



Universidade Federal de São Carlos

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Curso de Engenharia Agrônoma



GLÓRIA COSTA MACHADO

**EFEITO DA ADIÇÃO DA BIOMASSA DE *Phormidium autumnale* EM
FILMES BIODEGRADÁVEIS DE ALGINATO DE CÁLCIO**

ARARAS - 2022



Universidade Federal de São Carlos

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Curso de Engenharia Agrônoma



GLÓRIA COSTA MACHADO

**EFEITO DA ADIÇÃO DA BIOMASSA DE *Phormidium autumnale* EM
FILMES BIODEGRADÁVEIS DE ALGINATO DE CÁLCIO**

Monografia apresentada ao Curso de
Engenharia Agrônoma – CCA – UFSCar para
a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo

Orientador: Profa. Dra. Mariana Altenhofen da
Silva

ARARAS – 2022

Esse trabalho é dedicado a Wagner Cesar Machado, Angela Maria da Costa e Vitória Camila C. Machado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq e à Profa. Dra. Mariana Altenhofen da Silva, foram anos de muita paciência, parceria e dedicação, ao Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos, à Dra. Catarina Amorim Oliveira e ao pessoal do LABMAC por me auxiliarem com os materiais e testes para realização deste trabalho.

Agradeço aos meus avós, meus pais, Wagner e Angela, e minha irmã, Vitória, que sempre apoiaram as minhas decisões e me incentivaram aos estudos.

Também agradeço a quem esteve comigo no dia a dia da vida universitária, às mulheres maravilhosas da República Viracopos que me proporcionaram crescer muito nesses 5 anos em um lar com muito amor e fraternidade, ao Gabriel Lang, pelo companheirismo e apoio, e aos demais colegas que fiz durante a graduação, essas são pessoas que estiveram sempre me ajudando em todos os momentos e celebrando minhas pequenas conquistas.

**“Quem semeia valores capazes de
representar - ou de servir - a comunidade,
vive enquanto viver esta comunidade.”**

Hélio Pellegrino

RESUMO

O presente trabalho propôs o desenvolvimento de filmes biodegradáveis de alginato com adição de biomassa da microalga *Phormidium autumnale* visando a sua aplicação em alimentos e/ou na agricultura. Filmes de alginato sem e com adição de biomassa microalgal em diferentes concentrações (0,06 e 0,1% m/v em relação a solução polimérica), submetidos ou não ao processo de homogeneização da biomassa, foram produzidos e avaliados quanto as suas propriedades de aspecto visual e morfológico, espessura, transparência, conteúdo de umidade, solubilidade, grau de intumescimento (GI), permeabilidade ao vapor de água (PVA), estrutura química (FTIR), concentração de nitrogênio total (NT) e concentração de compostos fenólicos totais. Os filmes desenvolvidos apresentaram matriz polimérica contínua e homogênea, com coloração esverdeada nos filmes com biomassa, característica da microalga. A etapa de homogeneização da biomassa se mostrou eficiente para uniformizar a distribuição da biomassa na matriz polimérica. Houve a tendência no aumento da solubilidade e do PVA, além do aumento significativo de GI e NT nos filmes com a adição da biomassa. A presença da microalga também reduziu a transmitância e aumentou a opacidade dos filmes na região do UV-Vis. Os filmes com adição de biomassa apresentaram bandas acentuadas no número de onda 3235 cm^{-1} , indicando a presença de compostos fenólicos e lipídios. Em relação aos compostos fenólicos totais, houve o aumento significativo destes nos filmes com microalga em relação ao filme de alginato puro, indicando um possível caráter antioxidante dos filmes. Os resultados obtidos demonstram um potencial de aplicação dos filmes em alimentos e/ou na agricultura.

Palavras-chave: microalga; cianobactéria; biopolímeros; filmes biodegradáveis.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Visualização de <i>P. autumnale</i> em aumento de 40x (Visentin, 2020).. | 14 |
| Figura 2. Estrutura química do alginato (Lee & Mooney, 2012). | 19 |
| Figura 3. Representação esquemática do modelo “caixa de ovos” para alginato (Costa <i>et al.</i> , 2018). | 19 |
| Figura 4. Aparato experimental utilizado para determinação da permeabilidade ao vapor de água..... | 27 |
| Figura 5. Aspecto visual dos filmes de alginato sem e com adição de biomassa microalgal. | 29 |
| Figura 6. Microscopia ótica dos filmes de alginato sem e com adição de biomassa microalgal com o aumento de 40x..... | 30 |
| Figura 7. Micrografias da superfície e seção transversal (após fratura) dos filmes de alginato sem e com adição de biomassa microalgal..... | 32 |
| Figura 8. Espectro de transmitância (a) e opacidade dos filmes de alginato sem e com adição de biomassa microalgal..... | 34 |
| Figura 9. Perfil cinético de absorção de água dos filmes de alginato sem e com adição de biomassa microalgal..... | 36 |
| Figura 10. Espectros FTIR dos filmes de alginato sem e com adição de biomassa microalgal. | 39 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Composição dos filmes de alginato sem e com adição de biomassa de <i>P. autumnale</i> | 25 |
| Tabela 2. Umidade, solubilidade e grau de intumescimento dos filmes de alginato sem e com adição de biomassa microalgal. | 35 |
| Tabela 3. Espessura e permeabilidade ao vapor de água dos filmes de alginato sem e com adição de biomassa microalgal. | 38 |
| Tabela 4. Concentração de nitrogênio total dos filmes de alginato sem e com adição de biomassa microalgal..... | 39 |
| Tabela 5. Concentração de compostos fenólicos totais dos filmes de alginato sem e com adição de biomassa microalgal | 40 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 12 |
| 2.1. Microalgas | 12 |
| 2.1.1. <i>P. autumnale</i> | 13 |
| 2.2. Usos de biomassa microalgal e seus extratos | 14 |
| 2.3. Filmes Biodegradáveis..... | 16 |
| 2.4. Biopolímeros..... | 18 |
| 2.4.1. Alginato | 18 |
| 2.5. Uso de microalgas em materiais biodegradáveis | 20 |
| 3. OBJETIVOS | 22 |
| 3.1. Objetivos Gerais | 22 |
| 3.2. Objetivos Específicos | 22 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 23 |
| 4.1. Matérias-primas | 23 |
| 4.2. Obtenção da biomassa de <i>P. autumnale</i> | 23 |
| 4.3. Processo de fabricação dos Filmes | 23 |
| 4.3.1. Filmes de alginato puro | 23 |
| 4.3.2. Filmes de alginato com adição de biomassa microalgal | 24 |
| 4.4. Caracterização dos filmes..... | 25 |
| 4.4.1. Aspecto visual | 25 |
| 4.4.2. Espessura | 25 |
| 4.4.3. Propriedades radiométricas..... | 25 |
| 4.4.4. Morfologia..... | 26 |
| 4.4.5. Conteúdo de umidade | 26 |
| 4.4.6. Solubilidade em água | 26 |
| 4.4.7. Permeabilidade ao vapor de água (PVA)..... | 26 |
| 4.4.8. Grau de Intumescimento | 27 |
| 4.4.9. Estrutura química | 28 |
| 4.4.10. Nitrogênio total | 28 |
| 4.4.11. Compostos fenólicos totais..... | 28 |
| 4.5. Análises Estatísticas..... | 28 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 29 |
| 6. CONCLUSÃO | 41 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 42 |

1. INTRODUÇÃO

Diversas pesquisas destacam o potencial biotecnológico das microalgas, as quais, devido à versatilidade de crescimento, são consideradas recursos estratégicos, já que não requerem grandes áreas como as culturas agricultáveis, evitando a competição com o uso da terra. A imensa biodiversidade e variabilidade na composição da biomassa microalgal obtida de diferentes fontes, aliada ao melhoramento genético e ao desenvolvimento de tecnologias de cultivo em grande escala, tem permitido o emprego comercial de diversas espécies de microalgas (Sudhakar *et al.*, 2019).

O cultivo de microalgas é explorado visando à produção de biomassa tanto para uso na elaboração de produtos, quanto para a obtenção/extração de compostos de alto valor agregado. Dentre os compostos obtidos destacam-se proteínas, lipídios, carboidratos, pigmentos, vitaminas, esteróis e outros compostos passíveis de utilização nos diversos segmentos industriais, em alguns casos via aproveitamento de subprodutos, caracterizando uma biorrefinaria (Sudhakar *et al.*, 2019, Andrade *et al.*, 2020).

Neste sentido, o uso de biomassa microalgal e seus componentes já são propostos para diversas aplicações, tais como produção de biodiesel a partir da fração lipídica da biomassa, desenvolvimento de alimentos funcionais enriquecidos com moléculas bioativas, uso como fertilizantes na agricultura ou aditivos em ração animal. Além disso, outro mercado potencial para aplicação da biomassa microalgal, ainda pouco explorado, é o desenvolvimento de materiais renováveis e/ou biodegradáveis para aplicações na área de alimentos, farmacêutica e na agricultura (Fabra *et al.*, 2017).

Estudos do nosso grupo de pesquisa tem apontado a viabilidade de cultivo da cianobactéria filamentosa *Phormidium autumnale* tanto em meio sintético como em efluentes agroindustriais, como a vinhaça de cana de açúcar, com remoções de carbono orgânico total e nitrogênio total, além da biomassa gerada sugerir possíveis aplicações (Visentin *et al.*, 2019, Visentin, 2020).

O mercado de bioplásticos apresentou uma capacidade de produção global de 2,11 milhões de toneladas em 2019 e estima-se que este valor cresça 15% até 2024 (European Bioplastics, 2019). O setor de embalagens representa a maior aplicação dos bioplásticos com mais de 53% do total produzido em 2019, enquanto aplicações na agricultura representam aproximadamente 8% desse total. Diante deste

cenário, a demanda por biopolímeros também tem crescido nos últimos anos em termos de desenvolvimento tecnológico e aplicações comerciais (Fabra *et al.*, 2018). Dentre os polímeros naturais, polissacarídeos como amido, celulose, alginato, pectina e quitosana tem atraído atenção especial devido a sua vasta disponibilidade, custo e biodegradabilidade. (Medina-Jaramillo *et al.*, 2016, Fabra *et al.*, 2017, Carissimi *et al.*, 2018).

O alginato de sódio é um polissacarídeo hidrofílico extraído de diversas espécies de algas pardas (Phaeophyceae). Devido a sua capacidade de reagir irreversivelmente com íons divalentes, sobretudo com o cálcio, filmes de alginato tendem a formar matrizes coesas com boas propriedades mecânicas e de barreira para aplicações nas áreas de alimentos, farmacêutica, cosmética, têxtil e agrícola, porém, novos avanços ainda são possíveis através da incorporação de outros recursos naturais que podem melhorar a performance dos biocompósitos (Han & Wang, 2017).

As microalgas representam uma matéria-prima promissora para utilização como aditivo ou material de reforço na preparação de compostos biopoliméricos, pois além da alta produtividade e da habilidade de crescer em ambientes diversos, os aspectos físicos da biomassa reduzem a necessidade de etapas de pré-tratamento e extração, tornando o processo escalonável a um menor custo (Zeller *et al.*, 2013, Fabra *et al.*, 2017).

Alguns estudos relatam a produção de blendas de polímeros sintéticos com adição de biomassa microalgal residual (RMB) do processo de produção de biodiesel, agregando valor ao produto devido ao menor custo de produção e aproveitamento de resíduos. Processos comumente utilizados na indústria de plásticos, como extrusão e injeção, têm sido avaliados para o desenvolvimento de compósitos plásticos híbridos contendo RMB, demonstrando que a substituição de até 20% do polímero sintético pela RMB é viável resultando em materiais com propriedades mecânicas aceitáveis (Torres *et al.*, 2015).

No entanto, há poucos estudos sobre o uso de microalgas no desenvolvimento materiais renováveis e biodegradáveis, como filmes e coberturas (Yan *et al.*, 2016, Fabra *et al.*, 2017, Fabra *et al.*, 2018, Carissimi *et al.*, 2018). Acredita-se que este tópico tende a despertar o interesse de pesquisadores como forma de enfrentar os desafios da crescente demanda por matérias renováveis e/ou biodegradáveis.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Microalgas

As microalgas abrangem um grupo de micro-organismos de diferentes naturezas, incluindo tanto organismos fotossintetizantes eucarióticos como algas clorofíceas (Chlorophyta), quanto organismos procariotos, como cianobactérias (Cyanophyceae) (Mata *et al.*, 2010). Tradicionalmente, a classificação das microalgas tem sido realizada quanto ao tipo de pigmento, natureza química dos produtos de reserva, constituição da parede celular, além de critérios da citologia e morfologia. Além de serem micro-organismos predominantemente aquáticos, também se encontram em ecossistemas terrestres, representando uma diversidade de espécies em diversas condições ambientais (Andrade *et al.*, 2020, Mata *et al.*, 2010).

As microalgas podem ser divididas em Cyanophyta, Prochlorophyta, Chlorophyta, Rhodophyta, Heterokontophyta, Euglenophyta, Dinophyta, Cryptophyta, Glaueophyta e Haptophyta, englobando diversas classes de microalgas com ampla utilização biotecnológica (Andrade & Colozzi Filho, 2014).

A divisão Cyanophyta contempla as cianobactérias, micro-organismos singulares por possuírem organização celular procariótica e pela ausência de flagelos e da maioria das organelas (Lourenço, 2006). Por esse motivo estão mais relacionados às bactérias procarióticas do que com as algas eucarióticas. São Gram-negativos e exibem ampla diversidade morfológica, englobando seres de formas filamentosas, unicelulares ou agrupados em colônias (Reviere, 2010).

Cianobactérias receberam esse nome devido à presença de um pigmento azul-esverdeado, chamado de ficocianina que juntamente com ficoeritrina (pigmento avermelhado), tendem a mascarar a pigmentação da clorofila (Reviere, 2010). Diferenciam-se das bactérias por possuírem clorofila *a* e por apresentarem fotossistemas I e II, possibilitando a realização da fotossíntese oxigênica. Possuem um sistema elaborado de membranas internas responsáveis pelo transporte de elétrons da cadeia respiratória e fotossintética (Andrade & Colozzi Filho, 2014).

Com relação à parede celular das cianofíceas, esta é composta principalmente por peptidoglicano, polímero formado de N-acetilglucosamina, ácido N-acetilmurâmico e outros aminoácidos, adjacente à membrana celular. Externamente à camada de peptidoglicano tem-se outra de lipopolissacarídeos (Lourenço, 2006). A parede celular também é formada por uma bainha mucilaginosa, constituída de

carboidratos, que em alguns casos auxilia a cianobactéria no processo de deslizamento (movimentação) (Reviere, 2010).

Cianobactérias possuem como principal produto de reserva um polissacarídeo formado por monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo α -1,4, chamado de "amido das cianofíceas", que se difere do amido por ter ramificações maiores quando comparado à cadeia principal de polissacarídeos (Lourenço, 2006).

Além disso, cianobactérias continuam se adaptando a alterações ambientais, tolerando flutuações de salinidade, mudanças de temperatura, pH e baixa disponibilidade de nutrientes. Essa tolerância provavelmente está associada à condição de ser procarionte, pela simplicidade de sua célula, se tornando uma vantagem se tratando de sua função como organismo pioneiro em ambientes recém-formados (Lourenço, 2006).

Da mesma forma, também atuam no aproveitamento de carbono, nitrogênio e fósforo presentes no meio, realizando a ciclagem desses nutrientes em biomassa, surgindo uma tecnologia promissora pelo equilíbrio de vetores sustentáveis com o aproveitamento de compostos poluentes (Santos *et al.*, 2019, Visentin *et al.*, 2019). Sua biomassa oferece características interessantes como alternativas de matérias-primas para várias aplicações industriais, ambientais e em sistemas de biorrefinarias, pois possuem capacidade de desenvolver bioprodutos como lipídios, proteínas, carboidratos, pigmentos, possibilitando sua utilização em biocombustíveis, fertilizantes, cosméticos, alimentos para animais, medicamentos, entre outros (Zhu, 2015, Galanopoulos *et al.*, 2019).

2.1.1. *P. autumnale*

P. autumnale é uma cianobactéria filamentosa que vem demonstrando notoriedade em pesquisas (Rodrigues *et al.*, 2015, Francisco *et al.*, 2019, Santos *et al.*, 2019, Visentin, 2020). Apresenta filamentos de 3 a 6 μ m de diâmetro, não ramificada (Figura 1), e é capaz de sobreviver, por longos períodos em ambientes desérticos e ao congelamento, podendo tornar-se metabolicamente ativa após reidratação (Rodrigues *et al.*, 2015).



Figura 1. Visualização de *P. autumnale* em aumento de 40x (Visentin, 2020)

Sua característica morfológica filamentosa facilita a separação da biomassa dos meios de cultivo, o que deve ser levado em consideração, sendo um dos gargalos tecnológicos da produção de biomassa microalgal em larga escala visando à diminuição de custos (Lourenço, 2006, Klein *et al.*, 2018).

Estudos tem demonstrado o potencial dessa cianobactéria para a utilização em processos de biorremediação e para produção de óleos unicelulares, apresentando um teor médio de lipídios de 7% a 15%. Também se adapta em efluentes com altas cargas orgânicas e nutricionais, podendo ser aplicada para remoção de matéria orgânica, nitrogênio total e fósforo além de gerar biomassa rica em bioprodutos (Francisco *et al.*, 2019, Santos *et al.*, 2019, Visentin, 2020).

2.2. Usos de biomassa microalgal e seus extratos

Microalgas, incluindo as cianobactérias, além do alto teor proteico e lipídico, são fontes reconhecidas de substâncias bioativas tais como pigmentos, ácidos graxos poli-insaturados, aromas, vitaminas, hormônios, compostos fenólicos, exopolissacarídeos, dentre outras (Rizwan *et al.*, 2018). Muitos destes compostos derivados de microalgas têm sido comercialmente utilizados em diversas aplicações na área de alimentos, farmacêutica, médica, cosmética e agricultura.

Nos últimos anos, o interesse pelas microalgas como fontes comerciais destes e outros biocompostos de alto valor agregado tem se intensificado, em parte devido a tentativas de se viabilizar a produção de biocombustíveis a partir de microalgas. Neste sentido, o termo “biorrefinaria microalgal” inclui o aproveitamento de águas residuárias para o desenvolvimento de microalgas com posterior geração de biomassa e extração de bioprodutos de alto valor agregado (Santos *et al.*, 2016, Rizwan *et al.*, 2018).

Microalgas como *Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, e *Schizochytrium* são classificadas como fontes de alimentos sendo reconhecidas como GRAS (*Generally recognized as safe*) pela Agência Americana para Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration*, FDA). Conseqüentemente, muitos compostos de alto valor agregado produzidos por microalgas podem ser administrados na forma de biomassa seca ou liofilizada, sem necessidade de extração (Walker *et al.*, 2005). Dentre as principais espécies de microalgas utilizadas na área de alimentos e farmacêutica estão a *Chlorella* e a *Spirulina*, porém, outras vem ganhando espaço no mercado de alimentos saudáveis como a *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Schizochytrium*, *Scenedesmus*, *Aphanizomenon*, *Odontella* e *Porphyridium*. No entanto, ainda existem desafios a serem enfrentados em termos de legislação e regulamentação do uso de microalgas e seus extratos nas diversas aplicações, sobretudo em alimentos (Borowitzka, 2013, Chacón-Lee & González-Mariño, 2010).

As cianobactérias podem apresentar alto teor proteico, apresentando em média 57% de proteínas, o que as torna fonte alternativa de nutrição em relação outros alimentos, como a carne e a soja. Atualmente, a cianobactéria mais consumida como suplemento de alto valor nutricional é a *Spirulina*, sendo comercializada na forma de comprimidos, barras e como constituinte de outros produtos. Proteínas microalgais também são utilizadas na alimentação animal, associadas a melhora na resposta imunológica, aumento de fertilidade e ganho de peso, e na aquicultura como alimentação de larvas de diversas espécies de peixes, crustáceos e moluscos (Borba & Ferreira, 2018).

Além do potencial para produção de biodiesel devido a sua capacidade de acumular altas concentrações de lipídeos unicelulares, as frações lipídicas das cianobactérias também apresentam em seu perfil lipídico rico em ácidos graxos poli-insaturados (EPA e DHA - ω 3) (Perez-Garcia *et al.*, 2011).

As cianobactérias possuem paredes celulares diferenciadas em comparação com outras bactérias Gram-negativas. Essa diferença está na presença da camada de peptidoglicano que é mais espessa e apresenta um grau maior de reticulação entre as cadeias polissacarídicas. Além disso, diversas cianobactérias caracterizam-se pela presença de exopolissacarídeos (EPS), como é o caso da *P. autumnale*, sendo de grande interesse para aplicações no setor alimentício, farmacêutico, biomédico e de biorremediação. Os EPS de cianobactérias são mais

complexos quando comparados a outros micro-organismos, e apresentam físico-químicas potencialmente úteis (Di Pippo *et al.*, 2013).

Em um estudo recente, Nascimento *et al.* (2020) apresentaram dados de composição química, perfil de ácidos graxos, perfil de carotenoides e compostos orgânicos voláteis da cianobactéria *P. autumnale* cultivada em meio BG11 a 25°C, com o intuito de indicar o potencial de uso da biomassa desta microalga como alimento não convencional. Em média, a composição da biomassa em umidade, proteínas, lipídeos, fibras, cinzas e carboidratos foi de 4,01%, 50,20%, 15,49%, 0,72%, 7,12% e 22,43%, respectivamente.

Morançais *et al.* (2018) relatam que existem três classes de pigmentos encontrados em microalgas, são eles as clorofilas, carotenoides e ficobiliproteínas, sendo os dois últimos de maior interesse comercial, sendo amplamente utilizados em cosméticos e alimentos. Rodrigues *et al.* (2015) indicaram que a *P. autumnale* foi capaz de produzir quantidades consideráveis de carotenoides, clorofilas e ficobiliproteínas em condições de cultivo fotoautotrófico e sugerem o potencial antioxidante desta biomassa.

Estudos também apontam aplicações das microalgas na agricultura como biofertilizante de solo, principalmente pelo aproveitamento da biomassa residual (RMB), após a extração da fração lipídica para de biodiesel. Desta maneira, as microalgas viabilizam a reciclagem de compostos nitrogenados e fosfatados e minerais acumulados em sua biomassa, como um fertilizante (Mata *et al.*, 2010; Renuka *et al.*, 2016; Suganya *et al.*, 2016, Bettani *et al.*, 2019). Coppens *et al.* (2016) compararam o cultivo de tomate em estufa fertilizados com biomassa de microalgas, com sistemas convencionais de fertilizantes inorgânico e orgânico. Os autores concluíram que os fertilizantes de microalgas melhoraram a qualidade dos frutos, pelo aumento do teor de açúcares e de carotenoides. Bettani *et al.* (2019), obtiveram fertilizantes biodegradáveis de pectina com adição de vinhaça e RMB com potencial de ser usado como fertilizante na agricultura.

2.3. Filmes Biodegradáveis

A crescente preocupação com os impactos ambientais gerados pelo acúmulo de materiais plásticos e o possível esgotamento dos recursos naturais não renováveis, vêm impulsionando o desenvolvimento de novas tecnologias como a de filmes biodegradáveis, produzidos a partir de biopolímeros como polissacarídeos,

proteínas e outros componentes que podem ser degradados no meio ambiente pela ação de micro-organismos do solo. Estes materiais representam uma alternativa viável para a redução do emprego de materiais de origem petroquímica nas mais diversas aplicações (Nešić *et al.*, 2019, Cazón *et al.*, 2017, Jiménez *et al.*, 2012).

A formulação de filmes biodegradáveis requer o uso de pelo menos um componente capaz de formar uma matriz estrutural com adequada coesividade. As forças coesivas dependem da estrutura do polímero, do solvente utilizado, da temperatura e da presença de outras moléculas tais como plastificantes e agentes reticulantes (Tharanathan, 2003). As substâncias formadoras de filmes, normalmente polímeros de alta massa molar, são capazes de formar uma estrutura contínua pelo rearranjo e interação entre as moléculas sob ação de um tratamento químico ou físico. Um dos métodos mais utilizados para a formação de filmes biodegradáveis é o *casting*, que compreende o preparo de uma solução filmogênica da macromolécula, aplicação dessa solução em um suporte ou molde adequado seguida de secagem sob condições controladas. Entre outros métodos que também podem ser empregados, encontram-se as técnicas tradicionais do processamento de plásticos flexíveis, como a extrusão, co-extrusão e laminação (Debeaufort *et al.*, 1998; Azeredo *et al.*, 2014).

O processo de formação de filmes, independente da técnica empregada, geralmente envolve associações intra e intermoleculares ou ligações cruzadas entre cadeias formando uma rede tridimensional semirrígida que promove a resistência estrutural. As condições de fabricação dos filmes incluindo pH do solvente, força iônica, uso de agentes reticulantes e tipo de solvente são parâmetros importantes para o controle da porosidade e das propriedades mecânicas e de barreira a umidade dos filmes (Tharanathan, 2003).

Em alimentos, os filmes e coberturas biodegradáveis podem atuar especificamente controlando a migração de água, a permeabilidade a gases, a migração lipídica, a rancidez oxidativa e, ainda, podem conter aditivos como antioxidantes e antimicrobianos, os quais visam retardar a taxa de deterioração e prolongar a vida de prateleira (Debeaufort *et al.*, 1998, Silva *et al.*, 2013, Bierhalz, *et al.*, 2013).

Filmes biodegradáveis para agricultura devem apresentar algumas características, incluindo propriedades mecânicas adequadas para instalação e durante o seu uso, e devem ser biodegradados no solo, preferencialmente antes da próxima safra (Briassoulis, 2004, Immirzi *et al.*, 2009, Liling *et al.*, 2016).

A mistura de biopolímeros (blenda) ou adição de outros compostos (compósitos) são estratégias eficientes para melhorar o desempenho das matrizes formadas e adicionar novas funcionalidades ao material. No entanto, assim como em polímeros sintéticos, as propriedades mecânicas e de barreira de biofilmes compostos dependem enormemente das características e compatibilidade dos biopolímeros e demais compostos envolvidos. Geralmente, quando os componentes utilizados são compatíveis, os filmes compostos podem formar estrutura homogênea e com melhores propriedades físico-químicas comparadas aos filmes de seus componentes individuais (Sobral *et al.*, 2004, Silva *et al.*, 2009, Silva *et al.*, 2013).

2.4. Biopolímeros

Os biopolímeros empregados na fabricação de filmes biodegradáveis podem ser polissacarídeos e seus derivados (alginatos, pectinas, quitosanas e amidos), proteínas (glúten, gelatina e zeína) e lipídeos (ceras, ácidos graxos e resinas) ou mesmo a combinação destes. Outros aditivos, como plastificantes, ajustadores de pH e agentes reticulantes, são geralmente combinados com os biopolímeros para modificar as propriedades físicas dos filmes (Han, 2014, Silva *et al.*, 2009).

Os polissacarídeos, ou hidrocolóides, geralmente, apresentam boas propriedades mecânicas e permeabilidade seletiva ao dióxido de carbono e ao oxigênio. Porém, apresentam baixa resistência à umidade devido as suas características hidrofílicas. Dentre os principais polissacarídeos destaca-se o alginato, um polissacarídeo abundante na natureza, extraído de algas pardas, que será utilizado neste trabalho.

2.4.1. Alginato

O alginato é um polissacarídeo aniônico extraído principalmente da parede celular de diversas espécies de algas pardas (classe Phaeophyceae), podendo representar até 40% da matéria seca. Quimicamente, é um copolímero linear (Figura 2) composto de resíduos dos ácidos β -D-manurônico (M) e α -L-gulurônico (G), que são unidos por ligações glicosídicas do tipo (1-4). Esses monômeros podem ser organizados em blocos de resíduos G consecutivos (blocos GG), de resíduos M consecutivos (blocos MM) ou resíduos alternados de M e G (blocos MG) (Lee & Mooney, 2012, Han & Wang, 2017).

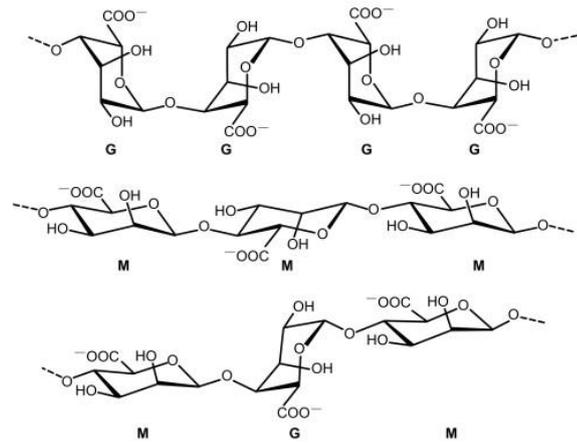


Figura 2. Estrutura química do alginato (Lee & Mooney, 2012).

A principal aplicação comercial do alginato é na forma de sal, sendo os principais alginatos de sódio, potássio e amônio. Devido às suas propriedades coloidais tais como espessamento, estabilização, suspensão, formação de gel e emulsificação, este biopolímero é amplamente utilizado nas indústrias alimentícia, farmacêutica, têxtil e papelreira (Han & Wang, 2017). Apesar de hidrocolóides como o alginato formarem filmes fortes, estes exibem pouca resistência à água devido à sua natureza hidrofílica. No entanto a habilidade do alginato de formar géis fortes e insolúveis com cátions divalentes, como o cálcio, pode ser utilizada para melhorar tais propriedades dos filmes de alginato (Liu *et al.*, 2016). O mecanismo que melhor descreve a formação de géis de alginato na presença de íons cálcio é chamado de modelo “caixa de ovos” (Figura 3) e descreveram zonas de junção em alginatos como consequência da interação entre os grupos carboxílicos de cadeias adjacentes (Lee & Mooney, 2012, Costa *et al.*, 2018).

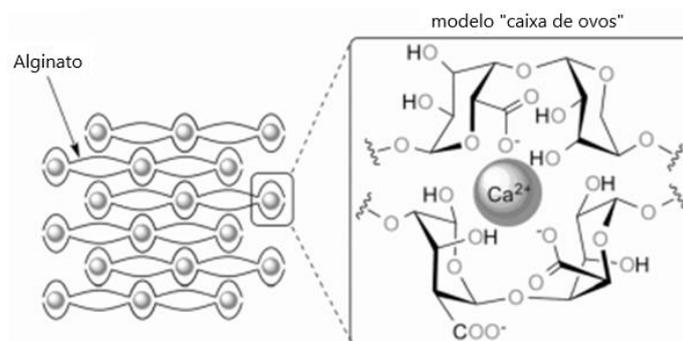


Figura 3. Representação esquemática do modelo “caixa de ovos” para alginato (Costa *et al.*, 2018).

2.5. Uso de microalgas em materiais biodegradáveis

Além das diversas aplicações citadas para a biomassa microalgal, uma área ainda pouco explorada é o seu uso no desenvolvimento de materiais biodegradáveis. Microalgas, podem representar uma alternativa interessante como matéria-prima, aditivo ou material de reforço na produção de filmes biodegradáveis pra aplicações como embalagens de alimentos ou para uso na agricultura. Além de apresentarem alta produtividade e possibilidade de cultivo em diversos ambientes, as microalgas são fontes de biopolímeros e outras moléculas bioativas que podem acrescentar funcionalidades aos materiais desenvolvidos (Fabra *et al.*, 2017).

Alguns estudos relatam o uso de microalgas em materiais de embalagem de polímeros sintéticos. Materiais compostos com adição da microalga *Chlorella* em resinas sintéticas, tais como polietileno (PE) (Zeller *et al.*, 2013), polipropileno (PP) (Zhang *et al.*, 2000a) e cloreto de polivinila (PVC) (Zhang *et al.* 2000b) tem sido estudados com o objetivo de produzir materiais ambientalmente amigáveis com propriedades de fixação de CO₂. Em um trabalho similar, Shi *et al.* (2012) produziram filmes de resinas termoplásticas contendo diversas microalgas para a biofixação de CO₂, tendo propriedades mecânicas comparáveis aos filmes puros de poliuretano e polietileno. Processos comumente utilizados na indústria de plásticos, como extrusão e injeção, têm sido avaliados para o desenvolvimento de compósitos plásticos híbridos contendo biomassa microalgal residual, demonstrando, por exemplo, que a substituição de até 20% do polímero sintético biodegradável polibutileno adipato-co-teraftalato (PBAT) pela RMB é viável resultando em materiais com propriedades mecânicas aceitáveis para na agricultura (Torres *et al.*, 2015).

No entanto, na literatura existem poucos relatos de utilização da biomassa microalgal ou seus extratos no desenvolvimento de filmes renováveis e biodegradáveis. Em um estudo recente, Carissimi *et al.* (2018) produziram filmes de amido de mandioca com adição de biomassa ou extrato das microalgas clorofíceas *Heterochlorella luteoviridis* ou *Dunaliella tertiolecta* para uso como embalagens de alimentos. A adição da biomassa (2%) aumentou a solubilidade em água, reduziu tensão na ruptura e aumentou o alongamento dos filmes. Todos os filmes com adição de microalga mostraram atividade antioxidante superior aos filmes controle, sugerindo seu potencial como embalagem ativa.

Em outro trabalho, Fabra *et al.* (2018) avaliaram o efeito da adição de biomassa de diferentes espécies de microalgas (*Nannochloropsis*, *Spirulina* e

Scenedesmus) nas propriedades estruturais e físico-químicas em filmes de amido termoplástico produzidos por prensagem. A adição de 20% de biomassa *Nannochloropsis*, em relação a massa de amido, causou uma redução na rigidez da matriz polimérica e diminuição na permeabilidade ao oxigênio e ao vapor de água, indicando boas propriedades para uso em alimentos. Em estudo do mesmo grupo, Fabra *et al.* (2017) demonstraram que a adição da biomassa íntegra ou tratada por ultrassom da microalga *Nannochloropsis gaditana sp.* em filmes de amido de milho tornaram os filmes mais hidrofóbicos com melhoria nas propriedades de barreira pode ser usada para produzir filmes híbridos de amido de milho com melhoria das propriedades de barreira.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da adição de biomassa da microalga *P. autumnale* nas propriedades de filmes de alginato de cálcio e verificar o potencial como material biodegradável para uso na agricultura ou como embalagem ativa de alimentos.

3.2. Objetivos Específicos

- Obtenção e preparo do inóculo da microalga *P. autumnale* para incorporação na matriz polimérica do alginato;
- Obtenção da biomassa sem e com homogeneização para incorporação nos filmes;
- Produção de filmes de alginato de cálcio sem e com adição da biomassa de *P. autumnale* (não homogeneizada e homogeneizada);
- Caracterização dos filmes de alginato de cálcio sem e com adição de biomassa microalgal em termos de aspecto visual e morfológico, espessura, propriedades óticas, propriedades de barreira a umidade, estrutura química (FTIR), teor de nitrogênio e fenólicos totais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Matérias-primas

Para a confecção dos filmes foi utilizado o alginato de sódio de média viscosidade (Sigma Aldrich®, EUA) proveniente de algas *Macrocystis pyriferae*. Cloreto de cálcio dihidratado (Synth, Brasil) foi utilizado como agente reticulante e glicerol P.A. (Synth, Brasil) como agente plastificante. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2. Obtenção da biomassa de *P. autumnale*

A cianobactéria *P. autumnale*, isolada do Deserto Cuatro Ciénegas no México (26° 59' N 102° 03' W), foi mantida e propagada em meio BG 11 (Rippka *et al.*, 1979) previamente esterilizado e com pH ajustado em 7,5. As culturas foram mantidas em frascos Erlenmeyer de 500 mL, em agitador orbital e fotoperíodo de 12h (claro-escuro) até atingirem as concentrações desejadas para posteriormente ser utilizado na produção dos filmes.

4.3. Processo de fabricação dos Filmes

4.3.1. Filmes de alginato puro

Os filmes de alginato foram obtidos por *casting* seguindo metodologia descrita por Bierhalz *et al.* (2013) em um processo que consiste em dois estágios de reticulação. No primeiro estágio, o plastificante (0,6 g de glicerol/g de alginato) foi adicionado em 370 mL de água destilada, mantendo-se sob agitação mecânica (1000 rpm) antes de adicionar o biopolímero. Em seguida, foram adicionados 6g (1,5% m/v) de alginato mantendo-se a agitação constante por 1h, até completa dissolução. A solução foi pré-reticulada com a adição de 30 mL de solução de cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,8% m/v a uma vazão de 5 mL/min por meio de uma bomba peristáltica (TecnoPon, LDP 101-3, Brasil). A solução filmogênica foi então transferida em alíquotas de 50 g para placas de polipropileno (d=14 cm) e estas foram submetidas à secagem a 40°C em estufa com recirculação de ar (Ethik, 420-2D, Brasil) por 24h. No segundo estágio de reticulação, os filmes foram retirados do suporte e imersos em 50 mL de solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5% m/v) e glicerol (5% v/v) por 20 min e em seguida imersos em água destilada com 5% de glicerol (v/v) por 1 min de cada lado para retirar o excesso de cálcio. Após este tempo os filmes foram mantidos em repouso sobre um

suporte até a secagem. Todos os filmes foram acondicionados em dessecador à temperatura ambiente e umidade relativa de 52% (controlada com solução de nitrato de magnésio) durante 3 dias, antes da realização dos ensaios de caracterização.

4.3.2. Filmes de alginato com adição de biomassa microalgal

Foram produzidos filmes com duas concentrações mássicas de biomassa microalgal em relação ao volume de solução polimérica. Além disso, avaliou-se o efeito de uma etapa de homogeneização da biomassa antes da incorporação na solução de alginato. Para o primeiro teste utilizou-se uma suspensão de microalgas cuja concentração era de 0,6 g/L de *P. autumnale*. Duas alíquotas de 400 mL desta suspensão foram concentradas a temperatura ambiente em centrífuga (SOLAB SL 701) a 1844 g por 20 min e a biomassa ressuspensa em 50 mL de água destilada cada. Uma das suspensões (proveniente de uma das alíquotas de 400 mL) foi transferida para um tubo Falcon contendo esferas de vidro e submetida a etapa de homogeneização no vórtex por 5 min. A biomassa concentrada foi então adicionada à solução de alginato antes da etapa de pré-reticulação (conforme descrito no item 4.3.1) mantendo-se a concentração final de alginato em 1,5% m/v e da biomassa microalgal em 0,06% m/v. Após esta etapa, a produção do filme seguiu o mesmo procedimento descrito para o filme de alginato puro, obtendo ao final 400 mL de suspensão filmogênica (Item 4.3.1). No segundo teste utilizou-se duas alíquotas de 350 mL de suspensão microalgal com concentração aproximadamente 1,2 g/L de biomassa. O mesmo procedimento descrito acima foi realizado, obtendo-se soluções poliméricas 1,5% m/v de alginato e 0,1% m/v de biomassa microalgal. A Tabela 1 apresenta a composição das soluções poliméricas utilizadas na produção dos filmes, bem como a denominação utilizada no trabalho.

Tabela 1. Composição dos filmes de alginato sem e com adição de biomassa de *P. autumnale*.

| Filme* | V_{Água} (mL) | m_{alginato} (g) | V_{glicerol} (mL) | V_{CaCl2.2H2O} (0,8% m/v) | m_{biomassa} (g massa seca) | Homogeneização biomassa |
|---------------|--|---|--|--|--|--|
| Alginato | 370 | 6 | 2,9 | 30 | --- | --- |
| 0,06% NH | 370 | 6 | 2,9 | 30 | 0,24 | Não |
| 0,06% H | 370 | 6 | 2,9 | 30 | 0,24 | Sim |
| 0,1% NH | 370 | 6 | 2,9 | 30 | 0,41 | Não |
| 0,1% H | 370 | 6 | 2,9 | 30 | 0,41 | Sim |

*Composição para o preparo de 400 mL de solução filmogênica, **as denominações 0,06% e 0,1% se referem a concentração de biomassa microalgal na solução filmogênica (g biomassa seca/100 mL solução), NH – não homogeneizado, H – homogeneizado.

4.4. Caracterização dos filmes

4.4.1. Aspecto visual

Foram realizadas avaliações subjetivas, considerando os aspectos visuais e táteis como homogeneidade, continuidade, facilidade de desprendimento do suporte e manuseio.

4.4.2. Espessura

A espessura média dos filmes foi obtida pela média aritmética dos valores de 15 medidas ao acaso em diferentes pontos do filme, utilizando-se um micrômetro digital (Mitutoyo, MDC-25S, Japão).

4.4.3. Propriedades radiométricas

A transmitância dos filmes foi avaliada segundo método proposto por Merino & Alvarez (2020). Os filmes foram cortados em retângulos (4x2 cm) e tiveram a espessura determinada em 5 pontos, em seguida foram colocadas no interior da cubeta. O espectro de transmitância dos filmes na região UV-vis foi obtido utilizando-se um espectrofotômetro HACH DR500 (Düsseldorf, Alemanha) na faixa de comprimento de onda de 290 a 900 nm. Uma cubeta vazia foi utilizada como branco. A opacidade dos filmes foi calculada pela Equação 1.

$$O = \frac{-\log T_{600}}{l} \quad (1)$$

Onde: O é a opacidade (1/mm), T_{600} é a transmitância a 600 nm e l é a espessura do filme em mm.

4.4.4. Morfologia

A estrutura morfológica dos filmes foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), em um microscópio Thermo Fisher Scientific® Prisma E observando-se a superfície no aumento de 1.000x e seção transversal no aumento de 4.000x (Gómez-Guillén *et al.*, 2007).

As amostras também foram avaliadas por microscopia ótica em microscópio MOTIC BA 210TL no aumento de 40x.

4.4.5. Conteúdo de umidade

O conteúdo de umidade dos filmes foi determinado pelo método gravimétrico em estufa a vácuo a 105°C por 24h, em triplicata (Irissin-Mangata *et al.*, 2001).

4.4.6. Solubilidade em água

A massa solubilizável em água foi quantificada gravimetricamente segundo método proposto por Irissin-Mangata *et al.* (2001). Inicialmente, a umidade de uma amostra de filme foi determinada (105°C, por 24h). Outra amostra do mesmo filme foi então imersa em 50 mL de água destilada e o sistema mantido sob agitação (150 rpm) a temperatura ambiente por 24h. Esse segundo filme foi então seco em estufa a vácuo para determinação da massa não solúvel. A massa solubilizável (MS) foi expressa em função da massa seca inicial e após solubilização em água, conforme Equação 2.

$$MS = \frac{m_o(1-\omega) - m_f}{m_o(1-\omega)} \cdot 100 \quad (2)$$

Onde: MS = massa solubilizável em água (g MS/ 100 g massa seca), m_o = massa total inicial da amostra (g), m_f = massa seca final não solúvel (g) e ω = fração de massa de umidade em base úmida (g H₂O/g filme).

4.4.7. Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade ao vapor d'água foi determinada gravimetricamente, em triplicata, de acordo com o método E95-96 (ASTM, 1995), utilizando-se uma célula de

acrílico com um volume interno de 30 mL e que dispõe de uma tampa com abertura central de 15,21 cm² na qual se fixa o filme. Cloreto de cálcio anidro granulado (Ecibra, São Paulo, Brasil) foi utilizado para preencher o fundo da célula até próximo à borda que foi mantida dentro de outro recipiente de acrílico, de 500 mL, hermeticamente fechado. O fundo desse recipiente continha uma solução saturada de NaCl (Synth, Diadema, Brasil) para manter o ambiente a 75% UR (Figura 4). A variação de massa da célula com o tempo corresponde à taxa com que a água que permeou pelo filme e foi usada para calcular o coeficiente de permeabilidade ao vapor de água (Equação 3).



Figura 4. Aparato experimental utilizado para determinação da permeabilidade ao vapor de água.

$$PVA = \frac{G \cdot \delta}{A_e \cdot \Delta P_{H_2O}} \quad (3)$$

Onde: PVA é o coeficiente de permeabilidade ao vapor de água (g.mm/m².dia.KPa), G é a taxa de permeação (g/dia) calculada por regressão linear de ganho de massa versus tempo, δ é a espessura do filme (mm), A_e é a área exposta do filme (m²) e ΔP_{H_2O} é a diferença de pressão parcial de vapor da água no ambiente dos dois lados do filme (kPa).

4.4.8. Grau de Intumescimento

O grau de intumescimento foi determinado segundo a metodologia proposta por Xu *et al.* (2003). A massa inicial de uma amostra circular de filme de 2,5

cm de diâmetro foi quantificada e imersa em 100 mL de água destilada sob agitação magnética. Após um determinado período, o filme foi novamente pesado, retirando-se o excesso de água para a determinação da massa do filme úmido. O grau de intumescimento (%GI) foi calculado em função da massa total inicial da amostra.

4.4.9. Estrutura química

A estrutura química foi avaliada através de espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), utilizando-se um espectrômetro Brucker modelo Tensor II. Os espectros foram obtidos à temperatura ambiente, em modo ATR (reflexão total atenuada), na região de 550 - 4000 cm^{-1} , com 16 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} (Costa *et al.*, 2018, Santos *et al.*, 2020).

4.4.10. Nitrogênio total

Uma amostra de 50 mg de filme foi dissolvida em 20 mL de solução de citrato de sódio 3%. O teor de nitrogênio total (TN) foi quantificado em TOC-Control L. A concentração de TN no filme foi expressa em mg/g de filme.

4.4.11. Compostos fenólicos totais

Para a determinação dos compostos fenólicos totais, amostras de 375 mg dos filmes foram imersas em 20 mL de etanol absoluto. Alíquotas de 0,2 mL dos extratos foram adicionadas em 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (10% v/v), após 8 min houve a adição de 0,8 mL de solução de carbonato de sódio (7% v/v). Em seguida, as soluções foram mantidas no banho a 50°C por 20 min, resfriadas em banho de gelo e as absorbâncias medidas em 760 nm no espectrofotômetro. O teor de compostos fenólicos totais foi representado em mg equivalente de ácido gálico (EAG) por g filme (Piñeros-Hernandez *et al.*, 2017).

4.5. Análises Estatísticas

A análise estatística dos dados foi efetuada por meio de análise de variância (ANOVA) e do teste de Scott-Knott, a fim de determinar diferenças significativas entre as médias, a um nível de probabilidade de 5% ($p < 0,05$). O Software Statistica v.7 (Statsoft Inc., EUA) foi utilizado para esses cálculos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O aspecto visual dos filmes de alginato sem e com adição de biomassa microalgal está apresentado na Figura 5. Todos os filmes apresentaram matriz polimérica contínua, flexível e com textura lisa. Em comparação ao filme de alginato puro, a adição da biomassa microalgal conferiu aos filmes coloração esverdeada característica da microalga, sendo que a cor se intensificou com o aumento da concentração de biomassa adicionada. A etapa de homogeneização da biomassa antes da sua incorporação na solução polimérica mostrou-se efetiva para garantir uma distribuição uniforme na matriz polimérica. Os filmes que continham biomassa não homogeneizada apresentaram filamentos aglomerados característicos da *P. autumnale*.

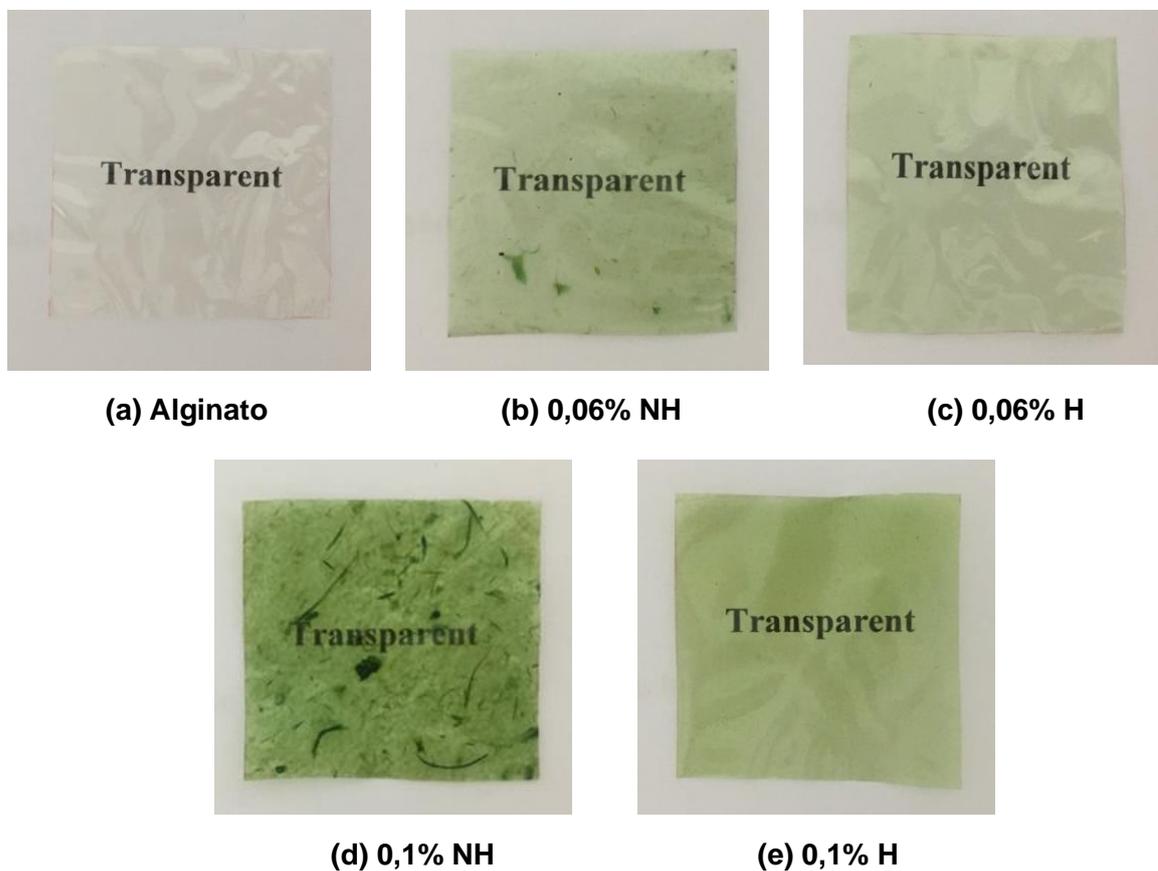


Figura 5. Aspecto visual dos filmes de alginato sem e com adição de biomassa microalgal.

A Figura 6 apresenta as micrografias dos filmes obtidas em microscópio óptico, com aumento de 40x. É possível constatar a incorporação adequada da biomassa microalgal na matriz polimérica dos filmes.

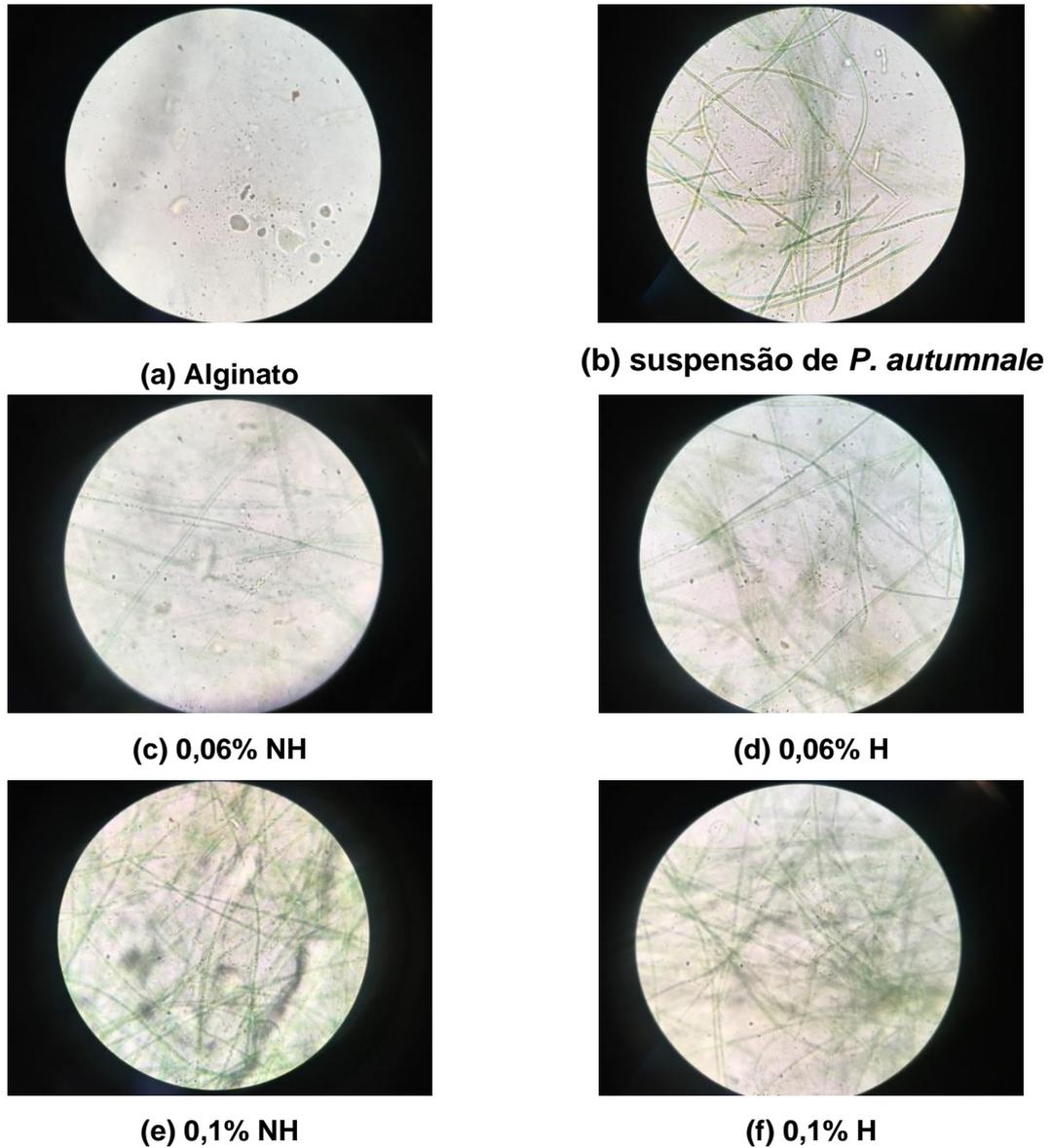
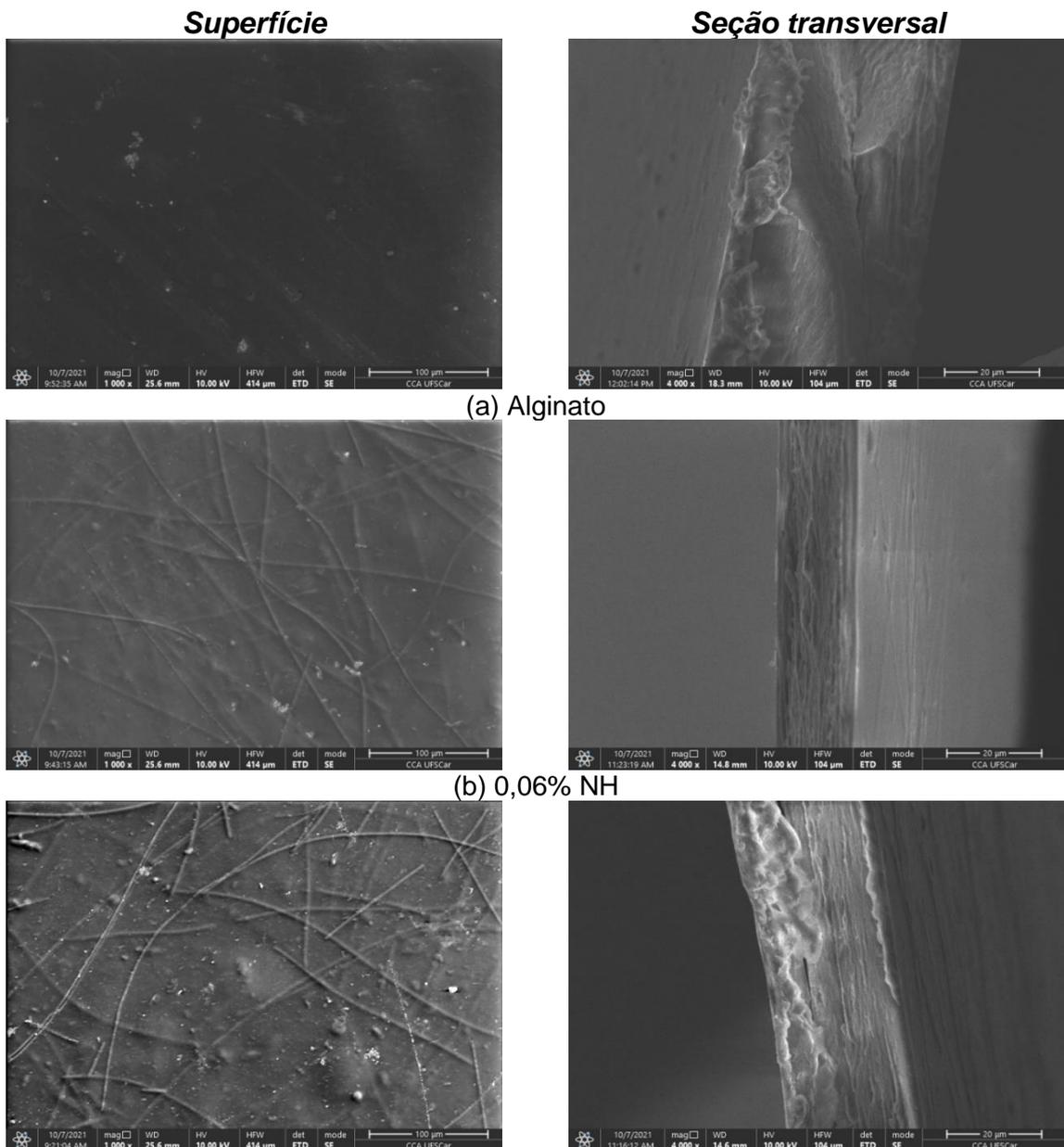


Figura 6. Microscopia ótica dos filmes de alginato sem e com adição de biomassa microalgal com o aumento de 40x.

A análise da microestrutura interna e superficial dos filmes fornece informações relevantes quanto ao arranjo dos diferentes componentes, que por sua vez tem possíveis impactos nas suas propriedades óticas e de barreira a umidade. As micrografias das superfícies e das seções transversais (após fratura) dos filmes de alginato sem e com adição de biomassa microalgal estão apresentados na Figura 7. O filme de alginato (Figura 7(a)) apresentou superfície e seção transversal lisas e homogêneas, consistente com a formação de um arranjo compacto das cadeias poliméricas. Por outro lado, as micrografias sugerem alteração evidente na morfologia das superfícies e estruturas internas dos filmes com a adição da biomassa microalgal. Estes apresentaram superfície com aspecto rugoso sugerindo que o empacotamento

das cadeias foi alterado pela presença dos componentes da microalga, comportamento já observado anteriormente por Gómez-Guillén *et al.* (2007) e Han *et al.* (2018). Nas superfícies é possível perceber a presença de filamentos característicos da *P. autumnale*. Os filmes com microalga também apresentaram seção transversal com aspecto lamelar, menos compacto comparado ao filme de alginato puro.

Pontos brancos de formato esférico foram observados com maior intensidade nos filmes 0,1% NH e H, essa mesma observação foi relatada por Fabra *et al.* (2018) em filmes de amido com adição de biomassa de *Nannochloropsis*. Sugere-se que sejam aglomerados da microalga com precipitação de cálcio proveniente da etapa de reticulação.



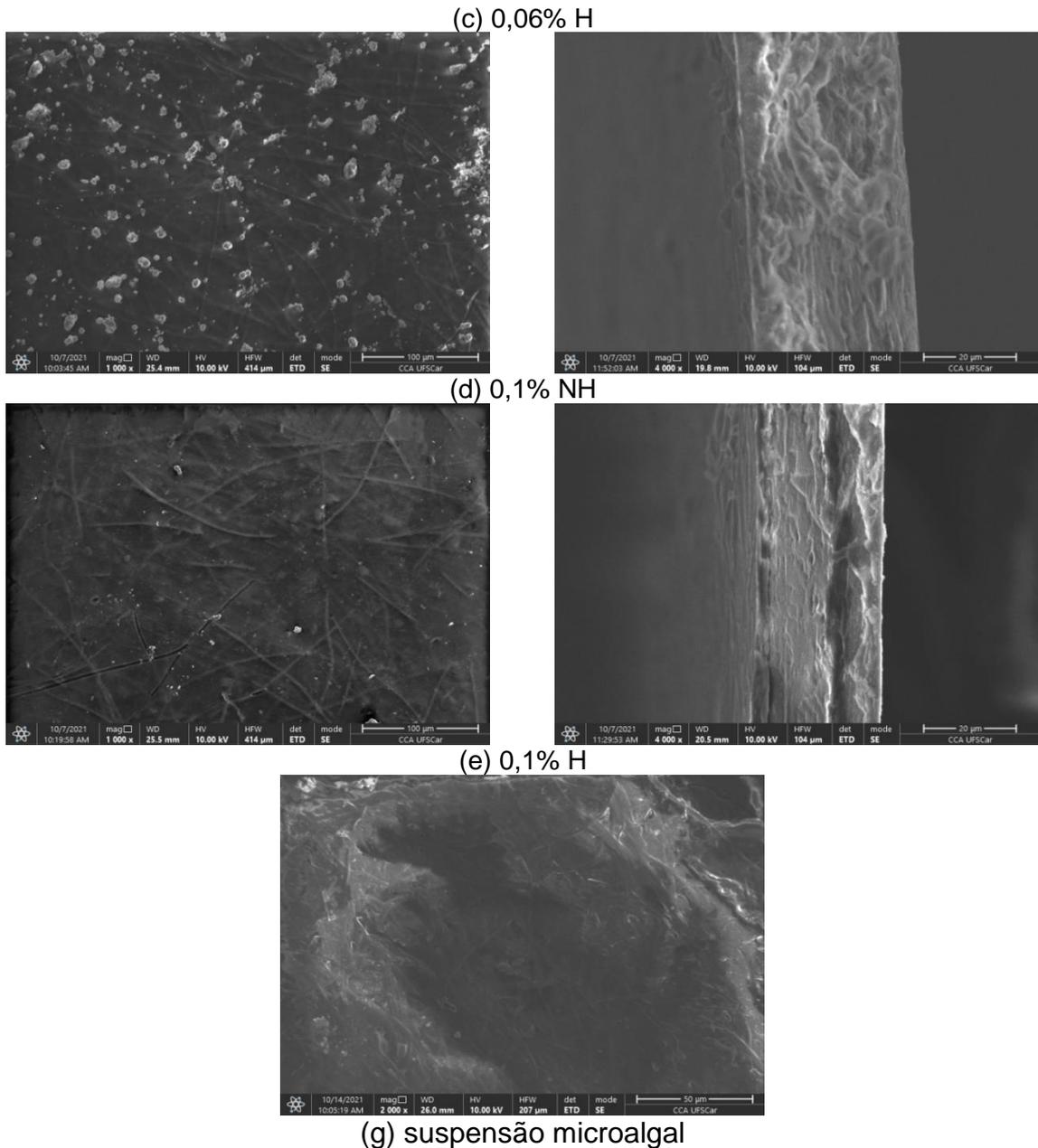
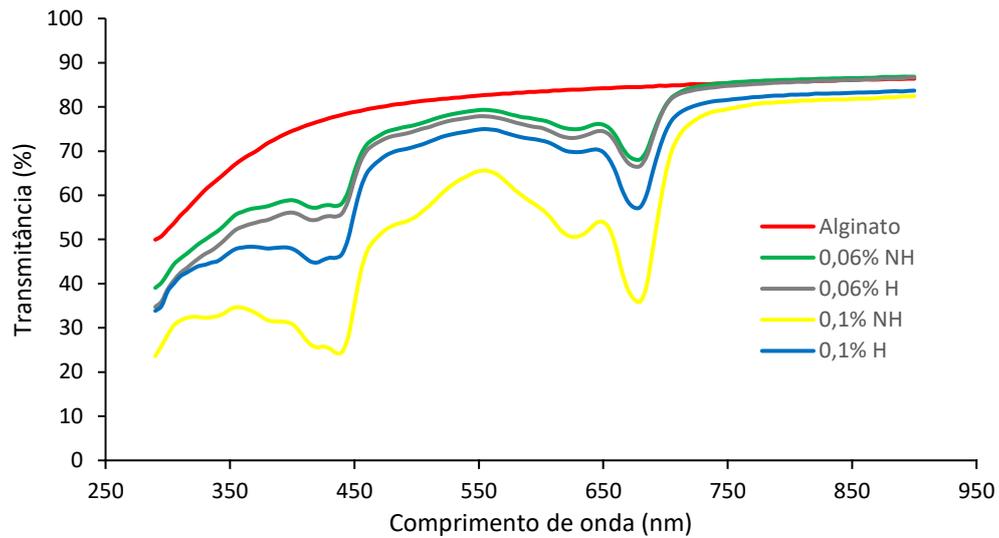


Figura 7. Micrografias da superfície e seção transversal (após fratura) dos filmes de alginato sem e com adição de biomassa microalgal.

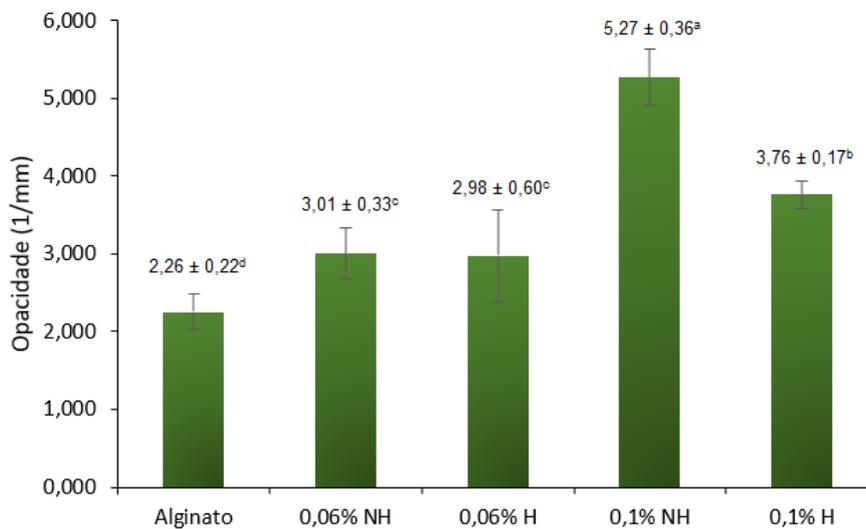
A passagem da luz através de um determinado meio modifica a distribuição espectral da radiação que passa através deste. Os filmes utilizados na agricultura como “*mulching*” podem reduzir a passagem da radiação fotossinteticamente ativa (400-700 nm) e assim, limitar a luz que atinge o solo prevenindo o crescimento de plantas daninhas e conseqüentemente a competição pela radiação solar e nutrientes para a cultura. Para determinar a transmitância da radiação UV-vis dos filmes, os seus espectros de transmissão foram obtidos na faixa de comprimento de onda de 290 a 900 nm (Figura 8(a)). Pode-se observar que em todos os casos a transmitância

aumenta com o aumento do comprimento de onda da radiação incidente, chegando a 88% para o filme de alginato puro. Resultado semelhante para filmes de alginato foi relatado por Liling *et al.* (2016), onde a transmitância dos filmes atinge a faixa de 80 a 90% com o aumento do comprimento de onda. A adição da biomassa microalgal nos filmes alterou o espectro de transmitância em comparação ao filme de alginato puro, sendo que a transmitância na região espectral de UV-Vis diminuiu com o aumento da concentração de biomassa. O filme 0,1% NH foi o que apresentou os menores valores de transmitância, ou seja, tem maior capacidade de bloquear a passagem da luz UV e visível. Esses resultados são positivos quando considerados para o uso na agricultura por reduzir a radiação no solo, como explicado anteriormente.

O comprimento de onda de 600 nm é comumente utilizado para determinar a opacidade dos filmes. A opacidade dos filmes de alginato sem e com adição de biomassa microalgal foram calculados pela Equação 1 e os valores estão apresentados na Figura 8(b). Conforme esperado, o filme de alginato apresentou $2,26 \text{ mm}^{-1}$, o menor valor de opacidade (mais transparente). O aumento da concentração de biomassa aumentou significativamente a opacidade dos filmes, atingindo $5,27 \text{ mm}^{-1}$ e $3,76 \text{ mm}^{-1}$ para os filmes 0,1% NH e 0,1% H, respectivamente. A etapa de homogeneização da biomassa tendeu a reduzir a opacidade, porém a diferença só foi significativa nos filmes com a maior concentração de biomassa (0,1% NH e 0,1% H). Resultados semelhantes foram observados visualmente por Carissimi *et al.* (2018) com filmes de amido contendo biomassa das microalgas *Heterochlorella luteoviridis* e *Dunaliella tertiolecta* e Fabra *et al.* (2018) para filmes de amido contendo *Nannochloropsis*, *Spirulina* e *Scenedesmus*. Para aplicações em alimentos, a diminuição da transparência da embalagem pode limitar sua aplicação em alguns casos (Fernandes *et al.*, 2015), porém a incorporação de microalga pode ter a vantagem de proteger componentes do alimento sensíveis a luz. Para uso na agricultura essa diminuição pode ser positiva, como já mencionado.



(a)



(b)

Figura 8. Espectro de transmitância (a) e opacidade dos filmes de alginato sem e com adição de biomassa microalgal.

As propriedades de umidade, solubilidade, permeabilidade ao vapor de água e intumescimento são essenciais para definir as aplicações potenciais dos materiais formados. Muitos fatores podem influenciar esses parâmetros, como características do polímero, a integridade da matriz, as interações entre a matriz polimérica e outros componentes da formulação, presença de plastificante, dentre outros (Carissimi *et al.*, 2018).

A Tabela 2 apresenta os valores de umidade, solubilidade em água e grau de intumescimento dos filmes de alginato sem e com adição de biomassa microalgal. Quanto ao teor de umidade observa-se que, com exceção do filme 0,1% NH, não foram observadas diferenças significativas entre as umidades das demais amostras, que obtiveram umidade de 18,23 a 20,24 H₂O/100 g. Os valores estão de acordo com faixas típicas entre 18 e 20 g H₂O/100 g filme de umidade em filmes de biopolímeros reportados na literatura (Silva *et al.* 2009, Rhim, 2004; Sobral *et al.*, 2004). Ressalta-se que pode ter havido erro experimental na determinação da umidade da amostra 0,1% NH e esta análise deverá ser reavaliada futuramente.

A solubilidade em água é um parâmetro importante uma vez que um alto valor de solubilidade pode comprometer a integridade dos filmes durante a aplicação. Em relação a esta propriedade, os valores encontrados estão próximos aos constatados em literatura, na faixa de 12,8 a 19,9 g MS/100 g filme (Turbiani *et al.*, 2007, Silva *et al.* 2009). Para o material analisado, observa-se um aumento significativo da solubilidade nos filmes 0,06% H, 0,1% NH e 0,1% H, na faixa de 16,01 a 20,68 g MS/100 g filme, quando comparado ao filme de alginato puro com solubilidade equivalente a 12,54 g MS/100 g filme. Esse aumento na solubilidade por ser atribuído a lixiviação de componentes da biomassa. Ainda assim, foi possível perceber que todos os filmes mantiveram estrutura íntegra após 24h de imersão em água. A baixa solubilidade é característica de filmes de alginato reticulados com íons cálcio, garantindo aos filmes boa estabilidade e integridade (Turbiani *et al.*, 2007). Sem a etapa de reticulação com cálcio todos os filmes eram 100% solúveis em água.

Tabela 2. Umidade, solubilidade e grau de intumescimento dos filmes de alginato sem e com adição de biomassa microalgal.

| Filme | Umidade* (g H ₂ O/100 g filme) | Solubilidade* (g MS/100 g filme) | %GI equilíbrio* (gH ₂ O/100 g filme) |
|----------|--|-------------------------------------|--|
| Alginato | 19,52 ± 1,61 ^b | 12,54 ± 1,88 ^a | 63,44 ± 3,66 ^a |
| 0,06% NH | 18,23 ± 0,10 ^b | 13,23 ± 1,94 ^a | 76,39 ± 1,52 ^b |
| 0,06% H | 20,24 ± 0,97 ^b | 16,01 ± 0,81 ^b | 80,69 ± 2,82 ^b |
| 0,1% NH | 11,12 ± 1,80 ^a | 20,68 ± 1,41 ^c | 85,33 ± 1,55 ^b |
| 0,1% H | 18,84 ± 1,22 ^b | 15,17 ± 1,32 ^b | 79,85 ± 4,66 ^b |

*Média ± desvio padrão de 3 determinações experimentais. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Scott-Knott (p<0,05).

O grau de intumescimento (%GI) de equilíbrio (após 1h de imersão em água) e o perfil cinético de absorção de água dos filmes estão apresentados na Tabela 2 e na Figura 9, respectivamente. Os valores de 63,44% para o filme de alginato puro e entre 76,39% e 85,33% para os filmes com microalga, estão dentro do esperado, de acordo com estudos de Turbiani *et al.* (2011), onde foram observados %GI na ordem de 70%. Além disso, esses resultados indicam um aumento significativo no %GI com a adição da biomassa, em relação ao filme de alginato puro, sugerindo que a presença da microalga altera a microestrutura polimérica, permitindo maior absorção de água. Porém não houve diferença significativa entre as duas concentrações de biomassa testadas. Esta propriedade é importante pois as modificações na matriz polimérica causadas pelo intumescimento influenciarão na difusividade de compostos ativos através do filme. Além disso, o maior intumescimento é bastante desejável para materiais destinados ao uso na agricultura, pois a manutenção de água na matriz polimérica pode permitir a redução dos intervalos de irrigação (Azeem, 2014, Chiaregato, 2021).

Os perfis cinéticos de absorção de água mostram comportamento característico de matrizes hidrofílicas, com um período de rápida absorção de água até o estabelecimento do equilíbrio, que se deu em torno de 5 min para os filmes de alginato puro e 15-20 min para os filmes com biomassa microalgal.

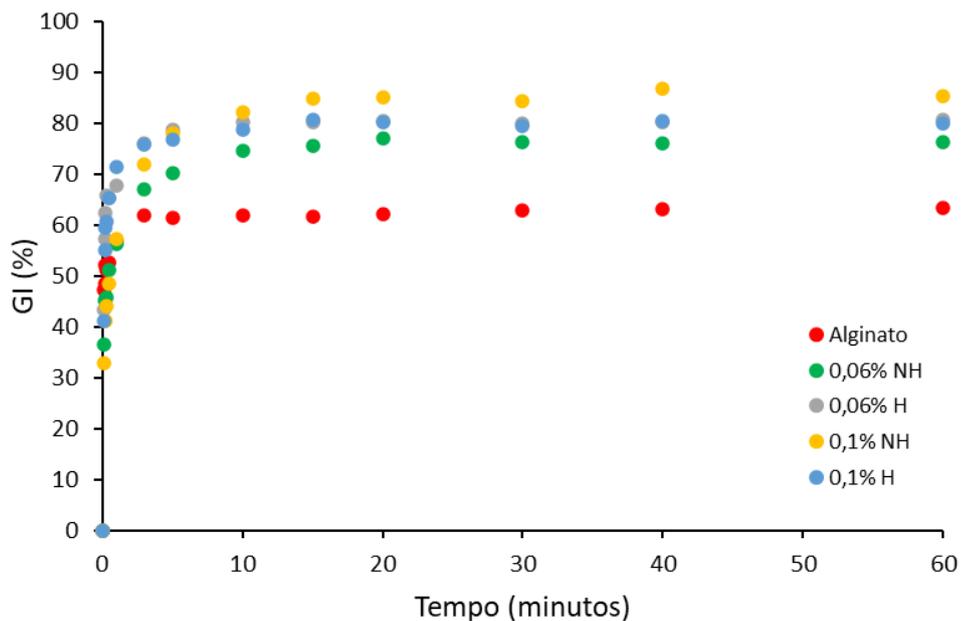


Figura 9. Perfil cinético de absorção de água dos filmes de alginato sem e com adição de biomassa microalgal.

Os valores de espessura e permeabilidade ao vapor de água dos filmes de alginato sem e com adição de biomassa microalgal estão apresentados na Tabela 3. As espessuras variaram de 0,027 mm para o filme de alginato puro a 0,056 mm para o filme 0,1% NH (Tabela 3) e estão de acordo com a ordem de 0,040 mm relatada anteriormente em literatura (Santos *et al.*, 2020). A tendência de aumento de espessura com a presença de biomassa está provavelmente relacionada com o aumento de sólidos solúveis na formulação. Os maiores valores de espessura observados para os filmes com biomassa sem a etapa de homogeneização (0,06% NH e 0,1% NH) pode estar relacionado com a presença dos aglomerados de biomassa, como podemos observar nas Figura 5 e 7 (amostras b e d).

A transferência de água em materiais poliméricos ocorre através da difusão molecular. Este processo envolve três etapas: a absorção na matriz polimérica; a migração através dos poros formados na cadeia polimérica e posterior dessorção a partir da outra superfície do filme. Essa característica de barreira pode ser avaliada pela taxa de permeabilidade ao vapor de água, definida como a taxa de transmissão de vapor de água através de um filme de espessura conhecida, por unidade de área, induzida por um gradiente de pressão parcial de vapor d'água entre as superfícies do material (Debeaufort *et al.*, 1998). Os valores dos coeficientes de permeabilidade ao vapor de água dos filmes variaram de 3,67 a 7,47 g.mm/m².dia.kPa (Tabela 3). O PVA tendeu a aumentar com a presença de biomassa microalgal, porém não houve diferença significativa entre os filmes com microalga que foram submetidos a etapa de homogeneização (0,06% H e 0,1% H) e o filme de alginato puros. A incorporação da biomassa não homogeneizada pode ter promovido pontos de heterogeneidade e menor compactação da matriz polimérica facilitando a passagem de umidade através do filme. Os valores de PVA estão de acordo com o encontrado nos trabalhos de Bierhalz *et al.* (2013) e Santos *et al.* (2020) que reportaram valores de 3,67 e 6,40 g.mm/m².dia.kPa, respectivamente, para filmes de alginato puro.

Tabela 3. Espessura e permeabilidade ao vapor de água dos filmes de alginato sem e com adição de biomassa microalgal.

| Filme | Espessura* (mm) | PVA** (g.mm/m ² .dia.kPa) |
|----------|----------------------------|---|
| Alginato | 0,027 ± 0,002 ^a | 3,67 ± 0,49 ^a |
| 0,06% NH | 0,044 ± 0,009 ^b | 5,13 ± 0,29 ^a |
| 0,06% H | 0,033 ± 0,003 ^a | 5,30 ± 0,13 ^a |
| 0,1% NH | 0,056 ± 0,005 ^b | 7,47 ± 0,15 ^b |
| 0,1% H | 0,039 ± 0,007 ^a | 4,01 ± 0,34 ^a |

*Média ± desvio padrão de 3 determinações experimentais. **Média ± desvio padrão de 15 determinações experimentais. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

A técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada com o intuito de se avaliar possíveis interações da microalga com a matriz polimérica de alginato e caracterizar alterações na estrutura molecular dos filmes. Os espectros obtidos para os filmes sem e com a adição biomassa microalgal estão apresentados na Figura 10. O espectro do filme de alginato puro apresentou bandas características do estiramento dos grupos O-H, COO⁻ (simétrico), COO⁻ (assimétrico) em 3235, 1594 e 1412 cm⁻¹, respectivamente. As bandas entre 800 e 1020 cm⁻¹ estão relacionadas com a estrutura polissacarídica do alginato. Estes picos correspondem a uma região chamada de “Impressão Digital” (Finger print) que é característica de cada polissacarídeo e ligações glicosídicas. Todas as bandas características encontradas no filme de alginato estão de acordo com resultados descritos na literatura (Santos *et al.*, 2020, Costa *et al.*, 2018).

Os espectros com adição de biomassa microalgal apresentaram um padrão similar, observando-se a preservação das mesmas bandas de absorção do filme de alginato. As bandas em 1594 cm⁻¹ apresentaram maior intensidade nos filmes com microalga, possivelmente devido a presença de grupamento amínicos da biomassa. As bandas em 2930 cm⁻¹ podem ser atribuídas a presença de lipídios e compostos fenólicos da biomassa (Yalcin *et al.*, 2020). Visentin (2020), em trabalho anterior do grupo pesquisa, obteve concentrações de 16,58 g lipídios/100g de massa seca e 31,7 g proteína/100 g massa seca para a biomassa de *P. autumnale* cultivada em meio BG 11.

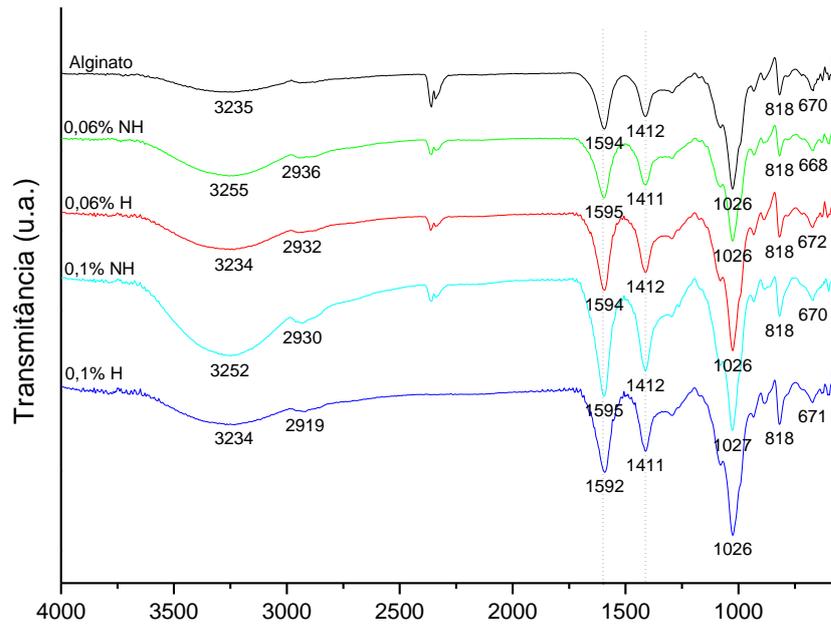


Figura 10. Espectros FTIR dos filmes de alginato sem e com adição de biomassa microalgal.

A Tabela 4 apresenta o teor de nitrogênio total (TN) dos filmes. Observa-se um aumento significativo de TN com o aumento da concentração de biomassa na matriz polimérica, atingindo o valor de 3,85 mg N/g de filme na amostra 0,01% NH. Esses resultados podem sugerir um potencial de uso dos filmes como fertilizantes de liberação lenta na agricultura onde fontes de N são essenciais para o crescimento das plantas (Mifflin & Lea, 1976).

Tabela 4. Concentração de nitrogênio total dos filmes de alginato sem e com adição de biomassa microalgal.

| Filme | Nitrogênio Total (mg/g de filme) |
|----------|----------------------------------|
| Alginato | 0,52 ± 0,06 ^d |
| 0,06% NH | 1,12 ± 0,10 ^c |
| 0,06% H | 1,30 ± 0,06 ^c |
| 0,1% NH | 3,85 ± 0,28 ^a |
| 0,1% H | 2,48 ± 0,34 ^b |

*Média ± desvio padrão de 3 determinações experimentais. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

A Tabela 5 apresenta a concentração de compostos fenólicos totais dos filmes de alginato com adição de biomassa microalgal. Houve um aumento da concentração com o aumento da concentração de microalga, com valores variando de 0,75 a 1,40 mg EAG/g filme para o filme 0,06% H e 0,1% NH, respectivamente. Considerando a incorporação da biomassa, os resultados demonstram uma tendência de menor concentração de fenólicos quando há homogeneização da biomassa, nos filmes 0,06% H e 0,1% H, podendo estar relacionado à degradação dos compostos durante este processo. A biomassa de *P. autumnale* apresentou concentração de fenólicos totais de 62,26 mg/g biomassa seca. Goiris *et al.* (2012) avaliaram o potencial antioxidante de microalgas do grupo Cyanophyta e constataram concentrações entre 1,09 a 4,57 mg EAG/g de microalga seca. Por outro lado, Chatterje e Bhattacharjee (2014) encontraram valores entre 8,62 a 117,15 mg EAG/g biomassa seca em extratos de *Phormidium valderianum* obtidos por extração com CO₂ supercrítico em diferentes condições. Já Nascimento *et al.* (2020) reportam valores de 160 e 155 mg EAG/g biomassa seca para extratos aquoso e acetona 50% de *P. autumnale*, respectivamente. Apesar da grande variação dos valores reportados na literatura, os dados indicam que a adição de biomassa da microalga *P. autumnale* nos filmes de alginato pode também conferir características bioativas, como propriedade antioxidante a esses materiais. Porém, esses resultados precisam ser complementados com outros testes para confirmação.

Tabela 5. Concentração de compostos fenólicos totais dos filmes de alginato sem e com adição de biomassa microalgal

| Filme | Compostos fenólicos totais (mg EAG/g filme) |
|----------------------|---|
| Alginato | 0,53 ± 0,05 ^e |
| 0,06% NH | 1,14 ± 0,10 ^b |
| 0,06% H | 0,75 ± 0,08 ^d |
| 0,1% NH | 1,40 ± 0,32 ^a |
| 0,1% H | 0,98 ± 0,07 ^c |
| Suspensão microalgal | 62,26 ± 2,36 [*] |

*Média ± desvio padrão de 3 determinações experimentais. Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

*mg Equivalente Ácido Gálico/g biomassa seca

6. CONCLUSÃO

Todos os filmes apresentaram matriz polimérica contínua e os filmes com adição de biomassa microalgal (0,06 e 0,1% m/v em relação a solução polimérica), submetidos ou não ao processo de homogeneização da biomassa, apresentaram cor característica da microalga. A etapa de homogeneização da biomassa se mostrou eficiente para uniformizar a distribuição da biomassa na matriz polimérica. A presença da biomassa reduziu a transmitância dos filmes na região do UV-Vis, nas concentrações de biomassa testadas houve uma tendência de aumento da solubilidade, GI, PVA, concentração de nitrogênio total e de compostos fenólicos totais dos filmes em relação ao filme de alginato puro. Pode-se considerar que os materiais desenvolvidos são promissores e apresentam potencial como filmes biodegradáveis para aplicação na agricultura e em alimentos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. Microalgas de águas continentais: potencialidades e desafios do cultivo. **IAPAR**, Londrina, v.1, 2014.

ANDRADE, D. S.; TELLES, T. S.; CASTRO, G. H. L. de The Brazilian microalgae production chain and alternatives for its consolidation. **Journal of Cleaner Production**, Londrina, v. 250, p. 119526, 2020

ASTM. Standard test methods of water vapor transmission of materials, E96-95. **Annual Book of ASTM standards**, Philadelphia, v. 4, p. 697-704, 1995.

AZEEM, B.; KUSHAARI, K.; MAN, Z. B.; BASIT, A.; THANH, T. H. Review on materials & methods to produce controlled release coated urea fertilizer. **Journal of controlled release**, v. 181, p. 11-21, 2014.

AZEREDO, H. M. C. de.; ROSA, M. F.; SÁ, M. de.; SOUZA FILHO, M.; WALDRON, K. W. The use of biomass for packaging films and coatings. *In: Advances in biorefineries*, Woodhead Publishing, p. 819-874, 2014.

BETTANI, S. R.; RAGAZZO, G. de O.; SANTOS, N. L.; KIECKBUSCH, T. G.; BASTOS, R. G.; SOARES, M. R.; SILVA, M. A. da. Sugarcane vinasse and microalgal biomass in the production of pectin particles as an alternative soil fertilizer. **Carbohydrate Polymers**, v. 203, p. 322-330, 2019.

BIERHALZ, A. C.; SILVA, M. A. da.; SOUSA, H. C. de.; BRAGA, M. E.; KIECKBUSCH, T. G. Influence of natamycin loading methods on the physical characteristics of alginate active films. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 76, p. 74-82, 2013.

BORBA, V. I. A.; FERREIRA, L. S. C. Cianobactéria *Arthrospira (Spirulina) platensis*: biotecnologia e aplicações. **Revista Acadêmica Oswaldo Cruz**, n.19, p. 1-23, 2018.

BOROWITZLKA, M. A. High-value products from microalgae—their development and commercialisation. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 3, p. 743-756, 2013.

BRIASSOULIS, D. An overview on the mechanical behaviour of biodegradable agricultural films. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 12, n. 2, p. 65-81, 2004.

CARISSIMI, M.; FLÔRES, S. H.; RECH, R. Effect of microalgae addition on active biodegradable starch film. **Algal Research**, v. 32, p. 201-209, 2018.

CAZÓN, P.; VELAZQUEZ, G.; RAMÍREZ, J. A.; VÁZQUEZ, M. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 136-148, 2017.

CHACÓN-LEE, T. L.; GONZÁLEZ-MARIÑO, G. E. Microalgae for “healthy” foods—possibilities and challenges. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 9, n. 6, p. 655-675, 2010.

CHATTERJEE, D.; BHATTACHARJEE, P. Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant rich fraction from *Phormidium valderianum*: Optimization of experimental process parameters. **Algal Research**, v.3, p. 49-54, 2014.

CHIAREGATO, C. G. **Desenvolvimento de materiais contendo macro e micronutrientes para liberação programada: uma agricultura sustentável**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais voltados à Agroindústria) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2021.

COPPENS, J.; GRUNERT, O.; VAN DEN HENDE, S.; VANHOUTTE, I.; BOON, N., HAESAERT, G.; GELDER, L. de. The use of microalgae as a high-value organic slow-release fertilizer results in tomatoes with increased carotenoid and sugar levels. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 4, p. 2367-2377, 2016.

COSTA, M. J.; MARQUES, A. M.; PASTRANA, L. M.; TEIXEIRA, J. A., SILLANKORVA, S. M.; CERQUEIRA, M. A. Physicochemical properties of alginate-based films: Effect of ionic crosslinking and mannuronic and guluronic acid ratio. **Food Hydrocolloids**, v. 81, p. 442-448, 2018.

DEBEAUFORT, F.; QUEZADA-GALLO, J. A.; VOILLEY, A. Edible films and coatings: tomorrow's packagings: a review. **Critical Reviews in Food Science**, v. 38, n. 4, p. 299-313, 1998.

DI PIPPO, F.; ELLWOOD, N. T.; GISMONDI, A.; BRUNO, L.; ROSSI, F.; MAGNI, P.; PHILIPPIS, R. de. Characterization of exopolysaccharides produced by seven biofilm-forming cyanobacterial strains for biotechnological applications. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 6, p. 1697-1708, 2013.

European Bioplastics - Bioplastics Market Data. 2019. Disponível em: http://docs.european-bioplastics.org/publications/market_data/Report_Bioplastics_Market_Data_2019.pdf>. Acesso em: 03 de ago. 2022.

FABRA, M. J.; MARTÍNEZ-SANZ, M.; GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; COLLI-MARQUÉS, J. M.; MARTÍNEZ, J. C.; LÓPEZ-RUBIO, A. Development and characterization of hybrid corn starch-microalgae films: Effect of ultrasound pre-treatment on structural, barrier and mechanical performance. **Algal Research**, v. 28, p. 80-87, 2017

FABRA, M. J.; MARTÍNEZ-SANZ, M.; GÓMEZ-MASCARAQUE, L. G.; GAVARA, R.; LÓPEZ-RUBIO, A. Structural and physicochemical characterization of thermoplastic corn starch films containing microalgae. **Carbohydrate Polymers**, v. 186, p. 184-191, 2018.

FERNANDES, A. P. S.; COSTA, J. B.; SOARES, D. S. B.; MOURA, C. J. D.; SOUZA, A. R. M. D. Aplicação de filmes biodegradáveis produzidos a partir de concentrado proteico de soro de leite irradiado. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, p. 192-199, 2015.

FRANCISCO, E. C.; JACOB-LOPES, E.; VIEIRA, K. R.; FRANCO, T. T. Nitrogen starvation of assessment in the production of single cell oils and biodiesel quality in heterotrophic cultures of cyanobacteria *Phormidium autumnale*. **Journal of Advanced Chemical Engineering**, v. 9, p. 192-198, 2019.

GALANOPOULOS, C.; KENKEL, P.; ZONDERVAN, E. Superstructure optimization of an integrated algae biorefinery. **Computers & Chemical Engineering**, v. 130, p. 106530, 2019.

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; IHL, M.; BIFANI, V.; SILVA, A.; MONTERO, P. Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae* Turcz). **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1133–1143, 2007.

GOIRIS, K.; MUYLAERT, K.; FRAEYE, I.; FOUBERT, I.; BRABANTER, J. de.; COOMAN, L. de. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. **Journal of applied phycology**, v. 24, n. 6, p. 1477-1486, 2012.

HAN, J. H. Edible films and coatings: a review. *In: Innovations in food packaging*, Academic Press, p. 213-255, 2014.

HAN, Y.; WANG, L. Sodium alginate/carboxymethyl cellulose films containing pyrogallol acid: Physical and antibacterial properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 4, p. 1295-1301, 2017.

HAN, Y.; YU, M.; WANG, L. Physical and antimicrobial properties of sodium alginate/carboxymethyl cellulose films incorporated with cinnamon essential oil. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 15, p. 35-42, 2018.

IMMIRZI, B.; SANTAGATA, G.; VOX, G.; SCHETTINI, E. Preparation, characterisation and field-testing of a biodegradable sodium alginate-based spray mulch. **Biosystems Engineering**, v. 102, n. 4, p. 461-472, 2009.

IRISSIN-MANGATA, J.; BAUDUIN, G.; BOUTEVIN, B.; GONTARD, N. New plasticizers for wheat gluten films. **European Polymer Journal**, v. 37, p. 1533-1541, 2001.

JIMÉNEZ, A.; FABRA, M. J.; TALENS, P.; CHIRALT, A. Edible and biodegradable starch films: a review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 6, p. 2058-2076, 2012.

KLEIN, B. C.; BONOMI, A.; MACIEL FILHO, R. Integration of microalgae production with industrial biofuel facilities: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 1376-1392, 2018.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. **Progress in polymer science**, v. 37, n. 1, p. 106-126, 2012.

LILING, G.; DI, Z.; JIACHAO, X.; XIN, G.; XIAOTING, F.; QING, Z. Effects of ionic crosslinking on physical and mechanical properties of alginate mulching films. **Carbohydrate Polymers**, v. 136, p. 259-265, 2016.

LIU, G.; ZHOU, H.; WU, H.; CHEN, R.; GUO, S. Preparation of alginate hydrogels through solution extrusion and the release behavior of different drugs. **Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition**, v. 27 n. 18, p. 1808-1823, 2016.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. **RiMa**, São Carlos, v. 606, 2006.

MATA, T. M., MARTINS, A. A., CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.

MEDINA-JARAMILLO, C. M.; GUTIÉRREZ, T. J.; GOYANES, S.; BERNAL, C.; FAMÁ, L. Biodegradability and plasticizing effect of yerba mate extract on cassava starch edible films. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 150-159, 2016.

MERINO, D.; ALVAREZ, V. A. Green microcomposites from renewable resources: Effect of seaweed (*Undaria pinnatifida*) as filler on corn starch–chitosan film properties. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 28, n. 2, p. 500-516, 2020.

MIFLIN, B. J., LEA, P. J. The pathway of nitrogen assimilation in plants. **Phytochemistry**, New York, v.15, p.873-885, 1976.

MORANÇAIS, M.; MOUGET, J. L.; DUMAY, J. Proteins and Pigments. *In: Microalgae in Health and Disease Prevention*, Academic Press, p. 145-175, 2018.

NASCIMENTO, T. C. do.; NASS, P. P.; FERNANDES, A. S.; VIEIRA, K. R.; WAGNER, R.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q. Exploratory data of the microalgae compounds for food purposes. **Data in Brief**, v. 29, p. 105182, 2020.

NEŠIĆ, A.; CABRERA-BARJAS, G.; DIMITRIJEVIĆ-BRANKOVIĆ, S.; DAVIDOVIĆ, S.; RADOVANOVIĆ, N.; DELATTRE, C. Prospect of polysaccharide-based materials as advanced food packaging. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 135, 2019

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. **Water Research**, v. 45, n. 1, p. 11-36, 2011.

PIÑEROS-HERNANDEZ, D.; MEDINA-JARAMILLO, C.; LÓPEZ-CÓRDOBA, A.; GOYANES, S. Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 488-495, 2017.

RENUKA, N.; PRASANNA, R.; SOOD, A.; AHLUWALIA, A. S.; BANSAL, R.; BABU, S., SINGH, R.; SHIVAY, Y. S.; NAIN, L. Exploring the efficacy of wastewater-grown microalgal biomass as a biofertilizer for wheat. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 7, p. 6608-6620, 2016.

REVIERS, B. de. Natureza e posição das "algas" na árvore filogenética do mundo vivo. **FRANCESCHINI, I. M. (Org.)** - Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica, Porto Alegre: Artmed, cap. 1, p. 19-58. 2010.

RHIM, J. W. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. **LWT-Food science and technology**, v. 37, n. 3, p. 323-330, 2004.

RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J. B., HERDMAN, M., STANIER, R. Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 1-61, 1979.

RIZWAN, M.; MUJTABA, G.; MEMON, S. A.; LEE, K.; RASHID, N. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 92, p. 394-404, 2018.

RODRIGUES, D. B.; MENEZES, C. R.; MERCADANTE, A. Z.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q. Bioactive pigments from microalgae *Phormidium autumnale*. **Food Research International**, v. 77, p. 273-279, 2015.

SANTOS, A. M. dos.; SANTOS, A. M. dos.; SARTORI, R. B.; RECK, N.; ZEPKA, L. Q.; LOPES, E. J. Biorremediação de efluente cervejeiro por *phormidium autumnale* em biorreatores multifuncionais. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 2, n. 3, p. 1010-1019, 2019.

SANTOS, A. M. dos.; SANTOS, A. M. dos.; SEVERO, I. A.; QUEIROZ, M. I.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E. Nutrient cycling in wastewater treatment plants by microalgae-based processes. *In: Industrial waste: management, assessment and environmental issues*, New York, Nova Science Publishers, Inc, p. 41-63, 2016.

SANTOS, N. L., RAGAZZO, G. O., CERRI, B. C., SOARES, M. R., KIECKBUSCH, T. G., SILVA, M. A. da. Physicochemical properties of konjac glucomannan/alginate films enriched with sugarcane vinasse intended for mulching applications. **International journal of biological macromolecules**, v. 165, p. 1717-1726, 2020.

SHI, B.; WIDEMAN, G.; WANG, J. H. A new approach of BioCO₂ fixation by thermoplastic processing of microalgae. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 20, n. 1, p. 124-131, 2012.

SILVA, M. A. da.; BIERHALZ, A. C. K.; KIECKBUSCH, T. G. Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca²⁺ ions: Effect of the plasticizer concentration. **Carbohydrate polymers**, v. 77, n. 4, p. 736-742, 2009.

SILVA, M. A. da., IAMANAKA, B. T., TANIWAKI, M. H., KIECKBUSCH, T. G. . Evaluation of the antimicrobial potential of alginate and alginate/chitosan films containing potassium sorbate and natamycin. **Packaging Technology and Science**, v. 26, n. 8, p. 479-492, 2013.

SOBRAL, P. J. D. A.; GARCÍA, F. T.; HABITANTE, A. M. Q. B.; MONTERREY-QUINTERO, E. S. Propriedades de filmes comestíveis produzidos com diferentes concentrações de plastificantes e de proteínas do músculo de tilápia-do-nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 255-262, 2004.

SUDHAKAR, M. P.; KUMAR, B. R.; MATHIMANI, T.; ARUNKUMAR, K. A review on bioenergy and bioactive compounds from microalgae and macroalgae-sustainable energy perspective. **Journal of Cleaner Production**, v. 228, p. 1320-1333, 2019.

SUGANYA, T.; VARMAN, M., MASJUKI, H. H.; RERGANATHAN, S. Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: a biorefinery approach. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 909-941, 2016.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in food science & technology**, v. 14, n. 3, p. 71-78, 2003.

TORRES, S.; NAVIA, R.; CAMPBELL, R. M.; COOKE, P.; MISRA, M.; MOHANTY, A. K. Green composites from residual microalgae biomass and poly (butylene adipate-co-terephthalate): processing and plasticization. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 3, n. 4, p. 614-624, 2015.

TURBIANI, F. R. B.; KIECKBUSCH, T. G.; GIMENES, M. L. Desenvolvimento e caracterização de filmes ativos de alginato de sódio reticulados com benzoato de cálcio. *In*: 10º Congresso Brasileiro de Polímeros, 10, 2007, Maringá. **10º CBPol** [...]. Maringá: ABPol, 2007.

TURBIANI, F. R. B.; KIECKBUSH, T. G.; GIMENES, M. L. Liberação de benzoato de cálcio de filmes de alginato de sódio reticulados com íons cálcio. **Polímeros**, v. 21, n. 3, p. 175-181, 2011.

VISENTIN, T. G.; GUIMARÃES, B. M.; SAAVEDRA, M. D.; BASTOS, R. G. Response surface methodology to evaluation of biomass productivity by *Phormidium autumnale* from sugarcane vinasse. *In: XXII Natiaonal Bioprocesses Symposium (Sinaferm), XIII Enzymatic Hydrolysis of Biomass Symposium (SHEB), Uberlandia, 2019.*

VISENTIN, T. G. **Produção de bioprodutos a partir do cultivo batelada e batelada alimentada de *Phormidium autumnale* em vinhaça de cana-de-açúcar.** Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente) – Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, p. 114, 2020.

WALKER, T. L.; PURTON, S.; BECKER, D. K.; COLLET, C. Microalgae as bioreactors. **Plant cell reports**, v. 24, n. 11, p. 629-641, 2005.

XU, Z. K.; DAI, Q. W.; LIU, Z. M.; KOU, R. Q.; XU, Y. Y. Microporous polypropylene hollow fiber membranes: Part II. Pervaporation separation of water/ethanol mixtures by the poly (acrylic acid) grafted membranes. **Journal of Membrane science**, v. 214, n. 1, p. 71-81, 2003.

YALCIN, D.; KATIRCIOĞLU, H. T.; ÖZER, T.; SHAMCHI, M. P.; ERKAYA, İ. A. Evaluation of phytotherapeutic activities and phytochemical content of *Phormidium autumnale* Gomont from natural freshwater sources. **Environmental monitoring and assessment**, v. 192, n. 4, p. 1-11, 2020.

YAN, C.; WANG, R.; WAN, J.; ZHANG, Q.; XUE, S.; WU, X.; ZHANG, J.; LU, Y.; CONG, W. Cellulose/microalgae composite films prepared in ionic liquids. **Algal Research**, v. 20, p. 135-141, 2016.

ZELLER, M. A.; HUNT, R.; JONES, A.; SHARMA, S. Bioplastics and their thermoplastic blends from *Spirulina* and *Chlorella* microalgae. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 130, n. 5, p. 3263-3275, 2013.

ZHANG, F.; ENDO, T.; KITAGAWA, R.; KABEYA, H.; HIROTSU, T. Synthesis and characterization of a novel blend of polypropylene with *Chlorella*. **Journal of Materials Chemistry**, v. 10, n. 12, p. 2666-2672, 2000a.

ZHANG, F.; KABEYA, H.; KITAGAWA, R.; HIROTSU, T., YAMASHITA, M., OTSUKI, T. An exploratory research of PVC-*Chlorella* composite material (PCCM) as effective utilization of *Chlorella* biologically fixing CO₂. **Journal of Materials Science**, v. 35, n. 10, p. 2603-2609, 2000b.

ZHU, L. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: an innovative framework. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 41, p. 1376-1384, 2015.