



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PARTÍCULAS À BASE DE
BIOPOLÍMEROS E VINHAÇA COM ADIÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL
PARA USO COMO FERTILIZANTE**

SILVIA RAQUEL BETTANI

**Araras
2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PARTÍCULAS À BASE DE
BIOPOLÍMEROS E VINHAÇA COM ADIÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL
PARA USO COMO FERTILIZANTE**

SILVIA RAQUEL BETTANI

**ORIENTADORA: PROFa. DRa. MARIANA ALTENHOFEN DA SILVA
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. MARCIO ROBERTO SOARES**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Produção
Vegetal e Bioprocessos Associados
como requisito parcial à obtenção do
título de MESTRE EM PRODUÇÃO
VEGETAL E BIOPROCESSOS
ASSOCIADOS

Araras
2018

Bettani, Silvia Raquel

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PARTÍCULAS À
BASE DE BIOPOLÍMEROS E VINHAÇA COM ADIÇÃO DE BIOMASSA
MICROALGAL PARA USO COMO FERTILIZANTE / Silvia Raquel

Bettani. -- 2018.

94 f. : 30 cm.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal de São Carlos, campus
Araras, Araras

Orientador: Mariana Altenhofen da Silva

Banca examinadora: Mariana Altenhofen da Silva, Fernando César
Bachiega Zambrosi, José Carlos Casagrande, Marcio Roberto Soares

Bibliografia

1. Pectina. 2. Quitosana. 3. Desmodesmus subspicatus. I. Orientador. II.
Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Maria Helena Sachi do Amaral – CRB/8 7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Silvia Raquel Bettani, realizada em 29/06/2018:

Mariana A. do Silva

Prof. Dra. Mariana Altenhofen da Silva
UFSCar

Fernando C.B. Zambrosi

Prof. Dr. Fernando Cesar Bachiega Zambrosi
IAC

José Carlos Casagrande

Prof. Dr. José Carlos Casagrande
UFSCar

Marcio Roberto Soares

Prof. Dr. Marcio Roberto Soares
UFSCar

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar e iluminar, a Prof.^a Dr.^a Mariana Altenhofen da Silva e o Prof. Dr. Marcio Roberto Soares por me orientarem.

Agradeço também ao técnico João Consoni pela ajuda nas análises químicas, a mestranda Bianca Carreiro Cerri por todo apoio em momentos difíceis da qualificação até a defesa e a minha esposa Débora Marta Bettani pelo apoio incondicional.

O Laboratório de Fertilidade de Solo, Laboratório de Ecotoxicologia e Química Ambiental (LEQA) e o Laboratório de Microbiologia Aplicada e Controle (LABMAC) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos (CCA/UFSCar) foram fundamentais para o desenvolvimento do meu mestrado, meus sinceros agradecimentos aos responsáveis Prof. Dr. Jose Carlos Casagrande (Fertilidade do solo), Prof. Dr. Marcio Roberto Soares e Prof.^a Dr.^a Patrícia Monquero (LEQA), ao Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos (LABMAC) e aos amigos e funcionários dos laboratórios pela prontidão em me ajudar e pela amizade.

Agradeço ao Prof. Dr. Theo Guenter Kieckbusch coordenador do LEPPBio (Laboratório de Produtos e Processos em Biorrecursos) da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, pela colaboração nas discussões e nas análises.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (processo n. 431509/2016-6) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

	Página
ÍNDICE DE TABELAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	5
2.1 Objetivo geral.....	5
2.2 Objetivos específicos.....	5
3 REVISÃO DA LITERATURA	7
3.1 Fertilizantes.....	7
3.2 Vinhaça.....	10
3.3 Sistemas de liberação lenta de nutrientes	13
3.4 Biopolímeros naturais.....	14
3.4.1 Pectina	15
3.4.2 Quitosana.....	18
3.5 Biomassa microalgal.....	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Matérias-primas e reagentes	23
4.2 Vinhaça.....	23
4.3 Desenvolvimento do processo para obtenção das partículas	24
4.3.1 Ajuste do pH da vinhaça.....	26
4.3.2 Concentração dos biopolímeros na solução com vinhaça	26
4.3.3 Agitação	26
4.3.4 Adição de biomassa microalgal.....	26
4.3.5 Testes na etapa de reticulação	27
4.3.5.1 Tipo e concentração da solução reticuladora.....	27
4.3.5.2 Altura de gotejamento	27
4.3.5.3 Tempo de reticulação.....	27
4.3.6 Secagem	27
4.4 Caracterização das partículas.....	28
4.4.1 Aspecto visual e diâmetro médio	28

4.4.2 Intumescimento em água	28
4.4.3 Teor de umidade	28
4.4.4 Determinação do pH em água e em cloreto de cálcio 0,01 mol L ⁻¹ ...	28
4.4.5 Massa solubilizável (MS)	29
4.4.6 Resistência à compressão	29
4.4.7 Caracterização química das partículas e da biomassa microalgal...	29
4.4.8 Estrutura química.....	30
4.4.9 Morfologia.....	30
4.5 Teste de Biodegradação em solo.....	31
4.5.1 Coleta e análise física e química do solo.....	31
4.5.2 Ensaio de biodegradação.....	31
4.6 Tratamento estatístico e forma de análise dos resultados.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Caracterização físico-química da vinhaça	33
5.2 Desenvolvimento do processo para obtenção das partículas	34
5.2.1 Ajuste do pH da vinhaça.....	34
5.2.2 Agitação	35
5.2.3 Concentração dos biopolímeros na solução com vinhaça	36
5.2.4 Adição de biomassa microalgal.....	38
5.2.5 Altura do gotejamento	38
5.2.6 Tipo e concentração da solução reticuladora	40
5.2.7 Tempo de reticulação	40
5.2.8 Secagem	41
5.2.9 Definição das formulações otimizadas para caracterização.....	41
5.3 Caracterização das partículas	42
5.3.1 Aspecto visual.....	42
5.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	44
5.3.3 Teor de umidade, pH e massa solubilizável das partícula	47
5.3.4 Diâmetro e resistência mecânica das partículas.....	48
5.3.5 Grau de intumescimento - variação do diâmetro das partículas	50
5.4 Caracterização química das partículas e da biomassa microalgal	53
5.5 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).56	
5.6 Biodegradação.....	60
5.7 Implicações práticas do uso das partículas como fertilizante	65

5.8 Classificação das partículas de acordo com a legislação brasileira	69
6 CONCLUSÕES	72
7 LITERATURA CITADA.....	74

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Composição química média da vinhaça produzida a partir da fermentação de diferentes mostos a base de cana-de-açúcar.....	11
Tabela 2: Composição físico-química média da vinhaça <i>in natura</i> utilizada na elaboração das partículas	34
Tabela 3: Resumo das formulações das partículas selecionadas.....	42
Tabela 4: Resultados médios de umidade, pH e massa solubilizável das partículas	47
Tabela 5: Diâmetro médio e força na compressão das partículas.....	48
Tabela 6: Caracterização química das partículas.....	1
Tabela 7: Caracterização química da biomassa microalgal	1
Tabela 8: Porcentagem de retenção dos nutrientes oriundos da vinhaça e da biomassa microalgal, nas partículas de pectina e de quitosana com vinhaça e biomassa microalgal.....	1
Tabela 9: Caracterização química do Latossolo Vermelho distrófico utilizado na avaliação da biodegradação das partículas biopoliméricas	61
Tabela 10: Composição granulométrica do Latossolo Vermelho distrófico utilizado na avaliação biodegradação de partículas biopoliméricas	61
Tabela 11: Percentual de mineralização das partículas de pectina no solo	63
Tabela 12: Percentual de mineralização das partículas de quitosana no solo	64
Tabela 13: Proporção de macronutrientes em partículas de pectina e de quitosana	67

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Estrutura química da cadeia da pectina (Hourdet e Muller, 1991)	15
Figura 2: Estruturas da pectina de alto teor de metoxilação (a) e de baixo teor de metoxilação (b) (Tharanathan, 2003)	16
Figura 3: Mecanismo de gelificação de pectinas ATM. (Adaptado de Flutto, 2003)..	17
Figura 4: Representação esquemática do modelo “caixa de ovos” (Braccini e Pérez, 2001)	17
Figura 5: (a) Estrutura da quitosana; (b) estrutura da quitina (Einbu e Varum, 2004)	18
Figura 6: Representação esquemática da reticulação iônica da quitosana com íons tripolifosfato (Fonte: Mi et al., 1999)	20
Figura 7: Fluxograma do processo de obtenção de partículas de pectina-vinhaça e quitosana-vinhaça	24
Figura 8: Esquema do sistema experimental para produção das partículas de pectina, quitosana e vinhaça (Adaptado de DE-BASHAN; BASHAN, 2010)	25
Figura 9: Partículas de quitosana e vinhaça reticuladas em solução de TPP 5% por 20 minutos. Quitosana 2% (A), 3% (C) e 5% (E) antes da secagem, e quitosana 2% (B), 3% (D) e 5% (F) após a secagem	37
Figura 10: Partículas de pectina e vinhaça gotejadas a 10 e 30 cm do reticulante. Pectina 3% (A), 5% (C) e 7% (E) gotejadas a 10 cm do reticulante e pectina 3% (B), 5% (D) e 7% (F) gotejadas a 30 cm do reticulante. Ambas antes da secagem	39
Figura 11: Aspecto visual das partículas: (A) água e quitosana, (B) água e pectina, (C) vinhaça e quitosana, (D) vinhaça e pectina, (E) vinhaça, quitosana e microalga e (F) vinhaça, pectina e microalga	43
Figura 12: Aspecto das partículas em imagem aproximadas obtidas em estereoscópio com câmera acoplada Leica M 205 C	43
Figura 13: Micrografias das partículas de pectina com água (partícula inteira, P1a e superfície, P1b), pectina com vinhaça (partícula inteira, P2a e superfície, P2b) e pectina com vinhaça e biomassa microalgal (partícula inteira, P3a e superfície, P3b)	45
Figura 14: Micrografias das partículas de quitosana com água (partícula inteira, Q1a e superfície, Q1b), quitosana com vinhaça (partícula inteira, Q2a e superfície, Q2b) e	

quitosana com vinhaça e biomassa microalgal (partícula inteira, Q3a e superfície, e Q3b)	46
Figura 15: Variação do diâmetro das partículas depectina controle (Pec-C) (A), pectina com vinhaça (Pec-V) (B) e pectina com vinhaça e biomassa microalgal (Pec-V-M) (C), onde A1, B1, C1 são partículas secas e A2, B2, C2 são partículas após 30 minutos de imersão em água.....	51
Figura 16: Variação do diâmetro das partículas de quitosana controle (Qui-C) (D), quitosana com vinhaça (Qui-V) (E) e quitosana com vinhaça e biomassa microalgal (Qui-V-M) (F), onde D1, E1, F1 são partículas secas e D2, E2, F2 são partículas após 30 minutos de imersão em água	52
Figura 17: Espectro de FTIR das partículas de pectina controle, Pec-C (A), pectina com vinhaça, Pec-V (B) e pectina com vinhaça e biomassa microalgal, Pec-V-M (C)	58
Figura 18: Espectro de FTIR das partículas de quitosana controle, Qui-C (A), quitosana com vinhaça, Qui-V (B) e quitosana com vinhaça e biomassa microalgal, Qui-V-M (C)	60
Figura 19: Perfil de liberação de CO ₂ (mg) durante a biodegradação das partículas de pectina controle (Pec-C, ▲), pectina com vinhaça (Pec-V, ■) e pectina com vinhaça e biomassa microalgal (Pec-V-M, ●)	62
Figura 20: Perfil de liberação de CO ₂ (mg) durante a biodegradação das partículas de quitosana controle (Qui-C, ▲), quitosana com vinhaça (Qui-V, ■) e quitosana com vinhaça e biomassa microalgal (Qui-V-M, ●).....	63

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PARTÍCULAS À BASE DE BIOPOLÍMEROS E VINHAÇA COM ADIÇÃO DE BIOMASSA MICROALGAL PARA USO COMO FERTILIZANTE

Autora: SILVIA RAQUEL BETTANI

Orientadora: Profa. Dra. MARIANA ALTENHOFEN DA SILVA

Co-orientador: Prof. Dr. MARCIO ROBERTO SOARES

RESUMO

A vinhaça é o efluente líquido mais expressivo do setor sucroenergético, sendo gerado na proporção de 12 litros por litro de etanol produzido. Seu principal destino é a fertirrigação, em plantações próximas às usinas, porém quando aplicada em proporções inadequadas pode causar impactos ambientais, além de ter seus íons lixiviados. Uma estratégia alternativa para a destinação final da vinhaça e ampliação da área de aplicação é o desenvolvimento de sistemas de liberação lenta e/ou controlada à base de polímeros biodegradáveis, como a pectina e a quitosana, utilizando vinhaça como solvente. Esta pesquisa teve como objetivo o estudo do processo de obtenção de partículas de pectina e de quitosana por gelificação ionotrópica utilizando vinhaça como solvente, para uma possível aplicação na agricultura. Além da incorporação da vinhaça, também considerou-se a adição da biomassa desengordurada da microalga *Desmodesmus subspicatus* como biofertilizante. As partículas foram avaliadas quanto ao aspecto visual, diâmetro médio, conteúdo de umidade, pH, solubilidade, resistência mecânica, composição química, morfologia e biodegradação. Em geral, as partículas apresentaram matriz polimérica homogênea e formatos esféricos. As partículas de pectina e vinhaça apresentaram diâmetro médio de 2,7 mm, teor de umidade de 16,0%, pH 3,0, solubilidade de 64 e 48 g.100 g⁻¹ em água e em CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹, respectivamente, e força de compressão de 31 N. As partículas de quitosana e vinhaça tiveram um diâmetro médio de 1,9 mm, teor de umidade de 15,2%, pH 6,6, solubilidade de 43 e 34 g. 100g⁻¹ em água e em CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹, respectivamente, e força na compressão de 62 N. A adição da biomassa microalgal, de maneira geral, não alterou as propriedades das partículas, porém causou aumento na concentração de N das partículas de pectina e na concentração de micronutrientes de ambas. As partículas desenvolvidas retiveram parte dos nutrientes da vinhaça em sua composição e apresentaram, na forma de partículas sólidas, de 65 a 93% de mineralização após 36 dias de sua aplicação no solo. De acordo com a legislação brasileira vigente, estas podem ser classificadas como biofertilizante e apresentam potencial para serem aplicadas na agricultura, possibilitando a reciclagem de nutrientes da vinhaça, dos biopolímeros e da biomassa microalgal para o solo e, sobretudo, o aproveitamento deste importante resíduo da indústria sucroalcooleira.

Palavras chave: Pectina, quitosana, *Desmodesmus subspicatus*, vinhaça, biopolímero

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF BIOPOLYMERS AND VINASSE BASED PARTICLES ADDED WITH MICROALGAE BIOMASS FOR USE AS FERTILIZER

Author: SILVIA RAQUEL BETTANI

Adviser: Profa. Dra. MARIANA ALTENHOFEN DA SILVA

Co-adviser: Prof. Dr. MARCIO ROBERTO SOARES

ABSTRACT

Sugarcane vinasse is the main wastewater from the ethanol industry, produced in a proportion of about 12 liters per liter of ethanol. Among alternatives to its disposal, Fertirrigation is commonly used in order to improve soil fertility of crops near the sugarcane producing areas. However, it is currently being questioned due to its effects on the soil and on groundwaters, caused by nutrient lixiviation. An alternative would be the development of slow and/or controlled release systems based on biodegradable polymers, such as pectin and chitosan, using vinasse as the solvent. This could reduce the amount applied and allow the extension of fertirrigation covered area. This study proposed the development of pectin and chitosan particles by ionotropic gelation using vinasse as solvent, intending a possible application in agriculture. Besides the use of vinasse, the incorporation of *Desmodemus subspicatus* defatted biomass was considered to enhance nutrient content. The particles were evaluated according to their visual aspects, average diameter, moisture content, pH, solubility in water and CaCl_2 0.01 mol L^{-1} , mechanical property, chemical composition, morphology and biodegradation in soil. In general, the particles showed homogeneous matrix and spherical shapes. Pectin/vinasse particles had an average diameter of 2.7 mm, moisture content of 16.0%, pH 3.0, soluble matter of 64 and $48 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ in water and CaCl_2 0.01 mol L^{-1} , respectively, and compression force of 31 N. Chitosan/vinasse particles had an average diameter of 1.9 mm, moisture content of 15.2%, pH 6.6, soluble matter 43 and $34 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ in water and 0.01 mol L^{-1} CaCl_2 , respectively, and compression force of 62 N. The addition of microalgae biomass did not greatly affect particles properties. However, it increased the concentration of N for pectin particles and the concentration of micronutrients for both particles. The developed materials were able to retain nutrients from vinasse and showed, as solid particles, 65-93% of mineralization after 36 days of contact with soil. According to the Brazilian current legislation, they can be classified as biofertilizers and represent a novel application in agriculture, allowing the recycling of nutrients from vinasse, biopolymers and microalgal biomass to the soil.

Keywords: Pectin, chitosan, *Desmodemus subspicatus*, vinasse, biopolymer

1 INTRODUÇÃO

A vinhaça é um efluente líquido oriundo da destilação de uma solução alcoólica denominada vinho, obtida no processo de fermentação do caldo de cana-de-açúcar, do melaço ou da mistura dos dois, também conhecida pelos nomes vinhoto, tiborna ou restilo (DN.COPAM 164/2011). Este é o principal resíduo das indústrias no processo de produção do etanol, sendo que a cada litro de etanol produzido são gerados cerca de 12 litros de vinhaça (De Medina e Brinholi, 1998, Elia Neto et al, 2009, Fuess et al, 2017). Dessa forma, a produção brasileira total de etanol (anidro e hidratado) na safra 2017/18 de cana-de-açúcar, estimada em 27,1 bilhões de litros (CONAB, 2018), deverá gerar 325 bilhões de litros de vinhaça.

Este resíduo é caracterizado por ser um líquido de odor forte, coloração marrom-escuro, baixo pH, alto teor de potássio e com alta carga de matéria orgânica, podendo ser um material de impacto ambiental negativo dependendo da forma de uso (Orlando Filho et al, 1983; España-Gamboa et al, 2011).

Em 1980, o extinto Ministério do Interior proibiu o lançamento, direto ou indireto, da vinhaça em qualquer coleção hídrica pelas destilarias de álcool instaladas

ou que venham a se instalar no país (Brasil,1980). A partir de então a forma de disposição passou a ser a fertirrigação, sendo sua aplicação diretamente no solo (*in natura*) devido ao seu potencial de fertilizante orgânico com alto teor de potássio, substituindo em parte o adubo mineral (Elia Neto et al, 2016).

No Brasil, praticamente todo o volume de vinhaça é utilizado como fertilizante nas áreas cultivadas com cana-de-açúcar. Além de reduzir os custos com a aplicação de fertilizantes e proporcionar incrementos na fertilidade do solo, a prática é reconhecida como forma de disposição final que atende a Norma Técnica (NT) P4.231 (CETESB, 2015), que dispõe sobre os critérios e procedimentos para aplicação de vinhaça em solos agrícolas no Estado de São Paulo (Soares et al., 2014).

Além do alto custo de aspersão da vinhaça nas áreas agrícolas, existe uma distância acima da qual há comprometimento da viabilidade econômica do transporte rodoviário ou dutoviário da vinhaça. Estes entraves limitam a sua aplicação somente nas áreas mais próximas da unidade produtora, o que tem provocado dificuldades para a destinação final dos atuais volumes de vinhaça em conformidade com a NT P4.231, a qual tem permitido taxas de $150 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ em média. O setor sucroenergético intensificou o uso de vinhaça concentrada, que tem se mostrado praticável nas áreas localizadas além da distância máxima econômica. Apesar da alta demanda de energia na forma de vapor, a tecnologia mais comum de concentração por evaporação tem permitido a obtenção de vinhaça concentrada a 40%. Uma tecnologia emergente, que utiliza vapores alcoólicos no processo de concentração, tem sido capaz de concentrar a vinhaça a 10% (Elia Neto, 2016).

Além da redução nos custos com o transporte, a vinhaça concentrada dispensa a aplicação por aspersão e, dependendo do grau de concentração, pode ajustar-se ao manejo utilizado com os fertilizantes sólidos convencionais, ou seja, com distribuição na linha de plantio. Essa mudança na forma da aplicação, constitui importante avanço na disposição da vinhaça em solos agrícolas.

O processo de concentração vai alterar a interação da vinhaça com o solo, mas, apesar da mudança na natureza física e no modo de aplicação, a vinhaça concentrada ainda apresentará alta solubilidade no solo. Uma estratégia promissora seria viabilizar o uso da vinhaça a partir de sistemas de liberação lenta. Trata-se de tecnologia empregada para retardar a disponibilização de nutrientes a partir de fertilizantes ou de princípios ativos de diversos insumos agrícolas, ampliando a eficiência e minimizando o impacto ambiental (Ghormade et al., 2011).

Diversos tipos de dispositivos de liberação lenta vêm sendo testados para uso na agricultura, e atualmente há uma tendência crescente no uso de polímeros biodegradáveis derivados de recursos renováveis. Estes materiais podem ser utilizados como condicionadores do solo, uma vez que melhoram a disponibilidade de água e permitem a liberação lenta de nutrientes, garantem benefícios econômicos e ambientais, evitam a contaminação do lençol freático e aumentam a eficiência de uso de nutrientes (Puoci et al, 2008; Nakasato, et al, 2017).

Dentre os polímeros naturais com boa capacidade de formação de hidrogéis, destacam-se a pectina e a quitosana. Esses polissacarídeos são abundantes na natureza e obtidos comercialmente de resíduos da indústria de cítricos e pesca, respectivamente (Fang et al., 2008). Segundo Bhattarai et al (2010), hidrogéis são compostos de redes de polímeros reticulados que possuem um alto número de grupos ou domínios hidrofílicos. Estas redes têm uma alta afinidade pela água, mas são impedidas de se dissolverem devido às ligações químicas ou físicas formadas entre as cadeias poliméricas. A água penetra nessas redes causando inchaço, dando forma ao hidrogel.

O solvente normalmente utilizado para a formação de géis de pectina e quitosana é a água, sendo necessário reduzir o pH para 3,5 e 3,0 para solubilização da quitosana e gelificação da pectina. Para a pectina de alto teor de metoxilação (ATM), além do pH baixo é necessário a presença de um alto teor de sólidos solúveis para a gelificação. Assim, algumas das características como pH baixo, alto teor de sólidos solúveis como glicerol e açúcares residuais (Navarro, 2000), tornam a vinhaça um meio interessante para solubilização de biopolímeros. A incorporação de nutrientes da vinhaça em uma matriz polimérica, possibilita a elaboração de novos materiais e como consequência agrega valor ao excedente desse subproduto.

A aplicação da vinhaça como solvente na produção de partículas de pectina ou de quitosana é uma maneira de oferecer outras opções de uso para o efluente na forma de tecnologia inédita e inovadora, que deverá ampliar a eficiência de uso de nutrientes por meio da liberação lenta e melhor aproveitar os nutrientes da vinhaça. O processo tende a concentrar a vinhaça, implicando menor volume de material para ofertar a mesma quantidade (ou mais) de nutrientes por m³, quando comparado com a prática de aplicação de vinhaça *in natura*, por fertirrigação. A mudança da natureza física da vinhaça de líquida para partículas sólidas pode representar inovação no seu modo de uso com finalidade agrícola, com aplicação nos sulcos de plantio no ciclo de

cana-planta, ou na entrelinha nos ciclos de cana-soca, havendo disponibilização de nutrientes de forma gradual e mais compatível com a necessidade e capacidade de absorção pelas plantas. Além disso, o desenvolvimento de partículas sólidas amplia as perspectivas de uso da vinhaça em outras culturas além da cana-de-açúcar, significando importante solução para que o setor sucroenergético providencie destinação final mais adequada ao efluente, sobretudo aos excedentes.

Além do aproveitamento da vinhaça, um outro resíduo com potencial fertilizante é a biomassa residual microalgal. A produção de microalgas em escala comercial tem alcançado crescente atenção, principalmente no que diz respeito ao aproveitamento das frações lipídicas e proteicas da biomassa microbiana. A maioria das pesquisas refere-se à produção de biomassa para alimentação animal e humana e à extração de compostos com elevado valor agregado (Pulz; Gross, 2004; Spolaore et al., 2006; Harun et al., 2010). No entanto, estudos vêm apontando aplicações das microalgas na agricultura, como fertilizante de solo (Mata et al., 2010; Renuka et al., 2016; Suganya et al. 2016). Diferentes espécies da microalga clorofícea *Desmodesmus* (*Scenedesmus*) vêm sendo cultivadas como células livres e imobilizadas a partir de águas residuárias industriais e domésticas, apresentando alta viabilidade celular, com tolerância a variações de temperatura e pH (Martínez et al., 2000; Voltolina et al., 2005; Zhang et al., 2008; Li et al., 2010; Hodaifa et al., 2012; Prathima Devi et al., 2012). Pesquisadores do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) vem desenvolvendo projetos sobre o cultivo desta microalga a partir de águas residuárias agroindustriais (como a vinhaça), com produção e aproveitamento da biomassa para obtenção de biodiesel. Entretanto, estes estudos não têm abordado o aproveitamento da biomassa residual desengordurada, que apresenta potencial promissor para ser aproveitada como biofertilizante.

A incorporação da vinhaça e da biomassa residual microalgal a uma matriz polimérica pode apresentar alguns benefícios para o setor agrícola, tais como a melhor destinação e o aumento do valor agregado destes resíduos, assim como a elaboração de um produto biodegradável com nutrientes incorporados, com potencial aplicação no solo como biofertilizante.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

A presente pesquisa teve como objetivo geral estudar o processo de produção de partículas biodegradáveis de pectina e de quitosana, utilizando vinhaça como solvente e com adição de biomassa microalgal. Além disso, propôs-se uma avaliação do potencial de aplicação destas partículas na agricultura como biofertilizante e sistema alternativo de liberação lenta de nutrientes, oriundos da vinhaça e da biomassa microalgal, e assim oferecer uma forma alternativa de destinação da vinhaça.

2.2 Objetivos específicos

Para organizar o desenvolvimento da pesquisa, os seguintes objetivos específicos foram idealizados:

- Estudo de métodos para produção de partículas de pectina e de quitosana com vinhaça e biomassa microalgal, e elaboração de um protocolo experimental por meio de ajuste das principais variáveis do processo;

➤ Caracterização das partículas, produzidas de acordo com as formulações selecionadas, em termos de diâmetro médio, morfologia, umidade, pH, solubilidade, propriedades mecânicas e composição química;

➤ Avaliação da cinética de biodegradação em solo das partículas produzidas, visando a verificação do potencial de aplicação dos biopolímeros como tecnologia alternativa de liberação lenta, garantindo a disponibilização mais lenta e gradual dos nutrientes.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Fertilizantes

O uso de fertilizantes tem uma contribuição essencial para a sustentabilidade da agricultura e para a segurança alimentar (Fernandez-Perez et al., 2008). Tratam-se de fertilizantes definidos na legislação brasileira (Brasil, 1982) como “substâncias minerais ou orgânicas, naturais ou sintéticas, fornecedoras de um ou mais nutrientes das plantas”, que têm como função repor ao solo os elementos retirados em cada colheita, com a finalidade de manter, ou mesmo de ampliar, o seu potencial produtivo.

Os elementos químicos presentes nos fertilizantes, conforme a quantidade ou proporção exigidas pelas plantas, podem ser divididos em duas categorias: macronutrientes primários (nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K)) e secundários (cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S)), requeridos em quantidades expressas em kg ha^{-1} , e micronutrientes (boro (B), cloro (Cl), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), molibdênio (Mo), níquel (Ni) e zinco (Zn)), expressas em g ha^{-1} . Se o solo não dispuser de quantidade suficiente de qualquer dos nutrientes mencionados, mesmo aqueles

minimamente necessários, há prejuízo para as fases vegetativa e reprodutiva da planta, com redução drástica da produção (Dias e Fernandes, 2006; MeurerAbi, 2007).

Diversos tipos de fertilizantes, naturais e sintéticos, estão disponíveis no mercado para uso em grande escala na agricultura (Naz e Sulaiman, 2016). Para a indústria de fertilizantes, produtos contendo N, P_2O_5 e K_2O , na forma de matérias-primas, de fertilizantes simples ou de fertilizantes mistos (mistura de grânulos, mistura granulada ou mistura complexa), são os prioritários. O Brasil é um dos grandes importadores mundiais de fertilizantes. De acordo com o mais recente anuário da Associação Brasileira das Indústrias de Tecnologia em Nutrição Vegetal (ABISOLO, 2018), o Brasil importou, em 2017, 8,7 milhões de toneladas de fertilizantes nitrogenados (ureia, sulfato de amônio e nitrato de amônio), 5,7 milhões de toneladas de fertilizantes fosfatados (superfosfato simples, superfosfato triplo, fosfato monoamônico e fosfato diamônico) e 9,7 milhões de toneladas de fertilizantes potássicos (cloreto de potássio).

A necessidade do Brasil em adquirir matérias-primas ou fertilizantes para o suprimento direto de macronutrientes secundários (Ca, Mg e S) tem menor expressão econômica na indústria de fertilizantes (Dias e Fernandes, 2006). O Brasil é autossuficiente na produção do calcário agrícola, insumo que representa a principal fonte de Ca para a agricultura nacional. O uso do gesso agrícola (sulfato de cálcio), subproduto da fabricação dos fertilizantes fosfatados, também representa fonte importante de Ca para as culturas. Dessa forma, o país não depende de importações para o suprimento de Ca com finalidade agrícola. A importação de 7,3 mil toneladas de cloreto de cálcio em 2017 foi para atender, principalmente, a indústria do petróleo e do gás. O calcário, principalmente o dolomítico, também é a fonte principal de Mg para a agricultura no Brasil. Em 2017, o país importou 5,2 mil toneladas de sulfato de magnésio e 4,3 mil toneladas de nitrato de magnésio, das quais aproximadamente 75% foi utilizada com finalidade agrícola. Dentre os macronutrientes secundários, o Brasil possui maior dependência das importações de enxofre. Em 2017, foram importadas 1,9 milhões de toneladas do elemento. Apesar de serem requeridos em menores proporções quando comparados aos macronutrientes, o adequado suprimento de micronutrientes na agricultura brasileira também tem importante dependência das importações. Em 2017, as principais fontes de micronutrientes importadas pelo Brasil foram: B - 40 mil t de ácido bórico e 12 mil t de bórax; Fe – 1,6

mil t de sulfato ferroso; Mn – 7,2 mil t de sulfato de manganês; Mo – 370 t de molibdato de sódio e 11 t de molibdato de amônio.

Sabe-se que uma parte dos nutrientes adicionados ao solo não é aproveitada pelos vegetais devido a diversas rotas de perda, como lavagem do perfil do solo através da água da chuva ou da irrigação (lixiviação), por arraste de partículas (erosão), por imobilização pelos organismos, por fixação (adsorção envolvendo reações de alta energia) pelas partículas coloidais do solo e por volatilização. Estima-se que o índice de aproveitamento do nitrogênio seja de 70 a 90%, do fósforo seja de 5 a 20% e do potássio, de 50 a 70%. Um dos fatores que contribuem substancialmente para essas perdas é a pronta solubilização dos fertilizantes (Alcarde et al, 1998). Atualmente, do total de fertilizantes aplicado na agricultura, em torno de 40% são perdidos de várias formas no solo por falta de uma tecnologia adequada. A viabilização de formas alternativas para a produção e aplicação de fertilizantes vem sendo estudada visando superar esses entraves tecnológicos (Granda, 2014).

A União Europeia, já há alguns anos, vem incentivando os agricultores a reduzir o uso de fertilizantes sintéticos através da otimização da sua aplicação e também pela sua substituição, parcial ou completa, por biofertilizantes (Ivanova et al., 2005).

O déficit estrutural na demanda por macronutrientes no mercado brasileiro é decorrente da pujança e competitividade do agronegócio e das restrições estruturais da indústria de produção de fertilizantes, uma vez que o país carece de insumos dessa indústria. Entretanto, a abundante produção de resíduos por alguns setores do agronegócio possibilita que os nutrientes presentes nesses rejeitos possam ser reaproveitados, reduzindo, assim, a destinação ambientalmente incorreta e atribuindo maior contorno de economia circular ao agronegócio brasileiro. A produção de resíduos dos setores sucroalcooleiro, bovino, suíno e avicultor de corte poderia suprir, aproximadamente, metade da demanda de macronutrientes brasileira em um cenário hipotético de aproveitamento de todos os resíduos gerados por esses segmentos. Apenas a conversão dos nutrientes presentes nos segmentos que apresentam menos desafios logísticos (sucroalcooleiro, suíno e avicultor de corte) representaria um mercado potencial superior a US\$ 1 bilhão anuais (Cruz et al, 2017).

3.2 Vinhaça

A vinhaça ou vinhoto é o efluente líquido mais expressivo do setor sucroenergético, proveniente da destilação da solução alcoólica obtida do processo de fermentação do caldo de cana-de-açúcar, do melaço ou da mistura de caldo e melaço. Tem-se observado uma variação da taxa de produção de vinhaça de 7 a 16 litros por litro de etanol produzido. Porém, há tendência de diminuir a proporção para 12 litros de vinhaça por litro de etanol, média bastante representativa da atual tecnologia de produção de etanol (Elia Neto et al., 2009). O potencial poluente da vinhaça é cerca de cem vezes maior que o do esgoto doméstico, decorrente da alta carga de matéria orgânica, baixo pH, elevadas DBO e DQO, além de cor escura e odor característico (Freire e Cortez, 2000; Sartori, 2011; Bonini, 2012).

Não há opção para o tratamento convencional da vinhaça que possibilite atingir os padrões de lançamento em corpos d'água exigidos pela legislação. Por isso, a vinhaça é classificada como Resíduo Sólido Classe II-A, não perigoso e não inerte, conforme a norma ABNT 10.004. Ainda que não exista solução definitiva para a destinação da vinhaça, o setor sucroenergético tem conseguido neutralizar o potencial poluidor da sua altíssima carga orgânica (Soares et al., 2014). A prática de fertirrigação é apresentada como a solução para o enorme problema da disposição desse resíduo desde que foi proibido o seu simples descarte no curso d'água mais próximo da usina, prática comum durante a história (Brasil, 1980; Bonini, 2012). Quando depositada no solo, a vinhaça pode promover uma melhoria na fertilidade, o que beneficia as culturas agrícolas. Entretanto, as taxas de aplicação, que dependem não somente das características da vinhaça, mas também das do solo e da cultura da cana-de-açúcar, não devem ultrapassar a capacidade de retenção de íons até a profundidade de 0,8 m no perfil do solo, considerada a zona de efetiva absorção do sistema radicular. A aplicação de vinhaça em proporções exageradas pode resultar na lixiviação de íons, sobretudo de nitrato (NO_3^-) e de potássio (K^+), que podem alcançar áreas adjacentes e águas subterrâneas, causando impactos ambientais e sanitários (Corbi, 2006).

O método de cálculo das dosagens de vinhaça a serem aplicadas no solo é definido pela Norma Técnica P4.231 (CETESB, 2015). O cálculo envolve o teor de potássio (K) e a capacidade de troca de cátions (CTC) no solo (até 0,8 m) e o teor de K_2O da vinhaça. Apesar de ser considerada um marco regulatório na legislação ambiental, a NT P4.231 tem sido criticada por não considerar os teores de NO_3^- , no

cálculo das taxas de aplicação de vinhaça, o que representa risco iminente de contaminação de águas subterrâneas em virtude da grande mobilidade do íon no solo.

A composição química da vinhaça (Tabela 1) indica que a matéria orgânica é seu principal componente. No entanto, vários elementos químicos participam da sua composição, o que inclui macronutrientes primários (N-NO₃⁻, N-NH₄⁺ e, principalmente, K⁺), secundários (Ca²⁺, Mg²⁺ e SO₄²⁻) e alguns micronutrientes (Cu²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺ e Zn²⁺) (Soares et al., 2014).

Tabela 1: Composição química média da vinhaça produzida a partir da fermentação de diferentes mostos a base de cana-de-açúcar

Parâmetro	Tipo de mosto		
	Melaço	Caldo	Misto
pH	4,2-5,0	3,5-4,6	3,5-4,6
Temperatura (°C)	80-100	80-100	80-100
DBO (mg L ⁻¹ O ₂)	25.000	6.000-16.500	19.800
DQO (mg L ⁻¹ O ₂)	65.000	15.000-33.000	45.000
Sólidos totais (mg L ⁻¹)	81.500	23.700	52.700
Sólidos voláteis (mg L ⁻¹)	60.000	20.000	40.000
Sólidos fixos (mg L ⁻¹)	21.500	3.700	12.700
Nitrogênio (mg L ⁻¹ N)	450-1.610	150-700	330-710
Fósforo (mg L ⁻¹ P ₂ O ₅)	100-350	10-610	90-610
Potássio (mg L ⁻¹ K ₂ O)	3.500-7.870	1.010-2.100	2.100-4.600
Cálcio (mg L ⁻¹ CaO)	450-5.180	130-1.540	570-4.570
Magnésio (mg L ⁻¹ MgO)	420-1.520	200-490	330-700
Sulfato (mg L ⁻¹ SO ₄ ²⁻)	1.050-6.400	600-2.030	1.600-3.740
Carbono (mg L ⁻¹ C)	11.200-22.900	5.700-13.400	8.700-12.100
Ferro (mg L ⁻¹)	52-120	45-110	47-130
Cobre (mg L ⁻¹)	3-9	1-18	2-57
Zinco (mg L ⁻¹)	3-4	2-3	3-50
Manganês (mg L ⁻¹)	6-11	5-6	5-10
Relação C/N	16,0	19,7-21,1	16,4
Matéria orgânica (mg L ⁻¹)	37.000-63.940	15.300-45.000	3.800-45.100

Fonte: (1) Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (1982), (2) Glória e Orlando Filho (1983) e (3) Orlando Filho e Leme (1984). Adaptado e compilado por Soares et al. (2014).

A composição química da vinhaça é variável e depende de fatores como a composição e natureza da matéria prima, método de fermentação utilizado, sistema

utilizado na preparação do mosto, tipo de levedura utilizada, destilador e do tipo de flegma separado (Helbel e Andrade, 2009)

A vinhaça possui um elevado teor de água e sua aplicação em áreas mais distantes da destilaria sofre as limitações resultantes do alto custo de transporte. Existe uma distância econômica para transporte e aplicação da vinhaça por fertirrigação, acima da qual os custos são maiores do que a adubação mineral convencional. Com a alta dos preços dos fertilizantes, estima-se que ainda compense percorrer a distância de 38 km utilizando o transporte rodoviário. Com isto, as áreas agrícolas mais próximas das unidades produtoras não têm sido suficientes para receber o crescente volume de vinhaça. A aplicação recorrente de vinhaça nestas áreas, além de desrespeitar a legislação, amplia o risco de saturação do solo, podendo desencadear impactos negativos do seu uso agrícola, tais como a contaminação das águas subterrâneas, o desequilíbrio de nutrientes no solo, a intensificação dos odores e a atração de vetores (mosca do estábulo em áreas tradicionais da pecuária) (Gomes et al, 2011; Soares et al, 2014, Elia Neto, 2016).

A produção de etanol teve um crescimento médio de 6,91% a.a. no período de 1975 a 2009 (Da Cruz et al, 2012) e segundo dados da CONAB (2018) a produção brasileira de etanol total (anidro e hidratado) a partir da safra 2017/18 de cana-de-açúcar está estimada em 27,1 bilhões de litros, o que deverá gerar 325,2 bilhões de litros de vinhaça. Assim, a destinação adequada do volume de vinhaça gerado ainda constituirá um problema de difícil solução, com risco de trazer impactos negativos ao meio ambiente por disposição inadequada (Bisinoti et al, 2017).

Soares et al (2014) e Lofrano et al (2016) relataram que os impasses para o uso da vinhaça na fertirrigação obrigam o setor sucroenergético a buscar novas alternativas de destinação final adequada para o efluente. Os autores sugerem que pesquisas voltadas a sanar ou a minimizar os efeitos e danos ambientais, bem como o desenvolvimento de tecnologias de aplicação empregando-se esse efluente, são fundamentais. Devido ao alto custo normalmente envolvido na implementação seria interessante que as estratégias inovadoras ofereçam algum atrativo, como valor agregado e geração de novos subprodutos com valor econômico.

3.3 Sistemas de liberação lenta de nutrientes

Uma das maneiras mais promissoras e viáveis de se contornar os problemas relacionados ao uso de fertilizantes baseia-se em tecnologias de sistemas de liberação lenta e/ou controlada. A possibilidade de proteger e encapsular agroquímicos, tais como fertilizantes, herbicidas, fungicidas e inseticidas em matrizes/dispositivos de liberação lenta e/ou controlada, tem despertado interesse nas áreas de agricultura sustentável e segurança alimentar. Assim, o interesse pelo uso de materiais alternativos na agricultura tem aumentado devido à necessidade de melhorar os sistemas de produção com aumento de produtividade e redução de custos (Ghormade et al., 2011). Pesquisas demonstraram que a adição de fertilizantes em matrizes poliméricas reduziu a lixiviação de N e de K em solos bem drenados, assim como aumentou a recuperação de N, P, Fe e Mn pelas plantas (Mikkelsen, 1994, Ibrahim et al., 2016). Azeem et al (2014) sugerem que os sistemas de revestimento da ureia com polissacarídeo devem ser melhorados a fim de evitar a perda de nitrogênio através de lixiviação, volatilização e desnitrificação.

Diversos tipos de dispositivos de liberação vêm sendo testados para fornecer a quantidade de nutrientes adequada em uma taxa controlada e o uso de polímeros hidrofílicos como carregadores de nutrientes é uma das tendências mais difundidas. Hidrogéis são exemplos de materiais alternativos que possuem a habilidade de aumentar significativamente seu tamanho, através da absorção de água, e de gradualmente liberar princípios ativos encapsulados no meio em que estão inseridos (Liang et al., 2007, Zhong et al., 2013). Os hidrogéis são definidos como redes poliméricas tridimensionais que podem reter uma quantidade significativa de água dentro de sua própria estrutura e intumescer, sem a dissolução (Kaewpirom & Boonsang, 2006; Rui et al., 2007). Alguns polímeros têm sido usados para preparar hidrogéis que aumentam a retenção de água no solo, reduzindo a frequência de irrigação (Abedi-Koupaia et al., 2008; Mendonça et al., 2013).

Atualmente os materiais são compostos de polímeros sintéticos ou semissintéticos não-biodegradáveis, tais como poliacrilamida, poliacrilamida-acrilato e poliacrilonitrila poliestireno, podendo acumular resíduos no solo devido ao seu uso continuado (Mendonça et al., 2013). Assim, há tendência crescente no uso de polímeros biodegradáveis derivados de recursos renováveis. Estes materiais podem ser utilizados como condicionadores do solo ou como fertilizante orgânico, desde que atendam a especificações legais. Para condicionadores, a Capacidade de Retenção

de Água (CRA) mínima deve ser de 60% e Capacidade de Troca Catiônica (CTC) de 200 mmol c/kg (IN35, Brasil, 2006), enquanto que para fertilizante orgânico devem apresentar teores mínimos de macronutrientes secundários e micronutrientes, para classificação como biofertilizante não há especificações a serem atendidas, devendo apenas relatar a composição, conforme estabelecido na norma IN 25 (BRASIL, 2009).

Os sistemas de liberação lenta e/ou controlada podem ser produzidos por diferentes métodos que incluem a cobertura ou imobilização de agentes ativos, garantindo a sua liberação lenta/gradual ou controlada a partir de variáveis ambientais, como temperatura, umidade ou pH do solo (Bashan 1986; Kim et al. 2012).

Diversas técnicas são utilizadas para obtenção de matrizes poliméricas: processos físicos como atomização (*spray drying*, *spray chilling/cooling*), extrusão, leito fluidizado e co-cristalização; processos químicos como, inclusão molecular e polimerização interfacial; e processos físico-químicos como coacervação simples e complexa, envolvimento lipossômico, separação por fase orgânica e gelificação/gelificação inversa. A taxa de degradação da matriz polimérica terá relação direta com a atividade biológica dos micro-organismos do solo. As partículas secas podem ser armazenadas a temperatura ambiente por longos períodos, garantindo a manutenção dos princípios ativos imobilizados. Além disso, são facilmente transportadas.

3.4 Biopolímeros naturais

Dentre os polímeros naturais que se apresentam como potenciais formadores de hidrogéis, destacam-se a pectina e a quitosana (Fang et al., 2008).

O solvente normalmente utilizado para a formação de partículas de pectina e de quitosana é a água, sendo necessário reduzir o pH para solubilização (quitosana) e gelificação (pectina ATM) dos polímeros. Assim, algumas características da vinhaça como pH baixo, alto teor de sólidos solúveis como glicerol e açúcares residuais (Navarro, 2000), a tornam um solvente interessante para estes biopolímeros. Este uso para vinhaça, principal água residuária do setor sucroalcooleiro, pode representar uma alternativa para o aproveitamento deste resíduo. Não há relatos em trabalhos na literatura científica sobre a utilização da vinhaça como solvente para produção de partículas biodegradáveis.

3.4.1 Pectina

Pectinas são polissacarídeos aniônicos solúveis em água que, junto com a celulose e com a hemicelulose, formam a estrutura das paredes celulares dos vegetais (Hiorth et al., 2003). As pectinas podem ser extraídas de diferentes fontes. As principais fontes comerciais são o bagaço de frutas cítricas (25% da matéria seca) e o bagaço seco de maçã (15-18% da matéria seca), nos quais a extração é conduzida sob condições ácidas ou básicas com posterior deslignificação pelo tratamento com cloreto de sódio (Marudova et al., 2004). A produção industrial brasileira teve início no ano de 1954, na cidade de Limeira-SP, sendo a maior produtora mundial de pectina cítrica (Canteri et al, 2012).

A aplicação mais conhecida desta matéria-prima é como agente espessante e gelificante na produção de diversos alimentos como geléias, sucos de frutas e produtos lácteos. Entretanto, características como biocompatibilidade e a não-toxicidade também permitem que a pectina esteja sendo crescentemente utilizada nas áreas farmacêutica e biotecnológica, com destaque para o uso em sistemas de liberação controlada de princípios ativos (Liu et al., 2007, Murata et al., 2004, Sriamornsak & Nunthanid, 1998).

Quimicamente, a pectina é um polissacarídeo complexo composto de resíduos do ácido D-galacturônico unidos por ligações glicosídicas do tipo α (1,4) (Figura 1), cujos grupos carboxílicos podem estar parcialmente esterificados por metoxilas. Açúcares neutros, principalmente D-galactose, L-arabinose e L-raminose e, em menor quantidade, D-xilose, também podem estar ligados à cadeia da pectina (Walkenström et al., 2003; Cardoso et al., 2003; Willats et al., 2006).

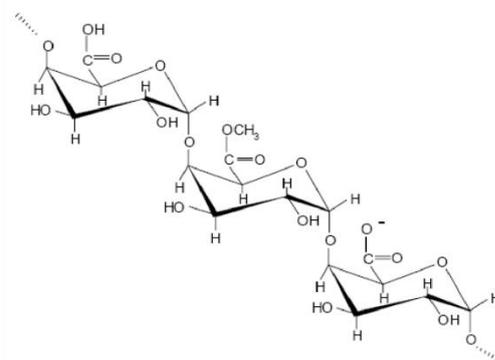


Figura 1: Estrutura química da cadeia da pectina (Hourdet e Muller, 1991)

O teor de metoxilação (TM) é utilizado como critério para a classificação comercial das pectinas e corresponde à proporção dos grupos de ácido galacturônico metilados presentes na molécula de pectina. O teor de metoxilação varia com a idade e a localização dentro do tecido da planta, com o método de extração e com o conteúdo de açúcares neutros e possui importante influência sobre as propriedades da pectina, especialmente a solubilidade e as características gelificantes e formadoras de filme (Liu et al., 2007).

As pectinas são classificadas como pectinas de alto teor de metoxilação (ATM), quando possuem acima de 50% de seus grupos carboxílicos esterificados, e como pectinas de baixo teor de metoxilação (BTM), quando 50% ou menos de seus grupos estão esterificados (Figura 2). A distribuição de cargas ao longo das cadeias de pectinas pode ser modificada utilizando métodos químicos e enzimáticos de desesterificação, visando a obtenção de produtos com características distintas (Hiorth et al., 2003; Marudova et al., 2004). Quando o processo de desesterificação é realizado com amônia, alguns grupos metil éster são substituídos por grupos amidas, resultando em pectinas BTM com grau de amidação (May, 1997).

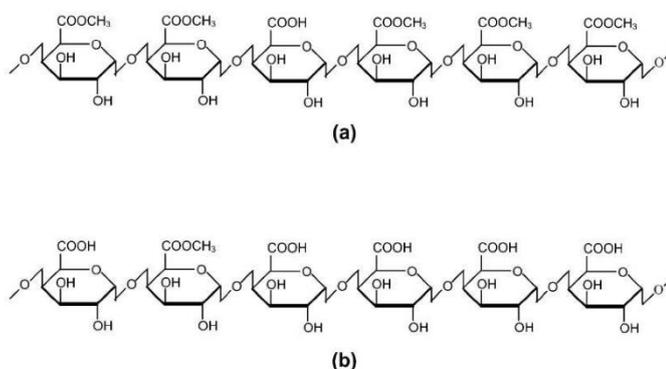


Figura 2: Estruturas da pectina de alto teor de metoxilação (a) e de baixo teor de metoxilação (b) (Tharanathan, 2003)

Os mecanismos de associação e gelificação são diferentes para os dois tipos de pectinas. As pectinas ATM apresentam, predominantemente, interações intermoleculares por ligações de hidrogênio e forças hidrofóbicas. A gelificação de pectinas ATM é normalmente observada em pH ácido (< 3,5) e na presença de altas concentrações de açúcares ou outros sólidos solúveis. O pH ácido provoca a protonação dos grupos carboxílicos, diminuindo a repulsão eletrostática entre as cadeias

e aumenta a formação de ligações de hidrogênio (Walkenström et al., 2003). O açúcar e outros sólidos solúveis semelhantes tendem a desidratar as moléculas de pectina em solução por redução da atividade de água, favorecendo as interações hidrofóbicas entre as cadeias de pectina e conseqüentemente a gelificação e a força do gel (Flutto, 2003) (Figura 3).

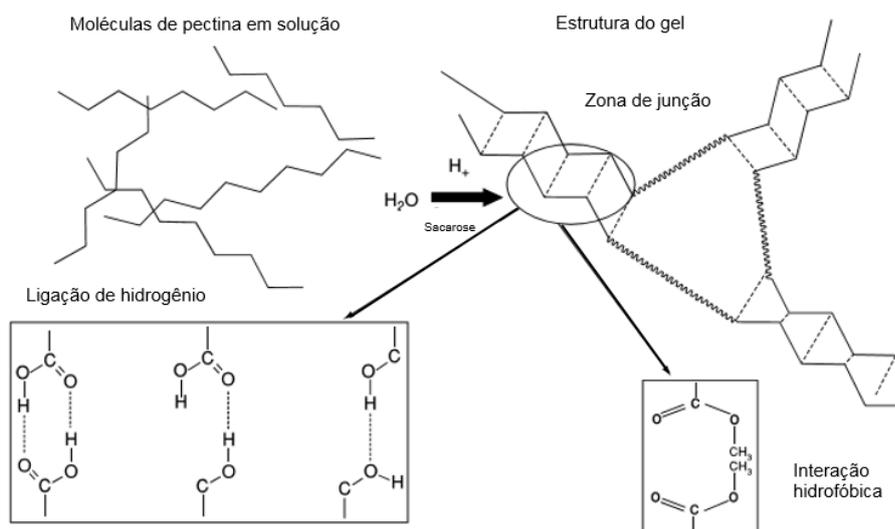


Figura 3: Mecanismo de gelificação de pectinas ATM. (Adaptado de Flutto, 2003)

Nas pectinas BTM, ligações de hidrogênio e forças eletrostáticas são predominantes nas associações intermoleculares. Pectinas BTM gelificam na presença de cátions divalentes, principalmente cálcio, em uma ampla faixa de pH (2,6-8,0), e de conteúdo de sólidos solúveis (10 a 70%). Neste caso, o modelo “caixa de ovos” descrito normalmente para o alginato (Figura 4) tem sido amplamente aceito para géis de pectato de cálcio.

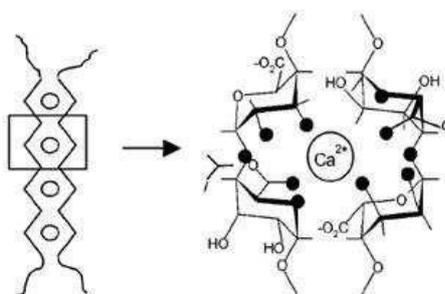


Figura 4: Representação esquemática do modelo “caixa de ovos” (Braccini e Pérez, 2001)

3.4.2 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo derivado do processo de desacetilação parcial da quitina. A quitina é, depois da celulose, o segundo biopolímero natural mais abundante, encontrada em exoesqueletos de crustáceos (principalmente caranguejo, camarão e lagosta), na parede celular de fungos e em outros materiais biológicos (Krochta e De Mulder Johnston, 1997; Park et al., 2001; Garcia et al., 2004). As principais fontes comerciais da quitina são os resíduos de camarão, siri e lagosta. O camarão apresenta na sua composição cerca de 5 a 7% de quitina, e o siri, de 15 a 20% (Moura et al., 2006).

Em termos moleculares, a quitosana (Figura 5a) é formada pela repetição de unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glicose (ou D-glicosamina) unidas por ligações glicosídicas do tipo α - (1,4), apresentando uma cadeia polimérica similar à da celulose. Durante a desacetilação, parte das ligações N-acetil da quitina (Figura 5b) são rompidas com formação de unidades que contém grupamentos amínicos livres, conferindo à quitosana uma natureza catiônica. Entretanto, a quitosana não é um composto uniforme e sim um grupo de polímeros parcialmente desacetilados, dos quais os que apresentam grau de desacetilação acima de 30% já podem ser considerados como quitosana (Lazaridou e Biliaderis, 2002; Garcia et al., 2004; López-Caballero et al., 2005). A quitosana é insolúvel em água, mas pode ser solubilizada em soluções ácidas.

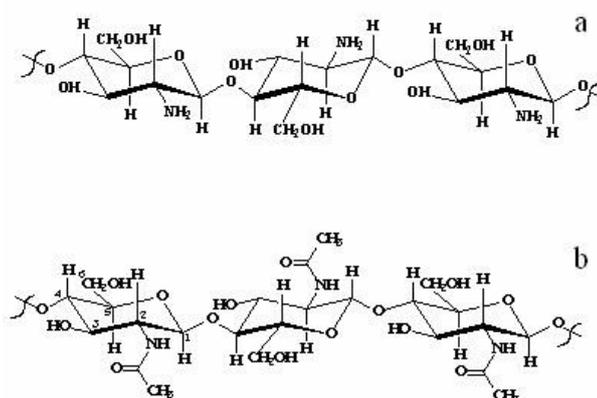


Figura 5: (a) Estrutura da quitosana; (b) estrutura da quitina (Einbu e Varum, 2004)

As aplicações e características do polímero dependem fundamentalmente do grau de desacetilação e do tamanho da cadeia do polímero. A quitosana é um

polieletrólito linear em pH ácido, com boa capacidade de formação de filmes e hidrogéis, dentre outras aplicações (Shu et al., 2001).

Devido a sua não-toxicidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade (Coma et al., 2002), a quitosana vem sendo considerada há décadas um composto de grande interesse industrial (Shu et al., 2001). Dentre as diversas aplicações destacam-se: biomateriais para medicina, membranas filtrantes para tratamento de efluentes, filmes e esferas, fibra dietética e medicamento contra hipertensão devido a sua ação quelante com íons cloreto. Na indústria farmacêutica, a quitosana tem sido estudada para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada (Yao et al., 1996). Kashyap et al. (2015), descreveram os sistemas de liberação a base de quitosana para aplicações na agricultura e apontaram alguns desafios que precisam ser superados. Segundo os autores, embora a preparação de nanopartículas como dispositivos de liberação controlada possa ser mais dispendiosa do que a aplicação de fertilizantes convencionais, esses materiais colaboram com a sincronização de liberação de fertilizantes para sua melhor absorção pelas culturas, e também podem prevenir perdas indesejáveis de nutrientes para o solo, água e ar, com benefícios de exigir menor quantidade de fertilizantes, com menor impacto ambiental indesejável.

O uso de esferas de quitosana como sistema de liberação controlada é bem estabelecido na literatura, sobretudo para as aplicações na área farmacêutica. Muitas aplicações abordam o uso de esferas de quitosana reticuladas covalentemente utilizando glutaraldeído ou etilenoglicol diglicil éter. Porém, estes agentes reticulantes são tóxicos e podem deixar resíduos nas partículas formadas. A quitosana também pode formar gel com aniões multivalentes, como o tripolifosfato (TPP), por interação iônica (Figura 6). Em comparação aos géis covalentes, os géis iônicos de quitosana apresentam menor resistência mecânica e podem apresentar alto grau de intumescimento dependendo do pH do meio (Mi et al., 2003; Rayment & Butler, 2008).

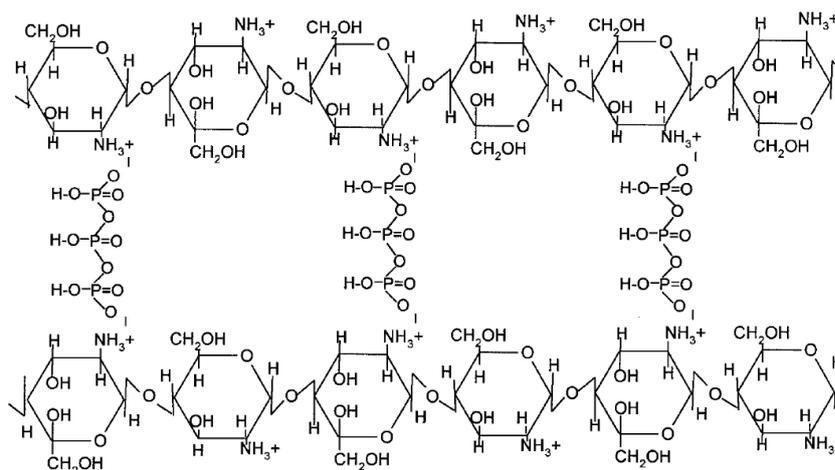


Figura 6: Representação esquemática da reticulação iônica da quitosana com íons tripolifosfato (Fonte: Mi et al., 2003)

3.5 Biomassa microalgal

As microalgas são organismos fotossintetizantes eucarióticos, como algas clorofíceas (Chlorophyta), ou organismos procariotos, como cianobactérias (Cyanophyceae) (Mata et al., 2010). A produção de microalgas em escala comercial tem apresentado crescente atenção, principalmente no que diz respeito ao aproveitamento das frações lipídicas e proteicas da biomassa microbiana. Os tópicos mais estudados referem-se à produção de biomassa para alimentação animal e humana e extração de compostos de elevado valor agregado, tais como ácidos graxos poli-insaturados, carotenóides, ficofobilinas, polissacarídeos, vitaminas, esteróis, compostos bioativos naturais e toxinas com atividade biológica (Pulz; Gross, 2004; Derner et al., 2006; Spolaore et al., 2006; Harun et al., 2010).

Estudos apontam aplicações das microalgas na agricultura como biofertilizante de solo, principalmente pelo aproveitamento da biomassa residual desengordurada. A biomassa é co-produto da produção de biocombustível em um sistema considerado sustentável (terceira geração), em que as microalgas são cultivadas em águas residuais a fim de que estas utilizem potenciais contaminantes, tais como amônia, nitratos e fosfatos (NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-}), como nutrientes. Desta maneira, as microalgas viabilizam a reciclagem de compostos nitrogenados e fosfatados, incorporando-os e acumulando-os em sua biomassa, como um fertilizante (Derner et al., 2006; Mata et al., 2010; Renuka et al., 2016; Suganya et al. 2016).

Coppens et al. (2016) avaliaram experimentos de cultivo de tomate em estufa e compararam o potencial de fertilização de dois tipos de biomassa de microalgas,

com os 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 carotenóides, o que permite seu uso como fertilizante orgânico para o cultivo de tomate.

Diferentes espécies da microalga clorofícea *Desmodesmus* (*Scenedesmus*) vêm sendo cultivadas como células livres e imobilizadas a partir de águas residuárias industriais e domésticas, apresentando alta viabilidade celular, com tolerância a variações de temperatura e pH (Martínez et al., 2000; Voltolina et al., 2005; Zhang et al., 2008; Li et al., 2010; Hodaifa et al., 2012; Prathima Devi et al., 2012, Jesus, 2018).

A microalga *Scenedesmus* pode ser vista como uma cepa representativa, com potencial comercial relevante para oportunidades de combustível ou coproduto, pois está intimamente relacionado ao *Desmodesmus* (Davis et al, 2016). O gênero *Desmodesmus* foi diferenciado de *Scenedesmus* por An et al (1999), utilizando análises do DNA ribossômico ITS-2 de estirpes de *Scenedesmus*. Estes autores mostraram que esta molécula é adequada para a resolução de relações evolutivas em vários níveis taxonômicos, o que possibilitou a diferenciação em dois grupos com gêneros distintos, *Desmodesmus* e *Scenedesmus*. Embora os autores tenham encontrado semelhanças na morfologia das células vegetativas para espécies de *Scenedesmus* e *Desmodesmus*, estes foram considerados como membros de gêneros independentes, da família Scenedesmaceae.

De Jesus Torres et al (2014) buscando verificar a capacidade de sobrevivência de microalgas verdes e seu potencial para remoção de nitrogênio e fósforo em efluente de esgoto sanitário, realizaram caracterizações físico-químicas da biomassa microalgal seca. Dentre as espécies estudadas, a biomassa de *Desmodesmus sp.* apresentou composição de 23,5% de proteína e 10,8% de carboidratos totais. Estes dados corroboram com os encontrados por Rossi (2013) em estudo utilizando efluente doméstico como substrato alternativo à produção de biodiesel, em que o teor de proteína nas cepas de *Desmodesmus* foi de 21% e diferiu em relação ao teor de carboidratos que foi de 60% em condição otimizada de efluente.

O uso de microalgas para o tratamento de efluentes e águas residuárias traz como vantagem, além da biorremediação e a possibilidade de produção de biocombustível, o acúmulo de elementos retirados e também de alguns metais de interesse agrônômico, na biomassa microalgal. Rossi (2013) observou, eficiência de remoção de 99% do P-fosfato e de 50 a 83% do N-nitrato quando utilizou cepas de

Desmodesmus cultivadas em condição otimizada de efluente. De Mattos e Bastos (2016) também constataram a remoção de 52,1% de nitrogênio e 36,2% da demanda química de oxigênio (DQO), cultivando a microalga *Desmodesmus subspicatus* em vinhaça. Os autores demonstram o aumento da biomassa em detrimento da DQO e do Nitrogênio Total da vinhaça.

Estudos apontam o potencial de empregar microalgas para biorremediação em águas poluídas por metais, devido à capacidade de biosorção das microalgas e/ou a neutralização dos efeitos tóxicos dos íons de metais pesados (Kumar et al, 2015; Zeraatkac et al, 2016). Buscando avaliar o efeito dos metais cobre (Cu) e níquel (Ni) sobre o crescimento de duas microalgas, Rugnini et al (2017) obtiveram resultados promissores na remoção de metais em meio aquoso, onde 43% e 39% de Cu foi removido por *Desmodesmus sp.* e *C. vulgaris*, respectivamente e Ni atingiu 32% para *C. vulgaris* e 39% para *Desmodesmus sp.* Através de microscopia eletrônica de varredura os autores verificam a bioacumulação intracelular de metais em *Desmodesmus sp.*

Portanto o uso da biomassa microalgal residual pode ser interessante como fonte de nitrogênio, fósforo, carboidratos e por conter alguns micronutrientes metálicos de interesse agrônômico incorporados para aplicação em solos cultiváveis.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Matérias-primas e reagentes

Para a confecção das partículas, foram utilizadas pectina cítrica de alto teor de metoxilação (ATM) (Genu tipo B Rapid Set-Z, CPKelco, Brasil) e quitosana de massa molar média (Sigma-Aldrich, EUA). Cloreto de cálcio dihidratado (Synth, Brasil) em solução de etanol e tripolifosfato de sódio - TPP (Synth, Brasil) foram utilizados como agentes reticulantes. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

A biomassa liofilizada desengordurada de *Desmodemus subspicatus* foi obtida no Laboratório de Microbiologia Aplicada e Controle (LABMAC) do CCA/UFSCar.

4.2 Vinhaça

A vinhaça foi coletada em uma agroindústria sucroalcooleira da região de Araras-SP, diretamente das colunas de destilação, à 95°C, e levada ao Laboratório de Fertilidade de Solo (UFSCar) para acondicionamento e caracterização físico-química.

A caracterização físico-química da vinhaça foi realizada conforme Rodella (1983) e Da Glória e Rodella (1972), quanto aos seguintes parâmetros: nitrogênio total (mg L^{-1}), cálcio (CaO , mg L^{-1}), magnésio (MgO , mg L^{-1}), fósforo (P_2O_5 , mg L^{-1}) e teor de óxido de potássio (K_2O , mg L^{-1}), além de microelementos, como ferro (mg L^{-1}), cobre (mg L^{-1}), zinco (mg L^{-1}) e manganês (mg L^{-1}), carbono orgânico (mg L^{-1}), sulfato (SO_4^{2-} , mg L^{-1}) e pH por leitura direta em pHmetro.

4.3 Desenvolvimento do processo para obtenção das partículas

Diversos testes preliminares foram realizados com o intuito de se estabelecer os níveis adequados dos parâmetros do processo de produção de partículas de pectina e de quitosana utilizando vinhaça como solvente. Neste primeiro momento foram observados aspectos de formação de gel, solubilização adequada dos biopolímeros, formato das partículas obtidas e estabilidade das partículas em água e após a secagem. As etapas do processo, bem como os parâmetros estudados estão resumidos na Figura 7 (os parâmetros estão indicados na Figura 7 pela numeração de 1 a 6 e serão descritos a seguir nos Itens 4.3.1 a 4.3.6).

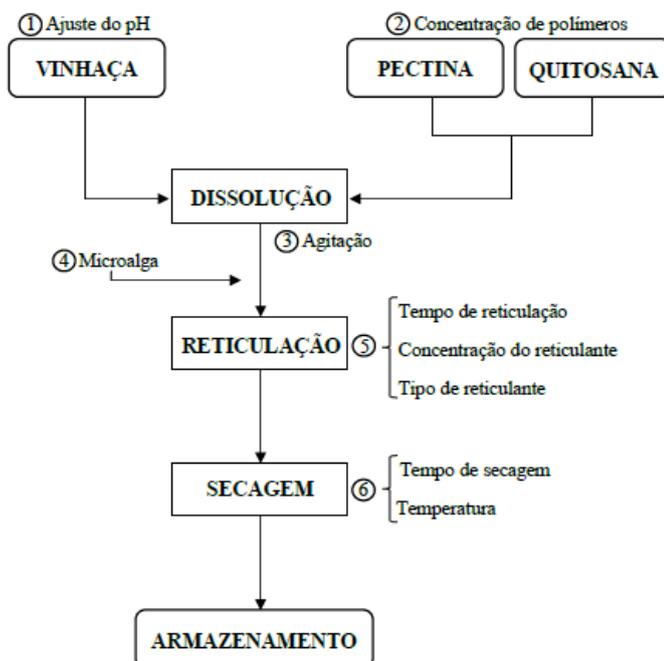


Figura 7: Fluxograma do processo de obtenção de partículas de pectina-vinhaça e quitosana-vinhaça

Inicialmente, as soluções poliméricas foram preparadas através da adição da quantidade adequada dos biopolímeros (pectina ATM ou quitosana) em 100 mL do solvente apropriado (vinhaça *in natura* ou água destilada) com pH previamente ajustado. Após a adição dos biopolímeros, o sistema foi mantido sob agitação constante até completa dissolução e homogeneização do material. Para as formulações contendo microalga, uma quantidade definida de biomassa liofilizada desengordurada da microalga *Desmodesmus subspicatus* foi adicionada à solução após ajuste do pH.

A obtenção das partículas foi realizada pela técnica de gotejamento da solução de biopolímero (100 mL) em solução reticulante (100 mL) sob agitação, conforme metodologia proposta por Liu et al (2002) e Sun et al (2011) com modificações. Uma agulha (BD Slomed, diâmetro: 0,70 x 30 mm) foi acoplada a uma mangueira de silicone ligada a uma bomba peristáltica para controle da vazão de gotejamento da solução. A altura de gotejamento foi mantida constante (padronizada nos testes preliminares) desde a ponta da agulha até a superfície da solução reticulante. O sistema experimental de gotejamento está ilustrado na Figura 8.

Após a formação e estabilização das partículas, estas foram secas em estufa com circulação forçada de ar (Marconi, MA035, Brasil). As partículas foram acondicionadas à temperatura ambiente e umidade relativa de 52% (controlada com solução de nitrato de magnésio) por 3 dias, antes da realização dos ensaios de caracterização.

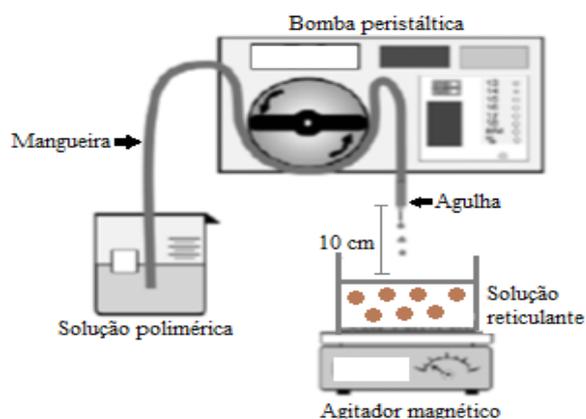


Figura 8: Esquema do sistema experimental para produção das partículas de pectina, quitosana e vinhaça (Adaptado de DE-BASHAN; BASHAN, 2010)

4.3.1 Ajuste do pH da vinhaça

No processo de produção das partículas, é necessário o ajuste do pH da vinhaça para a formação adequada dos géis de pectina e de quitosana. Foram testados os valores de pH 3,0, 3,5 e 4,0, para os géis de pectina, e de pH 2,5, 3,0 e 3,5 para géis de quitosana, utilizando-se ácido acético glacial para ajuste de pH.

Além do ácido acético, também foi testado o ajuste do pH da vinhaça utilizando-se ácido clorídrico (HCl) e ácido fosfórico (H₃PO₄), devido ao baixo custo do HCl e a incorporação do elemento fósforo, de interesse agrônômico.

4.3.2 Concentração dos biopolímeros na solução com vinhaça

Para a produção do gel de pectina ATM, as concentrações testadas foram de 3, 5 e 7 g de pectina/ 100 mL de vinhaça *in natura*, enquanto que para o gel de quitosana testaram-se 2, 3 e 5 g de quitosana/ 100 mL de vinhaça.

4.3.3 Agitação

Após adição do biopolímero (pectina ATM ou quitosana) ao solvente (vinhaça ou água), a solução necessita ser homogeneizada para garantir a completa solubilização. Para definir o tipo de homogeneização mais adequada foram testadas agitação em agitador magnético, agitador mecânico e agitador orbital, todas a temperatura ambiente. O biopolímero foi adicionado ao meio líquido sob agitação constante.

Os tempos de agitação avaliados foram 1h e 24h em agitador magnético, agitador mecânico e agitador orbital.

4.3.4 Adição de biomassa microalgal

Para avaliar o efeito da incorporação da biomassa microalgal liofilizada desengordurada (*Desmodesmus subspicatus*) nas partículas de pectina-vinhaça e quitosana-vinhaça, foram testadas concentrações de 0,5 e 1 g de biomassa/ 100 mL de solução polimérica, sendo adicionada à solução logo após o biopolímero, ainda sob agitação. O critério utilizado para estabelecer a concentração de microalga na solução foi a suspensão da biomassa sem que houvesse corpo de fundo na solução polimérica.

4.3.5 Testes na etapa de reticulação

4.3.5.1 Tipo e concentração da solução reticuladora

Para partículas de pectina, foram testadas as seguintes soluções reticuladoras:

- (a) etanol 98%;
- (b) solução de cloreto de cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 1,5% m/v;
- (c) etanol 98% + $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1% m/v);
- (d) etanol 98% + $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,5% m/v).

Para partículas de quitosana, as seguintes soluções reticuladoras foram testadas:

- (a) solução de tripolifosfato de sódio (TPP), nas concentrações de 2, 3, 4 e 5% m/v;e
- (b) solução de etanol 98% com TPP 1% m/v.

4.3.5.2 Altura de gotejamento

Para o gotejamento das soluções poliméricas na solução reticuladora, foram testadas as alturas de 10 e 30 cm (partindo da ponta da agulha de gotejamento até a solução), para as formulações testadas.

4.3.5.3 Tempo de reticulação

Após serem gotejadas nos seus respectivos reticulantes, as partículas foram mantidas imersas por 10, 20 e 30 minutos na solução reticulante, para estabilização e em seguida separadas do reticulante por meio de uma peneira para posterior secagem.

O critério utilizado para este teste foi o comportamento das partículas no reticulante, principalmente a capacidade de manter o formato mais próximo de esférico possível sem se dissolver. Após a secagem, as partículas foram imersas em água destilada para observação do tempo necessário para o início da solubilização. As observações foram realizadas no intervalo do tempo zero (após imersão) até 4h.

4.3.6 Secagem

Duas condições de secagem das partículas foram avaliadas: secagem à temperatura ambiente, por no mínimo 48h, e secagem em estufa com circulação de ar (Marconi, MA035), à 30°C por 24h.

4.4 Caracterização das partículas

Após formação, estabilização e secagem, as partículas foram acondicionadas à temperatura ambiente e umidade relativa de 52% (controlada com solução supersaturada de nitrato de magnésio) por 3 dias, antes da realização dos ensaios de caracterização. As caracterizações foram realizadas nas formulações selecionadas de cada biopolímero.

4.4.1 Aspecto visual e diâmetro médio

A avaliação do aspecto visual foi realizada, considerando-se o formato, a homogeneidade e a presença de bolhas de ar. O diâmetro médio foi determinado pela medição de 10 partículas de cada formulação, sendo feitas duas medidas em cada partícula, utilizando-se o Software Image J®.

4.4.2 Intumescimento em água

O intumescimento das partículas foi observado através da medida do aumento do diâmetro após imersão das partículas em água (em Placa de Petri) por 30 minutos. As imagens do intumescimento, bem como as medidas de diâmetro foram adquiridas através de Estereoscópio com câmera acoplada Leica M 205 C.

4.4.3 Teor de umidade

O teor de umidade foi determinado em triplicata por método gravimétrico de secagem em estufa a 105°C por 24 horas.

4.4.4 Determinação do pH em água e em cloreto de cálcio 0,01 mol L⁻¹

O pH das partículas de pectina e de quitosana foram determinados de acordo com a metodologia proposta por Brasil (2007) para determinação de pH na análise dos fertilizantes orgânicos e organominerais destinados à aplicação via solo, com modificações. Pesaram-se 2 g ($\pm 0,05$ g) da amostra e adicionaram-se 20 mL de água. A suspensão foi homogeneizada e agitada sob movimentos circulares a cada 10 minutos. Após 30 minutos, o pH da suspensão foi medido a temperatura de 25 °C. O mesmo procedimento foi realizado substituindo a água por cloreto de cálcio 0,01 mol L⁻¹. A solução de cloreto de cálcio 0,01 mol L⁻¹ foi utilizada como forma de simular o efeito da concentração de sais presentes na solução de solo (Raij et al., 2001), pensando em uma possível aplicação das partículas como biofertilizante.

4.4.5 Massa solubilizável (MS)

A massa solubilizável das partículas foi quantificada segundo método proposto por Irissin-Mangata et al. (2001), com modificações. Pesou-se 0,3000 g de amostra (m_o) (em triplicata) em béquer de 250 mL e adicionaram-se 100 mL de água destilada. A suspensão foi mantida sob agitação de 100 rpm por 24 horas em mesa agitadora orbital (Solab, SL-180/D, Brasil). Após 24h, a amostra não solubilizada foi recolhida por filtração em papel filtro previamente seco e de massa conhecida. A massa seca final (m_f) foi obtida após secagem do papel filtro mais a massa não solubilizada, em estufa a 105°C por 24 h. A massa solubilizável (MS) foi expressa em função da massa seca inicial e após solubilização em água, conforme Equação 1. O mesmo procedimento foi realizado substituindo 100 mL de água por 100 mL de cloreto de cálcio (CaCl_2) 0,01 mol L⁻¹.

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

onde: MS = massa solubilizável em água (g MS/ 100 g partícula seca)

m_o = massa total inicial da amostra (g)

m_f = massa seca final não solúvel (g)

ω = fração de massa de umidade em base úmida (g H₂O/g partícula)

4.4.6 Resistência à compressão

A resistência à compressão foi determinada utilizando-se um texturômetro TA.XT2 (Stable Microsystems SMD, Inglaterra). A compressão foi realizada em temperatura ambiente até 70% de deformação da amostra, a uma velocidade de compressão de 0,05 mm s⁻¹, conforme proposto por Tomović et al. (2015) com modificações. A distância entre o probe (P/0.5, cilíndrico, diâmetro 12,7 mm) e a placa plana foi ajustada em 10 mm. Dez partículas de cada formulação foram comprimidas e a força máxima média foi determinada em Newton (N).

4.4.7 Caracterização química das partículas e da biomassa microalgal

A caracterização química das partículas foi realizada conforme Rodella (1983) e Da Glória e Rodella (1972), quanto aos seguintes parâmetros: nitrogênio total (%), carbono orgânico (%), cálcio (CaO, mg kg⁻¹), magnésio (MgO, mg kg⁻¹), fósforo (P₂O₅,

g kg⁻¹) e potássio (K₂O, mg kg⁻¹), além de microelementos, como ferro (mg kg⁻¹), cobre (mg kg⁻¹), zinco (mg kg⁻¹) e manganês (mg kg⁻¹).

A biomassa microalgal liofilizada foi caracterizada conforme Rodella (1983) e Glória e Rodella (1972) quanto aos teores de nitrogênio total (%), cálcio (CaO, mg kg⁻¹), magnésio (MgO, mg kg⁻¹), fósforo (P₂O₅, g kg⁻¹) e potássio (K₂O, mg kg⁻¹), além de microelementos, como ferro (mg kg⁻¹), cobre (mg kg⁻¹), zinco (mg kg⁻¹) e manganês (mg kg⁻¹).

A porcentagem de retenção de nutrientes nas partículas foi estimada pela razão entre a concentração real de nutrientes (C_{real}) e a concentração teórica de nutrientes ($C_{teórico}$) nas partículas (considerando a concentração inicial na vinhaça). A concentração teórica de nutriente na partícula e o percentual de retenção na partícula, foram estimados através das Equações 2 e 3, respectivamente.

$$C_{teórico} \text{ (g/kg)} = \frac{1000 \cdot \text{g nutriente por L vinhaça}}{\text{g partículas por L vinhaça}} \quad (2)$$

$$\text{Retenção \%} = \frac{C_{real}}{C_{teórico}} \cdot 100 \quad (3)$$

onde: 1000 = fator de conversão de g de partículas para kg de partículas.

4.4.8 Estrutura química

A estrutura química das partículas foi avaliada através da técnica de espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Os espectros de FTIR foram obtidos à temperatura ambiente, em modo ATR (reflexão total atenuada), utilizando um espectrômetro Brucker modelo Tensor II. Os espectros foram registrados na região de 550 - 4000 cm⁻¹, durante 16 varreduras com resolução de 4 cm⁻¹. As amostras foram trituradas e misturadas com brometo de potássio a uma razão de massa de 1:20 (amostra: KBr). Os discos de KBr foram preparados comprimindo a mistura de pó com uma prensa hidráulica.

4.4.9 Morfologia

A morfologia da superfície das partículas foi observada através de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) de bancada, da Hitachi, modelo TM3030

Plus. Amostras das partículas foram montadas em stubs e depois recobertas com ouro.

4.5 Teste de Biodegradação em solo

4.5.1 Coleta e análise física e química do solo

Para os ensaios de biodegradação, foi utilizada amostra de solo da camada 0-20 cm, coletada em área agrícola do Centro de Ciências Agrárias da UFSCar, Campus Araras-SP. A caracterização química e física do solo, classificado como Latossolo Vermelho distrófico (LVd), textura argilosa, foi realizada de acordo com Raij et al., (2001) e Claessen (1997).

4.5.2 Ensaio de biodegradação

O teste de biodegradação foi realizado pelo método da respirometria (Anderson, 1982; Moreira & Siqueira, 2006). A amostra de solo, previamente seca por 72 h a temperatura ambiente e peneirada em peneira com abertura de malha de 2,0 mm, teve o teor de umidade determinado por gravimetria. As partículas foram pesadas em triplicata (0,2 g) e enterradas a 2 cm de profundidade em porções de 50 g de solo (com altura total de 5 cm). O conjunto (solo + amostra) foi incubado a 25 °C em frascos herméticos contendo um recipiente com 10 mL de NaOH 0,5N. A massa de CO₂ liberada foi quantificada, em intervalos pré-determinados durante 36 dias, pela titulação do excedente de NaOH com HCl 0,5N. Foi realizado o controle negativo utilizando-se um frasco com solo sem partículas.

A cinética de biodegradação das partículas foi determinada pela massa de CO₂ liberada em função do tempo e o percentual de mineralização foi calculado segundo o método padrão ASTM D5988-03 (ASTM, 2003). A massa teórica de CO₂ (m_{rCO_2}) foi quantificada por estequiometria (Equação 4), por meio da massa de carbono (Y) da amostra determinada em módulo de sólidos SS5000A do analisador TOC/TN Shimadzu®, nas partículas de pectina e por dicromatometria conforme proposto por Raij et al. (2001) nas partículas de quitosana, devido as limitações do analisador TOC. A massa real de CO₂ (m_{rCO_2}) liberada foi calculada pela Equação 3, em que V_c é o volume de HCl 0,5 N utilizado na titulação do controle negativo, V_{am} é o volume de HCl 0,5 N utilizado na titulação da amostra, 22 é o equivalente grama do CO₂ e 0,5 é a normalidade do HCl. O percentual de mineralização é dado pela Equação 6.

$$m_t\text{CO}_2(\text{mg}) = \frac{44 \cdot Y}{12} \quad (4)$$

$$m_r\text{CO}_2(\text{mg}) = (V_c - V_{am}) \cdot 22.0,5 \quad (5)$$

$$\% \text{ mineralização} = (m_r\text{CO}_2 / m_t\text{CO}_2) \cdot 100 \quad (6)$$

4.6 Tratamento estatístico e forma de análise dos resultados

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, as comparações foram realizadas entre as 6 formulações de partículas, sendo 3 de pectina e 3 de quitosana. Para a análise estatística, os resultados dos parâmetros foram submetidos à análise de variância. Uma vez que o teste F foi significativo, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Utilizou-se o *Software RStudio 3.2.4* (The R Foundation for Statistical Computing Platform, 2016) para as análises.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química da vinhaça

Os resultados da caracterização físico-química da vinhaça *in natura* estão apresentados na Tabela 2.

Os valores observados da vinhaça *in natura* utilizada no estudo, estão de acordo com os encontrados na literatura para vinhaça de diferentes mostos (Freire e Cortez, 2000; Da Silva et al., 2014).

Tabela 2: Composição físico-química média da vinhaça *in natura* utilizada na elaboração das partículas

Parâmetro	Resultado
pH	4,5
Temperatura °C	95,0
Sólidos totais (mg L ⁻¹)	26800,0
Nitrogênio total (mg L ⁻¹)	543,3
Carbono orgânico (mg L ⁻¹)	7900,0
Fósforo (mg L ⁻¹ P ₂ O ₅)	85,0
Potássio (mg L ⁻¹ K ₂ O)	3923,3
Cálcio (mg L ⁻¹ CaO)	680,0
Magnésio (mg L ⁻¹ MgO)	270,0
Sulfato (mg L ⁻¹ SO ₄)	380,0
Matéria Orgânica (mg L ⁻¹)	13619,6
Fe (mg L ⁻¹)	18,3
Cu (mg L ⁻¹)	0,32
Zn (mg L ⁻¹)	0,47
Mn (mg L ⁻¹)	3,64

5.2 Desenvolvimento do processo para obtenção das partículas

Foram realizados testes preliminares a fim de definir os níveis adequados dos parâmetros do processo de produção de partículas de pectina ou de quitosana utilizando vinhaça como solvente, conforme indicado na Figura 5.

5.2.1 Ajuste do pH da vinhaça

A concentração dos biopolímeros para este teste foi mantida constante em 1,5 g biopolímeros/ 100 mL de vinhaça.

A quitosana é insolúvel em água, em solventes orgânicos e em bases, sendo solúvel na maioria das soluções de ácidos orgânicos com pH inferior a 6,0. Os ácidos acético e fórmico são os mais usados na solubilização do biopolímero. Soluções de quitosana também podem ser preparadas por dissolução em ácidos inorgânicos diluídos, tais como, nítrico, clorídrico, perclórico e fosfórico (Gonsalves et al, 2011). Na dissolução em meio ácido, os grupos amino livres da quitosana tornam-se protonados (-NH₃⁺), provocando repulsão eletrostática entre as cadeias poliméricas o que facilita sua solvatação em água e dá a quitosana característica de um polieletrólito catiônico (Rinaudo et al. 1999). A literatura aponta que o ácido acético é o ácido mais comumente utilizado para a solubilização da quitosana e as concentrações utilizadas são 0,1 mol L⁻¹ ou 1 mL ácido acético/ 100 mL (Rinaudo et al, 1999, Rutiaga et al.,

2005). O pH da solução de 1 mL/100mL, em água, é aproximadamente 3,0. Assim, os testes de ajuste de pH da vinhaça se deram a partir deste valor, assim como a elaboração da partícula controle de quitosana (Qui-C).

A pectina de alto teor de metoxilação é solúvel em água, no entanto necessita de pH baixo (< 3,5) para formação do gel. Neste caso, o abaixamento do pH provoca uma menor repulsão entre as moléculas de pectina, facilitando a interação (Flutto, 2003). Rutiaga *et al.* (2005), utilizaram solução aquosa de ácido acético 1 mL 100 mL⁻¹ (pH 3,0) para o preparo de soluções de pectina-amido visando a produção de filmes de amido-pectina.

Avaliou-se a solubilização e gelificação dos biopolímeros observando-se a formação e homogeneidade do gel. No caso da pectina, observou-se que em pH 4,0 havia formação de gel, mas sem dissolução completa do polímero, e nos pHs 3,5 e 3,0 obteve-se um gel homogêneo. Em pH 3,5 não houve formação de gel da quitosana. Contudo, em pHs 2,5 e 3,0, a quitosana dissolve totalmente e forma gel homogêneo. Para continuidade da pesquisa, optou-se pelo pH 3,5 para pectina e pH 3,0 para quitosana, tendo em vista o menor consumo de ácido acético.

Além do ajuste de pH da vinhaça com ácido acético, também foram testados ácido clorídrico (HCl) e ácido fosfórico (H₃PO₄) P.A. Observou-se que quando estes ácidos foram utilizados, não houve completa solubilização dos polímeros, apresentando heterogeneidade na solução. A baixa solubilidade observada está em concordância com resultados encontrados por Janegitz *et al.* (2007) que avaliaram a solubilidade da quitosana em diferentes ácidos e afirmam que isso ocorre devido ao grande aumento da força iônica acompanhada do decréscimo do pH.

5.2.2 Agitação

Observou-se que a utilização do agitador magnético foi mais adequada, uma vez que resultou em géis com menor formação de espuma e incorporação de ar, evitando a necessidade de procedimentos adicionais de separação da espuma e degaseificação da solução. A solução de pectina foi agitada por uma hora para obtenção de gel homogêneo. Para as soluções de quitosana, não foi possível o preparo do gel com agitador magnético devido à alta viscosidade. Optou-se pelo agitador mecânico para adição do polímero ao solvente, mantendo agitação de 1000 rpm por uma hora. Após este tempo, a solução foi colocada em mesa agitadora

(agitação orbital) por 24 horas, para que houvesse a completa solubilização do polímero e formação do gel.

5.2.3 Concentração dos biopolímeros na solução com vinhaça

Esta etapa teve como objetivo avaliar as concentrações de pectina e de quitosana mais adequadas para formação das partículas. Nestes testes os reticulantes utilizados foram solução etanólica de CaCl_2 1% para a pectina e solução de TPP 5% para a quitosana.

Para os géis de pectina, as concentrações testadas foram de 3, 5 e 7 % m/v de pectina em vinhaça *in natura*. Os resultados demonstraram que os géis de pectina 3% eram pouco viscosos e as partículas apresentaram formato de disco na reticulação, característica não desejada. Na concentração de 7%, o gel ficou extremamente viscoso dificultando o processo de gotejamento na solução reticuladora. As partículas apresentaram típico formato de “gota”. Assim, optou-se por utilizar a concentração de 5% de pectina, que apresentou partículas com formato esférico, para os testes posteriores.

Para a produção de partículas de quitosana, foram testadas as concentrações de 2, 3 e 5% m/v de polímero em vinhaça. O gel de 2% m/v, por ser pouco viscoso, no gotejamento na solução reticuladora formou discos planos que se dissolveram, o gel de 5% (m/v) dificultou o gotejamento por estar altamente viscoso, apresentando formato de uma “vírgula” (forma não desejável), como pode ser visto na Figura 9. Observou-se que a concentração de 3% m/v foi a mais indicada para a produção de partículas de quitosana por formar partículas esféricas.

Sun et al. (2011) testaram diferentes concentrações de quitosana (1,5, 2, 2,5 e 3%) para elaboração de esferas para liberação do fármaco glipizida. Os autores constaram que com o aumento da concentração de quitosana, a quantidade de fármaco livre diminuía, e que na concentração de 3,0% m/v de quitosana, a eficiência de encapsulação aumentou, no entanto, a viscosidade da solução era muito alta para se obter esferas de formato regular.

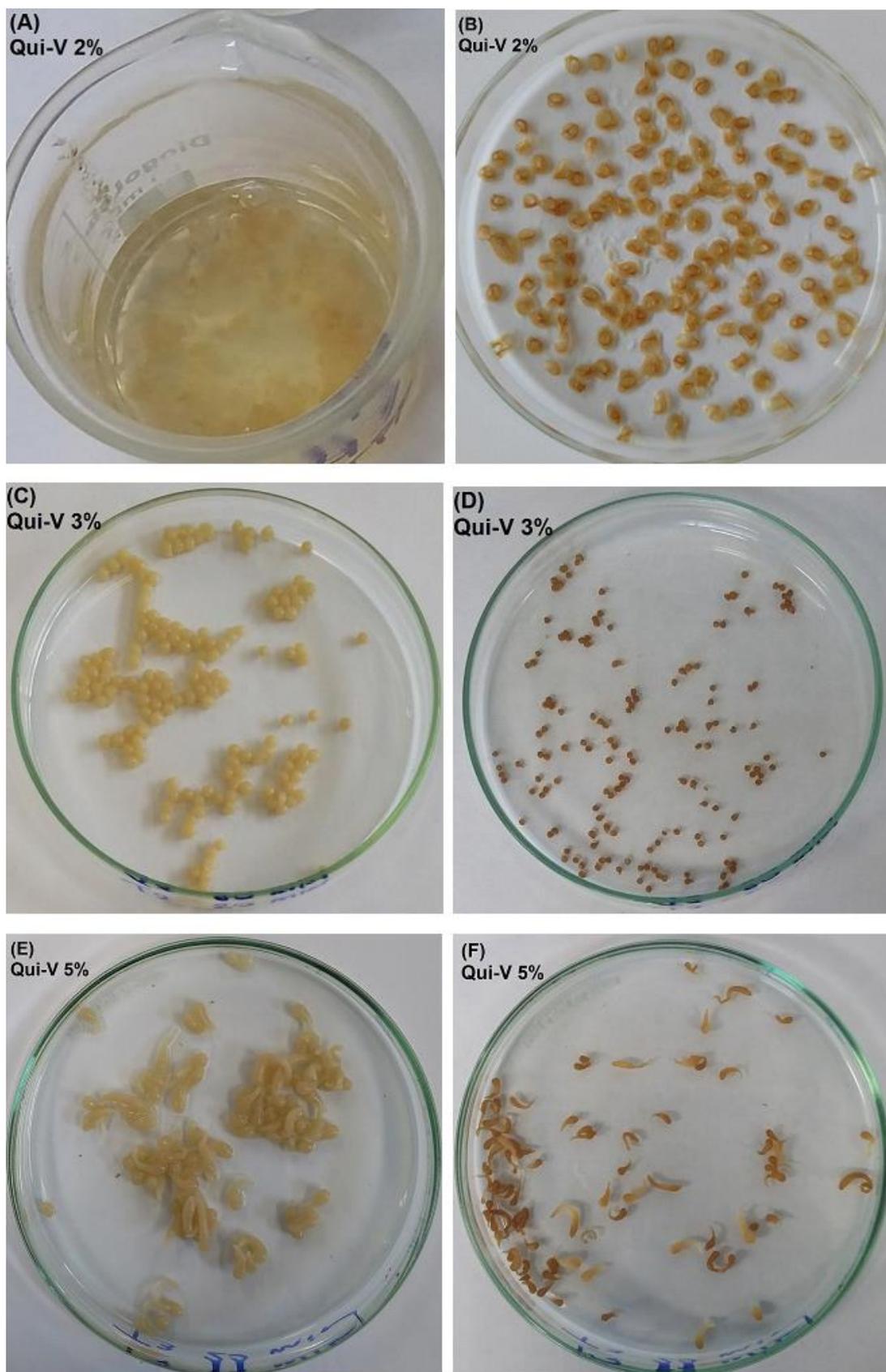


Figura 9: Partículas de quitosana e vinhaça reticuladas em solução de TPP 5% por 20 minutos. Quitosana 2% (A), 3% (C) e 5% (E) antes da secagem, e quitosana 2% (B), 3% (D) e 5% (F) após a secagem

5.2.4 Adição de biomassa microalgal

Em relação a adição de biomassa microalgal liofilizada desengordurada (*Desmodesmus subspicatus*) na solução polimérica, os testes com a adição de 1% m/v de microalga na solução, não foram satisfatórios, pois nesta concentração a biomassa não era totalmente incorporada ao gel. Na concentração de 0,5% m/v, não houve formação de corpo de fundo e obteve-se boa homogeneização no gel. Concentrações menores não foram testadas já que era desejado a maior incorporação possível da microalga nos géis.

5.2.5 Altura do gotejamento

Para o gotejamento das soluções poliméricas na solução reticuladora, foram testadas as alturas de 10 e 30 cm (partindo da ponta da agulha de gotejamento até a solução), para as formulações estudadas no decorrer dos testes preliminares. Pelos resultados das partículas formadas, baseando-se em atributos visuais como esfericidade e tamanho, determinou-se que a altura de 10 cm foi mais adequada, pois em 30 cm de altura as partículas apresentavam formato de disco (Figura 10).

Sun et al (2011) elaboraram esferas de quitosana pelo método de gotejamento em solução reticulante e mantiveram uma distância entre a ponta da agulha e a superfície da solução reticulante de 5 cm. Para o sistema experimental desenvolvido no presente trabalho, observou-se que distâncias inferiores a 10 cm levavam a aglomeração de gel no reticulante, o que não era desejado.

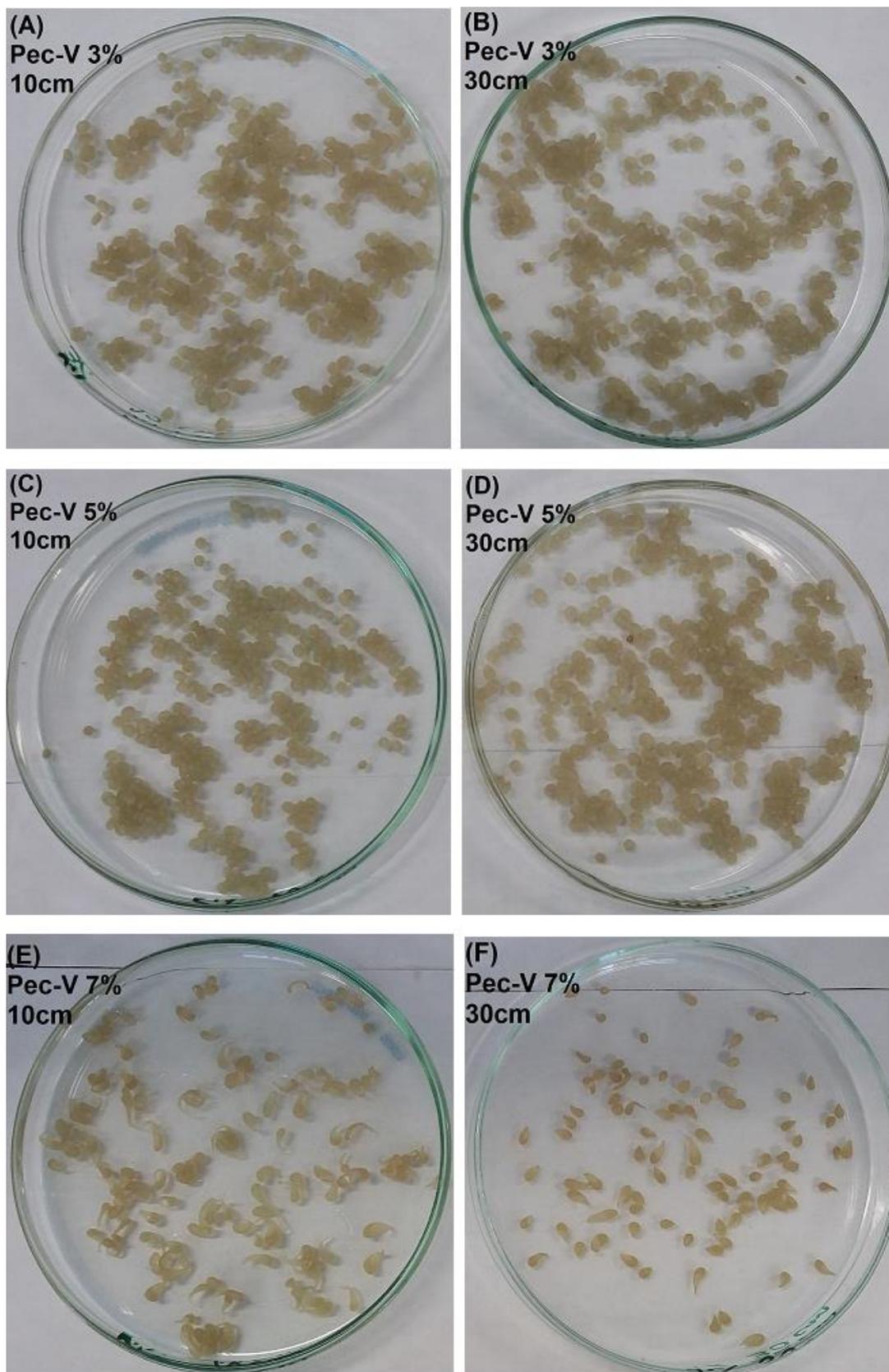


Figura 10: Partículas de pectina e vinhaça gotejadas a 10 e 30 cm do reticulante. Pectina 3% (A), 5% (C) e 7% (E) gotejadas a 10 cm do reticulante e pectina 3% (B), 5% (D) e 7% (F) gotejadas a 30 cm do reticulante. Ambas antes da secagem

5.2.6 Tipo e concentração da solução reticuladora

Dentre as soluções testadas, a melhor condição foi a reticulação da pectina em álcool adicionado de cloreto de cálcio (1%), visto que as partículas formadas em etanol 98% (sem adição de cloreto de cálcio) solubilizaram-se rapidamente em água. Em cloreto de cálcio 1,5 % (m/v), não houve formação de partículas. E em etanol 98% + CaCl₂.2H₂O (1,5% m/v) notou-se um excesso do sal, com formação de corpo de fundo no reticulante.

Para as partículas de quitosana, a reticulação com álcool não foi satisfatória, devido à baixa solubilidade do tripolifosfato de sódio (TPP) em etanol absoluto e à dissolução do gel no reticulante. Foram testadas as concentrações de TPP de 2, 3, 4 e 5% em solução aquosa. Nestas concentrações, não foram observadas diferenças no aspecto visual e formato das partículas. No entanto, observou-se que na relação volumétrica entre a solução polimérica e a solução reticuladora usada (1:1), havia, ao final do gotejamento, gel não reticulado nas soluções de 2, 3 e 4% m/v de TPP, o que pode ser explicado pelo esgotamento de TPP e a não formação de partículas. Assim, a solução de TPP 5% m/v foi selecionada para a continuidade do trabalho.

Shu e Zhu (2002) observaram que em concentração de TPP 1% e tempo de reticulação de 20 min, as esferas de quitosana secas apresentaram formato de disco colapsado no centro.

Giri et al. (2012), utilizaram solução de TPP 10% por 30 min para reticulação de partículas de quitosana para elaboração de sistemas de liberação controlada de fármacos. Sun *et al.* (2011) testaram concentrações de TPP de 2 a 4% para formação de partículas de quitosana (1,5 a 3%) e observaram que em todas as combinações a eficiência de encapsulação do princípio ativo foi superior a 90%. Bodmeier et al (1989) testaram concentrações de TPP de 1 a 10% para a formação de partículas de quitosana e observaram que a liberação do princípio ativo era mais lenta quando maiores concentrações de TPP eram utilizadas.

5.2.7 Tempo de reticulação

O período de 20 minutos de reticulação foi o mais adequado para as partículas de pectina. Nesta condição, as partículas se mantiveram íntegras e com formatos esféricos na razão volumétrica de solução polimérica e solução reticulante utilizada (1:1), mantendo a integridade por mais tempo quando imersas em água destilada. Embora tenham adquirido formato desejável aos 10 minutos de reticulação, as

partículas tenderam a se solubilizar rapidamente quando imersas em água, indicando menor grau de reticulação. As partículas solubilizaram-se na solução reticulante e tornaram-se gelatinosas após 30 minutos.

Estas observações se referem sobretudo as partículas de pectina, já que as de quitosana (após secagem) não se solubilizaram em água destilada no tempo de observação (0 a 4h).

5.2.8 Secagem

A secagem das partículas em temperatura ambiente não foi satisfatória, a alta amplitude térmica ao longo do período de secagem (48h), pode gerar partículas com diferentes características. Portanto, a secagem adotada para os experimentos foi em estufa com circulação de ar à 30°C por 24h, a fim de evitar fontes de variações que não fossem as do estudo. Mi et al. (2003) obtiveram partículas esféricas e homogêneas de quitosana reticuladas com TPP através da secagem em estufa à vácuo em temperatura de 40°C por 24h.

5.2.9 Definição das formulações otimizadas para caracterização

A partir dos testes preliminares, foram definidas as formulações padronizadas descritas a seguir e resumidas na Tabela 3. Estas formulações foram submetidas a ensaios de caracterização complementar (Item 5.3).

a) Pectina-Água (Pec-C): água destilada, pH 3,5 (ajustado com ácido acético), pectina ATM (5%), pré-reticulação com cloreto de cálcio na solução de biopolímero (0,013% m/v), agitação por 1 hora em agitador magnético, reticulação em etanol absoluto/cloreto de cálcio (1%) por 20 minutos e secagem em estufa à 30°C por 24h.

b) Pectina-Vinhaça (Pec-V): vinhaça *in natura*, pH 3,5 (ajustado com ácido acético), pectina ATM (5%), pré-reticulação com cloreto de cálcio na solução de biopolímero (0,013% m/v), agitação por 1 hora em agitador magnético, reticulação em etanol absoluto/cloreto de cálcio (1%) por 20 minutos, secagem em estufa à 30°C por 24h.

c) Pectina-Vinhaça-Microalga (Pec-V-M): vinhaça *in natura*, pH 3,5 (ajustado com ácido acético), pectina ATM (5%), pré-reticulação com cloreto de cálcio na solução de biopolímero (0,013% m/v), biomassa microalgal liofilizada (0,5%), agitação por 1 hora em agitador magnético, reticulação em etanol absoluto/cloreto de cálcio (1%) por 20 minutos e secagem em estufa à 30°C por 24h.

d) Quitosana-Água (Qui-C): água destilada/ácido acético 1%, pH 2,5 (ajustado com ácido acético, necessário para solubilização da quitosana em água), quitosana (3% m/v), agitação por 1 hora em agitador mecânico e por mais 24 horas em agitação orbital, reticulação em TPP (5%) por 20 minutos e secagem em estufa à 30°C por 24h.

e) Quitosana-Vinhaça (Qui-V): vinhaça *in natura*, pH 3,0 (ajustado com ácido acético), quitosana (3%), agitação por 1 hora em agitador mecânico e por mais 24 horas em agitação orbital, reticulação em TPP (5%) por 20 minutos e secagem em estufa à 30°C por 24h.

f) Quitosana-Vinhaça-Microalga (Qui-V-M): vinhaça *in natura*, pH 3,0 (ajustado com ácido acético), quitosana (3%), biomassa microalgal liofilizada (0,5%), agitação por 1 hora em agitador mecânico e mais 24 horas em agitação orbital, reticulação em TPP (5%) por 20 minutos e secagem em estufa à 30°C por 24h.

Tabela 3: Resumo das formulações das partículas selecionadas

Partícula	[biopolímero] (%)	[microalga] (%)	pH	Agitação tipo/tempo (h)	[reticulante]	Secagem Temp./tempo
Pec-C	5	-	3,5	Magnético/1	EtOH/ 1% CaCl ₂	30°C/24h
Pec-V	5	-	3,5	Magnético/1	EtOH/ 1% CaCl ₂	30°C/24h
Pec-V-M	5	0,5	3,5	Magnético/1	EtOH/ 1% CaCl ₂	30°C/24h
Qui-C	3	-	3,0	Mec/1, Orb/24	TPP 5%	30°C/24h
Qui-V	3	-	3,0	Mec/1, Orb/24	TPP 5%	30°C/24h
Qui-V-M	3	0,5	3,0	Mec/1, Orb/24	TPP 5%	30°C/24h

Pec-C: pectina e água, Pec-V: pectina e vinhaça, Pec-V-M: pectina, vinhaça e biomassa microalgal, Qui-C: quitosana e água, Qui-V: quitosana e vinhaça e Qui-V-M: quitosana, vinhaça e biomassa microalgal

5.3 Caracterização das partículas

5.3.1 Aspecto visual

Em geral, as partículas apresentaram matriz polimérica homogênea e formatos esféricos bem definidos, com exceção da partícula de pectina ATM utilizando água destilada como solvente, que apresentou formato de disco achatado (discoidal ou disciforme). Fotografias das partículas podem ser observadas na Figura 11. Imagens

aproximadas das partículas foram obtidas através de Estereoscópio com câmera acoplada Leica M 205 C (Figura 12).



Figura 11: Aspecto visual das partículas: (A) água e quitosana, (B) água e pectina, (C) vinhaça e quitosana, (D) vinhaça e pectina, (E) vinhaça, quitosana e microalga e (F) vinhaça, pectina e microalga

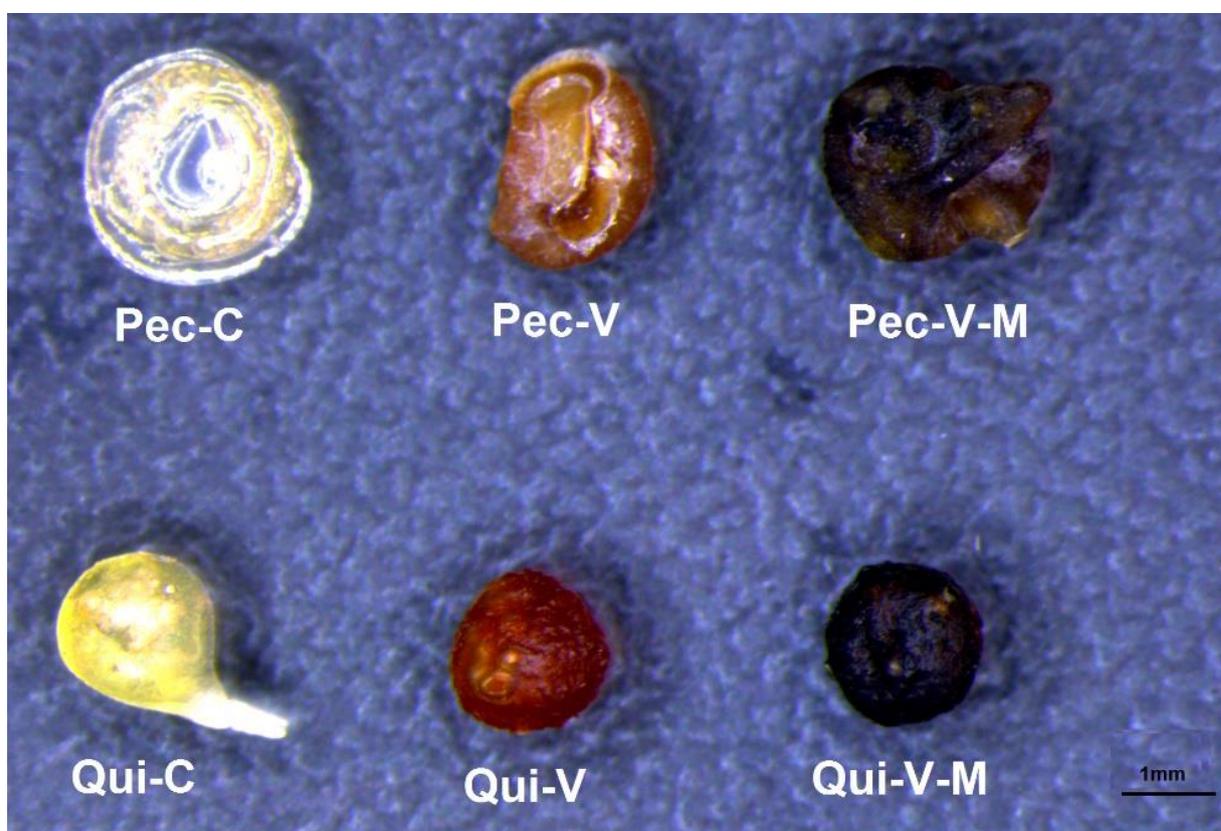


Figura 12: Aspecto das partículas em imagem aproximadas obtidas em estereoscópio com câmera acoplada Leica M 205 C

5.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia detalhada da superfície das partículas foi observada por microscopia eletrônica de varredura e as micrografias das partículas de pectina e de quitosana estão apresentadas nas Figuras 13 e 14, respectivamente.

A adição da vinhaça tornou a superfície das partículas mais rugosa em comparação aos controles (água). Notou-se com a incorporação da biomassa microalgal, sobretudo na superfície da partícula de pectina (Figura 13, P3b), que os fragmentos celulares da microalga são visíveis. A liofilização rompe as células da microalga e a transforma em um pó fino. Este aspecto fragmentado observado na superfície da partícula de pectina com vinhaça e biomassa microalgal (Pec-V-M) é reportado na literatura para microalgas liofilizadas ou secas em secador de bandeja (Pasquet et al., 2011; Larossa et al. 2018). Pasquet et al. (2011) também apontaram que pode haver precipitação de sais remanescentes do meio de cultura da microalga.

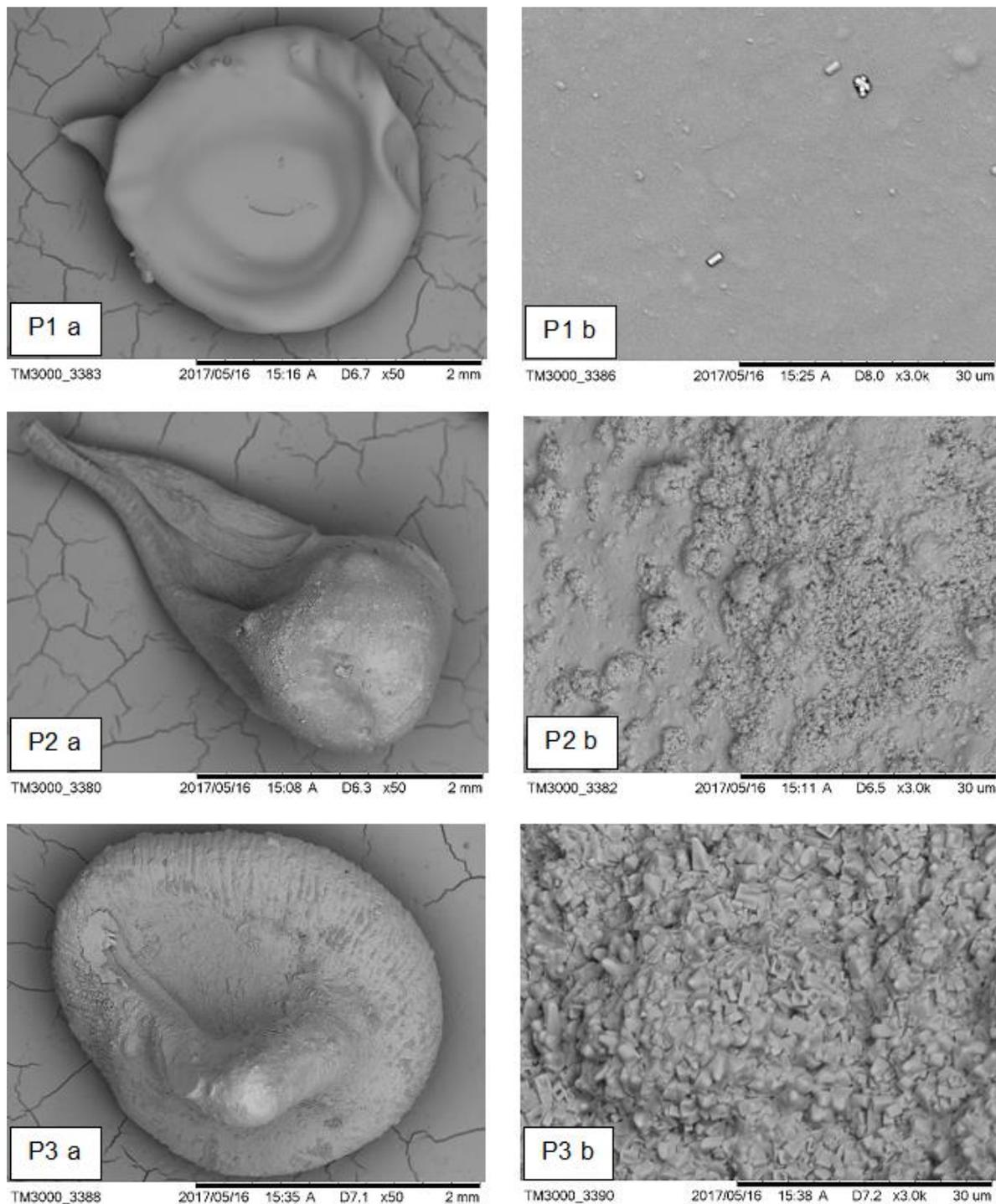


Figura 13: Micrografias das partículas de pectina com água (partícula inteira, P1a e superfície, P1b), pectina com vinhaça (partícula inteira, P2a e superfície, P2b) e pectina com vinhaça e biomassa microalgal (partícula inteira, P3a e superfície, P3b)

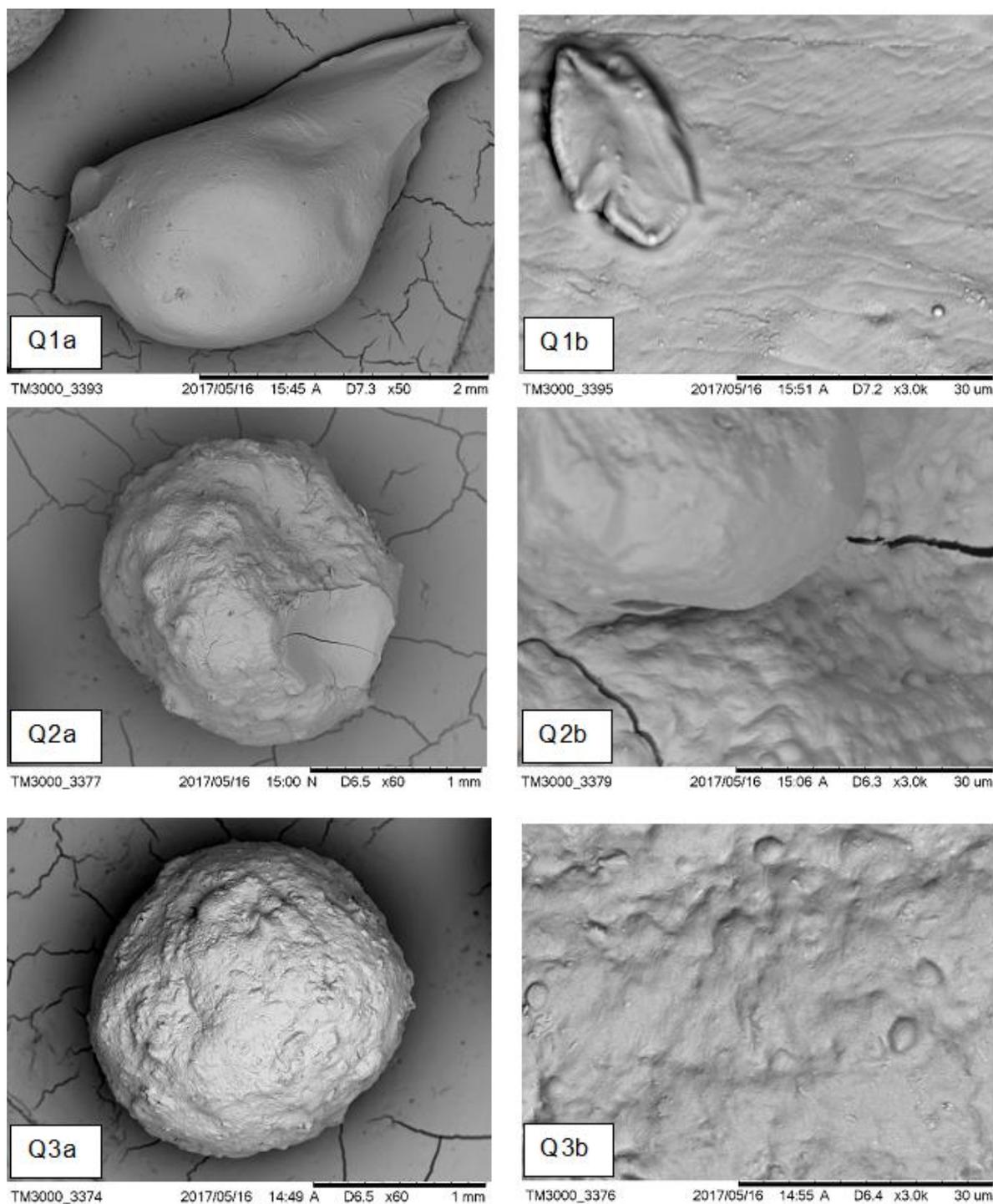


Figura 14: Micrografias das partículas de quitosana com água (partícula inteira, Q1a e superfície, Q1b), quitosana com vinhaça (partícula inteira, Q2a e superfície, Q2b) e quitosana com vinhaça e biomassa microalgal (partícula inteira, Q3a e superfície, Q3b)

5.3.3 Teor de umidade, pH e massa solubilizável das partículas

Os resultados da caracterização quanto ao teor de umidade e massa solubilizável (MS) e pH em água e em CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ estão apresentados nas Tabelas 4. A umidade variou entre 13,82 e 18,86%, com menor valor para a partícula Pec-V-M e maior valor para a partícula Pec-C.

Tabela 4: Resultados médios de umidade, pH e massa solubilizável das partículas

Partícula	Umidade (g $\text{H}_2\text{O}/100 \text{ g}$ partícula)*	pH		Massa Solubilizável (g MS/100g massa seca)*	
		Água	CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$	Água	CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$
Pec-C	18,86 ($\pm 0,32$) ^a	2,25	2,18	51,4 ($\pm 6,8$) ^{Bb}	22,5 ($\pm 2,6$) ^{Ac}
Pec-V	16,05 ($\pm 0,94$) ^c	3,06	3,01	64,1 ($\pm 1,3$) ^{Ba}	48,4 ($\pm 2,8$) ^{Aa}
Pec-V-M	13,82 ($\pm 0,39$) ^d	3,13	3,12	61,8 ($\pm 2,6$) ^{Ba}	42,6 ($\pm 3,3$) ^{Aa}
Qui-C	14,87 ($\pm 0,48$) ^c	7,56	7,53	35,4 ($\pm 0,7$) ^{Bd}	18,3 ($\pm 5,5$) ^{Ac}
Qui-V	15,27 ($\pm 1,55$) ^c	6,64	6,53	49,4 ($\pm 2,3$) ^{Bb}	33,8 ($\pm 3,0$) ^{Ab}
Qui-V-M	16,72 ($\pm 0,73$) ^b	6,67	6,54	43,1 ($\pm 5,1$) ^{Ac}	39,9 ($\pm 3,9$) ^{Ab}

Média \pm desvio padrão de *três determinações experimentais; letras minúsculas diferentes na mesma coluna indica que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias pelo teste de Scott-Knott, Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indica que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias pelo teste de Scott-Knott

Pec-C: pectina e água, Pec-V: pectina e vinhaça, Pec-V-M: pectina, vinhaça e biomassa microalgal, Qui-C: quitosana e água, Qui-V: quitosana e vinhaça e Qui-V-M: quitosana, vinhaça e biomassa microalgal.

O aumento da concentração de sais solúveis na solução do solo pode conduzir a erros na determinação do pH em água, este problema de sais solúveis é minimizado pela determinação do pH do solo em CaCl_2 . A solução de CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ foi utilizada como forma de simular o efeito da concentração de sais presentes na solução de solo, principalmente o íon Ca, oriundo da prática de calagem para correção da acidez do solo (Raij et al., 2001), considerando a possível aplicação das partículas como biofertilizante. Para todas as formulações, a massa solubilizável (MS) em CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ foi menor do que o valor observado para a MS em água, indicando que as partículas poderão apresentar mais estabilidade nas condições do solo.

A adição de vinhaça provocou um aumento na MS nos dois meios líquidos testados. Isso pode ser devido a maior concentração de sólidos solúveis na vinhaça que estariam sendo liberados para o meio. Em relação aos dois biopolímeros, as partículas de pectina, em geral, apresentaram maior solubilidade. A reticulação da quitosana com o TPP provavelmente foi mais efetiva do que a da pectina com CaCl_2 em etanol. Isso era esperado, uma vez que as pectinas ATM têm baixa interação com

íons cálcio, comparado às pectinas de baixo teor de metoxilação (BTM) (Fang et al., 2008).

A menor estabilização das partículas de pectina ATM, em relação às de quitosana, foi constatada no momento do contato com os meios líquidos. As partículas de pectina apresentaram intumescimento instantâneo da matriz, enquanto as de quitosana não sofreram, visualmente, alteração de tamanho. Apesar da menor estabilidade, este intumescimento das partículas de pectina e vinhaça pode ser positivo para a aplicação pretendida, uma vez que estas estruturas conseguiriam reter uma maior quantidade de água no solo, mantendo a umidade por períodos mais longos.

O pH das partículas de pectina, avaliado após 30 minutos de contato das partículas com a água ou com a solução de CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, foi menor do que o das partículas de quitosana. A solução de TPP, utilizada para a formação das partículas de quitosana tem pH básico (~ 8,5) o que fez com o pH das partículas suspensas nos meios líquidos fosse mais alto do que as partículas de pectina. Além disso, o rápido intumescimento das partículas de pectina no meio líquido provavelmente altera o pH do meio aquoso, o que não acontece com as partículas de quitosana. O meio líquido (água ou CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$) não influenciou o valor de pH.

5.3.4 Diâmetro e resistência mecânica das partículas

Os resultados do diâmetro médio e da força de compressão das partículas estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Diâmetro médio e força na compressão das partículas

Tratamento	Diâmetro médio (cm)*	Força na Compressão (N)**
Pec-C	0,429 ($\pm 0,002$) ^a	24,01 ($\pm 6,31$) ^d
Pec-V	0,266 ($\pm 0,008$) ^c	35,31 ($\pm 9,08$) ^d
Pec-V-M	0,301 ($\pm 0,016$) ^b	31,37 ($\pm 18,88$) ^d
Qui-C	0,228 ($\pm 0,002$) ^d	123,77 ($\pm 14,55$) ^a
Qui-V	0,194 ($\pm 0,005$) ^e	62,37 ($\pm 4,36$) ^c
Qui-V-M	0,226 ($\pm 0,005$) ^d	80,80 ($\pm 8,21$) ^b

Média \pm desvio padrão de: *vinte determinações experimentais; **dez determinações experimentais. Letras diferentes na mesma coluna indica que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias pelo teste de Scott-Knott.

Pec-C: pectina e água, Pec-V: pectina e vinhaça, Pec-V-M: pectina, vinhaça e biomassa microalgal, Qui-C: quitosana e água, Qui-V: quitosana e vinhaça e Qui-V-M: quitosana, vinhaça e biomassa microalgal.

As propriedades mecânicas são características importantes, pois elas podem prever a estabilidade e a funcionalidade dos materiais. Estas medidas podem fornecer informações sobre a magnitude das forças intermoleculares envolvidas na estabilização da matriz polimérica. Os resultados dos testes de resistência mecânica à compressão (Tabela 5) indicaram que as partículas de quitosana necessitam de uma maior força de compressão para deformarem e, portanto, são mais resistentes do que partículas de pectina ATM.

Para a quitosana, a adição da vinhaça provocou uma diminuição na sua força de compressão, indicando uma desestabilização da matriz pelos componentes da vinhaça. Por outro lado, as partículas de pectina ATM com vinhaça tiveram uma força maior em relação às partículas de pectina com água. Esta maior fragilidade das partículas de pectina ATM com água pode ser notada em seu formato achatado após a secagem no processo de produção. Acredita-se que o baixo pH e a presença de sólidos solúveis, como açúcares e glicerol, na vinhaça, requisitos importantes no mecanismo de gelificação das pectinas ATM, tenham contribuído para a formação e estabilidade do gel. A redução da atividade de água favorece as interações hidrofóbicas entre as cadeias de pectina e conseqüentemente a gelificação e a força do gel (Flutto, 2003).

A adição da biomassa microalgal não afetou significativamente a resistência mecânica das partículas de pectina e provocou um ligeiro aumento na força de compressão das partículas de quitosana. Isso pode ser considerado um resultado positivo, uma vez que o procedimento foi utilizado com intuito de melhorar a qualidade nutricional das partículas como fonte, principalmente, de nitrogênio, sem impactar nas propriedades estruturais das partículas.

O diâmetro médio das partículas de pectina foi maior em comparação às das partículas formuladas com quitosana. Isso se deve a reticulação mais efetiva da quitosana com o TPP, comparada a interação da pectina ATM com o íon cálcio.

No estudo de Benucci et al. (2016), o diâmetro das partículas de quitosana variou entre 0,30 e 0,35 cm, sendo maior que os valores encontrados no presente estudo em que as partículas de quitosana apresentaram diâmetro na faixa de 0,19 a 0,23 cm após secagem. No entanto o tamanho das partículas formadas depende de vários fatores como massa molar e concentração de polímero, concentração do reticulante e diâmetro da agulha usada no gotejamento.

O diâmetro médio das partículas garante a especificação estabelecidas pela INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 25 (Brasil, 2009) em relação a natureza física de biofertilizante e as classifica como Farelo Grosso, quanto a granulometria.

5.3.5 Grau de intumescimento - variação do diâmetro das partículas

A variação no diâmetro das partículas após 30 minutos de imersão em água está ilustrada nas Figuras 15 e 16, para partículas de pectina e vinhaça respectivamente. É possível observar que as partículas de pectina aumentaram cerca 40% seu tamanho após 30 minutos de contato com a água, enquanto que as de quitosana aumentaram aproximadamente 20% seu tamanho, resultado esperado pelo maior grau de reticulação das partículas de quitosana com TPP. A capacidade de absorção de água está relacionada com as características da estrutura polimérica e com a densidade de reticulação das cadeias. A partícula de pectina tem maior potencial de retenção de água quando comparada a partícula de quitosana.

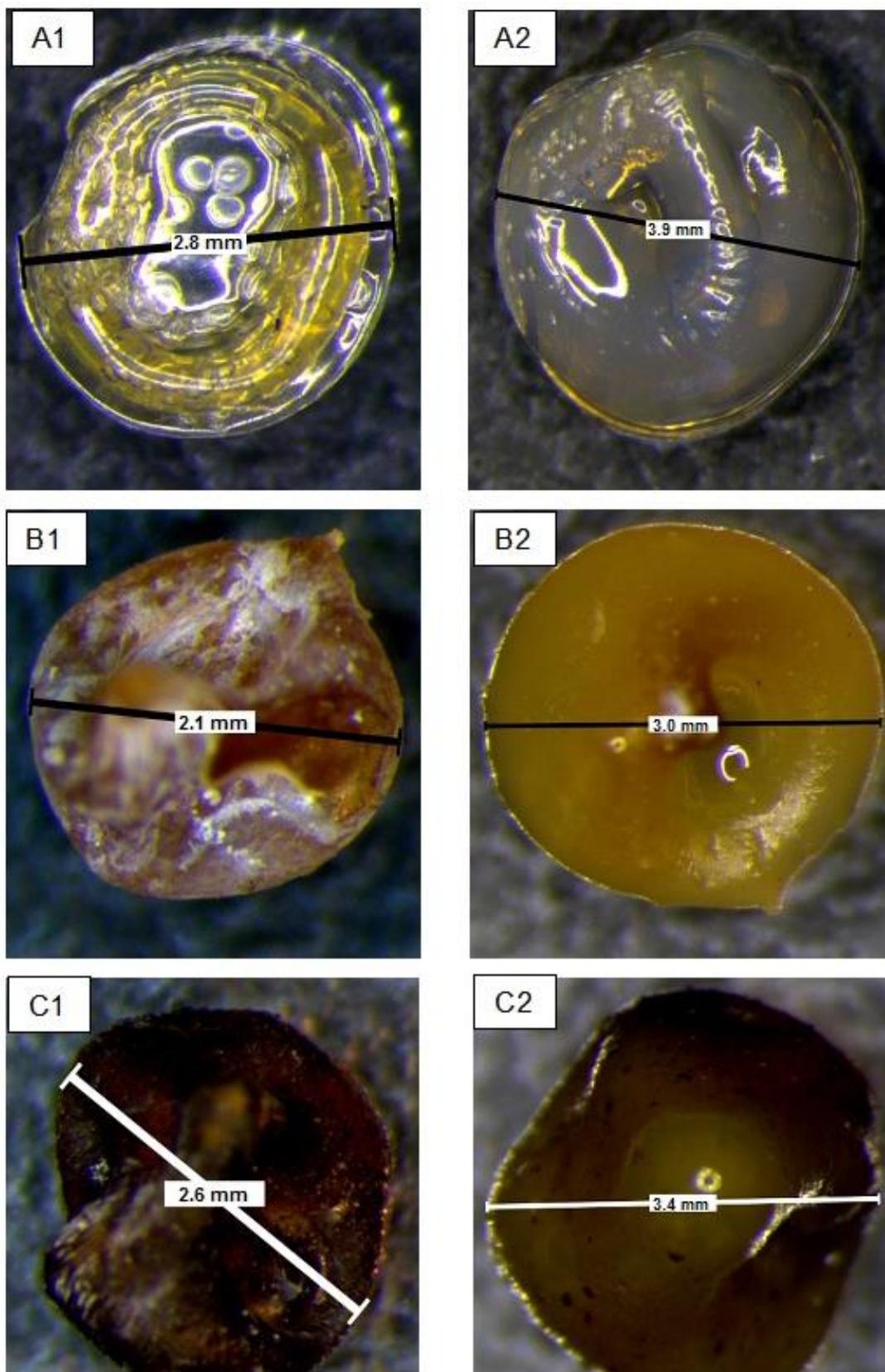


Figura 15: Variação do diâmetro das partículas depectina controle (Pec-C) (A), pectina com vinhaça (Pec-V) (B) e pectina com vinhaça e biomassa microalgal (Pec-V-M) (C), onde A1, B1, C1 são partículas secas e A2, B2, C2 são partículas após 30 minutos de imersão em água

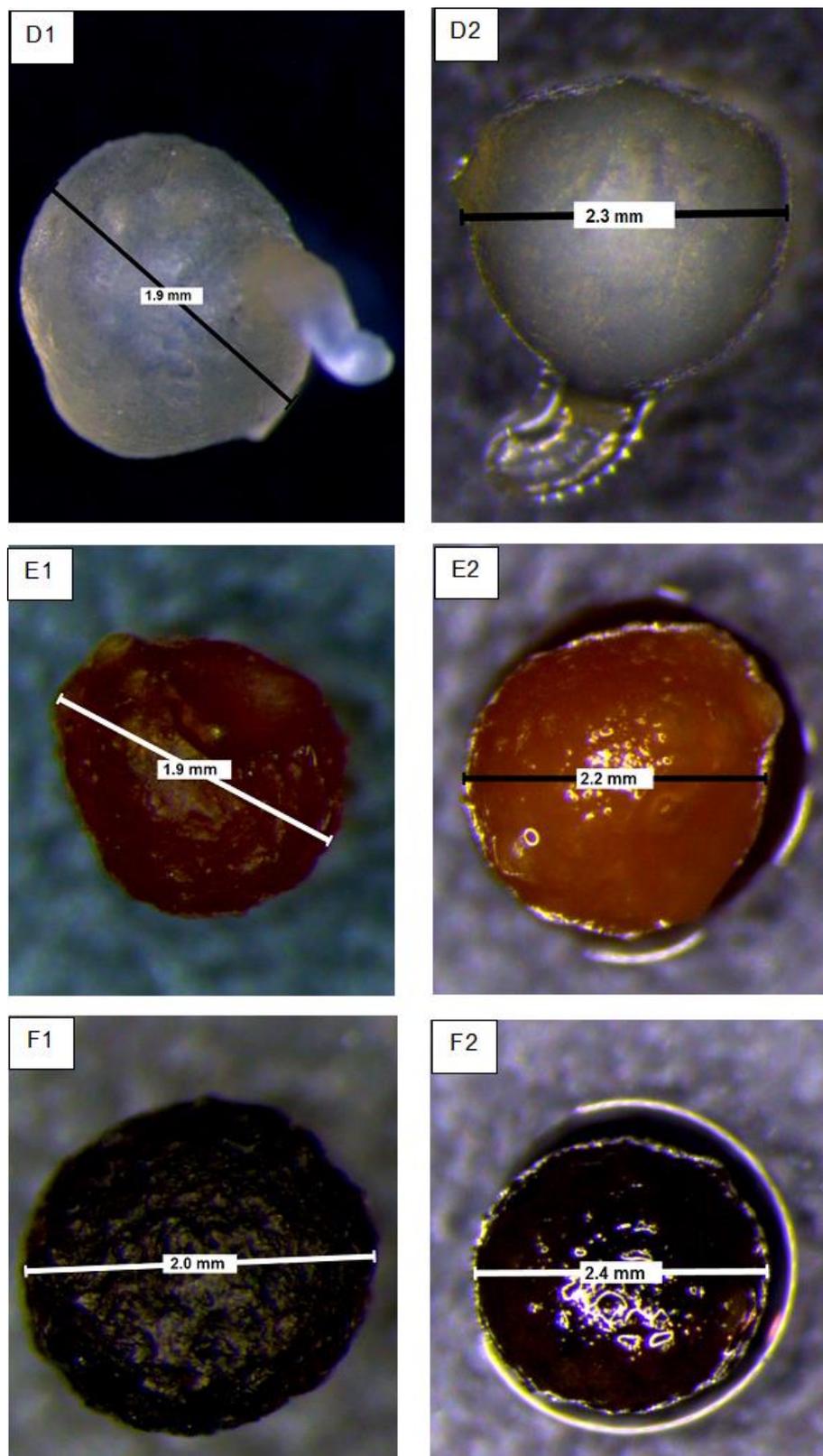


Figura 16: Variação do diâmetro das partículas de quitosana controle (Qui-C) (D), quitosana com vinhaça (Qui-V) (E) e quitosana com vinhaça e biomassa microalgal (Qui-V-M) (F), onde D1, E1, F1 são partículas secas e D2, E2, F2 são partículas após 30 minutos de imersão em água

5.4 Caracterização química das partículas e da biomassa microalgal

Os resultados da composição química das partículas e da biomassa microalgal estão apresentados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente. Na Tabela 8 é apresentado a percentagem de retenção dos nutrientes oriundos da vinhaça e da biomassa microalgal, nas respectivas formulações.

As variações dos teores de macro e micronutrientes das partículas estiveram associadas com o biopolímero (pectina e quitosana), com o agente reticulante (CaCl_2 e TPP), com o solvente (água e vinhaça) e com a biomassa microalgal.

Os teores de N da pectina são originalmente menores do que os da quitosana. Entretanto, a adição de vinhaça e da biomassa microalgal promoveram efeitos contrários nos teores de N das partículas, dependendo do biopolímero. Houve aumento significativo do teor de N nas partículas de pectina após a adição da vinhaça (+74%) e da vinhaça + biomassa microalgal (+136%). A partícula com pectina/vinhaça e incorporação de biomassa microalgal apresentou maiores teores de N em relação ao controle (Pec-C), o que o era esperado devido a sua contribuição oriunda de proteínas e de ácidos nucleicos, com um rendimento de 51% acima do que havia na vinhaça. As partículas de quitosana formuladas com vinhaça (Qui-V) e vinhaça + biomassa microalgal (Qui-V-M) apresentaram reduções de 11,9% e de 6,6%, respectivamente, nos teores finais de N. Considerando que as moléculas de quitosana apresentam grupamentos amínicos era esperado que o teor de N fosse maior em relação a pectina. A presença de nitrogênio oriundo do biopolímero explica a retenção deste elemento acima de 400% em relação a vinhaça.

Nas partículas de pectina, não houveram resultados estatisticamente diferentes para os teores de fósforo (P). A retenção de P variou entre 64 e 67%, o que demonstra a perda do nutriente durante o processo de reticulação. Os teores de fósforo também não diferiram estatisticamente nas partículas de quitosana, mas diferiram significativamente do tratamento de pectina. Isso se deve principalmente à etapa de reticulação, que no caso da quitosana é realizada em solução de tripolifosfato de sódio (TPP). Assim a retenção de P, em relação a vinhaça, foi superior a 8000%. Os teores de P_2O_5 foram drasticamente influenciados pelo uso do TPP como agente reticulante. As partículas de quitosana apresentaram teores 100 vezes maiores de P_2O_5 quando comparadas com as de pectina. A adição de vinhaça ou de biomassa microalgal não alteraram as concentrações de P_2O_5 , independentemente da natureza do biopolímero formador da partícula.

Tabela 6: Caracterização química das partículas

Partículas	g kg ⁻¹					mg kg ⁻¹				
	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	CaO	MgO	Cu	Fe	Mn	Zn	
Pec-C	5,0 (±0,0) ^f	0,8 (±0,2) ^b	0,5 (±0,1) ^d	46,4 (±4,6) ^a	0,4 (±0,2) ^c	1,3 (±0,5) ^b	37,4 (±3,0) ^d	1,7 (±0,4) ^d	12,5 (±1,5) ^b	
Pec-V	8,7 (±0,3) ^e	0,9 (±0,3) ^b	44,5 (±1,7) ^a	53,6 (±6,7) ^a	5,1 (±0,6) ^a	1,8 (±0,3) ^b	241,5 (±26,2) ^c	35,4 (±2,0) ^a	9,5 (±2,6) ^c	
Pec-V-M	11,8 (±0,3) ^d	0,8 (±0,2) ^b	35,8 (±2,7) ^b	51,9 (±4,5) ^a	4,7 (±0,3) ^a	4,6 (±1,0) ^a	386,8 (±4,9) ^b	34,4 (±2,1) ^a	15,2 (±0,3) ^a	
Qui-C	37,7 (±0,3) ^a	110,8 (±8,7) ^a	1,3 (±0,4) ^d	0,6 (±0,2) ^c	0,3 (±0,1) ^c	ND	41,8 (±4,4) ^d	2,5 (±0,2) ^d	12,3 (±0,2) ^b	
Qui-V	33,2 (±0,8) ^c	107,2 (±5,9) ^a	12,1 (±0,4) ^c	4,8 (±0,0) ^b	2,3 (±0,0) ^b	1,4 (±0,2) ^b	265,3 (±1,8) ^c	29,4 (±0,6) ^c	9,5 (±0,3) ^c	
Qui-V-M	35,2 (±0,3) ^b	103,2 (±0,8) ^a	12,2 (±0,4) ^c	5,2 (±0,1) ^b	2,7 (±0,1) ^b	4,0 (±0,8) ^a	431,4 (±9,8) ^a	32,4 (±0,6) ^b	12,6 (±1,3) ^b	

Média ± desvio padrão de três determinações experimentais. Letras diferentes na mesma coluna indica que há diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias pelo teste de Scott-Knott. ND: não detectável. Pec-C: pectina e água, Pec-V: pectina e vinhaça, Pec-V-M: pectina, vinhaça e biomassa microalgal, Qui-C: quitosana e água, Qui-V: quitosana e vinhaça e Qui-V-M: quitosana, vinhaça e biomassa microalgal.

Tabela 7: Caracterização química da biomassa microalgal

Amostra	g kg ⁻¹					mg kg ⁻¹				
	N	K ₂ O	P ₂ O ₅	CaO	MgO	Cu	Fe	Mn	Zn	
Biomassa microalgal	65 (±1)	15,5 (±0,4)	24,9 (±1,2)	3,3 (±0,9)	6,9 (±1,0)	49,7 (±10,7)	3399,9 (±324,9)	84,0 (±1,4)	88,0 (±1,5)	

Tabela 8: Porcentagem de retenção dos nutrientes oriundos da vinhaça e da biomassa microalgal, nas partículas de pectina e de quitosana com vinhaça e biomassa microalgal.

Partículas	%									
	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	CaO	MgO	Cu	Fe	Mn	Zn	
Pec-V	100	64	71	496	119	36	83	61	127	
Pec-V-M	151	67	64	530	121	102	147	66	227	
Qui-V	410	8246	21	48	58	30	98	54	136	
Qui-V-M	476	8600	23	56	73	93	172	65	197	

Pec-V: pectina e vinhaça, Pec-V-M: pectina, vinhaça e biomassa microalgal, Qui-V: quitosana e vinhaça e Qui-V-M: quitosana, vinhaça e biomassa microalgal. Cálculo realizado utilizando Equação 3.

O uso da vinhaça como solvente acrescentou K_2O às partículas, mas em magnitude que dependeu do biopolímero. A adição da vinhaça ampliou em 90 vezes o teor de K_2O das partículas de pectina, enquanto a formulação com vinhaça + biomassa microalgal (Pec-V-M) promoveu aumento de 72 vezes. Tanto a adição de vinhaça quanto a adição de vinhaça + biomassa microalgal resultaram em aumentos menos expressivos de K_2O (cerca de 9 vezes) na constituição final das partículas de quitosana. Entretanto houve baixa retenção de K_2O para ambos os polímeros, com valores variando entre 64 a 71%, para partículas de pectina, e de 21 a 23% para quitosana. Devido à alta mobilidade em meio aquoso, o íon K^+ se desprende do polímero na etapa de reticulação, o que pode ser confirmado pela menor retenção deste nutriente nas partículas de quitosana. Por outro lado, como a reticulação das partículas de pectina foi realizada em solução de etanol absoluto, houve maior retenção do K nas partículas devido a menor solubilidade do íon neste meio. Além disso há possibilidade de interação eletrostática do potássio com grupos carboxílicos das cadeias de pectina diminuindo a sua mobilidade.

O uso do $CaCl_2$ como reticulante das partículas de pectina resultou em teores de Ca acima de 10 vezes maiores do que os observados nas partículas de quitosana, sem alteração significativa após a adição de vinhaça ou de biomassa microalgal. Assim como para o fósforo nas partículas de quitosana, uma alta retenção de cálcio foi observada para as partículas de pectina. Os teores de CaO não diferiram nas partículas de pectina, porém obteve-se uma retenção de cerca de 500% explicado pela adição de $CaCl_2$ na formulação e também pelo reticulante que contem 1% de $CaCl_2$. Apesar de a pectina ATM apresentar alto grau de esterificação dos grupos carboxílicos por metoxilas (aproximadamente 70% segundo informação do fabricante), ainda existe a possibilidade de formação de zonas de reticulação pela interação eletrostática entre os grupos carboxílicos livre e os íons Ca^{+2} , como foi verificado a partir dos resultados para a concentração de Ca e confirmado pela melhoria da estabilidade do gel e das partículas com a adição deste íon. As partículas de quitosana apresentaram concentrações de CaO estatisticamente menores comparadas as das partículas de pectina. Foi possível perceber um aumento significativo de CaO com a adição de vinhaça e de biomassa microalgal nas partículas de quitosana.

Observaram-se aumentos significativos dos teores de magnésio (Mg) nos dois tipos de polímeros avaliados, quando o solvente foi vinhaça ou vinhaça acrescida de

biomassa microalgal. No tratamento com pectina, a retenção deste nutriente foi mais expressiva e variou entre 119 e 121%, para as partículas sem e com adição de biomassa microalgal, respectivamente. A retenção de Mg nas partículas de quitosana foi de 58 e 73%, para as partículas sem e com adição de biomassa microalgal, respectivamente. Esta diferença entre os valores obtidos para as partículas de quitosana e pectina se deve principalmente à interação do íon magnésio com os reticulantes, etanol absoluto (pectina) e solução aquosa de TPP (quitosana), ou seja, o elemento possui baixa solubilidade em solvente apolar (etanol) e por isso aparece em maior quantidade nas partículas de pectina. Por apresentar maior solubilidade em água, há perda de Mg pelas partículas de quitosana, tal como foi observado nos resultados de K_2O .

Os elementos cobre, ferro e zinco (micronutrientes) apresentaram retenção semelhante nas partículas de quitosana e pectina. Os teores aumentaram quando utilizou-se vinhaça como solvente, com concentrações ainda maiores quando à vinhaça acrescentou-se a biomassa microalgal. Houve, portanto, incorporação destes elementos a partir da vinhaça e, principalmente, da biomassa microalgal, em que os tratamentos apresentaram valores com aumento de 150 a 300%.

Os teores de manganês (Mn) foram estatisticamente superiores quando vinhaça e biomassa microalgal estavam presentes, se comparado a concentração na partícula com água (controle). Porém, a retenção foi de 61 e 66%, para Pec-V e Pec-V-M, respectivamente., devido à provável perda do elemento para o reticulante.

De forma geral as partículas de pectina e de quitosana com vinhaça e biomassa microalgal apresentam concentrações de macro e de micronutrientes superiores em relação ao controle (biopolímero e água).

5.5 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR das partículas de pectina controle (Pec-C), pectina/vinhaça (Pec-V) e pectina/vinhaça/microalga (Pec-V-M) estão apresentados na Figura 17. Para a partícula de pectina controle (Pec-C) podem ser observadas três regiões espectrais distintas, típicas de polissacarídeos (Coimbra et al., 2011, Assifaoui et al., 2010). A primeira ($3500 - 1800 \text{ cm}^{-1}$) apresenta duas bandas principais. A primeira, em aproximadamente 3350 cm^{-1} , correspondente a absorção devido ao estiramento dos grupos OH das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares nas cadeias de ácido galacturônico da pectina. A segunda, em 2933 cm^{-1} , corresponde ao

estiramento e deformação angular das ligações C-H nos grupos CH, CH₂ e CH₃. Ressalta-se, no entanto, que esta região também é associada a ligações de hidrogênio nas moléculas de água. A segunda região (1800 – 1500 cm⁻¹) é de especial interesse para a avaliação do grau de metoxilação da pectina, pois permite a observação da absorção no infravermelho dos grupos ácidos carboxílicos livres e esterificados das moléculas de pectina. A avaliação do espectro da amostra Pec-C evidencia a existência de duas bandas de absorção: em 1733 cm⁻¹, relacionada ao grupo metil éster (COOCH₃) e aos grupos carboxílicos não dissociados (COOH); em 1628 cm⁻¹, associada a vibração de estiramento dos íons carboxilato (COO⁻) presentes na pectina (Maciel et al., 2015, Coimbra et al., 2011). A maior intensidade da banda em 1733 cm⁻¹ confirma o alto grau de metoxilação da pectina utilizada (Szymanska-Chargot & Zdunek, 2013). Os grupos carboxílicos ionizados (COO⁻) absorvem tipicamente 1610 cm⁻¹ (Szymanska-Chargot & Zdunek, 2013). Estes grupos funcionais podem interagir eletrostaticamente com íons Ca⁺², conforme descrito pelo modelo “caixa de ovos”, deslocando os íons monovalentes presentes como K⁺ e Na⁺. Alguns autores relatam o deslocamento desta banda de absorção devido a essa interação, podendo sugerir a interação dos íons Ca do reticulante com as porções não metoxiladas da pectina (Assifaoui et al, 2010). Este efeito corrobora o aumento da estabilidade das partículas com a presença do íon Ca no reticulante. A terceira região (abaixo de 1500 cm⁻¹) corresponde as vibrações das ligações C-C, C-O-C e C-OH da estrutura do carboidrato e das ligações glicosídicas. É chamada de região de “*fingerprint*”, sendo específica de cada composto.

Os espectros das partículas de Pec-V e Pec-V-M (Figura 17) apresentaram as bandas de absorção típicas da pectina. As principais alterações, em relação à partícula controle (Pec-C), são descritas a seguir. As amostras de pectina com vinhaça (PEC-V) e vinhaça e microalga (Pec-V-M) apresentaram duas bandas acentuadas em 3500 e 3400 cm⁻¹, que podem ser atribuídas as vibrações de estiramento axial das ligações N-H em amidas primárias e O-H de grupos carboxílicos e álcoois, estando de acordo com o observado por Doelsch et al. (2009) para amostras de vinhaça de cana-de-açúcar. As bandas características dos grupos metil éster (COOCH₃), dos grupos carboxílicos não ionizados (COOH) e do íon carboxilato (COO⁻) também estão presentes nos espectros das partículas com vinhaça e vinhaça e biomassa microalgal. Porém, observou-se uma acentuação na intensidade da banda em 1620 cm⁻¹ para estas amostras devido a presença de ácidos carboxílicos provenientes da vinhaça e

da biomassa microalgal. Doelsch et al. (2009) determinaram a composição da vinhaça de cana-de-açúcar e observaram que os ácidos predominantes são o aconítico, málico, acético, cítrico e o lático. Nas partículas com biomassa microalgal também é observado uma banda em 1683 cm^{-1} atribuída a vibração das ligações C=O de amidas primárias (Corradini et al, 2010). Sudhakar & Premalatha (2015) determinaram o espectro FTIR da biomassa seca de *Scenedesmus* sp. revelando a presença de grupos -OH, -COOH, NH_2 e CO e está de acordo com o observado no presente estudo.

Nos três espectros da Figura 17 é possível observar bandas características de ligações glicosídicas entre 1090 cm^{-1} e 1010 cm^{-1} . As bandas em 1090 cm^{-1} foram intensificadas na presença de vinhaça e microalga. Esta banda é associada a ligações C-O de açúcares, álcoois, ácidos, ésteres e éteres (Doelsch et al., 2009) e a ácidos nucleicos e outros compostos fosfatados (Duygu et al., 2012). As bandas em $660\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ presentes nos espectros das partículas PEC-V e PEC-V-M são atribuídas a presença de sais inorgânicos como cloretos e sulfatos oriundos da vinhaça (Doelsch et al., 2009).

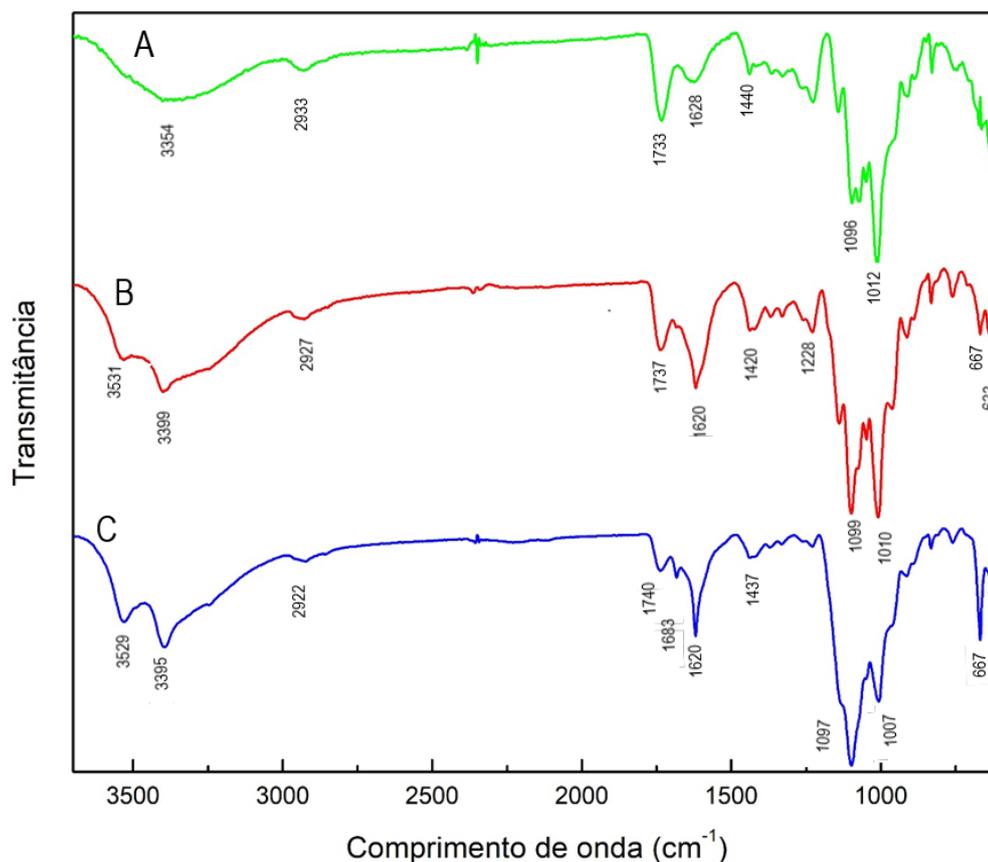


Figura 17: Espectro de FTIR das partículas de pectina controle, Pec-C (A), pectina com vinhaça, Pec-V (B) e pectina com vinhaça e biomassa microalgal, Pec-V-M (C)

Os espectros de infravermelho das partículas de quitosana controle (Qui-C), quitosana/vinhaça (Qui-V) e quitosana/vinhaça/biomassa microalgal (Qui-V-M) estão apresentados na Figura 18.

O espectro da partícula de quitosana controle apresentou bandas de absorção características do biopolímero e do reticulante TPP. Na região 3500-1800 cm^{-1} , as bandas de absorção em 3352 e 3294 cm^{-1} são associadas ao estiramento das ligações O-H e N-H. A banda em 2871 cm^{-1} pode ser associada a vibração da ligação C=O dos grupos amidados da quitosana. Alguns autores constataram que a reticulação da quitosana com TPP provocou o alargamento e achatamento destas bandas, em relação ao espectro da quitosana pura, indicando que as ligações de hidrogênio se intensificam na reticulação (Wu, Yang, Wang, Hu, & Fu, 2005). Na região de 1800 a 1500 cm^{-1} , apareceram duas bandas características. A primeira, em 1649 cm^{-1} , foi atribuída ao estiramento da ligação C=O da amida I dos grupos acetilados da quitosana. A segunda, em 1588 cm^{-1} , foi relacionada a deformação angular da ligação N-H e estiramento da ligação C-N dos grupamentos amínicos protonados (Mi et al., 2003). Em comparação ao espectro da quitosana pura, vários autores (Luo et al., 2010, Hu et al., 2008, Shah et al., 2009) relataram que as bandas da amida I e da amida II são deslocadas devido a interação eletrostática entre os grupos fosfato do TPP. Este deslocamento está de acordo com o observado neste estudo. Também se nota uma banda em 1150 cm^{-1} correspondente a vibração da ligação P=O do TPP. Outros estudos observaram espectro semelhante para partículas de quitosana e TPP (Bhumkar & Pokharkar, 2006, Xu & Du, 2003). Nas frequências abaixo de 1500 cm^{-1} , observaram-se as bandas características da região de *fingerprint*. As bandas em 1419 e 1377 cm^{-1} foram associadas ao estiramento dos grupos OH e CH₃, respectivamente. As bandas de absorção em 1060 cm^{-1} foram atribuídas ao estiramento das ligações C=O dos grupos C-O-H, C-O-C e CH₂CO. A banda em 891 cm^{-1} foi associada a deformação C-H dos anéis piranosídicos do polissacarídeo.

Os espectros das partículas de quitosana com vinhaça (Qui-V) e vinhaça e biomassa microalgal (Qui-V-M) apresentaram as bandas características da quitosana. A principal alteração percebida é uma intensificação e um pequeno deslocamento na banda em 1649 cm^{-1} na amostra controle (Qui-V) para 1635 cm^{-1} e 1638 cm^{-1} na Qui-V e Qui-V-M, respectivamente, que pode ser atribuído a presença de ácidos carboxílicos provenientes da vinhaça e da microalga (Doelsch et al., 2009).

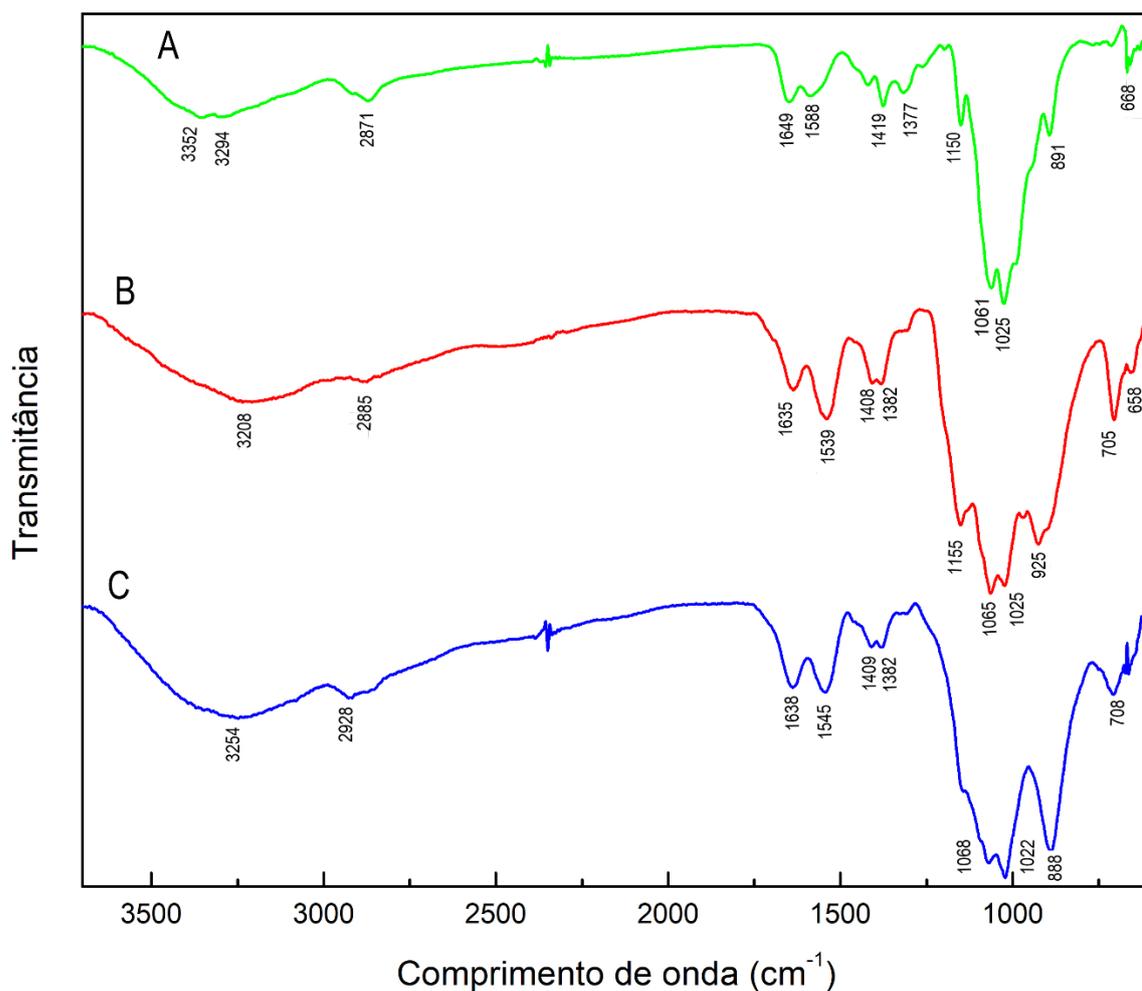


Figura 18: Espectro de FTIR das partículas de quitosana controle, Qui-C (A), quitosana com vinhaça, Qui-V (B) e quitosana com vinhaça e biomassa microalgal, Qui-V-M (C)

5.6 Biodegradação

A umidade do solo utilizado nos experimentos foi mantida a 60% da capacidade de campo, ideal para o crescimento microbiano (CETESB, 1990). O solo não foi esterilizado, com a finalidade de manter os micro-organismos vivos para atuarem sobre as partículas poliméricas (Campos et al, 2007). As caracterizações química e física do solo são apresentadas nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9: Caracterização química do Latossolo Vermelho distrófico utilizado na avaliação da biodegradação das partículas biopoliméricas

Solo	P _{Resina}	MO	pH	K	Ca	Mg	H+Al	Al	SB	CTC _t	V	m
cm	mg dm ⁻³	mg dm ⁻³	CaCl ₂	-----			mmol _c dm ⁻³	-----			----- % -----	-----
0-20	24	22	5,4	3,1	37	14	25	4,8	54,1	79,1	68	8

P_{res}: teor de fósforo extraído pelo método da resina trocadora de íons; MO: matéria orgânica; pH_{CaCl2}: pH do solo medido em solução de CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹ (relação solo:solução 1:2,5); H+Al: acidez potencial; SB: soma de bases = Ca+Mg+K; CTC_t: capacidade de troca de cátions total = SB + (H+Al); V%: percentual de saturação por bases = (SB/CTC_t)x100; percentual de saturação por alumínio = (Al/CTC_e)x100, em que CTC_e é a capacidade de troca de cátions efetiva = SB + Al.

Tabela 10: Composição granulométrica do Latossolo Vermelho distrófico utilizado na avaliação biodegradação de partículas biopoliméricas

Solo (cm)	Argila	Silte	Areia Total	Textura
	----- g kg ⁻¹ -----			
0-20	567	279	154	Argilosa

A maior atividade microbiológica ocorre na camada 0-20 cm do solo, devido à presença de matéria orgânica e ao efeito rizosférico. A predominância de determinado(s) grupo(s) de micro-organismos é definida por um amplo conjunto de fatores ambientais do solo. O LVd apresentou características físico-químicas (Tabelas 9 e 10) favoráveis ao desenvolvimento de microbiota competente na biodegradação de materiais orgânicos (Moreira & Siqueira, 2006). O conteúdo de matéria orgânica total no solo (2,2 g dm⁻³) é composto por materiais que variam quanto à resistência à biodegradação (desde recalcitrantes até moléculas simples). Partículas de pectina e quitosana constituirão substrato orgânico e sua distribuição em solos com baixos teores de matéria orgânica deverá proporcionar efeitos que superam o simples fornecimento de nutrientes. Por serem fonte de carbono prontamente assimilável, de nutrientes e, também, de energia, que resultará do rompimento das cadeias carbônicas dos componentes da vinhaça, as partículas Pec-V, Pec-V-M, Qui-V e Qui-V-M tenderão a aumentar a biomassa e a atividade microbiana no solo. São mais atrativas porque são de cadeias simples. Micro-organismos do solo são versáteis quanto à sobrevivência em amplas faixas de pH. Porém, o aparato enzimático microbiológico é sensível às condições de acidez elevada, devido à desnaturação das proteínas. O pH do LVd (Tabela 9) pode ser considerado adequado e estável para garantir funções vitais de células microbianas, grupos de micro-organismos especializados na degradação da matéria orgânica, níveis baixos de toxidez por Al (baixo m%) e disponibilidade de nutrientes, sobretudo de P (Moreira & Siqueira, 2006).

Além disso, há fornecimento equilibrado de Ca, Mg e K (Tabela 9). A análise granulométrica indicou a presença de 154 g kg^{-1} de areia, 279 g kg^{-1} de silte e 567 g kg^{-1} argila, confirmando a textura argilosa do solo. Trata-se de atributo importante, entre outras razões, na manutenção da umidade do solo, essencial na biodegradação, e no fornecimento de habitat para micro-organismos, devido à alta superfície específica da fração argila.

As Figuras 17 e 18 ilustram a marcha de desprendimento de CO_2 das amostras de solo contendo as partículas de pectina e quitosana, respectivamente, ao longo dos 36 dias de ensaio. Houve registro de liberação de CO_2 nas primeiras 24 h, seguido de perfil ascendente de intenso desprendimento de CO_2 até os 15 dias, indicando que a velocidade de biodegradação foi proporcional à quantidade de substrato orgânico presente.

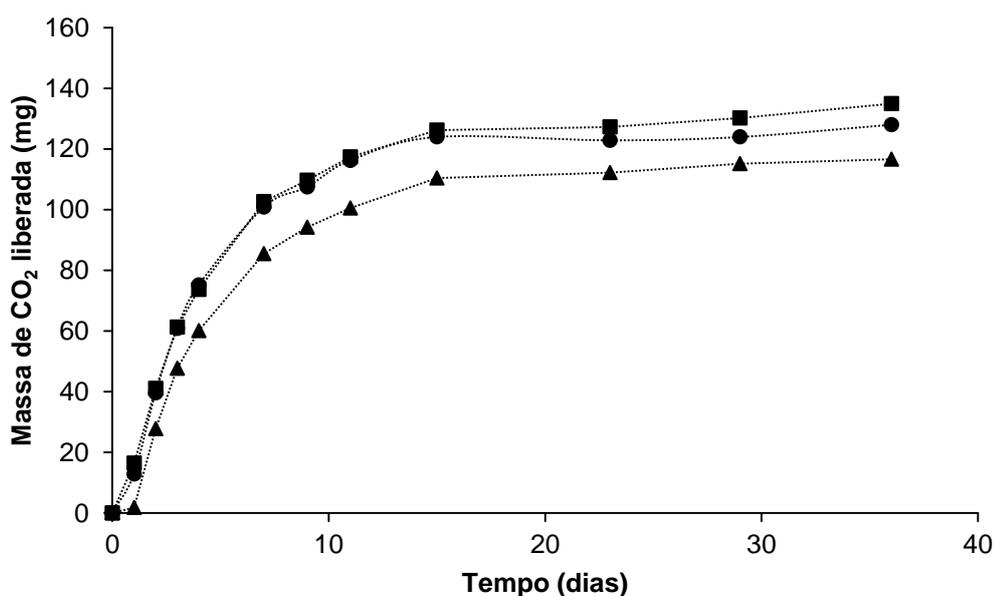


Figura 19: Perfil de liberação de CO_2 (mg) durante a biodegradação das partículas de pectina controle (Pec-C, ▲), pectina com vinhaça (Pec-V, ■) e pectina com vinhaça e biomassa microalgal (Pec-V-M, ●)

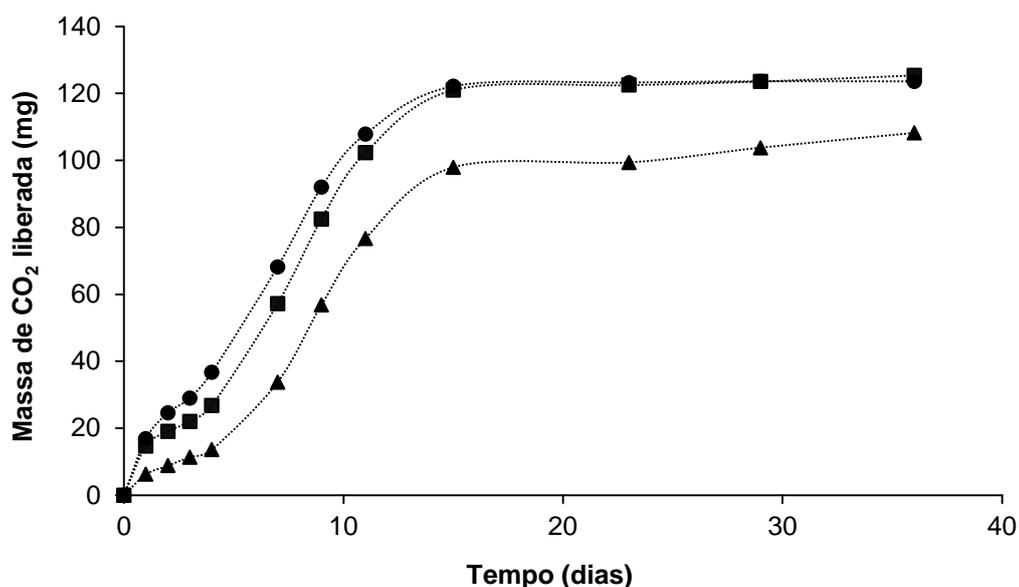


Figura 20: Perfil de liberação de CO₂ (mg) durante a biodegradação das partículas de quitosana controle (Qui-C, ▲), quitosana com vinhaça (Qui-V, ■) e quitosana com vinhaça e biomassa microalgal (Qui-V-M, ●)

O grau de mineralização das partículas de pectina (Tabela 11), após os 36 dias de contato com o solo, foi de 76,6% para o controle (Pec-C), 90,6% para as partículas de pectina com vinhaça (Pec-V) e 93,8% para as partículas de pectina com vinhaça e biomassa microalgal (Pec-V-M).

Tabela 11: Percentual de mineralização das partículas de pectina no solo

Partícula	C (%)	M _t CO ₂ (mg)	M _r CO ₂ (mg)	Mineralização (%)
Pec-C	20,75	152,17	116,6	76,63
Pec-V	20,30	148,87	134,9	90,62
Pec-V-M	18,61	136,47	128,0	93,79

Carbono (C), massa teórica de CO₂ (m_tCO₂), massa real de CO₂ (m_rCO₂)

Pec-C: pectina e água, Pec-V: pectina e vinhaça, Pec-V-M: pectina, vinhaça e biomassa microalgal, Qui-C: quitosana e água, Qui-V: quitosana e vinhaça e Qui-V-M: quitosana, vinhaça e biomassa microalgal.

Em estudo realizado por Rutiaga et al. (2005), filmes de pectina apresentaram um grau de mineralização do carbono em torno de 90% no mesmo período. Esta diferença pode ser devido a reticulação parcial da matriz polimérica pela adição do CaCl₂. A adição da vinhaça e da biomassa microalgal aumentou a biodegradação das partículas. A matéria orgânica da vinhaça é coloidal, composta por gliceróis e ácidos fracos facilmente decomponíveis, capazes de servir de substrato para o aumento imediato da microbiota (Neves *et al.*, 1983). Reis & Rodella (2002) avaliaram a

velocidade de decomposição de fontes distintas de matéria orgânica acrescentadas ao solo e verificaram a seguinte ordem de desprendimento de CO₂ ao longo de 71 dias de incubação: vinhaça > feijão de porco > esterco bovino > biossólido > turfa.

O grau de mineralização das partículas de quitosana (Tabela 12), após os 36 dias de contato com o solo, foi de 66,4% para o controle (Qui-C), 65,1% para as partículas de quitosana com vinhaça (Qui-V) e 82,6% para as partículas de quitosana com vinhaça e biomassa microalgal (Qui-V-M). Comparando-se a biodegradação das partículas de pectina no mesmo período (Tabela 11), observou-se que a quitosana apresentou perfis de liberação de CO₂ mais lentos, provavelmente devido a maior densidade de reticulação da quitosana pelo TPP, dificultando a ação dos microorganismos do solo. Além disso, a quitosana apresenta atividade antimicrobiana intrínseca, que pode ocasionar a redução da população microbiana envolvendo a amostra e conseqüentemente reduzir a taxa de biodegradação do material. Perotti et al. (2017) constataram que o grau de mineralização de compósitos de amido e amido com quitosana e nanoargilas reduziu de 100% para 28%, respectivamente, após 60 dias de contato dos materiais com o solo. Os autores atribuíram a redução na taxa de biodegradação do material à atividade antimicrobiana da quitosana.

Tabela 12: Percentual de mineralização das partículas de quitosana no solo

Partícula	C (%)	M _t CO ₂ (mg)	M _r CO ₂ (mg)	Mineralização (%)
Qui-C	23,94	175,56	116,6	66,42
Qui-V	28,24	207,09	134,9	65,14
Qui-V-M	21,04	154,29	128,0	82,96

Carbono (C), massa teórica de CO₂ (m_tCO₂), massa real de CO₂ (m_rCO₂)

Pec-C: pectina e água, Pec-V: pectina e vinhaça, Pec-V-M: pectina, vinhaça e biomassa microalgal, Qui-C: quitosana e água, Qui-V: quitosana e vinhaça e Qui-V-M: quitosana, vinhaça e biomassa microalgal.

A vinhaça na forma de partículas sólidas apresentou de 65 a 93% de biodegradação após 36 dias do início do teste, constituindo uma forma inovadora de aplicação do efluente no solo, uma vez que todo o conteúdo da vinhaça *in natura* aplicada por fertirrigação está disponível a partir do momento que infiltra no solo. Isso aumenta a probabilidade de lixiviação de íons, implicando baixo aproveitamento de nutrientes pelas plantas de cana-de-açúcar e no aumento dos riscos de contaminação das águas subterrâneas. A biodegradação gradual das partículas de vinhaça ao longo de 36 dias pode ter sido conseqüência da presença dos biopolímeros, que podem ter incorporado às partículas a característica de liberação lenta.

5.7 Implicações práticas do uso das partículas como fertilizante

A alteração do atual modo de aplicação da vinhaça, ou seja, da fertirrigação em área total para a aplicação localizada no sulco de plantio, implica importante avanço no uso quali e quantitativo do efluente em solos agrícolas.

De acordo com a Norma Técnica P4.231 (CETESB, 2015), a racionalização da dosagem para a boa prática da disposição de vinhaça em solo agrícola deve fundamentar-se na equação 7:

$$\text{Quantidade de vinhaça (m}^3 \text{ ha}^{-1}\text{)} = \frac{[(0,05 \times \text{CTC}_t - \text{K}_{\text{Solo}}) \times 3744 + 185]}{\text{K}_{\text{vinhaça}}} \quad (7)$$

em que:

0,05 = 5% da CTC_t , ou seja, proporção máxima da capacidade de troca de cátions total do solo que pode estar ocupada pelo potássio (K);

CTC_t = capacidade de troca de cátions total do solo, expressa em $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$, obtida pela análise de solos para fins de fertilidade, realizada por laboratório de análise de solo que utiliza metodologia adotada pelo Instituto Agrônômico de Campinas (IAC) e devidamente assinada por responsável técnico;

K_{Solo} = teor de potássio (K) do solo, expresso em $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$, à profundidade de 0 a 0,80 m, obtida pela análise de solos para fins de fertilidade, realizada por laboratório de análise de solo que utiliza metodologia adotada pelo Instituto Agrônômico de Campinas (IAC) devidamente assinada por responsável técnico;

3144 = constante que converte os resultados da análise de solo para fins de fertilidade, expressos em $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$, para kg de potássio (K) por volume de solo contido em 1 (um) hectare à 0,80 m de profundidade;

185 = quantidade de K_2O , em kg, extraída pela cultura da cana-de-açúcar, por corte;

$\text{K}_{\text{vinhaça}}$ = teor de potássio (K) da vinhaça, expresso em kg de $\text{K}_2\text{O m}^{-3}$, apresentado em boletim analítico assinado por responsável técnico.

Uma situação hipotética foi elaborada a partir da análise da vinhaça da Tabela 2, cujo teor de K_2O é de $3,9 \text{ kg m}^{-3}$, e de uma análise de solo da camada 0-0,8 m de um solo agrícola cultivado com cana-de-açúcar, com as seguintes características: $\text{CTC}_t = 4,0 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; teor de K na profundidade de 0-0,8 m = $0,05 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$. Nestas condições, a taxa de aplicação de vinhaça, permitida pela P4.231, foi de $190 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$.

A dose de $190 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ de vinhaça *in natura* leva para o solo $741 \text{ kg de K}_2\text{O ha}^{-1}$. A quantidade é elevada porque considera o suprimento de K_2O para a camada de 0-0,8 m do solo. Os $185 \text{ kg de K}_2\text{O ha}^{-1}$ exigidos para cada ciclo de cana-de-açúcar são contabilizados para a oferta na camada arável (0-0,2 m). Para dar destino final para todo o volume de vinhaça produzido, é preciso considerar que o solo deverá funcionar como um armazém de K_2O . Para isso, não se considera apenas o teor de K_2O que deveria existir na camada arável (0-0,2 m) para a cana-de-açúcar, mas sim a capacidade total de armazenar K_2O na camada 0-0,8 m de solo. Considera-se 0,8 m na equação de cálculo devido à profundidade média do sistema radicular da cana-de-açúcar em solos ácidos tropicais.

O protocolo experimental desenvolvido neste estudo indicou que o uso de 1 L de vinhaça *in natura* produz cerca de 60 g de partículas de pectina (Pec-V). Dessa forma, a dose recomendada de $190 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ de vinhaça pode ser transformada em 11.400.000 g de partículas. Considerando o teor de K_2O das partículas Pec-V igual a $44,5 \text{ g kg}^{-1}$, a quantidade de partículas (11,4 t) originadas de 190 m^3 de vinhaça conteria 507 kg de K_2O .

Na fertirrigação com vinhaça *in natura*, o efluente é aplicado em área total, considerando 0,8 m de profundidade. Com a conversão da vinhaça para partículas, o material passa a ser distribuído da mesma forma que um fertilizante convencional, ou seja, na linha de cultivo. Admitindo o suprimento somente na camada arável (0-0,2 m), pode-se considerar apenas o teor de K_2O necessário para cada ha de cana-de-açúcar, ou seja, o valor de $185 \text{ kg de K}_2\text{O por ha}$, tal como consta na fórmula da CETESB (2015). Para acrescentar esta quantidade de K_2O na forma de partículas de pectina, seriam necessários 4.160 kg do material. A partir do espaçamento convencional de 1,4 m entre linhas usado no cultivo de cana-de-açúcar, seriam necessários 580 g de partículas por metro linear, aplicadas no sulco de plantio, para suprir a exigência teórica de $185 \text{ kg ha}^{-1} \text{ K}_2\text{O}$ pela cana-de-açúcar. A quantidade de material aplicado passa a ser muito menor por que a vinhaça deixou de ser aplicada por fertirrigação, em área total e para a camada 0,8 m, e passou a ser aplicada na forma de adubação, localizada na linha de cultivo e para a camada 0,2 m. Entretanto, a aplicação de $4,1 \text{ t ha}^{-1}$ de Pec-V acrescenta 36 kg ha^{-1} de N, 37 kg ha^{-1} de P_2O_5 , 225 kg ha^{-1} de Ca e 21 kg ha^{-1} de Mg. O cálculo da aplicação de partículas baseado no teor de K_2O , ou seja, da mesma forma que a utilizada para o cálculo da aplicação de vinhaça, resulta em oferta de N, no plantio, suficiente para a cultura da cana-de-

açúcar, que necessita, aproximadamente, de 60-90 kg ha⁻¹ de N por ciclo, com aplicação de 30 kg ha⁻¹ na ocasião do plantio e de 30-60 kg ha⁻¹ na adubação de cobertura aos 30-60 dias após o plantio. As adubações fosfatada e potássica dependem da produtividade esperada, do ambiente de produção e dos teores indicados pela análise de solo. A adubação fosfatada pode variar de 40 a 180 kg ha⁻¹ de P₂O₅, enquanto a potássica varia de 40 a 200 kg ha⁻¹ de K₂O.

O protocolo de produção resultou em partículas com proporções N-P₂O₅-K₂O distintas das de formulações de fertilizantes encontradas no mercado (Tabela 13). Dentre as fórmulas de fertilizantes minerais mais encontradas no comércio citam-se (Trani & Trani, 2011): a) para semeadura/plantio das culturas: 04-14-08; 08-28-16; 05-30-10; 05-30-15; 04-20-20 e 05-25-25; b) para aplicação em cobertura (adubações realizadas durante o desenvolvimento das culturas): 20-05-20; 20-00-20; 20-05-15; 14-07-28; 12-06-12; 10-10-10 e 15-15-15.

Tabela 13: Proporção de macronutrientes em partículas de pectina e de quitosana

Partícula	Proporção (%) N-P ₂ O ₅ -K ₂ O	Nutrientes adicionais
Pec-V	0,87-0,09-4,5 (01-00-04)	3,8% Ca + 0,3% Mg
Pec-V-M	1,18-0,08-3,6 (01-00-03)	3,7% Ca + 0,3% Mg
Qui-V	3,32-10,7-1,2 (03-10-01)	0,3% Ca + 0,1% Mg
Qui-V-M	3,52-10,3-1,2 (03-10-01)	0,4% Ca + 0,2% Mg

Pec-V: pectina e vinhaça, Pec-V-M: pectina, vinhaça e biomassa microalgal, Qui-V: quitosana e vinhaça e Qui-V-M: quitosana, vinhaça e biomassa microalgal.

As partículas de Pec-V e Pec-V-M apresentaram baixos teores de P₂O₅, enquanto as de Qui-V e Qui-V-M exibiram baixos teores de K₂O. Notou-se que a composição do agente reticulante foi importante na definição de teores de Ca, nas partículas de pectina que são reticuladas com CaCl₂, e de P₂O₅, nas partículas de quitosana que são reticuladas com TPP. A natureza do biopolímero determinou a concentração de N das partículas, com um acréscimo significativo de N observado com a adição de biomassa microalgal nas partículas Pec-V-M (Tabela 6). Foi evidente o aumento do teor de K₂O com o uso da vinhaça como solvente.

Aportes significativos de micronutrientes foram observados após a inclusão da biomassa microalgal às partículas. Entretanto, as quantidades de micronutrientes na composição final das partículas são insuficientes para representar acréscimos

significativos a partir de adubação com Pec-V. Com a aplicação de 4,1 t ha⁻¹ de partículas Pec-V, seriam acrescentados 7,1 g ha⁻¹ de Cu, 986,4 g ha⁻¹ de Fe, 142,6 g ha⁻¹ de Mn e 39,2 g ha⁻¹ de Zn. Quando necessárias, as recomendações de adubação indicam a adição de 1 a 5 kg ha⁻¹ de microelementos metálicos, sobretudo de Cu e Zn, cujos relatos de deficiência no solo são mais frequentes.

Admitindo que houve 90,6% de biodegradação das partículas Pec-V no período de 36 dias (Figura 19), há garantia do suprimento de N no período que antecede a adubação de cobertura. Partindo-se do cálculo inicial, a quantidade de vinhaça para aplicação em conformidade com a P4.231 (190 m³) produz 11.400 kg de partículas Pec-V, quantidade suficiente para ser utilizada na adubação de plantio de 2,8 ha de cana-de-açúcar.

Dentre as vantagens do uso da vinhaça na elaboração de partículas com biopolímeros, particularmente a Pec-V, incluem-se: a) aplicação da vinhaça no sulco de plantio, utilizando a mesma tecnologia de aplicação de fertilizantes convencionais e dispensando a onerosa aplicação de vinhaça por fertirrigação em área total; b) a vinhaça na forma de partículas possibilita o transporte para áreas mais distantes das unidades sucroenergéticas, ampliando a distância mínima econômica considerada viável para o uso da vinhaça; c) a produção de partículas Pec-V amplia as alternativas de uso da vinhaça como fertilizante em outras culturas agrícolas além da cana-de-açúcar, o que pode contribuir decisivamente para o uso racionalizado e legalmente correto do volume total de efluente.

5.8 Classificação das partículas de acordo com a legislação brasileira

A legislação brasileira de fertilizantes tem passado por alterações recentes, de forma a aprimorar e a esclarecer as definições dos diversos produtos enquadrados nesta categoria de insumos agrícolas. A adequação das partículas de pectina e de quitosana, acrescentadas ou não de biomassa microalgal, à legislação vigente, não é trivial.

De acordo com o Decreto n. 4954 de 2004, com as alterações promovidas pela redação do Decreto n. 8384 de 2014, destacaram-se as seguintes definições para a discussão do enquadramento dos materiais obtidos neste estudo:

III - fertilizante: substância mineral ou orgânica, natural ou sintética, fornecedora de um ou mais nutrientes de plantas, sendo:

b) fertilizante orgânico: produto de natureza fundamentalmente orgânica, obtido por processo físico, químico, físico-químico ou bioquímico, natural ou controlado, a partir de matérias-primas de origem industrial, urbana ou rural, vegetal ou animal, enriquecido ou não de nutrientes minerais;

d) fertilizante binário: produto que contém dois macronutrientes primários;

e) fertilizante ternário: produto que contém os três macronutrientes primários;

f) fertilizante com outros macronutrientes: produto que contém os macronutrientes secundários, isoladamente ou em misturas destes, ou ainda com outros nutrientes;

l) fertilizante orgânico simples: produto natural de origem vegetal ou animal, contendo um ou mais nutrientes de plantas;

m) fertilizante orgânico misto: produto de natureza orgânica, resultante da mistura de dois ou mais fertilizantes orgânicos simples, contendo um ou mais nutrientes de plantas;

n) fertilizante orgânico composto: produto obtido por processo físico, químico, físico-químico ou bioquímico, natural ou controlado, a partir de matéria-prima de origem industrial, urbana ou rural, animal ou vegetal, isoladas ou misturadas, podendo ser enriquecido de nutrientes minerais, princípio ativo ou agente capaz de melhorar suas características físicas, químicas ou biológicas;

VI - biofertilizante: produto que contém princípio ativo ou agente orgânico, isento de substâncias agrotóxicas, capaz de atuar, direta ou indiretamente, sobre o todo ou parte das plantas cultivadas, elevando a sua produtividade, sem ter em conta o seu valor hormonal ou estimulante;

XI - produto - qualquer fertilizante, corretivo, inoculante, biofertilizante, remineralizador e substrato para plantas;

XII - produto novo: produto sem antecedentes de uso e eficiência agronômica comprovada no País ou cujas especificações técnicas não estejam contempladas nas disposições vigentes;

As partículas Pec-V, Pec-V-M, Qui-V e Qui-V-M atendem à definição de produto e de fertilizante, na medida em que são substâncias orgânicas, em sua maior proporção, de origem natural (pectina, quitosana, vinhaça, microalgas) ou sintética (agentes reticulantes) e fornecem nutrientes (N, P, K, Ca e Mg), podendo ser binários (Pec-V e Qui-V) ou ternários (Pec-V-M e Qui-V-M), ou ainda fertilizantes com outros macronutrientes, pois possuem concentrações importantes de Ca e de Mg.

Adequam-se também ao conceito de fertilizante orgânico, uma vez que a natureza dos seus componentes é fundamentalmente orgânica (pectina, quitosana, vinhaça, microalgas), que tem origem na agroindústria e que é enriquecida de nutrientes minerais (P_2O_5 e Ca) advindos dos agentes reticulantes.

Poderiam ser consideradas fertilizante orgânico misto, se os seus componentes orgânicos (pectina, quitosana, vinhaça, microalgas) fossem reconhecidamente classificados fertilizantes orgânicos simples. Na medida em que não há enquadramento reconhecido de todos os componentes orgânicos sob a denominação de fertilizante orgânico simples, a especificação de fertilizante orgânico composto pode ser mais adequada, pois o produto final é o resultado do uso de matéria-prima de natureza compatível com as usadas neste estudo, submetidas à processos físicos, químicos e físico-químicos, e enriquecidas com nutrientes minerais (P_2O_5 e Ca) originados de substâncias empregadas para melhorar suas características físicas (reticulação) e químicas.

As partículas podem ser classificadas como produto novo, ainda desprovido de comprovação de eficácia quanto ao uso ou eficiência agronômica e cujos componentes, principalmente a biomassa microalgal e o tripolifosfato de sódio, não têm enquadramento nas disposições vigentes.

A classificação das partículas como biofertilizantes parece ser a mais adequada tendo em vista os biopolímeros que se comportam como agentes orgânicos e o comprovado aumento de produtividade proporcionado pela adição da vinhaça através da fertirrigação na cultura de cana-de-açúcar (Da Silva, et al. 2014; De Souza, et al., 2015). Apesar de não é explícito pela legislação o significado de agente orgânico e a

efetividade das partículas em atuar direta ou indiretamente nas plantas cultivadas, por não terem sido aplicadas em culturas.

6 CONCLUSÕES

A partir da padronização das formulações e ajuste dos parâmetros do processo de produção, foi possível obter partículas biopoliméricas estáveis, utilizando a pectina e a quitosana como fonte de N e como agentes retardadores da biodegradação das partículas, a vinhaça como fonte de K_2O e solvente e a biomassa microalgal como fonte complementar de micronutrientes, constituindo estratégia válida e alternativa para a destinação final da vinhaça. De acordo com a legislação brasileira em vigor, o produto pode ser classificado como biofertilizante. As partículas de pectina, quitosana e vinhaça apresentaram potencial para serem aplicadas como biofertilizante na agricultura, possibilitando a reciclagem de nutrientes da vinhaça, dos biopolímeros e da biomassa microalgal para o solo e, sobretudo, o aproveitamento deste importante resíduo da indústria sucroalcooleira.

As partículas produzidas apresentaram matriz polimérica homogênea, formatos esféricos bem definidos, diâmetro variando entre 2 e 3 mm. Houve aumento da rugosidade superficial das partículas com a adição da vinhaça, intensificada após o acréscimo da biomassa microalgal. A adição da vinhaça provocou um aumento na solubilidade das partículas, quando comparadas às formulações com água. A menor solubilidade das partículas em solução de $CaCl_2$ $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, sugere uma maior

estabilidade das partículas no meio simulante de solução de solo. As partículas de quitosana com vinhaça apresentaram menor solubilidade, comparada as de pectina. As partículas de pectina apresentaram o dobro de capacidade de intumescimento, sendo capazes de ampliar em 40% o tamanho após 30 minutos de contato com a água. A vinhaça diminuiu a resistência mecânica das partículas de quitosana e aumentou a resistência das partículas de pectina. A presença da vinhaça conferiu maior estabilidade ao gel de pectina ATM, comparado à formulação com água, provavelmente devido a presença de sólidos solúveis na vinhaça, característica importante no mecanismo de gelificação desta pectina.

Em relação a composição química, as partículas de pectina (Pec-V e Pec-V-M) apresentaram quantidades equilibradas de N (1%), K₂O (3-4%) e Ca (4%) e foram desprovidas de quantidades importantes de P₂O₅. As partículas de quitosana (Qui-V e Qui-V-M) apresentaram maiores concentrações de N (3,3-3,5%) e de P₂O₅ (10-11%), mas concentrações mais baixas de K₂O (1%) e, sobretudo, de Ca (0,3%). Os agentes reticulantes foram fontes determinantes de P₂O₅ para as partículas de quitosana (tripolifosfato de sódio) e de Ca para as partículas de pectina (cloreto de cálcio). A natureza do biopolímero definiu a concentração de N e a vinhaça respondeu pelos aportes de K₂O. A biomassa microalgal causou aumento na concentração de N das partículas de pectina e na concentração de micronutrientes.

Após 36 dias de contato com o solo, houve 91% e 65% de biodegradação das partículas de Pec-V e de Qui-V, respectivamente. A adição da biomassa microalgal aumentou a proporção de biodegradação das partículas (Pec-V-M - 94%; Qui-V-M - 83%). A quitosana apresentou maior potencial para uso como biopolímero com função de retardar a disponibilização de nutrientes, caracterizando um sistema de liberação lenta. Essa propriedade foi particularmente importante para as partículas de quitosana, que apresentaram altas concentrações de N em sua composição.

7 LITERATURA CITADA

ABEDI-KOUPAI, J.; SOHRAB, F.; SWARBRICK, G. Evaluation of hydrogel application on soil water retention characteristics. **Journal of Plant Nutrition**, v. 31, n. 2, p.317–331, 2008.

ABISOLO – Associação Brasileira das Indústrias de Tecnologia em Nutrição Vegetal – 4º Anuário Brasileira das Indústrias de Tecnologia em Nutrição Vegetal, Cap. 2, São Paulo, 179 p. 2018.

ALCARDE, J. C.; GUIDOLIN, J.A.; LOPES, A.S. Os adubos e a eficiência das adubações. ANDA, Boletim Técnico 3, ed.3, São Paulo, 1998. 35p.

AN, S.S.; FRIEDL, T.; HEGEWALD, E. Phylogenetic relationships of Scenedesmus and Scenedesmus-like coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparisons. **Plant Biology**, v. 1, n.4, p. 418-428, 1999.

ANDERSON J.P. **Soil respiration**. In: Methods of soil analysis, part 2, Chemical and microbiological properties. 2nd ed. Madisom, p. 831-871, 1982.

ASSIFAOU, A.; LOUPIAC, C.; CHAMBIN, O.; CAYOT, P. Structure of calcium and zinc pectinate films investigated by FTIR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 345, n. 7, p. 929-933, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT NBR 10.004: Resíduos sólidos - Classificação. Rio de Janeiro, 2004.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS - ANDA. **Principais indicadores do setor de fertilizantes**: comentários, 2016. Disponível em: <<http://anda.org.br/index.php?mpg=03.00.00>>. Acesso em: 22 fev. 2016.

ASTM. Standard test method for determining aerobic biodegradation in soil of plastic materials or residual plastic materials after composting. D 5988-03. **Annual Book of ASTM Standards**. Philadelphia, 2003.

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.

BASHAN, Y. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for the slow release of bacteria that affect plant growth. **Applied Environment Microbiology**, v. 51, p. 1089-1098, 1986.

BENUCCI, I.; LOMBARDELLI, C.; CACCIOTTI, I.; LIBURDI, K.; NANNI, F.; ESTI, M. Chitosan beads from microbial and animal sources as enzyme supports for wine application. **Food Hydrocolloids**, v.61, p.191-200, 2016.

BHATTARAI, N.; GUNN, J.; ZHANG, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 62, n. 1, p. 83-99, 2010.

BHUMKAR, D. R.; POKHARKAR, V. B. Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: a technical note. **Aaps Pharmscitech**, v. 7, n. 2, p. E138-E143, 2006.

BISINOTI, M. C.; FERREIRA, O. P.; MOREIRA, A. B.; FREGOLENTE, L. G. **Processo para a conversão da vinhaça em material sólido rico em carbono e nutrientes e água clarificada para reuso**. Brasil, 2017. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/148722>>. Acesso em: 03 jan 2018.

BODMEIER, R.; CHEN, H.; PAERATAKUL, O. A novel approach to the oral delivery of micro-or nanoparticles. **Pharmaceutical research**, v. 6, n. 5, p. 413-417, 1989.

BONINI, M. A. **Cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscopica* Nägeli e *Chlorella vulgaris* em diferentes fontes de carbono e em vinhaça**. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente) - Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2012.

BRACCINI, I.; PÉREZ, S. Molecular basis of Ca²⁺ Induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 4, p. 1089-1096, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento. **Decreto n. 86.955, de 18 de fevereiro de 1982**. 1982. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1980-1987/decreto-86955-18-fevereiro-1982-436919-publicacaooriginal-1-pe.html>>. Acesso em: 22 fev. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 25, DE 23 DE JULHO DE 2009**. Aprovar as normas sobre as especificações e as garantias, as tolerâncias, o registro, a embalagem e a rotulagem dos fertilizantes orgânicos simples, mistos, compostos, organominerais e biofertilizantes destinados à agricultura. Brasília, DF, 25 jul. 2009. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=recuperarTextoAtoTemáticaPortal&codigoTemática=1229186>. Acesso em: 04 mar. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº. 28, de 17 de julho de 2007**. Métodos analíticos oficiais para fertilizantes minerais, orgânicos, organo-minerais e corretivos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 31 jul. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **INSTRUÇÃO NORMATIVA SDA Nº 35, DE 4 DE JULHO DE 2006**. Aprovada as normas sobre especificações e garantias, tolerâncias, registro, embalagem e rotulagem dos corretivos de acidez, de alcalinidade e de sodicidade e dos condicionadores de solo, destinados à agricultura. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Seção 1, n 132. Brasília, DF, 14 jul. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes minerais, orgânicos, organominerais e corretivos**. Brasília: MAPA/ SDA/CGAL, 2014. 220 p.

BRASIL Ministério do Interior. Portaria nº 158, de 03 de novembro de 1980. [Mantém proibição de lançamento direto ou indireto de vinhoto em qualquer coleção hídrica]. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 6 nov. 1980a. Seção 1, p. 22250. Publicada também em: LEX: coletânea de legislação e jurisprudência: legislação federal e marginália, São Paulo, v. 44, p. 1981-83, out.- dez. 1980

CAMPOS, A.; MARTINS-FRANCHETTI, S. M.; MARCONATO, J. C.; AGNELLI, J. A. M.; MONTEIRO, M. R. Biodegradation of blend films in soil and soil with chorume. I. PVC/PCL. **Research Journal of Biotechnology**, p. 20-25, 2007.

CANTERI, M. H. G.; MORENO, L.; WOSIACKI, G.; SCHEER, A. P. Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros**, v. 22, n. 2, p. 149-157, 2012.

CARDOSO, S. M.; COIMBRA, M. A.; SILVA, J. A. L. Temperature dependence of the formation and melting of pectin-Ca²⁺ networks: a rheological study. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 801-807, 2003.

CLAESSEN, M.E.C. Manual de métodos de análise de solo. **Embrapa Solos-Documentos (INFOTECA-E)**, 1997. Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/169149/1/Manual-de-metodos-de-analise-de-solo-2-ed-1997.pdf> Acessado em: 20 dez 2018.

COIMBRA, P., FERREIRA, P., DE SOUSA, H. C., BATISTA, P., RODRIGUES, M. A., CORREIA, I. J., GIL, M. H. Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, n. 1, p. 112-118, 2011.

COMA, V.; MARTIAL-GROS, A.; GARREAU, S.; COPINET, A.; SALIN, F.; DESCHAMPS, A. Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 3, p.1162-1169, 2002.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB. **Norma Técnica P 4.231**: Vinhaça: critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. São Paulo, 2015. 15 p.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB. **Norma Técnica L6.350**: Solos – Determinação biodegradação de resíduos – Método respirométrico de Bartha, São Paulo, 1990.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**, v. 4 - Safra 2017/18, n. 4 - Quarto levantamento, Brasília, p. 1-77, abril. 2018

COPPENS, J.; GRUNERT, O.; VAN DEN HENDE, S.; VANHOUTTE, I.; BOON, N.; HAESAERT, G.; DE GELDER, L. 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.

CORRADINI, E.; DE MOURA, M. R.; MATTOSO, L. H. C. A preliminary study of the incorporation of NPK fertilizer into chitosan nanoparticles. **Express Polymer Letters**, v. 4, n. 8, p. 509-515, 2010.

CORBI, J.J.; STRIXINO, S.T.; SANTOS, A.; DEL GRANDE, M. Diagnóstico ambiental de metais e organoclorados em córregos adjacentes a áreas de cultivo de cana-de-açúcar (Estado de São Paulo, Brasil). **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 61-65, 2006.

CP KELCO. **Best choice guidelines for the consumer products industry**. 2012. Disponível em: < <https://www.cpkelco.com/wp-content/uploads/2012/08/FoodCatalog.pdf> >. Acesso em: 12 janeiro 2016.

CRUZ, C. et al. Fertilizantes Organominerais de Resíduo do Agronegócio: Avaliação do Potencial Econômico Brasileiro. **Industria Química/BNDES Setorial**, n. 45, p.137, 2017.

DA CRUZ, M.G.; GUERREIRO, E.; RAIHER, A.P. A evolução da produção de etanol no Brasil, no período de 1975 a 2009. **Revista Econômica do Nordeste**, v. 43, n. 4, p. 141-160, 2012.

DA GLORIA, N. A.; RODELLA, A. A. Inorganic quantitative analysis of sugarcane juice, vinasse and molasses: I. calcium, magnesium, potassium, sulfur and phosphorus determination in a single extract. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 29, p. 5-17, 1972.

DA SILVA, A. P.; BONO, J. A.; PEREIRA, F. D. A. Aplicação de vinhaça na cultura da cana-de-açúcar: Efeito no solo e na produtividade de colmos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi**, v. 18, n. 1, p.38-43, 2014.

DAVIS, R.; MARKHAM, J.; KINCHIN, C.; GRUNDL, N.; TAN, E.C.; HUMBIRD, D. **Process design and economics for the production of algal biomass: algal biomass production in open pond systems and processing through**

dewatering for downstream conversion. NREL (National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden, CO (United States)), 2016.

DE SOUZA, J. K. C., DE OLIVEIRA MESQUITA, F., NETO, J. D., DE SOUZA, M. M. A., DE AZEVEDO FARIAS, C. H., MENDES, H. C., & DE ANDRADE NUNES, R. M. Fertirrigação com vinhaça na produção de cana-de-açúcar. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 11, n. 2, p. 7-12, 2015.

Deliberação Normativa COPAM nº 164, de 30 de março de 2011. **Conselho Estadual de Política Ambiental**. Disponível em: <<http://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=16794>>. Acesso em: 07 jan. 2018

DERNER, R.B., OHSE, S., VILLELA, M., CARVALHO, S.M., FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n.6, p.1959-1967, 2006.

DE-BASHAN L.E.; BASHAN, Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1611–1627, 2010.

DE JESUS TORRES, H. S., CASSINI, S. T. A., & GONÇALVES, R. F. Isolamento, sobrevivência e caracterização da biomassa de microalgas cultivadas em efluente de tratamento de esgoto sanitário visando a produção de biocombustíveis. **IX Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental, Porto Alegre: ABES**, 2014.

DE MATTOS, L. F. A.; BASTOS, R. G. COD and nitrogen removal from sugarcane vinasse by heterotrophic green algae *Desmodesmus* sp. **Desalination and Water Treatment**, v. 57, n. 20, p. 9465-9473, 2016.

DE MEDINA, C.C.; BRINHOLI, O. Uso de resíduos agroindustriais nas produções de cana-de-açúcar, açúcar e álcool. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 33, n. 11, p. 1821-1825, 1998.

DIAS, V.P.; FERNANDES, E. Fertilizantes: uma visão global sintética. **BNDES Setorial**, n. 24, p. 97-138, 2006.

DOELSCH, E.; MASON, A.; CAZEVIEILLE, P.; CONDOM, N. Spectroscopic characterization of organic matter of a soil and vinasse mixture during aerobic or anaerobic incubation. **Waste Management**, v. 29, n. 6, p. 1929-1935, 2009.

DUYGU, D. Y.; UDOH, A. U.; OZER, T. B.; AKBULUT, A.; ERKAYA, I. A.; YILDIZ, K.; GULER, D. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identification of *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890 and *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing 1833. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 16, p. 3817-3824, 2012.

EINBU, A.; VÅRUM, K. M. Structure–property relationships in chitosan. In: TOMASIK, P. **Chemical and functional properties of food saccharides**. London: CRC Press, 2004.

ELIA NETO, A.; SHINTAKU, A.; DONZELLI, J.L. Processo agroindustrial. In: ANA – Agência Nacional de Águas; FIESP - Federação das Indústrias do Estado de São Paulo; ÚNICA - União da Indústria da Cana-de-Açúcar; CTC - Centro de Tecnologia Canavieira. **Manual de conservação e reuso de água na agroindústria sucroenergética**. Brasília: ANA, 2009.

ELIA NETO, A. Estado da Arte da Vinhaça. 2º Workshop Bioeconomia "Resíduos urbanos e agrícolas: energia, reciclagem de nutrientes e produção de fertilizantes", **IAC - Instituto Agrônomo de Campinas**. Campinas, agosto 2016. Disponível em: < www.unica.com.br/download.php?idSecao=17&id=35414851>. Acesso em: 02 jan. 2018.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Manual de métodos de análises do solo**. Rio de Janeiro: SNCLS, 212 p. 1997.

ESPAÑA-GAMBOA, E.; MIJANGOS-CORTES, J.; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J.; HERNÁNDEZ-ZARATE, G.; ALZATE-GAVIRIA,

L. Vinasses: characterization and treatments. **Waste Management and Research**, v. 29, n. 12, p. 1235–1250, 2011.

FANG, Y., AL-ASSAF, S., PHILLIPS, G. O., NISHINARI, K., FUNAMI, T., WILLIAMS, P. A. Binding behavior of calcium to polyuronates: comparison of pectin with alginate. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, p. 334-341, 2008.

FERNANDEZ-PEREZ, M.; GARRIDO-HERRERA, F.J.; GONZÁLEZ-PRADAS, E.; VILLAFRANCA-SÁNCHEZ, M.; FLORES-CÉSPEDES, F. (). Lignin and ethylcellulose as polymers in controlled release formulations of urea. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 108, n. 6, p. 3796-3803, 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **FAO statistical yearbook**: world food and agriculture. Rome, 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e00.htm>>. Acesso em: 22 fev. 2016.

FREIRE, W.J., CORTEZ, L.A.B. **Vinhaça de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Agropecuária, 203 p. 2000.

FUESS L.T.; RODRIGUES I.J.; GARCIA M.L. Fertirrigation with sugarcane vinasse: Foreseeing potential impacts on soil and water resources through vinasse characterization, **Journal of Environmental Science and Health**, Part. A, v. 52, n. 11, p. 1063-1072, 2017.

FLUTTO L. **PECTIN - Properties and Determination**, In **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition** (Second Edition), edited by Benjamin Caballero. Academic Press, Oxford, p. 4440-4449, 2003.

GANDRA, A. **Brasil pode aumentar dependência de importação de fertilizantes, diz Embrapa**. EBC Agência Brasil. 14 out. 2014. Disponível em: <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/pesquisa-e-inovacao/noticia/2014-10/reducao-da-importacao-de-fertilizantes-requer-novos>>. Acesso em: 23 jan. 2018.

- GARCIA, M. A.; PINOTTI, A.; MARTINO, M. N.; ZARITZKY, N. E. Characterization of composite hydrocolloid films. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 3, p. 339-345, 2004.
- GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V.; PAKNIKAR, K. M. Perspectives for nanobiotechnology enabled protection and nutrition of plants. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 792–803, 2011.
- GIRI, T. K.; THAKUR, A.; ALEXANDER, A.; BADWAIK, H.; & TRIPATHI, D. K. Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: present status and applications. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 2, n. 5, p. 439-449, 2012.
- GOLÇALVES, J. S.; FERREIRA, C. R. R. P. T.; SOUZA, S. A. M. Produção nacional de fertilizantes, processo de desconcentração regional e maior dependência externa. **Informações Econômicas**, v. 38, n. 8, 2008
- GOMES, M.T.M.; EÇA, K.S.; VIOTTO, L.A. Concentração da vinhaça por microfiltração seguida de nanofiltração. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 6, p. 633-638, 2011.
- GONSALVES, A. A.; ARAÚJO, C. R. M.; SOARES, N. A.; GOULART, M. O. F.; ABREU, F. C. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215-1223, 2011.
- HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE, G.M.; DAMQUAH, M.K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 1037–1047, 2010.
- HELBEL, A. F.; ANDRADE, L. R. **Caracterização e tratamento de efluentes gerados por destilaria de álcool**. Ji-Paraná: Unir, 21 p. 2009.

- HIORTH, M.; THO, I.; SANDE, S.A. The formation and permeability of drugs across free pectin and chitosan films prepared by a spraying method. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 175-182, 2003.
- HODAIFA, G.; MARTÍNEZ, M. E.; ÓRPEZ, R.; SÁNCHEZ, S. Inhibitory effects of industrial olive oil mill wastewater on biomass production of *Scenedesmus obliquus*. **Ecological Engineering**, v. 42, p. 30-34, 2012.
- HOURDET, D.; MULLER, G. Solution properties of pectin polysaccharides III, Molecular size of heterogeneous pectin chains. Calibration and application of SEC to pectin analysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 16, n. 4, p. 409, 1991.
- HU, B.; PAN, C.; SUN, Y.; HOU, Z.; YE, H.; HU, B.; ZENG, X. Optimization of fabrication parameters to produce chitosan–tripolyphosphate nanoparticles for delivery of tea catechins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 16, p. 7451-7458, 2008.
- IBRAHIM, S.; NAWWAR; G.A.M.; SULTAN, M. Development of bio-based polymeric hydrogel: green, sustainable and low cost plant fertilizer packaging material. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 1, p. 203–210, 2016.
- IRISSIN-MANGATA, J.; BAUDUIN, G.; BOUTEVIN, B.; GONTARD, N. New plasticizers for wheat gluten films. **European Polymer Journal**, v. 37, p. 1533-1541, 2001.
- IVANOVA E.; TEUNOU E.; PONCELET D. Alginate based macrocapsules as inoculants carriers for production of nitrogen biofertilizers. In: BALKAN SCIENTIFIC CONFERENCE OF BIOLOGY, 2005, Plovdiv. **Proceedings of...** Plovdiv: University of Plovdiv, 2005. p. 90–108.
- JANEGITZ, B. C.; LOURENÇÃO, B. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um método empregando quitosana para remoção de íons metálicos de águas residuárias. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 879, 2007.

- JESUS, G.C. Desenvolvimento de matrizes poliméricas de alginato e pectina para o cultivo de células imobilizadas de *desmodesmus subspicatus* em vinhaça de cana-de-açúcar. Dissertação (mestrado), Universidade Federal de São Carlos, Araras. 2018. 81p.
- KAEWPIROM, S.; BOONSANG, S. Electrical response characterisation of poly (ethylene glycol) macromer (PEGM)/chitosan hydrogels in NaCl solution. **European Polymer Journal**, v. 42, p. 1609-1616, 2006.
- KASHYAP, P.L.; XIANG, X.; HEIDEN, P. Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 36–51, 2015.
- KIM, I. Y.; PUSEY, P. L.; ZHAO, Y.; KORBAN, S. S.; CHOI, H.; KIM, K. K. Controlled release of Pantoea agglomerans E325 for biocontrol of fire blight disease of apple. **Journal of Controlled Release**, v. 161, p. 109-15, 2012.
- KROCHTA, J. M.; DE MULDER-JOHNSTON, C. Edible and biodegradable polymer films: challenges and opportunities. **Food Technology**, v. 51, n. 2, p. 61–74, 1997.
- KUMAR, K. S.; DAHMS, H. U.; WON, E. J.; LEE, J. S.; SHIN, K. H. Microalgae—A promising tool for heavy metal remediation. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 113, p. 329-352, 2015.
- LARROSA, A. P. Q.; CAMARA, A. S.; MOURA, J. M.; PINTO, L. A. A. Spirulina sp. biomass dried/disrupted by different methods and their application in biofilms production. **Food Science and Biotechnology**, p. 1-7, 2018.
- LAZARIDOU, A.; BILIADERIS, C. G. Thermophysical properties of chitosan, chitosan-starch and chitosan-pullulan films near the glass transition. **Carbohydrate Polymers**, v. 48, p. 179-190, 2002.

- LI, X.; HONG-YING, H.; KE, G.; YING-XUE, S. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.* **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5494–5500, 2010.
- LIANG, R.; LIU, M.; WU, L. Controlled release NPK compound fertilizer with the function of water retention. **Reactive and Functional Polymers**, v. 67, n. 9, p. 769–779, 2007.
- LIU, L.; MARSHALL, L. F.; HICKS, K. B. Pectin in controlled drug delivery: a review. **Cellulose**, v. 4, p. 15-24, 2007.
- LIU, X. D.; YU, W. Y.; ZHANG, Y.; XUE, W. M.; YU, W. T.; XIONG, Y.; MA, X.J.; CHEN, Y.; YUAN, Q. Characterization of structure and diffusion behaviour of Ca-alginate beads prepared with external or internal calcium sources. **Journal of microencapsulation**, v. 19, n. 6, p. 775-782, 2002.
- LOFRANO, R.C.Z.; LIMA, F.A.; SANTOS JUNIOR, A.C.; MARTINS, L.C.; SARROUH, B. Revisão sobre a toxicidade e impactos ambientais relacionados à vinhaça, efluente da indústria sucroalcooleira. **Cadernos UniFOA**, n. 32, p. 27-34, 2016.
- LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; PÉREZ-MATEOS, M.; MONTERO, P. A chitosan–gelatin blend as a coating for fish patties. **Food Hydrocolloids**, v. 19, p. 303-311, 2005.
- LUO, Y.; ZHANG, B.; CHENG, W. H.; WANG, Q. Preparation, characterization and evaluation of selenite-loaded chitosan/TPP nanoparticles with or without zein coating. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 942-951, 2010.
- LÜRLING, M. Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. **Annales De Limnologie - International Journal of Limnology**, v. 39, n. 2, p. 85-101, 2003.

- MACIEL, V. B. V.; YOSHIDA, C. M.; FRANCO, T. T. Chitosan/pectin polyelectrolyte complex as a pH indicator. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 537-545, 2015.
- MARINHO, F. B.; DA SILVA, H. S. N.; GAIA, C. L. B.; GAIA, J. A. S.; BRASILINO, T.; FURTADO, G. D. Resíduo da agroindústria sucroalcooleira – vinhaça. **Educação Ambiental em Ação**, v. 58, n. XV, 2017.
- MARTINEZ, M. E.; SÁNCHEZ, S.; JIMÉNEZ, J. M.; YOUSFI, F. E.; MUÑOZ, L. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource Technology**, v. 73, p. 263-272, 2000.
- MARUDOVA, M.; MACDOUGALL, A. J.; RING, S. G. Pectin–chitosan interactions and gel formation. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 1933-1939, 2004.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO N. S. Microalgae for biodiesel production and others applications: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 217-232, 2010.
- MAY, C.D. Pectins. In: Imeson A.P. (eds) **Thickening and Gelling Agents for Food**. Springer, Boston, MA, 1997.
- MENDONÇA, T. G.; URBANO, V. R.; PERES, J. G.; SOUZA, C. F. Hydrogel as an alternative to increase water storage capacity of soil. **Water Resources and Irrigation Management**, v. 2, p. 87-92, 2013.
- MI, F. L.; SUNG, H. W.; SHYU, S. S.; SU, C. C.; PENG, C. K. Synthesis and characterization of biodegradable TPP/genipin co-crosslinked chitosan gel beads. **Polymer**, v. 44, n. 21, p. 6521-6530, 2003.
- MIKKELSEN, R. L. Using hydrophilic polymers to control nutrient release. **Fertilizer Research**, v. 38, p. 53-59, 1994.

- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2ª ed., Lavras: Editora UFLA, 2006, p. 729.
- MOURA, C. et al. Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: avaliação do processo em escala piloto. **Vetor**, v. 16, n. 1-2, p. 37–45, 2006.
- MURATA, Y. et al. Drug release properties of a gel bead prepared with pectin and hydrolysate. **Journal of Controlled Release**, v. 95, n. 1, p. 61–6, 2004.
- NAVARRO, A.R.; SEPÚLVEDA, M. Del C.; RUBIO, M.C. Bio-concentration of vinasse from the alcoholic fermentation of sugar cane molasses. **Waste Management**, v. 20, p. 581-585, 2000.
- NAKASATO, D. Y.; PEREIRA, A. E. S.; OLIVEIRA, J. L.; OLIVEIRA, H. C.; FRACETO, L. F. Evaluation of the effects of polymeric chitosan/tripolyphosphate and solid lipid nanoparticles on germination of Zea mays, Brassica rapa and Pisum sativum. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.142, p.369–374, 2017.
- NAZ, M. Y.; SULAIMAN, S. A. Slow release coating remedy for nitrogen loss from conventional urea: a review. **Journal of Controlled Release**, v. 225, p. 109-120, 2016.
- NI, B.; LIU, M.; LÜ, S. Multifunctional slow-release urea fertilizer from ethylcellulose and superabsorbent coated formulations. **Chemical Engineering Journal**, v. 155, n. 3, p. 892-898, 2009.
- MEURER, E.J. Fatores que influenciam o crescimento e o desenvolvimento das plantas. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., H.V., BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B. & NEVES, J.C.L., eds. **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, p. 65-90. 2007.

- NEVES, M. C. P.; LIMA, I. T.; DOBEREINER, J. Efeito da vinhaça sobre a microflora do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 7, n. 2, p. 131-136, 1983.
- ORLANDO FILHO, J.; ZAMBELLO, JR. E.; AGUJARO, R.; ROSSETTO, A.J. Efeito da aplicação prolongada da vinhaça nas propriedades químicas dos solos com cana-de-açúcar. Estudo Exploratório, **STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.1, n. 6, p. 28-33, 1983.
- PASQUET, V., CHÉROUVRIER, J-R., FARHAT, F., THIÉRY, V., PIOT, J-M., BÉRARD, J-B., KAAS, R., SERIVE, B., PATRICE, T., CADORET, J-P., PICOT, L. Study on the microalgal pigments extraction process: Performance of microwave assisted extraction, **Process Biochemistry**, v. 46, p. 59-67, 2011.
- PARK, S. Y.; LEE, B. I.; JUNG, S. T.; PARK, H. J. Biopolymer composite films based on karrageenan and chitosan. **Materials Research Bulletin**, v. 36, p. 511-519, 2001.
- PEROTTI, G.F.; KIJCHAVENGKUL, T.; AURAS, R.A.; CONSTANTINO, V.R. L. Nanocomposites Based on Cassava Starch and Chitosan-Modified Clay: Physico-Mechanical Properties and Biodegradability in Simulated Compost Soil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 4, p. 649-658, 2017.
- PRATHIMA DEVI, M.; VENKATA SUBHASH, G.; VENKATA MOHAN, S. Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: effect of nutrient supplementation. **Renewable Energy**, v. 43, p. 276-283, 2012.
- PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 635–648, 2004.
- PUOCI, F.; IEMMA, F.; SPIZZIRRI, U.G.; CIRILLO, G.; CURCIO, M; PICCI, N. Polymer in Agriculture: a Review. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v.3, n.1, p. 299-314, 2008.

- RAIJ, B. van; ANDRADE, J. C., CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: IAC, 2001, 285 p.
- RAYMENT, P.; BUTLER, M. F. Investigation of ionically crosslinked chitosan and chitosan–bovine serum albumin beads for novel gastrointestinal functionality. **Journal of applied polymer science**, v. 108, n. 5, p. 2876-2885, 2008.
- REIS, T. C.; RODELLA, A. A. Cinética de degradação da matéria orgânica e variação do pH do solo sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, n. 3, 2002.
- 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.
- RINAUDO, M.; PAVLOV, G.; DESBRIERES, J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. **Polymer**, v. 40, n. 25, p. 7029-7032, 1999.
- RODELLA, A. A. Métodos de análise de solo, tecido vegetal, vinhaça e torta de filtro. In: ORLANDO FILHO, J. (Coord.). **Nutrição e adubação de cana-de-açúcar no Brasil**. Piracicaba: IAA/PLANALSUCAR, 1983. p.351-368
- ROSSI, R. A. **Seleção de microalgas dos gêneros Desmodesmus e Scenedesmus produtoras de lipídeos: otimização do cultivo e aplicação do efluente doméstico de reator UASB como substrato alternativo à produção de biodiesel**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- RUGNINI, L.; COSTA, G.; CONGESTRI, R.; BRUNO, L. Testing of two different strains of green microalgae for Cu and Ni removal from aqueous media. **Science of The Total Environment**, v. 601, p. 959-967, 2017.

RUI, L.; MINGZHU, L.; LAN, W. Controlled release NPK compound fertilizer with the function of water retention. **Reactive and Functional Polymers**, v.67, p.769-779, 2007.

RUTIAGA, M. O. et al. Mechanical property and biodegradability of cast films prepared from blends of oppositely charged biopolymers. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 13, n. 2, p. 185-191, 2005.

SARTORI, S. B. **Atividade enzimática e valores nutricionais de Pleurotus spp. cultivados em vinhaça**. 2011. 109 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

SHAH, S.; PAL, A.; KAUSHIK, V. K.; DEVI, S. Preparation and characterization of venlafaxine hydrochloride-loaded chitosan nanoparticles and in vitro release of drug. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 112, n. 5, p. 2876-2887, 2009.

SHU, X. Z., ZHU, K. J. Controlled drug release properties of ionically cross-linked chitosan beads: the influence of anion structure. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 233, n. 1-2, p. 217-225, 2002.

SHU, X. Z.; ZHU, K. J.; SONG, W. Novel pH-sensitive citrate cross-linked chitosan film for drug controlled release. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 212, p. 19-28, 2001.

SOARES, M. R.; CASAGRANDE, J. C.; NICOLOSO, R. S. Uso da vinhaça da cana-de-açúcar como fertilizante: eficiência agrônômica e impactos ambientais. In: PALHARES, J. C. P.; GEBLER, L. (Ed.). **Gestão ambiental na agropecuária**. Brasília: EMBRAPA, cap. 4. p. 145-198, 2014.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

SRIAMORNSAK, P.; NUNTHANID, J. Calcium pectinate gel beads for controlled release drug delivery I. Preparation and in vitro release studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 160, n. 2, p. 207–212, 1998.

SUDHAKAR, K.; PREMALATHA, M. Characterization of micro algal biomass through FTIR/TGA/CHN analysis: application to *Scenedesmus* sp. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, v. 37, n. 21, p. 2330-2337, 2015.

SUGANYA, T.; VARMAN, M.; MASJUKI, H. H.; RENGANATHAN, 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.

SUN, P.; LI, P.; LI, Y. M.; WEI, Q.; TIAN, L. H. A pH-sensitive chitosan-tripolyphosphate hydrogel beads for controlled glipizide delivery. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 97, n. 1, p. 175-183, 2011.

SZYMANSKA-CHARGOT, M.; ZDUNEK, A. Use of FT-IR spectra and PCA to the bulk characterization of cell wall residues of fruits and vegetables along a fraction process. **Food Biophysics**, v. 8, n. 1, p. 29-42, 2013.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science and Technology**, v. 14, n. 3, p. 71-78, 2003.

Trani P. E. & Trani A.L. **Fertilizantes: Cálculo de fórmulas comerciais**. Boletim Técnico IAC, 208 – Série Tecnologia APTA, Campinas: IAC. 29 p. 2011.

TOMLINSON, I. Doubling food production to feed the 9 billion: a critical perspective on a key discourse of food security in the UK. **Journal of Rural Studies**, v. 29, p. 81–90, 2011.

- TOMOVIĆ, N. S.; TRIFKOVIĆ, K. T.; RAKIN, M. P.; RAKIN, M. B.; BUGARSKI, B. M. Influence of compression speed and deformation percentage on mechanical properties of calcium alginate particles. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, v. 21, n. 3, p. 411-417, 2015.
- VOLTOLINA, D.; CORDERO, B.; NIEVES, M.; SOTO, L.P. Growth of *Scenedesmus* sp in artificial wastewater. **Bioresource Technology**, v. 68, p. 265-268, 1999.
- VOLTOLINA, D.; GÓMEZ-VILLA, H.; CORREA, G. Nitrogen removal and recycling by *Scenedesmus obliquus* in semicontinuous cultures using artificial wastewater and a simulated light and temperature cycle, **Bioresource Technology**, v. 96, p. 359-362. 2005.
- WALKENSTRÖM, P.; KIDMAN, S.; HERMANSSON, A. M.; RASMUSSEN, P. B.; HOEGH, L. Microstructure and rheological behaviour of alginate/pectin mixed gels. **Food Hydrocolloids**, v. 17, n. 5, p. 593–603, 2003.
- WILLATS, W. G. T., KNOX, J. P., MIKKELSEN, J. D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends in Food Science and Technology**, v. 7, p. 97-104, 2006.
- WINSLOW, F. H. **Production of polymer spheres**. U.S. Patent n. 2,712,536, 5 jul. 1955.
- Wu, Y., Yang, W., Wang, C., Hu, J., & Fu, S. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. **International journal of pharmaceuticals**, v.295, n. 1-2, p. 235-245. 2005.
- XU, Y.; DU, Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. **International Journal of Pharmaceuticals**, v. 250, n. 1, p. 215-226, 2003.

YAO, K. D.; LIU, J.; CHENG, G. X.; LU, X. D.; TU, H. L.; SILVA, J. A. L. D. Swelling behavior of pectin/chitosan complex films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 60, p. 279-283, 1996.

ZHANG, E.; WANG, B.; WANG, Q. ZHANG, S.; ZHAO, B. Ammonia-nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Scenedesmus* sp. isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3787-3793, 2008.

ZHONG, K. et al. Starch derivative-based superabsorbent with integration of waterretaining and controlled-release fertilizers. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1367–76, 2013.

ZERAATKAR, A. K.; AHMADZADEH, H.; TALEBI; A. F., MOHEIMANI, N. R.; MCHENRY, M. P. Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review. **Journal of environmental management**, v. 181, p. 817-831, 2016.