

Microrganismos fotossintetizantes produtores de polihidroxicanoatos: Produção, extração, biossíntese e aplicação alternativa em embalagens ativas incorporadas com óleos essenciais

 <https://doi.org/10.56238/sevned2024.008-001>

Pábulo Eugênio da Costa e Silva

Doutor em Biologia Aplicada à Saúde
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE),
Brazil

Anderson José Paulo

Doutor em Ciências Biológicas
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do
Amazonas (IFAM), Brazil

Edmilson Clarindo de Siqueira

Doutor em Biologia Celular e Molecular Aplicada
Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de
Pernambuco (IFPE), Brazil

Aline de Andrade Alves

Doutora em Ciências de Materiais

Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
(CETENE), Brasil

Maria Paloma Silva de Barros

Doutora em Genética
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
(CETENE), Brasil

Raquel Pedrosa Bezerra

Doutora em Ciências
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE),
Brazil

Ana Lúcia Figueiredo Porto

Doutora em Engenharia Química
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE),
Brazil

RESUMO

Os biopolímeros possuem uma vasta aplicabilidade, além de serem fontes biodegradáveis e apresentarem ciclos de vida relativamente menores quando comparados com as fontes de energia fósseis. Alguns desses biopolímeros são os polihidroxicanoatos (PHAs), uma classe de polímeros com a capacidade de formar membranas plásticas, semelhantes aos plásticos petroquímicos. Vários estudos sugerem que as microalgas/cianobactérias são um tipo de microrganismos fotossintetizantes que podem ser usados para obter PHAs a um custo mais baixo, porque eles têm requisitos mínimos nutricionais para o crescimento e são fotoautotróficos por natureza, ou seja, usam luz e CO₂ como suas principais fontes de energia, além do mais, as microalgas possuem potencial para alta produtividade, são tolerantes as mudanças das condições ambientais e podem ser cultivadas em áreas que não são adequadas para a agricultura. Essas membranas plásticas de PHAs produzidas por esses microrganismos fotossintetizante podem ser a alternativa para construção de uma película funcional com grandes características antimicrobianas, quando incorporadas com óleos essenciais, as famosas embalagens ativas, o futuro das indústrias de embalagens. Esse trabalho mostra a produção, extração, biossíntese e perspectiva de aplicação desses biopolímeros nas indústrias de embalagens, como películas incorporadas com óleos essenciais.

Palavras-chave: Microalga, Cianobactéria, Bioplástico, Biopolímero, Polihidroxicanoato, Óleos essenciais.

1 INTRODUÇÃO

Os polímeros possuem uma diversidade de aplicações, o que os tornam uma ferramenta necessária na sociedade. Barateando os custos de produção, minimizando o consumo de energia e poluição ambiental, como também reduzindo a geração de gases prejudiciais ao meio ambiente. Além de apresentarem uma multiusualidade, com propriedades protetoras e conservantes (elétricas, acústicas e térmicas) (Jamnongkan et al., 2022; Rosenboom et al., 2022). Segundo Wu et al. (2017), alguns polímeros possuem a capacidade de formar filmes e películas muito finas o que são atrativas na produção e aplicação em embalagens de alimentos.

Esses polímeros, denominados polihidroxialcanoatos (PHAs), são uma classe de poliésteres que podem ser produzidos por uma diversidade de microrganismos, inclusive microrganismos fotossintetizantes (Silva and Houllou, 2022), como fontes alternativas, ecológica, importante e sustentável de monômeros para a produção de bioplásticos (Coppola et al., 2021; Nandal et al., 2022). A biossíntese desses bioplásticos geralmente são realizadas sob condições limitantes de nutrientes, como o nitrogênio, fósforo, enxofre e excesso de carbono. Contudo, o mais interessante é que sob condições aeróbicas, diversos microrganismos podem degradar essas películas de PHAs e gerar dióxido de carbono e água, enquanto que sob condições anaeróbicas podem gerar metano e água (Surendran et al., 2020).

Na biossíntese dos PHAs as principais enzimas envolvidas são as PHAs sintase (phaC) e são divididas em classes de genes I, II, III e IV. As enzimas da classe II são responsáveis pela síntese de Mcl-PHA (comprimento de cadeia médio), enquanto o restante (I, III e IV) sintetiza Scl-PHA (comprimento de cadeia curta) (Jia et al., 2016). O rendimento de PHAs em microrganismos fotossintetizantes podem variar entre 1,0-70% (p/p) e as principais ferramentas para obtenção do polímero atualmente ainda são o uso de hipoclorito de sódio/clorofórmio/metanol (García et al., 2021; Panda et al., 2005; Sharma and Mallick, 2005; Bhati and Mallick, 2015; Ansari and Fatma, 2016). No entanto, a perspectiva de aplicação desses polímeros na formação de películas de PHA incorporadas com óleos essenciais (OE) para formação de embalagens ativas (EA) são uma grande inovação na indústria de embalagens (Giaquinto et al., 2017).

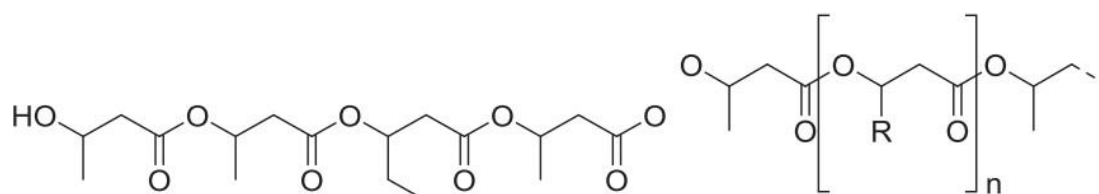
A proposta deste trabalho é demonstrar que os microrganismos fotossintetizantes podem ser uma ferramenta de baixo custo e promissora na produção de polihidroxialcanoatos, mostrando métodos de extração, biossíntese do polímero e perspectivas futuras de aplicação desses PHAs na formação de películas finas incorporadas com óleos essenciais, as famosas embalagens ativas, o futuro da indústria de embalagens.

2 POLIHIDROXIALCANOATO (PHA)

As grandes quantidades de plásticos não degradáveis estão entre os principais problemas globais conhecidos atualmente. Biopolímeros biodegradáveis produzidos por microrganismos são substitutos potenciais para os plásticos de origem petroquímica (Amadu et al., 2021). Os polihidroxicanoatos (PHAs) são uma classe de ésteres naturais secretados por microrganismos como grânulos intracelulares sob condições limitantes de nitrogênio, juntamente com excesso de fonte de carbono. Esta classe de ésteres naturais apresenta alta variabilidade por abranger mais de 150 tipos de monômeros e pesar até 100.000 Da (Dalton). O polímero permanece amorfo dentro das células devido à sua estabilidade contribuída pelos fosfolipídios enquanto se apresenta cristalino após a extração. Sua composição foi enunciada por Lemoigne em 1925, embora Beijerinck tenha relatado sua ocorrência em 1888 (De Koning, 1993; Pal et al., 1999).

A estrutura básica dos PHAs contém unidades repetidas de poliésteres alifáticos (Figura 1) variando de 600 a 35.000 (Albuquerque e Malafaia, 2018). PHA com $n=1$ representa uma classe de poli(3-hidroxicanoatos) enquanto $n=2$ representa poli(4-hidroxicanoatos). O tipo de derivado ligado à cadeia lateral (R) da unidade determina a funcionalidade do monômero. Dependendo do número de átomos de carbono em uma unidade monomérica da cadeia, os PHAs são classificados em três tipos: monômeros de cadeia curta (3 a 5 átomos de carbono), monômeros de cadeia média (6 a 15 átomos de carbono) e monômeros de cadeia longa (mais de 15). O tipo de PHA produzido depende das vias bioquímicas inerentemente (ou geneticamente modificadas) presentes nos microrganismos (Arumugam, 2020).

Figura 1 - Unidades repetidas do monômero de Polihidroxicanoatos.



Fonte: Reproduzido de Koller et al., 2017.

2.1 MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES PRODUTORES DE PHA

Diversos microrganismos fotossintetizantes são produtores de PHAs, no entanto, diversas técnicas de modelagem no meio de cultivo são aplicadas para o acúmulo desse biopolímero no interior das células, dentre os quais podemos destacar a redução dos níveis de nitrogênio, fósforo, ferro e o aumento da demanda de fonte de carbono. Costa et al. (2018A) avaliando a produção de PHA a partir a microalga *Chlorella minutissima* e as cianobactérias *Synechococcus subsalsus* e *Spirulina* sp. LEB-18, em meios padrões utilizando apenas sais e com 70% de limitação da fonte inorgânica de nitrogênio (NANO_3), verificou que *C. minutissima* não apresentou produção do biopolímero, no entanto, as

cianobactérias conseguiram produzir o PHA, e com maior intensidade quando a fonte de nitrogênio era limitada. Os resultados mostram que a redução de nitrogênio ocasiona mudanças notáveis na composição bioquímica das células, degradando proteínas e pigmentos fotossintéticos, mas pode favorecer o acúmulo de outras biomoléculas como lipídios e polihidroxialcanoatos. Costa et al. (2018B) também verificou que a cianobactéria *Spirulina* sp. LEB-18 em cultivo aberto do tipo raceway utilizando o meio Zarrouk também foi capaz de produzir PHA. Já Roja et al. (2019) também conseguiram produzir PHA em quatro diferentes microrganismos fotossintetizantes: (i) *Chlorella* sp., (ii) *Oscillatoria salina*, (iii) *Leptolyngbya valderiana* e (iv) *Synechococcus elongatus*. García et al. (2021) avaliou a produção de PHA da microalga *Scenedesmus* sp. sob condições de deficiência de nutrientes. Dezesesseis tipos diferentes de meios de cultura modificados foram preparados variando as concentrações de nitrogênio, fósforo, ferro, salinidade e fonte de carbono adicionada (glicose). Todos os meios produziram o biopolímero, com destaque para o meio de cultura composto por: glicose (1 g L⁻¹), nitrogênio (17,6 mM), fósforo (0 mM), ferro (0,021 mM) e salinidade (0,5 g L⁻¹). A tabela 1 mostra a produção de PHA a partir de diversos microrganismos fotossintetizantes. Mourão et al. (2020) também verificaram a produção de PHA a partir da microalga *Stigeoclonium* sp. B23 em meio BG-11 suplementado com acetato de sódio e bicarbonato de sódio como fonte e carbono, ou com deficiência de carbono/nitrogênio. Silva e Houllou (2022) também conseguiram obter a produção de PHA utilizando as microalgas *Chlorella vulgaris* e *Tetrademus obliquus* utilizando meio Bold's Basal suplementado com resíduo agroindustrial milhocina.

Tabela 1 - Rendimento de PHA em diferentes tipos de algas

Alga	Rendimento (%)	Referências
<i>Anabaena</i> sp.	2,3%	Lama et al., (1996)
<i>Arthrospira subsalsa</i>	14,7%	Shrivastav et al., (2010)
<i>Aulosira fertilissima</i>	10%	Samantaray and Mallick (2012)
<i>Botryococcus braunii</i>	16,4%	Kavitha et al. (2016)
<i>Calothrix scytonemicola</i> TISTR 8095	25,2%	Kaewbai-ngam et al., (2016)
<i>Calothrix</i> sp.	6,4%	Bhati et al., (2010)
Microalgae consortium	31%	Rahman et al. (2015)
<i>Nostoc muscorum</i>	8,7 - 69%	(Panda et al., 2005; Sharma and Mallick, 2005; Bhati and Mallick, 2015; Ansari and Fatma, 2016)
<i>Oscillatoria jatorvensis</i> TISTR 8980	15,7%	Kaewbai-ngam et al., (2016)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	10,06%	Hempel et al. (2011)
<i>Phormidium</i> sp. TISTR 8462	14,8%	Kaewbai-ngam et al., (2016)
<i>Scenedesmus</i> sp.	0,831 – 29,92%	García et al. (2021)
<i>Scytonema</i> sp.	7,4%	Bhati et al., (2010)
<i>Spirulina</i> sp. LEB-18	12 – 30,7%	(Costa et al., 2018A; Coelho et al., 2015)
<i>Synechococcus elongates</i>	7,02 – 17,15%	Mendhulkar and Shetye (2017)
<i>Synechococcus</i> MA19	55%	Nishioka et al., (2001)
<i>Synechococcus subsalsus</i>	16%	Costa et al. (2018C)
<i>Synechocystis</i> PCC6803	4,1 – 26%	(Khetkorn et al., 2016; Panda and Mallick, 2007; Wu et al., 2001)
<i>Synechocystis salina</i>	5,5 – 6,6%	Kovalcik et al. (2017)
<i>Chlorella sorokiniana</i> SVMIICT8	29,5%	Kumari et al. (2022)

Fonte: Autor.

3 MÉTODOS PARA EXTRAÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DE MICRORGANISMOS FOTOSSINTETIZANTES

Diversos métodos de extração são aplicados para obtenção dos polímeros de PHA. Costa et al. (2018) obtém o biopolímero a partir de uma extração utilizando hipoclorito de sódio a uma concentração final de 4%, a amostra é então incubada a 45 °C durante 20 minutos, seguido de centrifugação, extração do polímero utilizando clorofórmio e seguido por precipitação com metanol. Já Roja et al. (2019) utiliza o mesmo método de extração citado anteriormente para extração do polímero a partir de quatro espécies de algas, modificando apenas o tempo de extração (30 minutos). Por sua vez, Silva e Houllou (2022) obtiveram dois extratos a partir de duas microalgas utilizando uma extração simultânea com hipoclorito 4% + clorofórmio, seguido por centrifugação, coleta da fase orgânica, evaporação e desengorduramento com hexano. Nos estudos de García et al. (2021) foi realizado primeiramente uma lavagem da biomassa seca, com água destilada e etanol, em seguida o pellet centrifugado é subjugado a extração polimérica com clorofórmio, e a solução é passada em filtro de fibra de vidro (0,45µm) e o clorofórmio é então evaporado em rotoevaporador, obtendo ao final o polímero. Kovalcik et al. (2017) obtiveram o biopolímero a partir da cianobactéria *Synechocystis salina* primeiramente utilizando um banho ultrassônico da biomassa em etanol e acetona, para extração dos

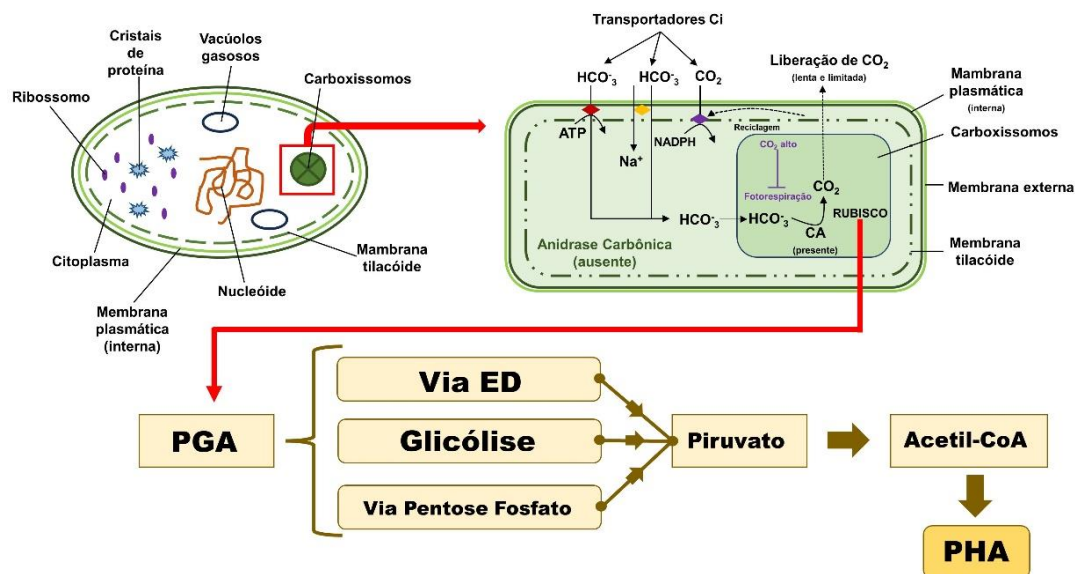
pigmentos. Em seguida, o PHA foi recuperado por extração Soxhlet utilizando clorofórmio quente, e posteriormente precipitado com etanol gelado. Por fim, Morais et al. (2015B) avaliaram três métodos de extração: i) hipoclorito de sódio 4%; ii) triclorometano e precipitação com metanol; iii) triclorometano com pré-tratamento com hipoclorito 4%. Em geral, as extrações de polihidroxialcanoatos a partir de microrganismos fotossintetizantes são realizadas com hipoclorito de sódio, clorofórmio e precipitação com metanol.

3.1 BIOSÍNTESE DE POLIHIDROXIALCANOATOS

Os microrganismos fotossintetizantes são organismos fotoautotróficos produtores de biomassa primária. Esses microrganismos apresentam a capacidade de utilizar nutrientes inorgânicos mínimos (CO_2) e prontamente disponíveis, assim como luz solar e água, demonstrando uma alta eficiência fotossintética, o que lhe conferem o título de "fábrica microbiana", podendo gerar diversos produtos de interesse industrial (Rahman et al., 2013, 2014; Singh e Mallick, 2017), como por exemplo, o PHA. Diversos estudos sugerem que os microrganismos fotossintetizantes produzem vários materiais básicos que podem gerar biofilmes plásticos. O poli-3-hidroxitirato (PHB) é um tipo de PHA que pode ser amplamente produzido por microalgas e cianobactérias, possuem uma ampla aplicação e pode ser uma alternativa sustentável para indústria plástica, por se tratar de um polímero bioderivado e biodegradável (Costa et al., 2019; Mendhulkar and Shetye 2017; Abdo and Ali 2019).

Sob condições autotróficas, as cianobactérias fixam a fonte de carbono no ciclo Calvin-Benson-Bassham (CBB) através da ribulose-1, 5-bifosfato carboxilase/oxigenase (RuBisCO). RuBisCO é responsável pela assimilação da maior parte do carbono disponível na Terra, devido à sua alta eficiência na captura de CO_2 . Transportadores inorgânicos de carbono (Ci) presentes na parede celular de microrganismos fotossintéticos transportam CO_2 atmosférico e ajudam a manter a concentração local de carbono para RuBisCO. A saída do ciclo de Calvin, gliceraldeído-3-fosfato após sua conversão em 3-fosfoglicerato (PGA), pode então entrar em qualquer uma das três vias para o metabolismo do açúcar, ou seja, via Entner-Doudoroff (ED), glicólise, via pentose fosfato e ser finalmente convertido em acetil-CoA para ser usado na via sintética do PHA (Singh e Mallick, 2017; Figura 2).

Figura 2 - Conversão de PHA a partir do acúmulo de carbono e fixação de CO₂ em cianobactérias



Fonte: adaptado de Afreen et al. 2021.

4 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais (OEs) consistem em metabólitos secundários que podem proteger plantas contra ameaças ambientais, microrganismos patogênicos, entre outros, sendo misturas de fenóis, monoterpenos, sesquiterpenos e outros compostos de plantas aromáticas (Ballester-Costa et al., 2017; Sangha et al., 2017). Quanto ao aspecto físico, OEs são líquidos oleosos aromáticos derivados de plantas, podendo ser extraídos de diferentes matrizes como folhas, botões, flores, sementes, cascas, raízes, galhos, madeira e frutas (Ghabraie et al., 2016; Lee et al., 2018). Eles têm sido tradicionalmente usados na terapêutica natural, preservação de alimentos, como medicamentos complementares em diversos tratamentos e como aromatizantes culinários, dado suas características organolépticas com grande aceitabilidade entre os consumidores (Ballester-Costa et al., 2017; Fratianni et al., 2010). Atualmente, aproximadamente 3.000 OEs são conhecidos e alguns deles são comercialmente importantes, sendo empregados na indústria da agropecuária, cosmética – em especial a perfumaria –, química, farmacêutica e alimentícia devido ao seu potencial bioativo, destacando-se seu potencial antimicrobiano frente a diversas cepas bacterianas e fúngicas (Cutillas et al., 2018; Ghabraie et al., 2016; Lagha et al., 2019).

Estes compostos são geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) (Ballester-Costa et al., 2016), e alguns são aprovados pela *Food & Drug Administration* (FDA) para serem usados como aditivos alimentares, tais como erva-cidreira, OEs de manjeriço, coentro, cravo, tomilho e baunilha (FDA | U.S. *Food & Drug Administração*). Portanto, eles estão ganhando interesse pelo seu potencial como conservantes naturais (Ballester-Costa et al., 2016), enquanto seu potencial como agentes

antimicrobianos e antioxidantes fornecem a base para muitas aplicações na preservação de alimentos processados e crus (Ballester-Costa et al., 2013).

4.1 APLICAÇÃO DE EMBALAGENS ATIVAS INCORPORADAS COM ÓLEOS ESSENCIAIS

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são fontes atrativas para a indústria de polímeros devido as suas grandes propriedades como sua alta biodegradabilidade e versatilidade de processamento, e o seu potencial para substituição dos plásticos petroquímicos (Bugnicourt et al., 2014). O uso de embalagens nas indústrias de processamento de alimento é essencial para manter a qualidade dos alimentos e vem sendo cada vez mais melhorada atualmente. Alternativas para aplicação de embalagens de PHA incorporadas com óleos essenciais (OE), as chamadas embalagens ativas (EA), são as mais recentes inovações biotecnológicas, e essas embalagens com características antimicrobianas conferem grande aplicação tecnológica, além de melhorar as características mecânicas das matrizes poliméricas (Wani et al., 2014; Muppalla et al., 2014; Giaquinto et al., 2017).

Nos estudos de Basnett et al. (2020) foi produzido um msc-PHA a partir da bactéria *Pseudomonas mendocina* usando um substrato de carbono barato, o meloço de cana-de-açúcar. Análises de caracterização confirmaram ser um copolímero denominado P(3HO-co-3HD), que foi incorporado com óleo essencial de limão (LEO) e avaliado a sua capacidade de ação antimicrobiana. As propriedades antimicrobianas do filme fabricado e incorporado com LEO frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* apresentou uma alta atividade para bactérias gram-positivas. Estudos de estocagem também demonstraram que após um ano os filmes apresentaram uma redução no conteúdo do LEO, no entanto, ainda apresentavam atividade frente a *S. aureus*. Essas embalagens denominadas garantem a qualidade, higiene, segurança e aumentam o tempo de vida de prateleira dos alimentos, protegendo os alimentos de fatores ambientais internos e externos (Gouvêa et al., 2015, Wrona et al., 2015). Os principais componentes presentes nos OEs e que promovem essas propriedades antimicrobianas as matrizes poliméricas são os aldeídos, fenóis e terpenóides oxigenados. Além do mais, a hidrofobicidade dos OEs permite que os lipídios encontrados na membrana das células bacterianas interajam entre si tornando a parede celular microbiana menos estável e permeável, permitindo a saída de componentes celulares e íons, o que pode ocasionar a morte celular (Ju et al., 2017; Khaneghah et al., 2018).

Nas análises de Silva e colaboradores (2020) novos filmes antimicrobianos de polihidroxibutirato (PHB) aditivados com polietilenoglicol (PEG) e óleo essencial de cravo (CEO), com atividade antimicrobiana frente a três bactérias (*E. coli*, *E. aerogenes* e *S. aureus*) foram avaliados. O principal componente encontrado no CEO foi o eugenol (72,96%), uma molécula fenólica encontrada em diversas plantas aromáticas. A adição do OE proporcionou uma maior flexibilidade e diminuição das interações intermoleculares entre as estruturas da matriz polimérica, obtendo filmes

menos cristalinos e conseqüentemente mais elásticos. A influência do óleo essencial de laranja (OEO) em blendas de PHB/PEG aditivados também foi avaliada frente as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, mostrando que o principal componente do OE (d-limoneno) torna os filmes mais resistente e flexível mecanicamente e também possui atividade antimicrobiana (Alves et al., 2021).

Por sua vez, Giaquinto et al. (2017) também avaliou a atividade antimicrobiana de filmes de PHB, no entanto, incorporados com óleo essencial de canola (CAOE). As análises mecânicas também mostraram que os filmes contendo CAOE apresentaram maior flexibilidade, e as análises térmicas mostraram que a adição do óleo também altera as propriedades térmicas do PHB, como as temperaturas de fusão e cristalização, cristalinidade relativa e máximo taxa de cristalização. De acordo com Basnett et al. (2020) a viabilidade dos OEs conferirem atividade antimicrobiana aos filmes de PHA podem fazer com que haja uma ampliação da aplicação desses biofilmes em diversos setores industriais, inclusive em materiais implantáveis, permitindo que esses materiais antimicrobianos possam ser empregados na regeneração de tecidos moles (pele).

5 CONCLUSÃO

Este trabalho demonstra que os microrganismos fotossintetizantes podem ser uma alternativa viável e de baixo custo para produção de biopolímeros (PHAs) com grande aplicação industrial, com produção semelhante às encontradas na literatura por bactérias, com vias biosintética ainda a serem melhores estudadas e elucidadas, e com grande perspectiva de aplicação desses biopolímeros na formação de películas finas incorporadas a óleos essenciais, as embalagens ativas, com características antimicrobianas e grande aplicabilidade na indústria de embalagens.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao apoio financeiro da Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) (Processo: BFP-0098-2.12/23), ao Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Pernambuco (IFPE) e ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).



REFERÊNCIAS

Abdo, S.M., & Ali, G.H. Analysis of polyhydroxybutrate and bioplastic production from microalgae. (2019). Bulletin of the National Research Centre, 43:1–4.

Albuquerque, P.B.S., & Malafaia, C.B. Perspectives on the production, structural characteristics and potential applications of bioplastics derived from polyhydroxyalkanoates. (2018). International Journal of Biological Macromolecules, 107, 615–625.

Alves, J.C.A., Silva, G.S., Souza, K.C., Silva, I.D.L., Silva, C.F., Caetano, V.F., & Vinhas GM. Evaluation of the influence of orange essential oil on PHB/PEG films. Research, Society and Development. (2021). 10(2), e30810212547.

Amadu, A. A., Qiu, S., Ge, S., Addico, G.N.D, Ameka, G.K., Yu, Z., Xia, W., Abbew, A-W., Shao, D., Champagne, P., & Wang, S. A review of biopolymer (Poly- β -hydroxybutyrate) synthesis in microbes cultivated on wastewater. (2021). Science of The Total Environment, 756, 143729.

Ansari, S & Fatma, T. Cyanobacterial polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, optimization and characterization. (2016). PLoS ONE 11(1), 20.

Arumugam, A. Polyhydroxyalkanoates (PHA) Production. (2020). Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials, 2, 236-252.

Ballester-Costa, C., Sendra, E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A., & Viuda-Martos, M. Chemical composition and in vitro antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth. (2013). Industrial Crops and Products, 50, 304–311.

Ballester-Costa, C., Sendra, E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A., & Viuda-Martos, M. Assessment of antioxidant and antibacterial properties on meat homogenates of essential oils obtained from four *Thymus* species achieved from organic growth. (2017). Foods, 6(8), 59.

Basnett, P., Marcello, E., Lukasiewicz, B., Nigmatullin, R., Paxinou, A., Ahmad, M. H., Gurumayum, B., & Roy, I. Antimicrobial Materials with Lime Oil and a Poly(3-hydroxyalkanoate) Produced via Valorisation of Sugar Cane Molasses. (2020). Journal of Functional Biomaterials, 10, 11(2), 24.

Bhati, R. & Mallick, N. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production by the diazotrophic cyanobacterium *Nostoc muscorum* Agardh: process optimization and polymer characterization. (2015). Algal Research, 7, 78–85.

Bhati, R., Samantaray, S., Sharma, L., & Mallick, N. Poly- β hydroxybutyrate accumulation in cyanobacteria under photoautotrophy. (2010). Biotechnology Journal, 5, 1181–1185.

Bugnicourt, E., Cinelli, P., Alvarez, V.A., & Lazzeri, A Polyhydroxyalkanoate (PHA): review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. (2014). Express Polym Lett 8(11):791–808.

Coelho, V.C., Silva, C.K., Costa, J.A.V., & Morais, M.G. Polyhydroxybutyrate production by *Spirulina* sp. LEB 18 grown under different nutrient concentrations. (2015) African Journal of Microbiology Research, 9, 1586–1594.

Coppola, G., Gaudio, M.T., Lopresto, C.G., Calabro, V., Curcio, S., & Chakraborty, S., Bioplastic from renewable biomass: a facile solution for a greener environment. (2021) Earth Sys Environ 5 (2), 231–251.

Costa, S. S., Miranda, A.L., Andrade, B.B., Assis, D.J., Souza, C.O., Morais, M.G., Costa, J.A.V., & Druzian, I. Influence of nitrogen on growth, biomass composition, production, and properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by microalgae. (2018A). *International Journal of Biological Macromolecules*, 116, 552-562.

Costa, S. S., Miranda, A.L., Andrade, B.B., Assis, D.J., Souza, C.O., Morais, M.G., Costa, J.A.V., & Druzian, I. Efficacy of *Spirulina* sp. polyhydroxyalkanoates extraction methods and influence on polymer properties and composition. (2018B). *Algal Research*, 33, 231–238.

Costa, S. S., Miranda, A.L., Andrade, B.B., Assis, D.J., Souza, C.O., Morais, M.G., Costa, J.A.V., & Druzian, I. Influence of nitrogen on growth, biomass composition, production, and properties of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by microalgae. (2018C). *International Journal of Biological Macromolecules*, 116, 552–562.

Costa, S.S., Miranda, A.L., Morais, M.G., Costa, J.A.V., & Druzian, J.I. Microalgae as source of polyhydroxyalkanoates (PHAs) — A review. (2019). *International Journal of Biological Macromolecules*, 131, 536-547.

Cutillas, A.B., Carrasco, A., Martinez-Gutierrez, R., Tomas, V., & Tudela, J. Thyme essential oils from Spain: Aromatic profile ascertained by GC–MS, and their antioxidant, anti-lipoxygenase and antimicrobial activities. (2018). *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(2), 529–544.

De Koning, G. J. Prospects of Bacterial Poly[(R)-3-(Hydroxyalkanoates)]. (1993) Eindhoven: Technische Universiteit Eindhoven, 145.

FDA | U.S. Food & Drug Administration. (n.d.). Retrieved May 25, 2021, from <https://www.fda.gov/>.

Fратиanni, F., De Martino, L., Melone, A., De Feo, V., Coppola, R., & Nazzaro, F. Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. (2010). *Journal of Food Science*, 75(8), M528–M535.

García, G., Sosa-Hernández, J.E., Rodas-Zuluaga, L.I., Castillo-Zacarías, C., & Parra-Saldívar, R. Accumulation of PHA in the Microalgae *Scenedesmus* sp. under Nutrient-Deficient Conditions. (2021). *Polymers*, 13(1), 131.

Ghabraie, M., Vu, K. D., Tata, L., Salmieri, S., & Lacroix, M. Antimicrobial effect of essential oils in combinations against five bacteria and their effect on sensorial quality of ground meat. (2016). *LWT – Food Science and Technology*, 66, 332–339.

Giaquinto, C. D. M., Souza, G. K. M., Caetano, V. F., & Vinhas, G M. Evaluation of the mechanical and thermal properties of PHB/canola oil films. (2017). *Polímeros*, 27(3), 201-207.

Gouvêa, D. M., Mendonça, R. C. S., Soto, M. L., & Cruz, R. S. Acetate cellulose film with bacteriophages for potential antimicrobial use in food packaging. (2015). *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 85-91.

Hempel, F., Bozarth, A.S., Lindenkamp, N., Klingl, A., Zauner, S., Linne, U., Steinbüchel, A., & Maier, U.G. Microalgae as bioreactors for bioplastic production. (2011). *Microbial Cell Factories*, 10, 81.

Jamnongkan, T., Intraramongkol, N., Samoechip, W., Potiyaraj, P., Mongkholrattanasit, R., Jamnongkan, P., Wongwachirakorn, P., Sugimoto, M., Ito, H., & Huang, C-F. Towards a circular

economy: study of the mechanical, thermal, and electrical properties of recycled polypropylene and their composite materials. (2022). *Polymers* 14 (24), 5482.

Jia, K., Cao, R., Hua, D.H., & Li, P. Study of Class I and Class III polyhydroxyalkanoate (PHA) syntheses with substrates containing a modified side chain. (2016). *Biomacromolecules* 17, 1477–1485.

Ju, J., Xu, X., Xie, Y., Guo, Y., Cheng, Y., Qian, H., & Yao, W. Inhibitory effects of cinnamon and clove essential oils on mold growth on baked foods. (2017). *Food Chemistry*, 240, 850–855.

Kaewbai-ngam, A., Incharoensakdi, A., Monshupanee, T. Increased accumulation of polyhydroxybutyrate in divergent cyanobacteria under nutrient-deprived photoautotrophy: an efficient conversion of solar energy and carbon dioxide to polyhydroxybutyrate by *Calothrix scytonemica* TISTR 8095. (2016). *Bioresource Technology*, 212, 342–347.

Kavitha, G., Kurinjimalar, C., Sivakumar, K., Kaarthik, M., Aravind, R., Palani, P., & Rengasamy, R. Optimization of polyhydroxybutyrate production utilizing wastewater as nutrient source by *Botryococcus braunii* Kütz using response surface methodology. (2016). *International Journal of Biological Macromolecules*, 93, 534–542.

Khaneghah, A. M., Hashemi, S. M. B., & Limbo, S. Antimicrobial agents and packaging systems in antimicrobial active food packaging: An overview of approaches and interactions. (2018). *Food and Bioproducts Processing*, 111, 1–19.

Khetkorn, W., Incharoensakdi, A., Lindblad, P., & Jantaro, S. Enhancement of poly-3-hydroxybutyrate production in *Synechocystis* sp. PCC 6803 by overexpression of its native biosynthetic genes. (2016). *Bioresource Technology*, 214, 761–768.

Koller, M., Vadlja, D., Braunegg, G., & Atlic, A. Formaland high-structured kinetic process modelling and footprint area analysis of binary imaged cells: Tools to understand and optimize multistagecontinuous PHA biosynthesis. (2017). *The EuroBiotech Journal*, 1 (3), 203–211.

Kovalcik, A., Meixner, K., Mihalic, M., Zeilinger, W., Fritz, I., Fuchs, W., Kucharczyk, P., Stelzer, F., & Drosig, B. Characterization of polyhydroxyalkanoates produced by *Synechocystis salina* from digestate supernatant. (2017) *International Journal of Biological Macromolecules*. 102, 497-504.

Kovalcik, A., Meixner, K., Mihalic, M., Zeilinger, W., Fritz, I., Fuchs, W., Kucharczyk, P., Stelzer, F., & Drosig, B. Characterization of polyhydroxyalkanoates produced by *Synechocystis salina* from digestate supernatant. (2017). *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 497–504.

Kumari, P., Kiran, B. R., & Mohan, S. V. Polyhydroxybutyrate production by *Chlorella sorokiniana* SVMIICT8 under Nutrient-deprived mixotrophy. (2022). *Bioresource Technology*, 354,127135.

Lagha, R., Abdallah, F. B., AL-Sarhan, B. O., & Al-Sodany, Y. Antibacterial and biofilm inhibitory activity of medicinal plant essential oils against *Escherichia coli* isolated from UTI patients. (2019). *Molecules*, 24(6), 1161.

Lama, L., Nicolaus, B., Calandrelli, V., Manca, M.C.,Romano, I., & Gambacorta, A. Effect of growth conditions on endo-and exopolymer biosynthesis in *Anabaena cylindrica* 10 C. (1996). *Phytochemistry*, 42, 655–659.

Lee, G., Kim, Y., Kim, H., Beuchat, L. R., & Ryu, J. H. Antimicrobial activities of gaseous essential oils against *Listeria monocytogenes* on a laboratory medium and radish sprouts. (2018). *International Journal of Food Microbiology*, 265, 49–54.

Mendhulkar VD, & Shetye L. Synthesis of biodegradable polymer polyhydroxyalkanoate (PHA) in cyanobacteria *Synechococcus elongates* under Mixotrophic nitrogen- and phosphate-mediated stress conditions. (2017) *Industrial Biotechnology*, 13:85–88.

Mendhulkar, V. D. & Shetye, L. Synthesis of biodegradable polymer polyhydroxyalkanoate (PHA) in cyanobacteria *Synechococcus elongates* under Mixotrophic nitrogen- and phosphate-mediated stress conditions. (2017). *Industrial Biotechnology*, 13, 85–88.

Mourão, M. M., Gradíssimo, D.G., Santos, A.V., Schneider, P.C., Faustino, S.M.M., Vasconcelos, V., & Xavier, L.P. Optimization of Polyhydroxybutyrate Production by Amazonian Microalga *Stigeoclonium* sp. B23. (2020). *Biomolecules*, 10(12), 1628.

Muppalla, S. R., Kanatt, S. R., Chawla, S. P., & Sharma, A. Carboxymethyl cellulose–polyvinyl alcohol films with clove oil for active packaging of ground chicken meat. (2014). *Food Packaging and Shelf Life*, 2(2), 51–58.

Nandal, M., Khyalia, p., Ghalawat, A., Jugiani, H., Kaur, M., Laura, J.S. Review on the use of microalgae biomass for bioplastics synthesis: a sustainable and green approach to control plastic pollution. (2022). *Pollution* 8 (3), 844–859.

Nishioka, M., Nakai, K. Miyake, M., Asada, Y., & Taya, M. Production of poly- β -hydroxybutyrate by thermophilic cyanobacterium, *Synechococcus* sp. MA19, under phosphate limited conditions. (2001). *Biotechnology Letters*, 23, 1095–1099.

Pal, S., Manna, A., Paul, A.K. Production of poly(β -hydroxybutyric acid) and exopolysaccharide by *Azotobacter beijerinckii* WDN-01. (1999). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15, 11–16.

Panda, B. & Mallick, N. Enhanced poly- β -hydroxybutyrate accumulation in a unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. (2017). *Letters in Applied Microbiology*, 44, 194–198.

Panda, B., Sharma, L., Mallick, N. Poly- β -hydroxybutyrate accumulation in *Nostoc muscorum* and *Spirulina platensis* under phosphate limitation. (2005). *Journal of Plant Physiology*, 162, 1376–1379.

Rahman, A., Anthony, R. J., Sathish, A., Sims, R. C., & Miller, C. D. Effects of wastewater microalgae harvesting methods on polyhydroxybutyrate production. (2014). *Bioresource Technology*, 156, 364–367.

Rahman, A., Linton, E., Hatch, A. D., Sims, R. C., & Miller, C. D. Secretion of polyhydroxybutyrate in *Escherichia coli* using a synthetic biological engineering approach. (2013). *Journal of Biological Engineering*, 7:24.

Rahman, A., Putman, R.J., Inan, K., Sal, F., A., Sathish, A., Smith, T., Nielsen, C., Sims, R.C., & Miller, C.D. Polyhydroxybutyrate production using a wastewater microalgae-based media. (2015). *Algal Research*, 8, 95–98.

Rosenboom, J.-G., Langer, R., & Traverso, G. Bioplastics for a circular economy. (2022). *Nature Reviews Materials*. 7 (2), 117–137.



- Samantaray, S. & Mallick, N. Production and characterization of polyhydroxybutyrate (PHB) polymer from *Aulosira fertilissima*. (2012) *Journal Applied Phycology*, 24, 803–814.
- Sangha, J. S., Astatkie, T., & Cutler, G. C. Ovicidal, larvicidal, and behavioural effects of some plant essential oils on diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). (2017). *Canadian Entomologist*, 149(5), 639–648.
- Sharma, L. & Mallick, N. Accumulation of poly- β hydroxybutyrate in *Nostoc muscorum*: regulation by pH, light–dark cycles, N and P status and carbon sources. (2005). *Bioresource Technology* 96, 1304–1310.
- Shrivastav, A., Mishra, S.K., Mishra, S. Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis by *Spirulina subsalsa* from Gujarat coast of India. (2010). *International Journal of Biological Macromolecules*, 46, 255–260.
- Silva, P.E.C., & Houllou, L.M. Obtainment of Polyhydroxyalkanoates (PHAs) from Microalgae Supplemented with Agro-Industry Residue Corn Steep Liquor. (2022). *Journal of Botany Research*, 5(1), 138-140.
- Singh, A. K., & Mallick, N. Advances in cyanobacterial polyhydroxyalkanoates production. (2017). *FEMS Microbiology Letters*, 364:fnx189.
- Singh, A. K., & Mallick, N. Advances in cyanobacterial polyhydroxyalkanoates production. (2017). *FEMS Microbiology Letters*, 364:fnx189.
- Surendran, A., Lakshmanan, M., Chee, J.Y., Sulaiman, A.M., Thuoc, D.V., & Sudesh, K. Can polyhydroxyalkanoates be produced efficiently from waste plant and animal oils? (2020). *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 169.
- Wani, A. A., Singh, P., & Langowski, H. C. Packaging. In Y. Motarjemi & L. Gorris (Eds.), *Encyclopedia of food safety*. (2014). UK: Elsevier Science, 211-218.
- Wrona, M., Bentayeb, K., & Nerín, C. A novel active packaging for extending the shelf-life of fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*). (2015). *Food Control*, 54, 200-207.
- Wu, H.Y., Liu, T.X., Hsu, C.H., Cho, Y.S., Xu, Z.J., Liao, S.C., Zeng, B.H., Jiang, Y.L., & Lien, S.Y. Thin-film coated plastic wrap for food packaging. (2017). *Materials* 10 (7).