Figure 4 – SEM images of uncoated and coated seeds with different formulations.

Figure 5 – Contour plots of germination of seeds.

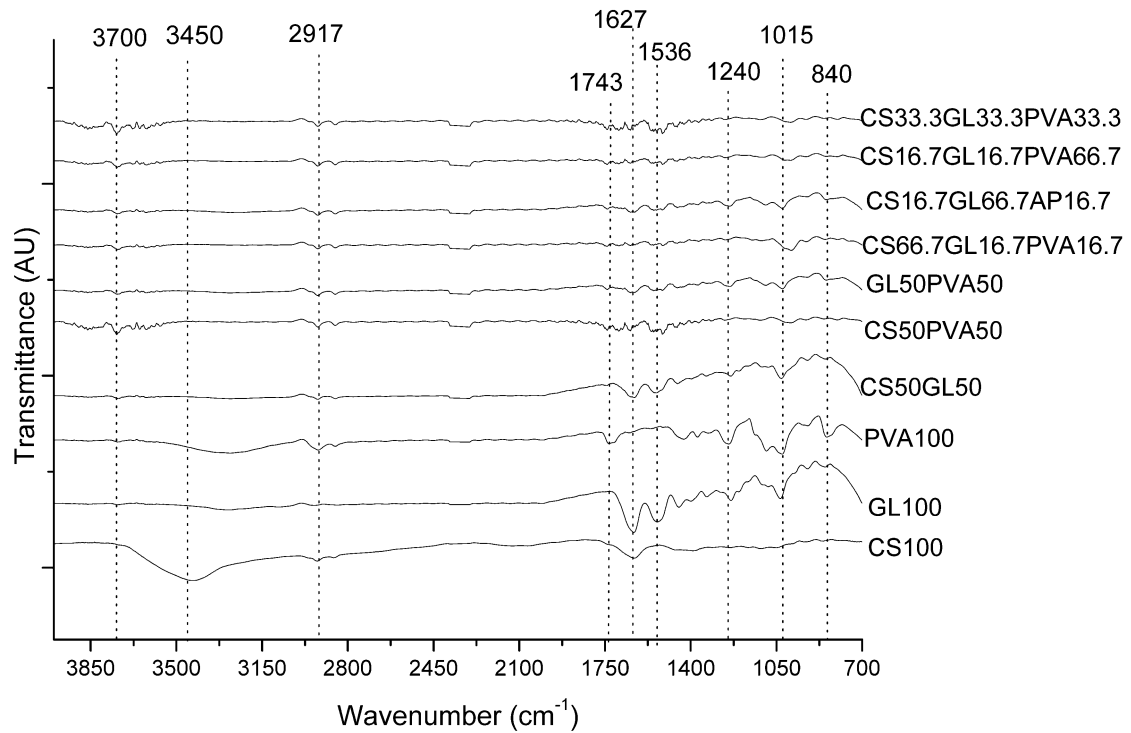


Figure 1

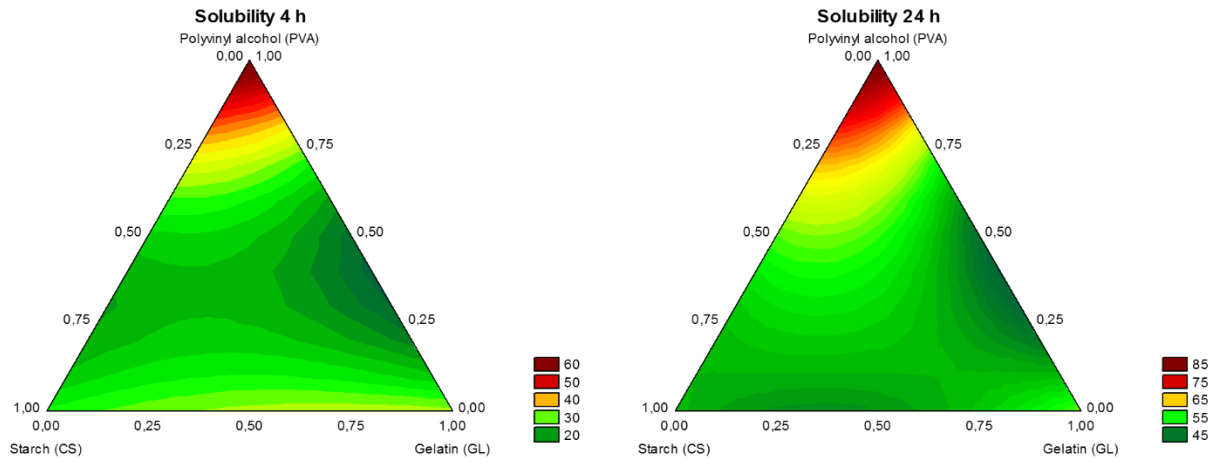


Figure 2

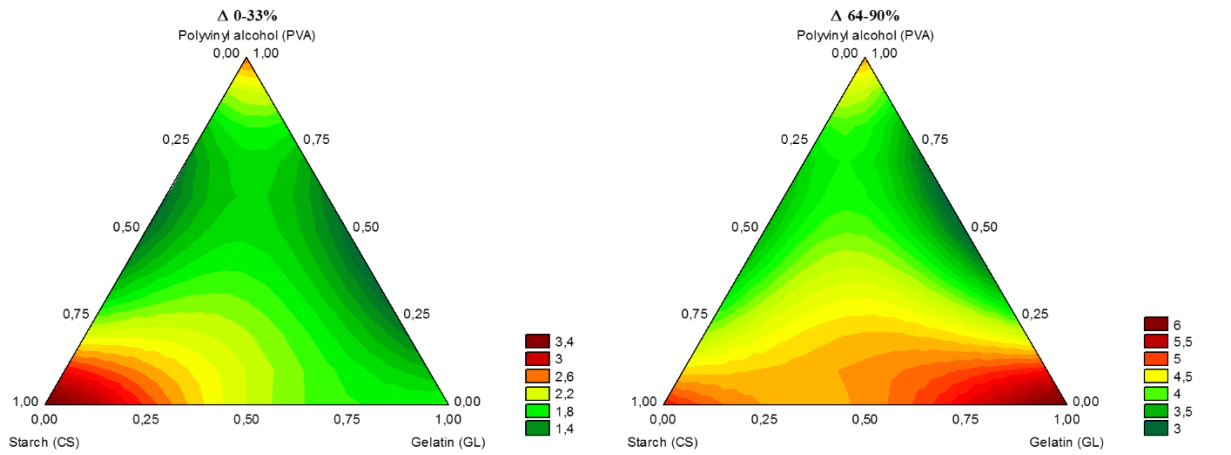


Figure 3

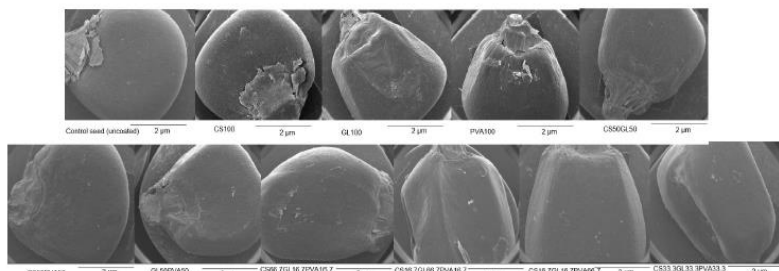


Figure 4

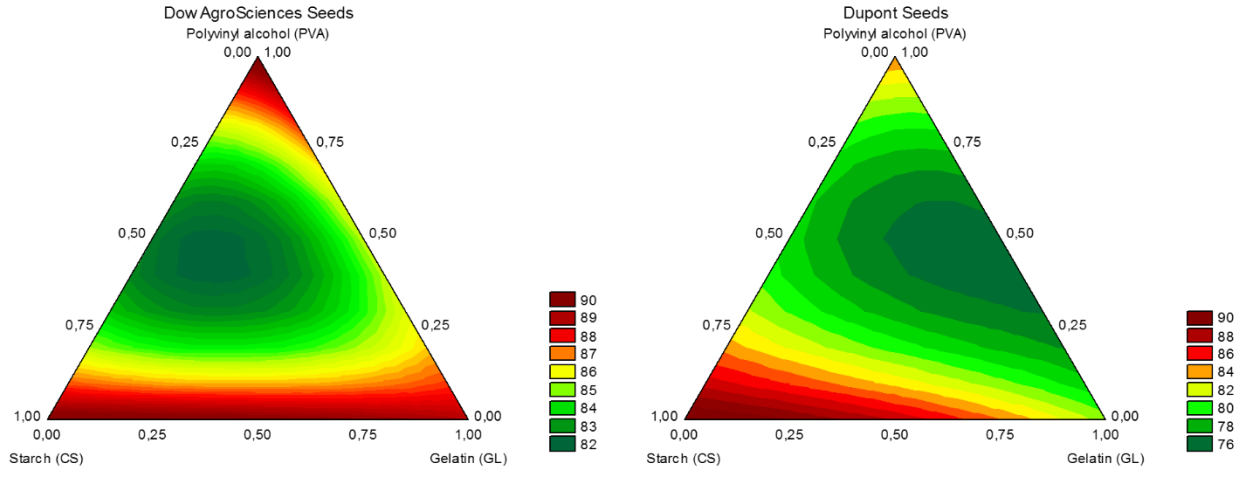


Figure 5

Table 1 – Mixtures composition in the filmogenic solutions formulated with cassava starch, gelatin and polyvinyl alcohol (PVA) in a three-component constrained simplex-centroid mixture design.

Formulations	Polymers proportions on filmogenic solution (%m/v)		
	Starch (X_1)	Gelatin (X_2)	PVA (X_3)
CS100	3	0	0
GL100	0	3	0
PVA100	0	0	3
CS50GL50	1.5	1.5	0
CS50PVA50	1.5	0	1.5
GL50PVA50	0	1.5	1.5
CS66.7GL16.7PVA16.7	2.0	0.5	0.5
CS16.7GL66.7PVA16.7	0.5	2.0	0.5
CS16.7GL16.7PVA66.7	0.5	0.5	2.0
CS33.3GL33.3PVA33.3	1.0	1.0	1.0

Table 2 – Experimental results of solubility, water vapor permeability and germination.

Formulations	Solubility		Water vapor permeability ($\text{g m}^{-1}\text{s}^{-1}\text{Pa}^{-1}$) $\times 10^{10}$			Germination (%)	
	4h (%)	24 h (%)	ΔRH (0-33%)	ΔRH (33-4%)	ΔRH (64-90%)	Dow AgroSciences seeds	DuPont seeds
CS100	27.22	49.80	3.45	3.85	4.72	90 \pm 2 ^a	89 \pm 2 ^a
GL100	28.75	54.68	1.75	2.92	6.00	90 \pm 2 ^a	82 \pm 8 ^{ab}
PVA100	61.65	84.61	2.68	4.88	5.10	89 \pm 1 ^{ab}	87 \pm 4 ^a
CS50GL50	29.44	45.27	1.90	2.35	4.23	91 \pm 1 ^a	87 \pm 4 ^a
CS50PVA50	24.49	55.76	1.17	2.26	3.47	81 \pm 6 ^b	80 \pm 6 ^b
GL50PVA50	13.32	40.88	1.13	2.04	3.20	85 \pm 8 ^{ab}	80 \pm 7 ^b
CS66.7GL16.7PVA16.7	21.70	51.34	2.71	4.65	5.75	85 \pm 8 ^{ab}	84 \pm 6 ^b
CS16.7GL66.7AP16.7	28.79	56.29	2.04	4.18	5.50	82 \pm 2 ^b	71 \pm 3 ^c
CS16.7GL16.7PVA66.7	28.87	64.39	1.45	2.67	2.78	88 \pm 4 ^{ab}	65 \pm 2 ^d
CS33.3GL33.3PVA33.3	18.12	45.47	1.55	2.90	3.95	82 \pm 5 ^b	86 \pm 3 ^a
Uncoated seeds	-	-	-	-	-	86 \pm 6 ^{ab}	88 \pm 8 ^a

Different letters in the same column indicate significant difference by Tukey test ($p \leq 0.05$).

Table 3 – Regression coefficients and ANOVA of mixture design models ^a.

Coefficient	Solubility		Water vapor permeability			Germination	
	4h	24 h	Δ RH	Δ RH	Δ RH	Dow AgroSciences	DuPont
			(0-33%)	(33-64%)	(64-90%)	Seeds	Seeds
β_1	26.49**	49.52***	3.56***	5.10**	5.09**	89.95**	90.41**
β_2	30.83***	56.66***	1.83**	3.24	6.12**	88.77**	80.50**
β_3	61.21***	85.12***	2.58***	4.43**	4.72**	90.40**	84.05**
β_{12}	8.50	-24.49	-2.41	-0.17	-3.51	1.45	5.83
β_{13}	-82.14**	-45.32	-7.54	-1.84	-5.74	-31.27	-35.07
β_{23}	-124.26***	-110.08**	-4.35	-1.31	-9.89	-17.64	-26.88
β_{123}	88.89	224.38	21.24	0.84***	31.17***	-55.06	-49.76
p (model)	0.0423**	0.1222	0.1226	0.5300	0.5500	0.4924	0.8819
R ²	0.95	0.90	0.90	0.67	0.66	0.70	0.40

^a – β_1 = cassava starch; β_2 = gelatin; β_3 = polyvinyl alcohol and ** $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.01$.