



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Marcia Parente Melo da Costa

**Desenvolvimento de biohidrogéis para aplicação na liberação controlada
de glifosato**

Rio de Janeiro

2018

Marcia Parente Melo da Costa

Desenvolvimento de biohidrogéis para aplicação na liberação controlada de glifosato

Tese apresentada, como requisito para a obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Polímeros

Orientador: Prof.^a Dr.^a Ivana Lourenço de Mello Ferreira

Coorientador: Prof. Dr. Maurício Tavares de Macedo Cruz

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CTC/Q

C837 Costa, Marcia Parente Melo da

Desenvolvimento de biohidrogéis para aplicação na liberação controlada de glifosato/ Marcia Parente Melo da Costa. – 2018.
174 f.

Orientador: Ivana Lourenço de Mello Ferreira
Co-orientador: Maurício Tavares de Macedo Cruz

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química.

1. Hidrogéis - Teses. 2. Polissacarídeos – Teses. 3. Glifosato – Teses I. Ferreira, Ivana Lourenço de Mello II. Cruz, Maurício Tavares de Macedo III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. IV. Título.

CDU 544.773.432

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta Tese.

Assinatura

Data

Marcia Parente Melo da Costa

Desenvolvimento de biohidrogéis para aplicação na liberação controlada de glifosato

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Polímeros

Aprovada em 19 de julho de 2018.

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Ivana Lourenço de Mello Ferreira (Orientador)
Instituto de Química – UERJ

Prof. Dr. Maurício Tavares de Macedo Cruz (Coorientador)
Instituto de Química – UERJ

Prof.Dr.Luiz Claudio de Santa Maria
Instituto de Química – UERJ

Prof. Dr. Glaucio Braga Ferreira
Instituto de Química – UFF

Prof.^a Dr.^a Viviane Gomes Teixeira
Escola de Química - UFRJ

Prof.Dr. Edwin Gonzalo Azero Rojas
Instituto de Biociências CCBS - UNIRIO

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais que sempre estiveram ao meu lado,
incentivando e me apoiando em todos os momentos difíceis.

À minha eterna orientadora Fernanda M. B. Coutinho que
sempre confiou no meu trabalho.

À Deus, por me fortalecer diariamente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me iluminar e me dar forças para não desistir.

Ao meu marido e filhos, pelo amor e por me apoiarem em todas as minhas escolhas.

À minha querida amiga, irmã e orientadora Ivana Lourenço de Mello Ferreira, pelo carinho, pela confiança e paciência, por acreditar no meu trabalho e compartilhar comigo os seus conhecimentos.

Ao Prof. Maurício Tavares de Macedo Cruz, coorientador e amigo querido pela amizade, por ter confiando meu trabalho, pela paciência em ensinar a mim e a todos os seus alunos.

Ao amigo e Prof. Marcos Antonio da Silva Costa pela amizade, por toda ajuda e conselhos. Sou eternamente grata!!!!

À amiga Jacira Castanharo pelo apoio e amizade.

À minha amiga Letícia Maia Prates por compartilhar comigo seus conhecimentos de Química Teórica. Muito obrigada!

As minhas amigas queridas, irmãs do coração, Tania Garcia e Regina Linhares, pela grande amizade e apoio em todos os momentos difíceis da minha vida.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Confocal/HUPE-UERJ, em especial à Kissila Rabello, pela sua incansável dedicação nas análises de microscopia de fluorescência.

Às técnicas Rita Maria Pinho Sá e Mônica Machado da Silva, químicas do Laboratório de Caracterização Instrumental do Instituto de Química da UERJ, por todas as análises FTIR e TGA.

Aos amigos queridos da biblioteca do Instituto de Química/UERJ, em especial à Elizabeth Costinha e ao Silvio pelo carinho.

Aos meus amigos queridos do Laboratório de Química de Polímeros do Instituto de Química da UERJ: Gustavo Monteiro, Fabiana Almeida, Flávio Silva de Sousa, Samir Nasser, Mariana Duarte, Diana Maciel, Rodrigo Bittencourt pelos momentos de descontração, pelo apoio e amizade.

Aos amigos Luiz Alberto de Oliveira, secretário da pós-graduação, e Aguielo pela ajuda e amizade.

A todos do Instituto de Química da UERJ, professores e funcionários, que me ajudaram e me incentivaram na realização deste trabalho.

À FAPERJ pelo auxílio financeiro na qualidade de bolsista de doutorado.

O bom lutador não desiste da batalha,
mas ganha fôlego, cria ânimo e retorna para a guerra.

Não desiste de lutar por seus sonhos e vitórias.

Yla Fernandes

RESUMO

COSTA, M.P.M. *Desenvolvimento de biohidrogéis para aplicação na liberação controlada de glifosato*. 174 f. 2018. Tese (Doutorado em Química de Polímeros) - Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Esta Tese visa ao desenvolvimento, caracterização e aplicação de biohidrogel constituído pela combinação de dois polissacarídeos, alginato de sódio (ALG) e quitosana (QUI), na liberação gradativa de glifosato, sem a presença de qualquer agente reticulante. Os resultados mostraram que as condições reacionais avaliadas: pH (4 a 9), temperatura (25 e 50°C) e razão entre os polissacarídeos (ALG:QUI = 2:1; 1:1 e 1:2), tiveram papel importante nas propriedades do biohidrogel obtido. Foi possível produzir um biohidrogel com grau de intumescimento superior a 1000%, boa estabilidade térmica e resistência à compressão de 0,077 MPa. O biohidrogel apresentou adsorção de 86% de glifosato em 48 h de teste. O teste de liberação gradativa do herbicida, realizado *in vitro* (até 60 dias) por medidas colorimétricas, mostrou que 73% de glifosato foram liberados entre 30 e 35 dias de teste. A liberação cumulativa foi de 90% no final de 60 dias, atingindo o equilíbrio em um tempo de 50 dias. Foi realizado um estudo computacional mecânico-quântico baseado na Teoria do Funcional de Densidade para avaliar a interação entre os polissacarídeos ALG e QUI e, assim, contribuir para o entendimento do mecanismo de gelificação. Por meio do estudo teórico, também, foi avaliada a interação entre o biohidrogel e o glifosato. Devido ao elevado custo computacional ALG e QUI foram representados por unidades de dissacarídeos. Com a modelagem foi possível obter parâmetros estruturais, eletrônicos e de energia de ALG e QUI e do complexo formado. Os resultados teóricos indicaram que a formação do complexo polieletrólítico ALG:QUI foram predominantemente eletrostáticas. Entretanto, uma contribuição covalente significativa na energia de interação entre os dímeros é apontada pelos cálculos EDA. Segundo a análise NBO, a componente covalente está presente nas ligações-H intermoleculares formadas entre os grupos $\sim\text{NH}_3^+$ e $\sim\text{COO}^-$, contribuindo efetivamente para estabilizar o complexo formado. Quando uma molécula de glifosato é aproximada ao complexo ALG:QUI, a mesma se liga, preferencialmente, ao dímero de quitosana. Este resultado está de acordo com as observações feitas por micrografias de fluorescência. Outro apontamento relevante do estudo computacional indicou claramente o papel do contra-íon sódio, ainda em ampla discussão na literatura. Segundo a análise dos resultados, a coordenação do Na^+ contribui entre 37 e 43% para a energia de estabilização do complexo formado.

Palavras-chave: Biohidrogel. Alginato de sódio. Quitosana. Complexo polieletrólítico. Modelagem molecular. Glifosato.

ABSTRACT

COSTA, M.P.M. *Development of biohydrogels for application in the controlled release of glyphosate*. 174 f. 2018. Tese (Doutorado em Química de Polímeros) - Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

This thesis aims at the development, characterization and application of a biohydrogel consisting of the combination of two polysaccharides, sodium alginate (SA) and chitosan (CH), in the gradual release of glyphosate without the presence of any crosslinking agent. The results showed that the reaction conditions evaluated: pH (4 to 9), temperature (25 and 50 ° C) and ratio between polysaccharides (SA:CH = 2: 1, 1: 1 and 1: 2) had an important role in the properties of the obtained biohydrogel. Thus, by adjusting such conditions, it was possible to produce a biohydrogel having a swelling degree greater than 1000%, good thermal stability and compressive strength of 0.077 MPa. The biohydrogel had an adsorption of 86% glyphosate in 48 h of test. The herbicide gradual release test performed in vitro (up to 60 days) by colorimetric measurements showed a release of 73% of glyphosate in 30-35 days of testing. The cumulative release was approximately 90% at the end of 60 days, reaching equilibrium in a time of 50 days. In order to contribute to the understanding of the gelation mechanism, a mechanical-quantum computational study based on the Functional Density Theory was carried out to evaluate the interaction between SA and CH polysaccharides. The theoretical study was also applied to evaluate the interaction between the biohydrogel and glyphosate. Due to the high computational cost SA and CH were represented by disaccharide units. With the modeling, it was possible to obtain structural, electronic and energy parameters of SA and CH and the complex formed. Theoretical results indicated that the formation of the SA:CH polyelectrolyte complex were predominantly electrostatic. However, a significant covalent contribution in the energy of interaction between the dimers is indicated by the EDA calculations. According to the NBO analysis, the covalent component is present in the intermolecular H bonds formed between the $\sim\text{NH}_3^+$ and the $\sim\text{COO}^-$ groups, effectively contributing to stabilize the formed complex. When a glyphosate molecule is approached to the AS:CH complex, it preferably binds to the chitosan dimer. This result is in agreement with observations made by fluorescence micrographs. Another relevant point in the computational study clearly indicated the role of the sodium counter ion, still in wide discussion in the literature. According to the results analysis, Na^+ coordination contributes between 37 and 43% for the stabilizing energy of the formed complex.

Keywords: Biohydrogel. Sodium alginate. Chitosan. Polyelectrolyte Complex. Molecular modeling. Glyphosate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cronograma resumido da evolução dos hidrogéis.....	27
Figura 2 – Estrutura química do alginato (a) e do alginato carregado negativamente (b).....	32
Figura 3 – Estrutura química da quitosana parcialmentedesacetilada (a) e totalmente desacetilada (b).....	33
Figura 4 – Forma protonada da quitosana.....	34
Figura 5 – Modelos de polieletrólitos.....	35
Figura 6 – Representação esquemática de complexo polieletrólito (PEC).....	36
Figura 7 – Movimentação de herbicida no ambiente.....	40
Figura 8 – Estrutura química do N-(fosfonometil) glicina (glifosato) e de seus principais produtos de degradação o ácido aminometilfosfônico (AMPA) e a sarcosina.....	41
Figura 9 – Dissociação do glifosato de acordo com seu comportamento zwitteriônico	42
Figura 10 – Representação esquemática de um sistema convencional e um sistema de liberação gradativa para aplicação de herbicidas.....	43
Figura 11 – Representação gráfica da combinação de três funções gaussianas para representar uma função de Slater.....	49
Figura 12 – Processo de transformação de orbital atômico para orbital molecular.....	52
Figura 13 – Diagrama de nível de energia para a formação da molécula A.....	53
Figura 14 – Modos de aproximação testados para a interação entre os dímeros otimizados de alginato e quitosana.....	55
Figura 15 – Esquema ilustrativo de preparação dos bio-hidrogéis.....	64
Figura 16 – Fotografia digital dos corpos de prova utilizados para o ensaio de compressão.....	67
Figura 17 – Ensaio de compressão em máquina universal de ensaio Emic DL 2000.	68
Figura 18 – Reação proposta da obtenção do púrpura de Ruhemann a partir do glifosato com ninidrina na presença de molibdato de sódio.....	69

Figura 19 – Espectro de absorção na região do visível do glifosato em diferentes concentrações.....	70
Figura 20 – Geometria preferencial das espécies isoladas: (a) alginato MM, (b) quitosana protonada e (c) glifosato.....	76
Figura 21 – Geometrias de mínimo de energia (com numeração nos átomos) obtidas com a metodologia B3LYP/6-311+G(d,p) para as espécies isoladas: (a) alginato MM, (b) quitosana e (c) glifosato.....	77
Figura 22 – Definição dos ângulos diedros χ , ϕ e ψ para os dímeros de alginato (a) e de quitosana (b).....	78
Figura 23 – Estruturas dos complexos (a e a') ALG:QUI e (b e b') ALG:QUI.2H ₂ O otimizados com a metodologia B3LYP/6-311+G(d,p): (a e b) vista superior e (a' e b') vista lateral ampliada.As linhas pontilhadas indicam as ligações-H intermoleculares (I e II).....	81
Figura 24 – Esfera de coordenação do cátion sódio nos complexos ALG:QUI.2H ₂ O (a) e ALG:QUI/ GLP (b).....	84
Figura 25 – Estrutura de energia mínima do complexo ALG:QUI/GLP: (a) vista superior e (a') vista lateral estendida. Linhas pontilhadas representam as ligações H intermoleculares (I, II e III).....	85
Figura 26 – Análise de decomposição de energia de estabilização dos complexos ALG:QUI e ALG:QUI.2H ₂ O.....	87
Figura 27 – Resultado NBO para a sobreposição $p_z-\sigma^*$ envolvida na formação de ligações-H entre dímeros de alginato e quitosana: (a) ALG:QUI; (b) ALG:QUI/GLP; (c) entre o dímero de quitosana e a molécula de glifosato e (d) ligação intramolecular m	90
Figura 28 – Espectro de ¹³ C CP-MAS NMR do alginato de sódio.....	94
Figura 29 – Representação da formação do biohidrogel (ALG:QUI)	95
Figura 30 – Ilustração esquemática das vias de preparo dos complexos ALG:QUI e fotografia digital das amostras em cada um dos diferentes valores de pH.	97
Figura 31 – Influência da concentração das soluções de polissacarídeos sobre o grau de intumescimento (GI) dos biohidrogéis em pH4 e preparo em T= 25°C.....	99
Figura 32 – Influência da temperatura e do pH do meio sobre o grau de intumescimento (GI).....	102
Figura 33 – Fotografias digitais do biohidrogel seco e intumescido em água.....	104
Figura 34 – Micrografias de SEM das amostras de biohidrogel preparadas com solução de: [ALG] = 3,0% m/v e [QUI] = 1,5% m/v.....	106

Figura 35 – Micrografias de SEM das amostras de biohidrogel preparadas com solução de: [ALG] = 1,0% m/v e [QUI] = 1,5% m/v.....	109
Figura 36 – Micrografias de SEM das amostras de biohidrogel preparadas com solução de: [ALG]=3,0% m/v e [QUI] = 1,0% m/v.....	112
Figura 37 – Curvas TG e DTG dos polissacarídeos puros.....	116
Figura 38 – Espectros de FT-IR dos polissacarídeos puros (alginato de sódio e quitosana) e do biohidrogel.....	119
Figura 39 – Variação da força em função da taxa de deformação dos bio-hidrogéis secos	121
Figura 40– Tensão máxima ($\sigma_{\text{máx.}}$) <i>versus</i> composição dos bio-hidrogéis secos.....	122
Figura 41 – Fotografia digital das amostras de biohidrogéis com composições 3,0 % ALG: 1,5 % QUI (2:1) pH 4 a 50°C e 3,0 % ALG: 1,5 % QUI (1:1) pH 6 a 50°C, intumescidas em água, após realização do ensaio de compressão.....	123
Figura 42 – Espectro de NMR ^{13}C CP-MAS: (a) quitosana, (b) alginato de sódio e (c) biohidrogel.....	124
Figura 43 – Curva de calibração do glifosato ($\lambda = 570 \text{ nm}$)	128
Figura 44 – Curvas de adsorção e da quantidade de glifosato (qt) em mg/g de biohidrogel com glifosato <i>versus</i> tempo (min).....	129
Figura 45 – Cinética de adsorção: (a) Pseudo-primeira-ordem e (b) Pseudo segunda-ordem da solução na concentração de 52 mg.L $^{-1}$ de glifosato pelo biohidrogel.....	130
Figura 46 – Isotermas de adsorção do biohidrogel ALG:QUI pelo herbicida glifosato: (a) modelo de Langmuir; (b) modelo de Freundlich.....	132
Figura 47 – Grau de intumescimento do biohidrogel ALG:QUI (1:1) em pH 6 em diferentes concentrações de glifosato.....	134
Figura 48 – Cinética de liberação do herbicida glifosato.....	136
Figura 49 – Quantidade de glifosato liberado em função do tempo no biohidrogel..	136
Figura 50 – Liberação cumulativa (%) <i>versus</i> tempo (dias).....	137
Figura 51 – Representação do biohidrogel (ALG:QUI) intumescido com solução de glifosato, representando o processo de liberação gradativa do herbicida glifosato.....	137

Figura 52 – Microscopia eletrônica de varredura (SEM) do biohidrogel: (a) sem a incorporação do glifosato e (b) com a incorporação do glifosato.....	139
Figura 53 – Tamanho de poros <i>versus</i> número de poros do biohidrogel.....	139
Figura 54 – Micrografias confocal a laser (CLSM) do biohidrogel: (a) sem glifosato e (b) com a incorporação do glifosato.....	140
Figura 55 – Complexo polieletrólito (ALG:QUI) com o herbicida glifosato.....	141
Figura 56 – Curvas TG e DTG do biohidrogel com e sem a incorporação do glifosato.....	142
Figura 57 – Espectro de FT-IR das amostras: (a) glifosato; (b) ALG:QUI com glifosato; (c) ALG:QUI sem glifosato; (d) quitosana; (e) alginato de sódio.....	144
Figura 58 – Propriedade mecânica (compressão) do biohidrogel intumescido com glifosato: Força (N) <i>versus</i> deformação (mm).....	145
Figura 59 – Estruturas de energia mais baixas do complexo ALG/QUI obtidas de aproximações iniciais.....	166

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Relação entre as propriedades e parâmetro estruturais da quitosana....	34
Tabela 2 –	Parâmetros aplicados no preparo dos biohidrogéis.....	63
Tabela 3 –	Distância H···O (em angstrom) e ângulo de ligação X–H···O para as ligações de hidrogênio intramoleculares formadas (a – n) nas geometrias de mínimo de energia das espécies isoladas.....	80
Tabela 4 –	Distância de ligação Na _(a) –O em angstrom ($d_{Na-O(x)}$ sendo x = número do átomo envolvido), carga NBO em Na _(a) (qNa , em \bar{e}), energia de coordenação de Na _(a) (E_{coord} , em kcal mol ⁻¹) e sua porcentagem de contribuição (%C) para a energia total de estabilização ($E_{stab(T)}$, em kcal mol ⁻¹), nos complexos ALG:QUI, ALG:QUI.2H ₂ O e ALG:QUI/GLP.....	82
Tabela 5 –	Carga sobre os átomos de oxigênio e hidrogênio (em \bar{e}), distância O···H e ângulo de ligação N–H···O (em angstroms) e energia envolvida (kcal.mol ⁻¹) nas ligações de hidrogênio formadas nos complexos ALG:QUI, ALG:QUI.2H ₂ O e ALG:QUI /GLP.....	88
Tabela 6 –	Atribuições do alginato no espectro de ¹³ C CP-MAS NMR.....	95
Tabela 7 –	Temperaturas de decomposição térmica dos polissacarídeos puros e dos bio-hidrogéis	117
Tabela 8 –	Atribuições vibracionais para as principais bandas dos espectros de FTIR dos polissacarídeos e dos biohidrogéis	119
Tabela 9 –	Valores de tensão máxima de compressão ($\sigma_{m\acute{a}x.}$) para os bio-hidrogéis secos.....	120
Tabela 10 –	Valores de grau de intumescimento no estado de equilíbrio (GI_{eq}), temperatura inicial de degradação (T_{onset}), temperatura em que a velocidade de degradação é máxima ($T_{m\acute{a}x.}$) e tensão máxima de compressão ($\sigma_{m\acute{a}x.}$) para os biohidrogéis.....	122
Tabela 11 –	Atribuições dos sinais observados nos espectros de NMR – CPMAS de ¹³ C dos biopolímeros puros e do biohidrogel.....	126

Tabela 12 –	Parâmetros de pseudo primeira ordem (k_1) e pseudo segunda ordem (k_2) para adsorção do glifosato.....	131
Tabela 13 –	Valores obtidos pelo ajuste da cinética de adsorção usando modelos de Langmuir e Freundlich.....	133
Tabela 14 –	Valores das temperaturas de degradação do herbicida glifosato e do biohidrogel.....	143
Tabela 15 –	Distância de ligação (em angstrom) envolvendo alguns átomos do dímero de alginato MM, isolado e dentro dos complexos ALG/QUI, ALG/QUI.2H ₂ O e ALG/QUI/GLP.....	167
Tabela 16	Distância de ligação (em angstrom) envolvendo alguns átomos do dímero de quitosana, isolado e dentro dos complexos ALG/QUI, ALG/QUI.2H ₂ O e ALG/QUI/GLP.....	168
Tabela 17	Distância de ligação (em angstrom) envolvendo os átomos da molécula de glifosato, isolada e dentro do complexo ALG/QUI/GLP.....	169
Tabela 18	Ângulos de ligação e ângulos diedros (ambos em grau) envolvendo alguns átomos do dímero de alginato MM, isolado e dentro dos complexos ALG/QUI, ALG/QUI.2H ₂ O e ALG/QUI/GLP.....	170
Tabela 19	Ângulos de ligação e ângulos diedros (°) envolvendo alguns átomos do dímero de quitosana, isolado e dentro dos complexos ALG/QUI, ALG/QUI.2H ₂ O e ALG/QUI/GLP.	171
Tabela 20	Energia absoluta (E_{abs} , em Hartree) da geometria das espécies, otimizadas isoladamente e dentro do complexo (dímeros de alginato e quitosana, glifosato (GLP) e moléculas de água), e dos complexos ALG/QUI, ALG/QUI.2H ₂ O e ALG/QUI/GLP, O termo E_{def} refere-se a energia de deformação ($kcal\ mol^{-1}$) das espécies após o processo de complexação.	172
Tabela 21	Energia NBO ($kcal\ mol^{-1}$) envolvida nas ligações Na (a)–O formadas nos complexos ALG/QUI, ALG/QUI.2H ₂ O e ALG/QUI/GLP.....	172
Tabela 22	Carga de NBO (em \bar{e}) em alguns átomos no dímero de alginato MM, isolado e dentro dos complexos ALG/QUI, ALG/QUI.2H ₂ O e ALG/QUI/GLP.....	173

Tabela 23	Carga de NBO (em \bar{e}) em alguns átomos no dímero de quitosana, isolado e dentro dos complexos ALG/QUI, ALG/QUI.2H ₂ O e ALG/QUI/GLP.....	174
-----------	--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAm	Acrilamida
ABRASCO	Associação Brasileira de Saúde Coletiva
ALG	Alginato de sódio
ALG:QUI	Complexo alginato:quitosana
AMPA	Ácido aminometilfosfônico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATM	Alto teor de metoxilação
ATR	Reflectância total atenuada
BSA	Albumina de soro bovino
BSSE	Erro de Superposição de Base
BTM	Baixo teor de metoxilação
C_0	Concentração inicial da solução (mg.L^{-1})
C_{eq}	Concentração da solução de herbicida no equilíbrio (mg.L^{-1});
C_t	Concentração da solução após determinado tempo(mg.L^{-1})
Carbaril	1-naftil-N-metilcarbamato
CG	Cromatografia gasosa
CGF	Função Gaussiana Contraída
CHN	Análise elementar: carbono; hidrogênio; oxigênio
CILAG	Chemical Industry Laboratory AG
CLSM	Microscopia confocal a laser
CTC	Capacidade de troca catiônica
DAPI	Dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole
DFO	Deferoxamina
DFT	Density Functional Theory (Teoria do Funcional de densidade)
DTG	Derivada da perda de massa ($^{\circ}\text{C}/\%$)
ECM	Matriz extracelular
EDA	Análise da Decomposição da Energia
f	Força (N)
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier

5-FU	Fluoruracila
GA ₃	Ácido giberélico
GG	Resíduo do ácido gulurônico
GGA	Gradiente da densidade de carga total
GI	Grau de intumescimento
GI _{eq}	Grau de intumescimento no estado de equilíbrio
GLP	Glifosato (n-(fosfometil) glicina))
HANW _s	Nanofios de hidroxiapatita
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IBAMA	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IM	Infarto do miocárdio
IPN	Rede interpenetrante
K ₁	Constante de pseudo-primeira ordem (min ⁻¹)
K ₂	Constante de pseudo-segunda ordem (min ⁻¹)
K _L e α _L	Constantes de Langmuir
K _F e n	Constantes de Freundlich
LDA	Local density Approximation
LMOEDA	Análise de Decomposição de Energia com base nos Orbitais Moleculares Localizados
MC	Metilcelulose
M _f	Massa da amostra inchada (g)
MM	Resíduo do ácido manurônico
MP2	Teoria de Perturbação de Segunda Ordem de Møller-Plesset
M _o	Massa da amostra inicial (g)
M _t	Quantidade de herbicida glifosato liberada pelo biohidrogel no tempo t
M _∞	Quantidade total de herbicida no biohidrogel
NBO	Natural Bond Orbital (Orbital Natural de Ligação)
NMR	Ressonância magnética nuclear
OG	Óxido de grafeno
PARAQUAT	1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto
PASP	Ácido poliaspártico
	Polietileno

PE	Complexo polieletrólito
PEC	Pectina
PECT	Poli(etilenoglicol)
PEG	Poli(óxido de etileno)
PEO	Polieletrólitos
PEs	Politereftalato de etileno
PET	Poli(hidroxietil metacrilato)
PHEMA	
PLA	Poliácido láctico
PLGA	Poli ácido-láctico-co-glicólico
PNIPAAm	Poli N-isopropilacrilamida
PP	Polipropileno
PVA	Álcool polivinílico
PVC	Policloreto de vinila
q_e	Quantidade máxima de herbicida adsorvido ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
Q_t	Quantidade de herbicida adsorvido em um determinado tempo ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
q_t	Quantidade de herbicida absorvida pelo biohidrogel ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
QUI	Quitosana
RdB	Isotiocianato de rodamina B
S_o	Área do corpo de prova
SCF	Campo autoconsistente
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
semi-IPN	Semi-interpenetrante
SINDAG	Sindicato Nacional das Empresas de Aviação Agrícola
SINDIVEG	Sindicato Nacional das Indústrias de Defesa Vegetal
STO	Orbital do tipo Slater
t	Tempo (min)
T_{onset}	Temperatura inicial de degradação
T_i	Temperatura inicial ($^{\circ}\text{C}$)
$T_{\text{máx.}}$	Temperatura máxima de degradação ($^{\circ}\text{C}$)
TG	Termogravimetria
TPP	Tripolifosfato
UV-vis	Espectroscopia no ultravioleta visível

V	Volume (mL)
$\sigma_{\text{máx.}}$	Tensão máxima de compressão
λ	Comprimento de onda (nm)
δ	Deslocamento químico (ppm)

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	25
1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
1.1	Polissacarídeos	30
1.1.1	<u>Alginato de sódio</u>	31
1.1.2	<u>Quitosana</u>	33
1.2	Complexo polieletrólítico (PEC)	35
1.3	Aplicação de hidrogel na agricultura	37
1.3.1	<u>Glifosato</u>	39
1.3.2	<u>Hidrogéis como sistemas de liberação gradativa</u>	43
1.4	Estudos computacionais aplicados a polissacarídeos	45
1.5	Métodos computacionais	47
1.5.1	<u>Teoria funcional de densidade (DFT)</u>	47
1.5.2	<u>Funcional híbrido B3LYP</u>	42
1.6	Conjunto base	49
1.7	Erro de superposição de base (BSSE)	50
1.8	Análise de Decomposição de Energia (EDA)	51
1.9	Orbitais naturais de ligação (NBO)	52
2	OBJETIVOS	54
2.1	Objetivos específicos	54
3	METODOLOGIA	55
3.1	Metodologia computacional	55
3.2	Metodologia experimental	58
3.2.1	<u>Materiais</u>	58
3.2.2	<u>Equipamentos</u>	59

3.3	Preparação dos biohidrogéis.....	60
3.3.1	<u>Caracterização dos polissacarídeos puros.....</u>	60
3.3.1.1	Ressonância magnética nuclear no estado sólido (¹³ C CP-MAS NMR).....	60
3.3.1.2	Análise elementar (CHN)	61
3.3.2	<u>Preparo das soluções de polissacarídeos.....</u>	62
3.3.3	<u>Preparo dos biohidrogéis.....</u>	62
3.3.4	<u>Caracterização dos biohidrogéis.....</u>	65
3.3.4.1	Grau de intumescimento (GI)	65
3.3.4.2	Caracterização morfológica.....	65
3.3.4.3	Estabilidade térmica.....	66
3.3.4.4	Composição química.....	66
3.3.4.5	Propriedade mecânica – teste de compressão.....	67
3.3.4.6	Ressonância magnética nuclear no estado sólido (NMR - ¹³ C CP-MAS).....	68
3.3.5	<u>Avaliação do biohidrogel na liberação gradativa do glifosato.....</u>	68
3.3.5.1	Quantificação de glifosato pelo método do púrpura de Ruhemann.....	69
3.3.5.2	Adsorção do glifosato pelo biohidrogel.....	70
3.3.5.3	Isotermas de adsorção.....	72
3.3.5.4	Liberação gradativa do herbicida glifosato <i>in vitro</i>	73
3.3.5.5	Caracterização das amostras de biohidrogel contendo o glifosato.....	74
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
4.1	Estudo computacional.....	75
4.1.1	<u>Estudo das espécies isoladas: dímero de alginato, de quitosana e molécula de glifosato.....</u>	75
4.1.2	<u>Avaliação das interações entre os dímeros de alginato de sódio e quitosana.....</u>	81
4.1.3	<u>Análise do complexo ALG:QUI microsolvatado: adição de 2 moléculas de H₂O.....</u>	83
4.1.4	<u>Interação entre o complexo ALG:QUI e a molécula de glifosato.....</u>	84

4.1.5	<u>Fragmentando a energia de estabilização no complexo ALG:QUI(EDA)</u>	86
4.1.6	<u>Análise dos Orbitais Naturais de Ligação (NBO)</u>	88
4.1.7	<u>Considerações finais do estudo teórico</u>	92
4.2	Estudo experimental	93
4.2.1	<u>Grau de intumescimento (GI)</u>	98
4.2.1.1	Influência da concentração das soluções de alginato de sódio e quitosana sobre o GI.....	98
4.2.1.2	Influência da temperatura e do pH do meio sobre o GI.....	102
4.2.2	<u>Microscopia eletrônica de varredura (SEM)</u>	105
4.2.3	<u>Estabilidade térmica</u>	116
4.2.4	<u>Composição química dos biohidrogéis</u>	118
4.2.5	<u>Resistência à compressão</u>	120
4.2.6	<u>Ressonância magnética nuclear no estado sólido (NMR¹³C CP-MAS)</u>	124
4.3	Avaliação das propriedades da composição “ideal” com o herbicida glifosato	127
4.3.1	<u>Curva de calibração do herbicida glifosato</u>	127
4.3.2	<u>Avaliação do processo de adsorção do herbicida glifosato</u>	128
4.3.3	<u>Cinética de adsorção</u>	130
4.3.4	<u>Isoterma de adsorção</u>	131
4.3.5	<u>Grau de intumescimento do biohidrogel na solução de glifosato</u>	133
4.3.6	<u>Estudo da liberação gradativa do glifosato</u>	135
4.3.7	<u>Microscopias eletrônicas de varredura e confocal a laser (SEM/ CLSM)</u>	138
4.3.8	<u>Estabilidade térmica (TGA)</u>	142
4.3.9	<u>Composição química (FTIR)</u>	143
4.3.10	<u>Propriedade mecânica do biohidrogel com glifosato</u>	145
	CONCLUSÕES	146
	REFERÊNCIAS	147

ANEXO – Produção científica.....	165
APÊNDICE – Material suplementar do estudo computacional.....	166

INTRODUÇÃO

No Brasil, o agronegócio é um dos principais setores da economia que apresenta elevado potencial de crescimento em curto prazo. Contudo, tal crescimento deve ocorrer de forma consistente e consciente, adequando-se a preocupação global com o meio ambiente. A utilização de pesticidas na agricultura é uma prática necessária no controle de pragas, doenças ou de plantas daninhas para se atingir altos índices de produtividade e assim atender a demanda crescente de alimentos. Entretanto, boa parte dos pesticidas apresentam propriedades que provocam sérios danos, tanto ao meio ambiente quanto a saúde dos seres vivos, e geralmente são utilizados de maneira pouco adequada durante o processo de aplicação (SILVA, 2010).

Herbicida (de acordo com a etimologia: herbi, erva, e cida matar) é um produto químico utilizado na agricultura para o controle de ervas classificadas como daninhas. Os herbicidas constituem um tipo de pesticida, sendo que as vantagens da utilização deste produto são rapidez de ação e custo reduzido. Representam hoje os produtos mais amplamente encontrados em recursos hídricos superficiais e subterrâneos do mundo todo, justificado pelo amplo uso em áreas agrícolas e urbanas.

O desenvolvimento de soluções tecnológicas baseadas na utilização de polímeros naturais não poluentes, biodegradáveis e hidrofílicos, como auxílio na redução dos problemas causados pelos pesticidas e para a obtenção de uma agricultura sustentável, tem crescido nas últimas décadas. Dentre tais soluções, a técnica de liberação gradativa, inicialmente desenvolvida para fármacos (SILVA *et al.* 2005; (<http://www.floresta.ufpr.br/alias/lpf/public>) acesso:19/02/2016, GUO *et al.* 2005; AOUADA *et al.* 2008), vem sendo adaptada para insumos agrícolas a partir de veículos biodegradáveis, e tem se mostrado uma ferramenta versátil e eficiente. Nesta linha, os hidrogéis iônicos têm merecido ampla atenção. Estes são redes poliméricas tridimensionais formadas por cadeias macromoleculares que apresentam grupos carregados, podendo ser constituídos por polímeros naturais (puros ou modificados), sintéticos ou por misturas (natural e sintético). Além disso, os hidrogéis podem sofrer incorporação de material inorgânico formando compósitos poliméricos, o que poderia acarretar melhorias suas propriedades (MOURA *et al.* 2008).

A alta porosidade aliada à presença de grupos carregados confere aos hidrogéis iônicos capacidade de reter grande quantidade de água, ou mesmo de outro fluido (intumescimento), fazendo dos mesmos, materiais apropriados para a incorporação e liberação gradativa de agentes agroquímicos, tais como: pesticidas, fertilizantes nutrientes. Desta forma, tem-se uma tecnologia

de baixo custo perfeitamente viável para ser empregada em plantações, que favorece a produtividade e reduz os riscos de contaminação ambiental e toxidez para o produtor (AOUADA *et al.* 2008 e 2009; FERNANDES, 2010; SILVA *et al.* 2010).

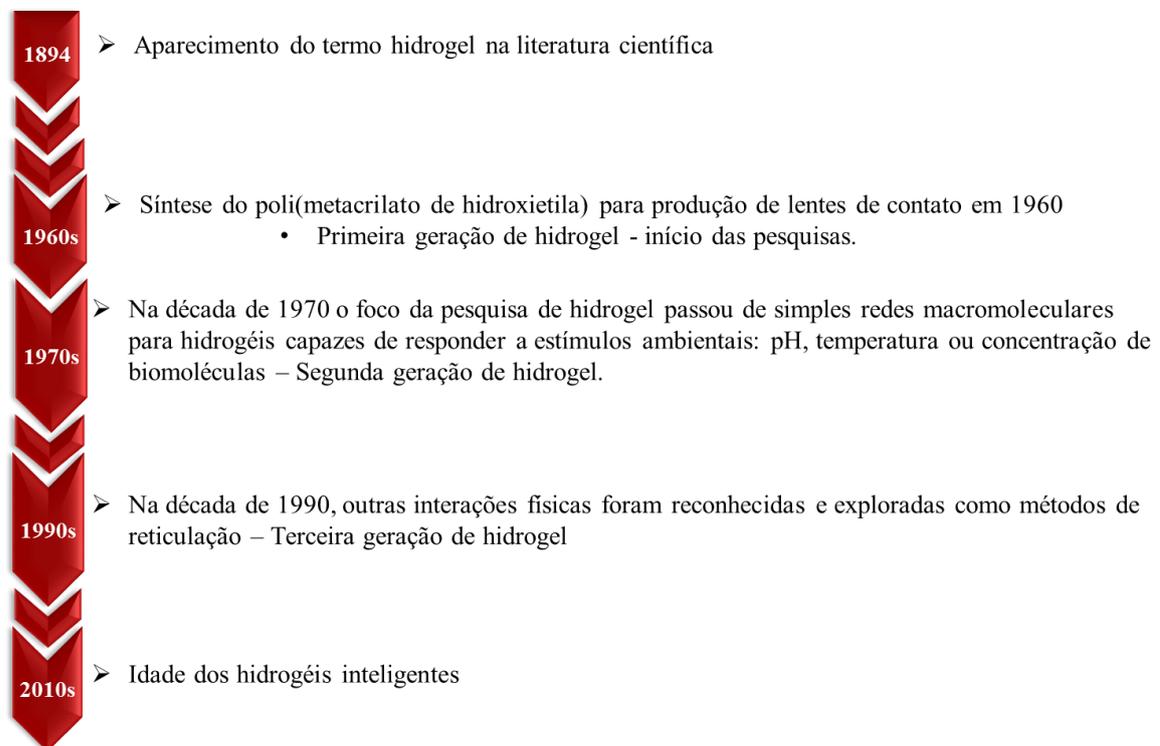
Até o presente momento, não foram encontrados na literatura, trabalhos a respeito da produção de bio-hidrogéis, constituídos somente por polissacarídeos (sem o uso de reticulantes), para serem aplicados na liberação gradativa de agroquímicos, nos quais tenha sido realizado um estudo computacional para verificar os fenômenos envolvidos na reticulação entre as respectivas cadeias poliméricas e, também, entre as moléculas do herbicida.

Assim, esta Tese tem como objetivo o preparo de biohidrogéis à base de alginato de sódio e quitosana, com alto grau de intumescimento (> 1000%) e resistência à compressão superior a 0,06MPa, não poluentes, biodegradáveis, hidrofílicos e com potencial para aplicação na liberação gradativa do herbicida glifosato, a fim de obter uma agricultura sustentável, a partir da redução de sua concentração no solo. Somado a isso, foi, também, objetivo desta Tese realizar um estudo computacional mecânico-quântico, baseado na Teoria do Funcional de Densidade, para avaliar as interações formadas, tanto entre os polissacarídeos, como entre estes e as moléculas do glifosato.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O termo hidrogel, surgiu na literatura científica por volta de 1900 para descrever um gel coloidal de sais inorgânicos. A síntese do poli(metacrilato de hidroxietila) para produção de lentes de contato em 1960, pelos cientistas Otto Wichterle e Drahoslav Lim, é considerada o começo da pesquisa do hidrogel (KOPEČEK, 2009). Após 50 anos, os estudos relacionados aos hidrogéis continuam em diversos campos. A poliacrilamida, o poli(ácidoacrílico) e outros poliacrilatos são extensivamente utilizados no preparo de materiais superabsorventes (Figura 1).

Figura 1- Cronograma resumido da evolução dos hidrogéis



Fonte: adaptado BUWALDA *et al.*, 2014.

Hidrogéis são materiais tridimensionais (3D) com capacidade de absorver grandes quantidades de água, mantendo a sua estabilidade dimensional. A rede tridimensional é formada por cadeias macromoleculares interligadas por ligações covalentes (reticulações) ou interações físicas, conferindo assim, insolubilidade aos hidrogéis. A sua alta hidrofiliicidade ocorre devido à presença de grupos -OH; -COOH; -CONH; -SO₃H, ao longo das cadeias poliméricas (GUPTA *et al.*, 2002; HOARE *et al.*, 2008; COIMBRA, 2010; BUENGER *et al.*, 2012; BUWALDA *et al.*, 2014). A presença desses grupos funcionaistorna os hidrogéis sensíveis às condições do meio,

tais como: temperatura, pH, concentração iônica, campo elétrico, e luz (MOURA *et al.*, 2008; KANG *et al.*, 2008).

Uma das áreas em que os hidrogéis são mais utilizados é como matriz polimérica para liberação controlada de fármacos. Polímeros naturais, especialmente os polissacarídeos, têm sido utilizados extensivamente em substituição aos polímeros sintéticos, principalmente, nas áreas da biotecnologia e de liberação de fármaco (GANJI *et al.*, 2010; BUWALDA *et al.*, 2014; GUILHERME *et al.*, 2015).

Miet *et al.* (2003) prepararam microesferas de quitina com poliésteres biodegradáveis poliácido-láctico-co-glicólico (PLGA) e poliácido láctico (PLA) para liberação da proteína BSA (albumina de soro bovino). Foram realizadas diferentes formulações, nas quais foi possível equilibrar a taxa de hidratação da quitina e a degradação da mistura, levando a uma liberação controlável de proteína (BSA) adequada e assim, desenvolvendo um novo sistema.

Dutta (2012) desenvolveu um material curativo através da mistura de poli(álcool vinílico) (PVA) e polietilenoglicol (PEG), utilizando como reticulante cloreto de cálcio (CaCl_2). A mistura foi exposta a irradiação gama a fim de sintetizar um hidrogel transparente para a produção dos curativos. O teste de penetração de micróbios no hidrogel foi realizado para confirmar a sua impermeabilidade às bactérias. Os resultados mostraram que o hidrogel pode ser considerado como um potencial material de curativo.

Yang *et al.* (2004) prepararam uma membrana formada pela mistura de poli(álcool vinílico) (PVA) e quitosana tratada com formaldeído. Os resultados mostraram que o teor de água, o vapor de água e a permeabilidade de solutos tais como: creatinina, 5-FU (fluoruracila) e vitamina B12 através da membrana aumentaram linearmente com o aumento do teor da quitosana.

Ruvinov e Cohen (2016), em um artigo de revisão, descreveram a versatilidade do alginato em aplicações biomédicas. Desde seu uso como implante cardíaco de suporte em pacientes após infarto agudo do miocárdio (IM) até seu emprego como veículo para transporte de células tronco e fatores regenerativos no coração. O alginato é usado amplamente para engenharia e regeneração de tecidos devido a sua biocompatibilidade, sua natureza não trombogênica e seu processo de gelificação, a qual se assemelha a matriz extracelular.

Jian *et al.* (2017) prepararam nanocompósitos à base de alginato de sódio e nanofios de hidroxiapatita (HANWs) com a finalidade de obter uma melhoria nas propriedades mecânicas utilizando o cloreto de cálcio (CaCl_2) como agente reticulante. Eles produziram um hidrogel com elevada biocompatibilidade, estrutura porosa e propriedades mecânicas significativas, com aplicação em vários campos da biomedicina como, por exemplo, na reparação em defeito ósseo.

Quimicamente, os hidrogéis, possuem suas cadeias poliméricas lineares ligadas covalentemente através de ligações cruzadas e irreversíveis. Por outro lado, os hidrogéis reticulados fisicamente possuem domínios físicos associados com os emaranhados da cadeia: interação hidrofóbica, ligação de hidrogênio, forças de van der Waals, e complexação iônica. Há um grande interesse pelo hidrogel reticulado fisicamente, pois além da facilidade de obtenção, grandes quantidades podem ser fabricadas rapidamente (HOFFMANN, 2002).

A principal desvantagem da reticulação física em hidrogéis, no entanto, está relacionada com as fracas propriedades mecânicas no estado intumescido (PATEL *et al.*, 2011). Geralmente, as propriedades mecânicas desses hidrogéis não são as ideais quando comparados aos demais materiais poliméricos. Contudo, é possível obter hidrogéis com boas propriedades mecânicas a partir da formação de materiais classificados inteligentes (*smart material*), pois estes mudam as suas propriedades, conforme o ambiente (MOURA *et al.*, 2008; SOUSA, 2009; BERGER *et al.*, 2004, DRAGAN, 2014). Estímulos físicos, tais como temperatura, campos elétrico ou magnético e tensão mecânica, vão alterar as interações moleculares. Estímulos químicos, tais como pH, fatores iônicos e agentes químicos, vão alterar as interações entre cadeias do polímero ou entre cadeias do polímero e do solvente em nível molecular (BUWALDA *et al.* 2014; HONEY *et al.* 2014), podendo assim, melhorar as suas propriedades mecânicas.

Os hidrogéis podem ser formados pela reticulação de um polímero (sintético ou natural), pela mistura de dois polímeros (sintéticos-sintético; sintético-natural ou natural-natural) ou ainda pela mistura de um polímero (sintético ou natural) com um copolímero.

Ni *et al.* (2010) produziram um hidrogel superabsorvente composto de alginato de sódio e ácido acrílico com o objetivo de melhorar a liberação gradativa de fertilizantes e, ao mesmo tempo, com a função de reter água. Esta combinação de polímero sintético e natural pode ajudar a manter a água por meio da capacidade de absorção do poli (ácido acrílico), enquanto melhora parcialmente sua degradabilidade.

Babuet *et al.* (2010) produziram um hidrogel composto pela combinação de dois polímeros naturais (alginato de sódio e quitosana) e o metacrilato de 2-hidroxietila. Nanopartículas de prata foram incorporadas a esse hidrogel após o nitrato de prata (AgNO_3) ser reduzido com borohidreto de sódio (NaBH_4) a temperatura ambiente. Esse hidrogel com as nanopartículas de prata mostrou ter atividade antibactericida contra *Escherichia coli*, mostrando ser um excelente antibiótico.

Os bio-hidrogéis preparados nesta Tese foram constituídos por dois polímeros naturais (polissacarídeos), sem a presença de reticulante.

1.1. Polissacarídeos

Polissacarídeos representam uma classe de macromoléculas de grande interesse. São carboidratos de alta massa molecular, constituídos de monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas. Os polissacarídeos não diferem apenas da natureza de seus monossacarídeos, mas também no comprimento de suas cadeias e na quantidade de cadeias ramificadas (VENUGOPAL, 2011). São produzidos a partir de fontes renováveis, incluindo plantas, sementes, animais, microorganismos, frutas, vegetais e microalgas. Os materiais biologicamente produzidos a partir de polissacarídeos possuem uma combinação única de propriedades funcionais e características favoráveis ambientalmente.

Nos últimos anos, a ciência tem apresentado um grande interesse em relação aos polissacarídeos. Uma vez, que eles correspondem às exigências de métodos de extração e processamento favoráveis ao ambiente, abundância, versatilidade, potencial biocompatibilidade e biodegradabilidade, fontes renováveis e baixo custo. Além disso, a boa reatividade química e a possibilidade de usar uma química bastante simples permite modificar suas propriedades finais (LAURIENZO *et al.*, 2015).

Polímeros naturais são principalmente utilizados em fármacos, como agentes de suporte de fármacos ou agentes antimicrobianos (RABEA *et al.*, 2003; ALTAF *et al.*, 2008; MOGOSANU *et al.*, 2014; BELLINI *et al.*, 2012; NOGUEIRA *et al.*, 2010; KUNDU, 2014), anti-inflamatórios ou modificadores de coagulação (KARAVAS *et al.*, 2014; GOMES *et al.*, 2014; LACERDA *et al.*, 1998), na engenharia de tecidos (DRURY *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2001; HUTMACHER, 2001; BELLINI *et al.*, 2015; KATTI, K. S. 2004; WIE *et al.*, 2004) e curativos em feridas (VEIGA *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2008; MENG *et al.*, 2010).

Os polissacarídeos em sua forma nativa não são capazes de produzir hidrogéis com boa estabilidade, a qual é uma condição essencial para uso como sistema de liberação controlada de nutrientes no solo (GUILHERME *et al.*, 2015). Hidrogéis à base de polissacarídeos podem ser preparados por reticulação química, física ou por ambas. A principal razão para concentrar a atenção nos polissacarídeos é certamente devido à sua versatilidade acompanhada pela biocompatibilidade e biodegradabilidade (BORGOGNA *et al.* 2011).

Os polissacarídeos podem ser classificados como não-polieletrólitos e polieletrólitos, os quais se dividem em positivamente e negativamente carregados. A conformação das cadeias dos polissacarídeos não é só dependente do pH e da força iônica do meio, mas também da temperatura e da concentração de determinadas moléculas (ALVAREZ-LORENZO *et al.*, 2013).

Nesta Tese foram preparados bio-hidrogéis a partir de um complexo polieletrólítico formado por um polissacarídeo aniônico (alginato de sódio) e outro polissacarídeo catiônico (quitosana).

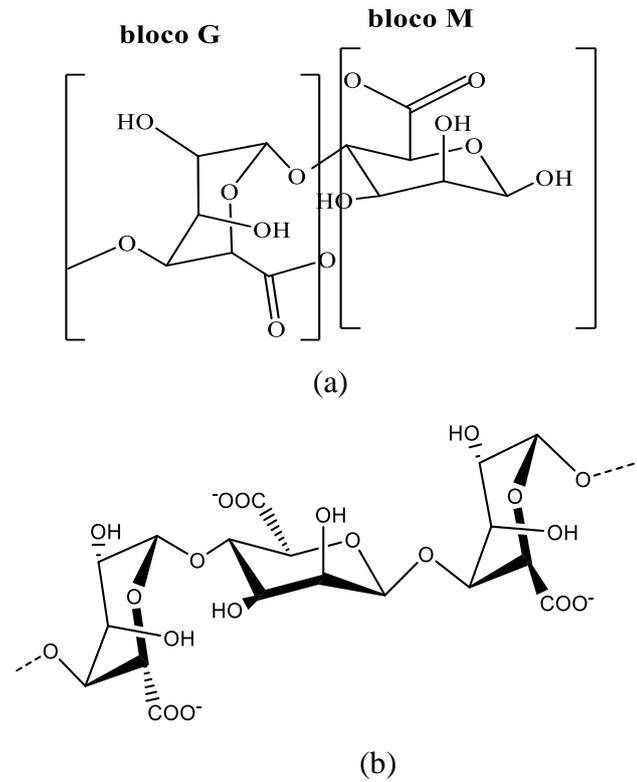
1.1.1. Alginato de sódio

Alginato é um polissacarídeo extraído de sua principal fonte, as algas marrons de espécies como *Macrocystis*, *Ascophyllum*, *Laminaria*, *Ecklonia* e *Sargassum*. Entretanto, o alginato pode ser obtido, também, a partir da biossíntese, utilizando-se microrganismos do gênero *Pseudomonas* e *Azotobacter*. Possui uma estrutura linear constituída por unidades de ácido β -D-manurônico (M) e de ácido α -L-gulurônico (G) ligadas por ligações glicosídicas, no qual varia em quantidade e na distribuição sequencial desses blocos ao longo da cadeia, dependendo da alga marinha que foi extraído (Figura 2). Longos blocos GG (6 a 10 unidades) fazem com que esse polissacarídeo seja rígido, forme géis mais fortes e tenha maior capacidade de formar complexo com íons divalentes (CUNHA *et al.*, 2009, LEE *et al.*, 2012).

O alginato é extensamente utilizado devido às suas propriedades espessantes, estabilizantes e gelificantes. Possui excelente biocompatibilidade, biodegradabilidade, hidrofiliçidade, porosidade, baixa toxicidade, baixo custo, e ainda apresenta uma habilidade em formar géis com cátions divalentes. Sendo assim, encontra aplicação na indústria de alimentos, na indústria têxtil e de papel, em cosméticos e na área farmacêutica e médica (MÜLLER *et al.*, 2011). Por ser um biopolímero com capacidade de reter grandes quantidades de fluidos, torna-se altamente adequado em aplicações na área biomédica, onde é extensivamente utilizado, principalmente, como substrato para cultura de células e liberação de fármacos (BAYSAL *et al.*, 2013, HECHT *et al.*, 2016).

Rassuet *al.* (2016) prepararam hidrogéis a partir da combinação de quitosana e alginato para liberação controlada de deferoxamina (DFO). DFO é um fármaco solúvel em água, com propriedades quelantes na captura de ferro livre presente tanto no plasma quanto nas células. Entretanto, ele apresenta limitações quanto ao seu uso clínico devido a sua má absorção pelo intestino. O hidrogel produzido serviu como transporte e liberação de DFO, atuando como apoio estrutural (cicatrização de fraturas) ou agente embólico e, em seguida, ele é absorvido pelo organismo após ter cumprido a sua função.

Figura 2 - Estrutura química do alginato



Legenda: (a) alginato e (b) alginato carregado negativamente.
 Fonte: A autora, 2018.

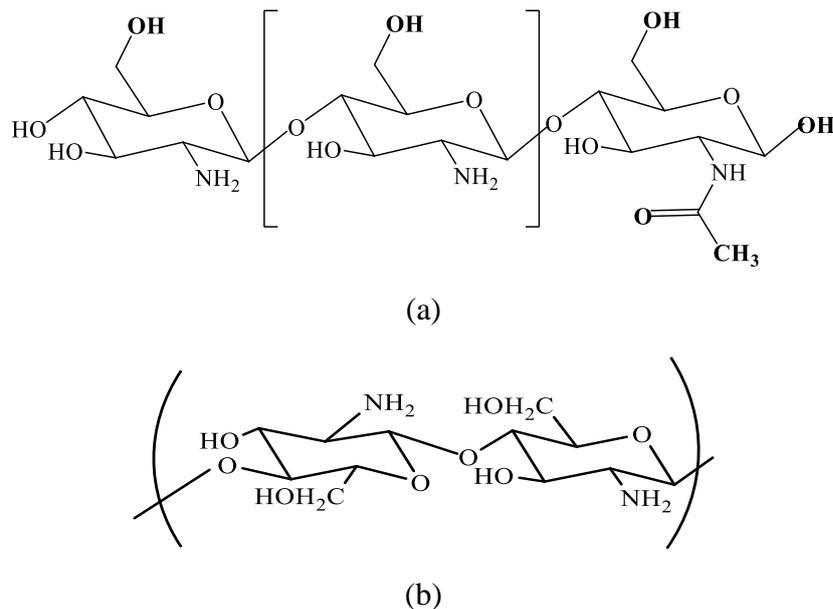
Marrella *et al.* (2017) produziram hidrogéis híbridos dealginato de sódio (ALG) funcionalizado com óxido de grafeno (OG) com a finalidade de obter um biomaterial com boas propriedades mecânicas para aplicações na engenharia de tecidos. Óxido de grafeno tem se tornado um dos mais promissores e interessantes materiais em diferentes áreas inclusive na biomedicina. Os pesquisadores conseguiram demonstrar que OG pode atuar tanto como um reforço eficaz como um ativador biológico em alginatos hidrofílicos. O composto formado pelo biopolímero (ALG) e óxido de grafeno (OG) possui um grande potencial a ser desenvolvido para aplicação na biomedicina.

1.1.2. Quitosana

Quitosana é o segundo biopolímero natural mais abundante depois da celulose. Possui uma cadeia linear obtida a partir da N-desacetilação da quitina, que é um constituinte da carapaça

de crustáceos e de paredes celulares de fungos (KUBOTA *et al.*, 2000). A estrutura química da quitosana parcialmente desacetilada é constituída por unidades β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose e β -(1 \rightarrow 4)-2 acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose (Figura 3a). Se totalmente desacetilada, a quitosana é constituída somente por unidades β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose (Figura 3b).

Figura 3 - Estrutura química da quitosana

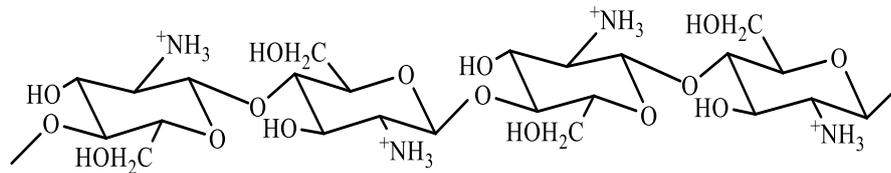


Legenda: (a) parcialmente desacetilada e (b) totalmente desacetilada.
Fonte: A autora, 2018.

Em fungos, a ocorrência da quitosana é menor do que quando retirada da quitina. Em soluções ácidas, a quitosana forma um polícatión por protonação dos grupos amino livres na cadeia polimérica (Figura 4).

Devido à sua abundância, à natureza de sua configuração química e a propriedades, tais como, não toxicidade, hidrofiliçidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e propriedades antibacterianas, os materiais formados por quitosana têm sido largamente empregados tanto na forma de filmes, como de géis e esferas, para os mais diversos fins, como na agricultura, em produtos de higiene pessoal, em cosméticos, na indústria alimentícia e no tratamento de água e esgoto. Esses materiais podem ser utilizados, também, em diversas áreas tecnológicas como da biotecnologia, em produtos biomédicos (pele artificial, adesivos cutâneos ou curativos, lentes de contato, etc.) e sistemas de liberação controlada de fármacos (BERGER *et al.*, 2004; KUMAR, 2000; DOMARD *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2005; LONGHINOTTI *et al.*, 1998).

Figura 4- Forma protonada da quitosana



Fonte: A autora, 2018.

A massa molar e o grau de desacetilação (GD) afetam diretamente as propriedades químicas e biológicas do polímero (Tabela 1) (GONÇALVES *et al.*, 2011; OGAWA, 1992; OGAWA *et al.*, 1993). Segundo Dash *et al.*, 2011, a degradação da quitosana é influenciada pelo grau de desacetilação (GD). Quanto maior é o grau de desacetilação maior quantidade de grupos amino e maior a sua resistência à degradação.

Tabela 1 - Relação entre as propriedades e parâmetro estruturais da quitosana

Propriedades	Características estruturais
Solubilidade	Aumenta GD ^(a)
Cristalinidade	Diminui GD
Biodegradabilidade	AumentaGD e diminui M _v ^(b)
Viscosidade	Aumenta GD
Biocompatibilidade	Aumenta GD

Legenda: (a) GD – grau de desacetilação; (b)M_v–massa molar.

Fonte: DASH *et al.*, 2011.

Zhuang *et al.* (2012) produziram um biomaterial a partir da combinação de quitosana e poli(álcool vinílico) (PVA) com o objetivo de ser aplicado na regeneração de tecidos. Um método eficaz para superar as desvantagens da quitosana é misturá-la com um polímero sintetizado para desenvolver um compósito e obter melhorias quanto à flexibilidade e molhabilidade.

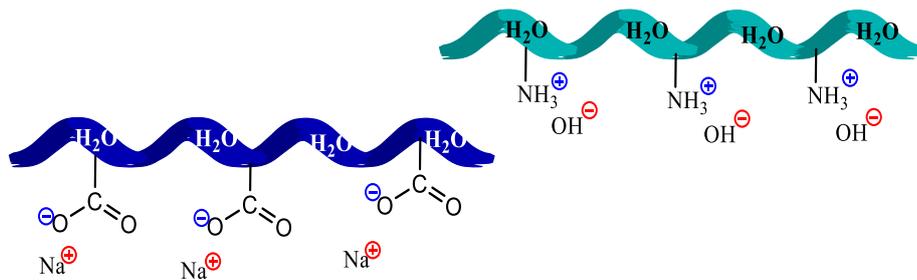
Unagolla *et al.* (2015) sintetizaram a quitosana a partir de crustáceos a fim de ser investigada a sua utilização para retirada de metais pesados, cádmio (II) e chumbo (II), em águas residuais. Estudos cinéticos foram conduzidos para os sistemas usando diferentes valores de pH na solução inicial de íons metálicos e dois níveis diferentes de grau de desacetilação (GD) de

quitosana. Foi observado o aumento da capacidade de remoção dos metais pesados pela quitosana à medida que os valores de pH e GD aumentam.

1.2. Complexo polieletrólítico (PEC)

Polieletrólitos são polímeros com grupos ionizáveis ao longo da cadeia, classificados em aniônicos e catiônicos, de acordo com seu grupo funcional. Em solventes polares, como a água, estes grupos podem dissociar-se deixando as cadeias poliméricas carregadas e liberando contraíons em solução (Figura 5).

Figura 5 - Modelos de polieletrólitos

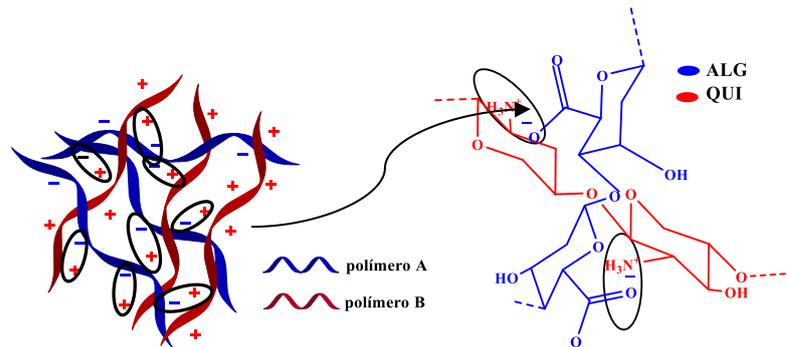


Fonte: A autora, 2018.

Complexos polieletrólíticos (PEC) são formados quando polieletrólitos de cargas opostas interagem por atração eletrostática em solução aquosa e passam a conferir propriedades únicas que diferem de cada componente isoladamente (FOLCHMAN-WAGNER *et al.* 2017) (Figura 6). As interações eletrostáticas constituem as principais forças atrativas para formação de complexos polieletrólitos, como por exemplo, as interações entre os grupos amina (NH_3^+) da quitosana e os grupos carboxilatos (COO^-) do alginato (COIMBRA *et al.*, 2011). Entretanto, outros diferentes tipos de interações podem ocorrer, tais como: ligações de hidrogênio, forças dipolo iônicas e interações hidrofóbicas, que frequentemente, desempenham um papel significativo na determinação das estruturas finais (DAKHARA *et al.* 2010).

Nas estruturas formadas entre quitosana e alginato, por exemplo, a presença de grupos funcionais polares nas moléculas resulta em interações intermoleculares muito fortes e elevada orientação da matriz formada, podendo resultar em melhores propriedades mecânicas (RASHIDOVA *et al.*, 2004).

Figura 6 - Representação esquemática de complexo polieletrólito (PEC)



Fonte: adaptado de Cunha, 2005.

A formação, estabilidade e propriedades finais dos PEC são influenciadas significativamente por diversos fatores tais como o grau de ionização de cada um dos polímeros carregados com cargas opostas, distribuição e densidade das cargas na cadeia polimérica, concentração dos polímeros, razão e ordem da mistura, grau de desacetilação (quitosana), massa molecular, bem como tempo e temperatura de agitação, força iônica e pH do meio de reação (KUMAR *et al.*, 2013; COIMBRA *et al.*, 2011; HAMMAN, 2010; BIGUCCI *et al.*, 2008).

O efeito do pH nas cadeias de um polieletrólito é bastante significativo para a formação do complexo (PEC). É observado que em pH básico ocorre uma maior intensidade de cargas negativas devido à desprotonação de grupamentos iônicos do polieletrólito aniônico; enquanto que, em pH ácido ocorre a protonação de grupamentos iônicos do polieletrólito catiônico (BERGER *et al.*, 2004). Assim, o processo de formação de um hidrogel, formado por um PEC, depende da concentração do reagente, da força iônica, do pH, da temperatura, da ordem de mistura, da flexibilidade e da composição química de cada polímero (KULIG *et al.*, 2016).

Kulig *et al.* (2016) produziram biomateriais baseados na complexação de entre os dois polieletrólitos; alginato (carregado negativamente) e quitosana (carregado positivamente), com o intuito de preparar filmes para embalagens utilizado na indústria alimentícia. Nesse estudo, eles puderam constatar a complementação das propriedades de cada um dos polissacarídeos. Os filmes produzidos tiveram melhorias tanto na flexibilidade, devido à presença do alginato, quanto na resistência térmica, devido à presença da quitosana.

Argin-Soysal *et al.* (2009) prepararam microcápsulas à base de xantana (poliânion) e quitosana (policátion), e investigaram os efeitos causados pela variação do pH e de diferentes concentrações de cada polissacarídeo. Os resultados deste estudo mostraram que as propriedades finais do complexo (xantana-quitosana) podem ser facilmente controláveis pela mudança desses parâmetros (pH e concentração) para melhoria nas propriedades.

Até o presente momento, não foram encontrados muitos trabalhos na literatura que tenham estudado o preparo de um biohidrogel a partir da formação de um PEC constituído por alginato de sódio e quitosana, para fins de aplicação do material final na área da agricultura. Nesta Tese, foram preparados bio-hidrogéis pela complexação de alginato de sódio com a quitosana para liberação gradativa de glifosato.

Para o agronegócio, principalmente, em sistemas de liberação gradativa de nutrientes e herbicidas, as principais propriedades que tornam os hidrogéis como fortes candidatos são: atoxidade; biodegradabilidade; variação de propriedades em função de estímulos externos (pH e temperatura); alta hidratação em um curto período de tempo e a capacidade de liberação gradativa e prolongada de herbicidas.

1.3. Aplicação de hidrogel na agricultura

O Brasil se tornou uma das grandes potências agrícolas do mundo. A competitividade da agricultura brasileira tem assegurado a crescente inserção do país no mercado agrícola internacional. Consequentemente, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo e tem o maior mercado destes produtos em âmbito mundial.

Segundo a Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO) 70% dos alimentos *in natura* consumidos no país estão contaminados por agrotóxicos. Desses, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 28% contêm substâncias não autorizadas (www.mundosustentavel.com.br/2015/ acessado em 06/2015). Estima-se que somente 0,1 % dos agrotóxicos aplicados no combate às pragas são, de fato, efetivos (SANTOS SILVA *et al.* 2012). O restante, se dispersa no meio ambiente. Dessa forma, torna-se importante estudar meios de se melhorar a produção agrícola sem prejudicar o meio ambiente e, intrinsecamente, os seres humanos.

Assim, faz se necessário, conforme o quarto princípio da química verde, o desenvolvimento de novas tecnologias que após realizarem a função desejada, não causem danos ao meio ambiente (LENARDÃO *et al.* 2003). A grande diversidade de estruturas químicas e de propriedades físicas exibidas pelos polissacarídeos tem sido extensivamente explorada no desenvolvimento de um grande número de sistemas de liberação de fármacos destinados às mais diversas aplicações. No ramo da agricultura, ainda existem poucos trabalhos onde tenha sido avaliada a aplicação de polissacarídeos na liberação controlada de insumos

agrícolas.

Azevedo *et al.* (2002) reuniram diversas informações da literatura a respeito do uso de hidrogéis na agricultura como condicionadores de solo, ou seja, produtos que promovem a melhoria das propriedades físicas, físico-químicas ou da atividade biológica do solo. Os efeitos benéficos dos hidrogéis, como aumento da retenção de água no solo, redução da lixiviação de nutrientes, melhoria na capacidade de troca catiônica (CTC) e maior disponibilidade de água para as plantas indicaram este material como sendo promissor para ser usado na agricultura irrigada, principalmente, pela habilidade em armazenar e disponibilizar água para as plantas.

Moreira (2011) demonstrou que os hidrogéis compostos por acrilato de sódio podem ser considerados como promissores para serem aplicados em diferentes campos na agricultura, destacando a liberação controlada de insumos agrícolas, por apresentarem grande capacidade de absorção de água e nutrientes em forma de soluções nutritivas, assim diminuindo o *stress* hídrico causado nas épocas de estiagem.

Bortolin *et al.* (2012) avaliaram a aplicação de hidrogéis à base de acrilamida (AAm) e metilcelulose (MC) como veículo potencial para a liberação controlada de fertilizantes (nitrato de amônio e fosfato de potássio). Foram preparadas amostras formadas por diferentes concentrações de acrilamida e metilcelulose e avaliou-se a cinética de adsorção e dessorção dos fertilizantes. Os resultados mostraram que a adição da metilcelulose nas cadeias de poli(acrilamida) provocou um aumento na quantidade de fertilizante adsorvido e aumentou o tempo e a quantidade de fertilizantes liberados. Além disso, tanto o processo de adsorção como o de liberação controlada foram fortemente influenciados pelas propriedades hidrofílicas (razão AAm/MC) dos hidrogéis produzidos. Os autores concluíram que os hidrogéis (AAm/MC) foram potencialmente viáveis para serem utilizados na liberação controlada dos fertilizantes estudados.

Yang *et al.* (2015) estudaram hidrogéis superabsorventes de copolímeros de acrilato de sódio, para irrigação na agricultura. Eles investigaram os efeitos deste hidrogel na distribuição de umidade durante a infiltração e evaporação. A aplicação destes hidrogéis na camada intermediária da raiz foi útil para aumentar o teor de água do solo, inibir a evaporação da água do solo na camada inferior e facilitar a conservação da umidade.

Pereira *et al.* (2017) produziram dois sistemas de nanopartículas, um deles à base de alginato/quitosana (ALG/QUI) e o outro à base de quitosana/tripolifosfato (QUI/TPP). O objetivo desses dois sistemas foi investigar a liberação do hormônio do ácido giberélico (GA_3). Giberelinas são uma classe de diterpenóides tetracíclicos, um hormônio responsável pelo desenvolvimento da planta. Os resultados apresentados nesse artigo mostraram que em ambos os sistemas desenvolvidos o encapsulamento do hormônio foi eficiente. Entretanto, a liberação foi

mais eficiente no sistema ALG/QUI.

1.3.1. Glifosato

O glifosato é o ingrediente ativo com destaque nas formulações de herbicidas, representando, em 2012 uma grande parcela do mercado com mais de 180.000 toneladas em vendas (IBAMA, 2012). O glifosato tornou-se o herbicida mais comercializado do mundo para o controle de ervas daninhas em áreas agrícolas e não-agrícolas (AGUIAR *et al.*, 2016) sendo sintetizado pela primeira vez em 1950 por Henri Martin, um pesquisador de uma empresa farmacêutica suíça (CILAG) e mais tarde pela Aldrich Chemical Co. (FRANZ *et al.*, 1997; DILL *et al.*, 2010). Sua ação herbicida foi descrita por Bairde colaboradores em 1971 e reivindicada pela Monsanto que, mais tarde, introduziria esse composto no produto formulado Roundup®.

A exposição de organismos aquáticos a esse poluente é uma preocupação de muitos ecotoxicologistas. Diversos estudos *in vitro* e *in situ* revelaram o potencial efeito mutagênico e carcinogênico do glifosato (BOLOGNESI *et al.*, 1997; LIN *et al.*, 2000) assim como seu impacto à vida aquática (TSUI *et al.*, 2003).

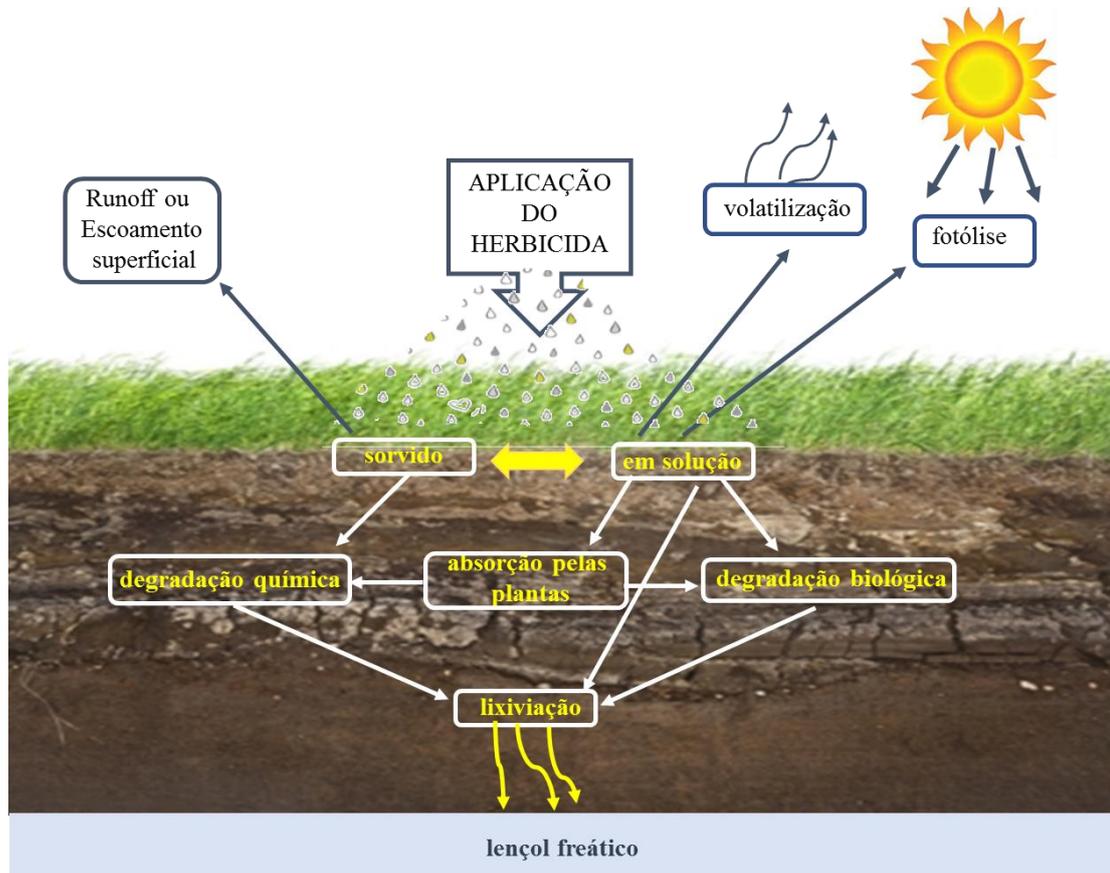
Atualmente o estudo de comportamento de herbicidas no solo tem sido descrito como a transformação, o transporte e a retenção que os herbicidas podem sofrer no solo. A Figura 7 mostra as possibilidades de movimentação de um herbicida no ambiente.

O glifosato (N-(fosfonometil) glicina), cuja fórmula é $C_3H_8NO_5P$ (Figura 8), é um herbicida de amplo espectro, não seletivo e utilizado mundialmente contra uma grande variedade de plantas daninhas em vários tipos de cultura (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002a). O glifosato faz parte do grupo dos fosfanados, grupo de compostos que apresenta estrutura similar a classe dos organofosforados, diferenciando apenas com relação à substituição de um dos átomos oxigênio ligado ao fósforo por um grupo de aminoácido simples chamado de glicina (BAIRD, C. 2002).

O glifosato não é metabolizado pela planta, razão pela qual não apresenta seletividade. Devido a isto, praticamente toda a concentração do ingrediente ativo aplicado chega ao solo na sua forma original. Estudos realizados no meio ambiente mostram que os solos apresentaram as maiores concentrações de glifosato. Segundo LIU *et al.* 1991, a degradação do herbicida glifosato no solo segue duas rotas. A primeira consiste na transformação do glifosato em ácido aminometilfosfônico (AMPA) pela ação da bactéria *Flavobacterium sp* (AMARANTE JUNIOR

et al, 2002). A segunda é pela clivagem C-P do glifosato produzida pela bactéria *Agrobacterium radiobacter*, resultando sarcosina (Figura 8).

Figura 7 -Movimentação de um herbicida no ambiente



Fonte: A autora, 2018.

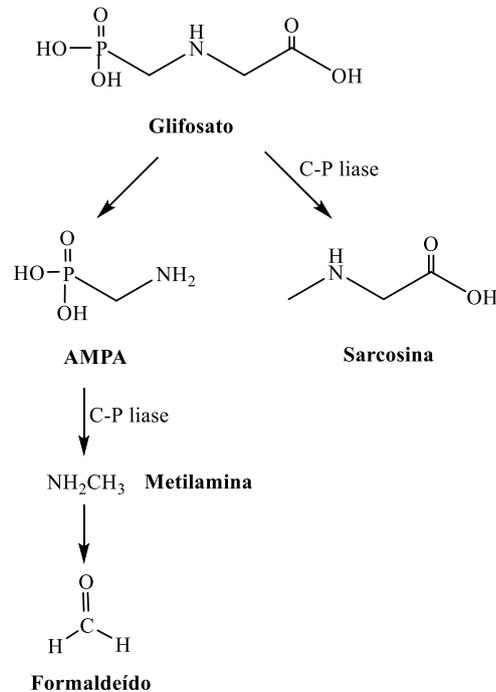
Uma característica importante do glifosato é sua capacidade de ser adsorvido pelas partículas do solo e permanecer inativo até a sua completa degradação. O glifosato é rapidamente degradado por microrganismos do solo, sendo que sua meia-vida média (tempo médio necessário para que metade da quantidade aplicada do produto seja degradado) é de 32 dias (GIESY *et al.*, 2000).

Em condições ambientais, o glifosato é muito solúvel em água e quase insolúvel em solventes orgânicos comuns, tais como etanol e cetona. Funde a 200°C e possui grande estabilidade em presença da luz, inclusive em temperaturas acima de 60°C (British Crop Protection Council, 2015).

A molécula de glifosato apresenta comportamento zwitteriônico, ou seja, possui a capacidade de apresentar cargas positivas e negativas ao mesmo tempo devido ao seu caráter anfótero, o qual faz com que ele possa atuar como ácido e base fracos ao mesmo tempo

(AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002).

Figura 8 -Estrutura química doN-(fosfonometil) glicina(glifosato) e de seus principais produtos de degradação o ácido aminometilfosfônico(AMPA) e a sarcosina



Fonte: AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002.

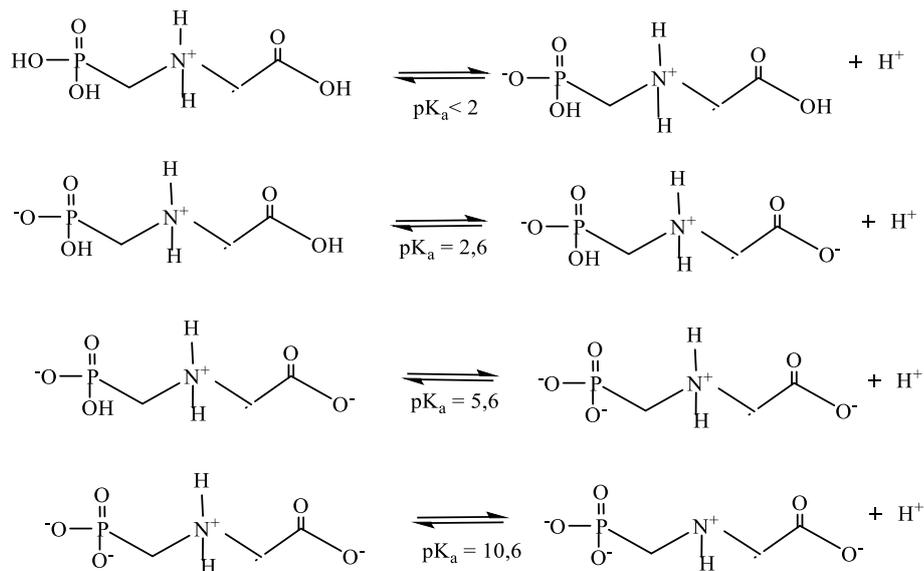
A Figura 9 apresenta as dissociações da molécula de glifosato conforme o seu comportamento zwitteriônico. Em $pK_a < 2$, cujo pH está abaixo de 0,8, a molécula do glifosato se apresenta com uma protonação no grupo amina. Em pH 2,2, tem-se predominância da forma molecular com uma dissociação (PO_2H^-) e uma protonação (NH_2^+), sendo que, 50% do composto já possuirá duas dissociações, embora mantenha a protonação no grupamento amina. Entre pH 2,2 - 5,4, o herbicida se mostra com predominância da forma com duas dissociações, tendo 50% das moléculas com três dissociações em pH 5,4. A partir de pH 5,4 até 10,2, tem-se três dissociações. Nesta forma, o pH da molécula de glifosato se apresenta com três e quatro dissociações. O glifosato se apresenta totalmente dissociado em pH acima de 11 (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002a) (Figura 9).

Desde que foi introduzido no mercado de defensivo agrícola, o uso do glifosato tornou-se uma prática frequente, devido à sua grande eficácia contra plantas daninhas, apresentando mais de 750 formulações registradas (Glifosato AKB 480; Roundup® Original; Roundup® Transorb; Touchdown®; Glifos®; Rodeo® (TONI *et al.*, 2006; DOMINGUÉZ *et al.*, 2016). As formulações comerciais variam na composição química de acordo com as suas aplicações,

podendo apresentar maior ou menor toxicidade (WEBSTER *et al.*, 2014).

O glifosato, além de ser usado como herbicida no Brasil, também é uma das substâncias oficialmente usadas pelo governo norte-americano no Plano Colômbia, que há 15 anos destina-se a combater as plantações de coca e maconha na Colômbia. (www.mundosustentavel.com.br/2015/ acessado em 01/2017).

Figura 9 -Dissociação do glifosato de acordo com seu comportamento zwitteriônico



Fonte: AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002.

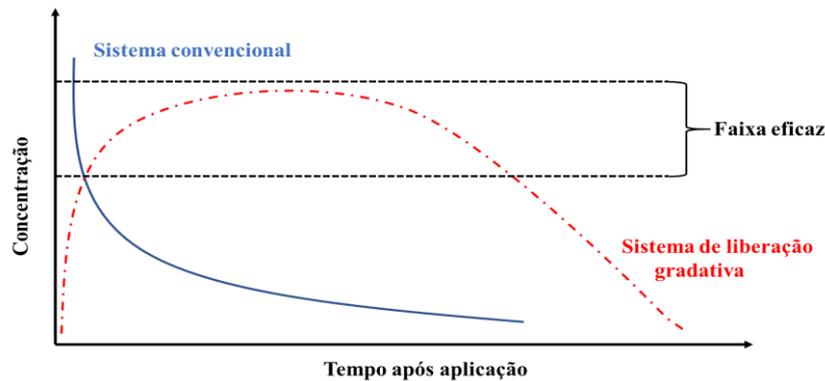
Sendo assim, a preocupação crescente com a preservação e com a conservação ambiental tem resultado na busca de tecnologias para a implantação de sistemas de produção agrícola com enfoques ecológicos, rentáveis e socialmente justos. O enfoque agroecológico se orienta para o uso responsável dos recursos naturais (solo, água, ar, flora, fauna, energia e minerais). Dentro deste contexto, esta Tese visa o desenvolvimento de soluções tecnológicas baseadas na utilização de polímeros naturais, não poluentes, para uma agricultura sustentável a partir de sistemas baseados em liberação gradativa, os quais propiciarão a redução do uso de agrotóxicos.

1.3.2. Hidrogéis como sistemas de liberação gradativa

O termo liberação gradativa tem sido utilizada em sistemas que possuem a capacidade de liberar de forma contínua e prolongada uma determinada substância. Os estudos de liberação gradativa, inicialmente desenvolvidos para fármacos, vêm sendo utilizados, também, para

insumos agrícolas (fertilizantes, nutrientes, herbicidas, etc.) (Figura 10) (GRILLO *et al.*, 2010b, 2011; FERNÁNDEZ-PÉREZ *et al.*, 2010, 2011; SILVA *et al.*, 2010, LOBO *et al.*, 2011).

Figura 10 - Representação esquemática de um sistema convencional e um sistema de liberação gradativa para aplicação de herbicidas



Fonte: A autora, 2018 (adaptado ANSEL, *et al.* 2007).

Os sistemas de liberação gradativa podem conduzir a diversas vantagens, tais como: redução na quantidade de substância química; diminuição no risco de contaminação ambiental; redução na quantidade de energia gasta, uma vez que se reduz o número de aplicações necessárias comparadas com os sistemas convencionais; aumento da segurança das pessoas responsáveis pela aplicação do produto no campo (GRILLO *et al.* 2010; EZEONU *et al.*, 2012).

A utilização de sistemas constituídos por diversos tipos de polímeros (naturais e/ou sintéticos) é uma das técnicas de liberação gradativa mais utilizada devido às suas vantagens, tais como, versatilidade; eficácia; baixo custo; produção que utiliza equipamentos e técnicas convencionais (LYRA, 2007).

Alemzadehe Vossoughi (2002) estudaram o comportamento de liberação controlada do herbicida Paraquat em hidrogéis formados por poli(álcool vinílico) reticulado com glutaraldeído. Esses autores observaram que o processo de liberação do herbicida é fortemente dependente da concentração do agente de reticulação, apresentando pequeno grau de liberação do herbicida quando este se encontra confinado em hidrogéis reticulados com altos valores de glutaraldeído.

Isiklan (2007) preparou esferas de alginato para aplicação na liberação controlada do inseticida *Carbaril* ($C_{12}H_{11}NO_2$). Foram preparadas diferentes formulações em que o alginato de sódio foi reticulado com íons cálcio e níquel. Os resultados mostraram que a liberação do inseticida a partir dos hidrogéis de alginato de cálcio foi menor do que com os hidrogéis de alginato de níquel. Além disso, a taxa de liberação diminuiu quando se aumentou a concentração do reticulante.

Aouada (2009) estudou a aplicação de hidrogéis de poliacrilamida e metilcelulose na liberação controlada do pesticida *Paraquat* ($C_{12}H_{14}Cl_2N_2$). De um modo geral, a velocidade inicial de liberação foi rápida, diminuindo após alguns dias, indicando que as moléculas de Paraquat na superfície dos hidrogéis se difundiram rapidamente após o inchamento inicial do gel. Após isso, a liberação do pesticida ocorreu de modo controlado, com a concentração de Paraquat mantendo-se constante de 15 a 46 dias. A capacidade de liberação do Paraquat mostrou-se dependente do inchamento da matriz e da densidade de cadeias da rede.

Maruyama *et al.* (2016) produziram nanopartículas de alginato/quitosana (ALG/QUI) e quitosana/tripolifosfato (QUI/TPP) para encapsulamento do herbicida imazapic e imazapyr, herbicidas considerados seletivos para as culturas do amendoim, milho e cana, não sendo tóxico às culturas, controlando plantas daninhas. As nanopartículas apresentaram estáveis durante trinta dias de armazenamento a temperatura ambiente. O encapsulamento foi considerado eficiente entre 50 e 70% adsorção do herbicida imazapic e imazapyr. A análise de solo revelou que as nanopartículas de ALG/QUI apresentaram os melhores resultados em termos da diminuição da toxicidade e da efetiva ação herbicida no solo.

O Brasil lidera, desde 2010 o mercado de defensivos agrícola com ação herbicida representando 33% (2.428 milhões de dólares) das vendas em todo país (SINDAG, 2012). Esse consumo excessivo é devido a dois fatores: aumento da atividade agrícola, fazendo do país um dos maiores produtores de alimento do mundo e o aumento significativo de área plantada de culturas geneticamente modificadas do mundo (23%). O aumento do plantio dessas culturas, principalmente, a soja transgênica, tem levado ao aumento do uso de herbicidas com destaque especial para o glifosato e isso tem elevado em muito o aparecimento de doenças como deficiência de crescimento e / ou atraso mental (GOMES *et al.*, 2014; CATTANI *et al.*, 2014, PAGANELLI *et al.*, 2010). BENACHOUR e SÉRALINI (2009) demonstraram que as formulações de glifosato induzem a morte das células e necrose nas células umbilicais, embrionárias e placentárias humanas. No entanto, o glifosato, é um dos herbicidas mais consumidos no mercado brasileiro.

Assim, os hidrogéis (sistemas hidrofílicos) quando intumescidos podem atuar como um sistema de liberação gradativa de substâncias solúveis em água. Neste caso, um herbicida pode ser inserido no biohidrogel, e este no solo (HOFFMAN, 2002).

Com o intuito de investigar as interações responsáveis pela formação do complexo polieletrólítico (ALG/QUI) e, também, as interações entre o complexo e o herbicida (glifosato) quando incorporado ao biohidrogel, foi empregada a química computacional, cujo objetivo foi propor possíveis mecanismos através dos quais essas moléculas interagem entre si.

1.4. Estudos computacionais aplicados a polissacarídeos

O estudo de propriedades moleculares por meio de métodos de modelagem molecular já é percebido no meio científico como um forte aliado para um entendimento mais aprofundado de observações experimentais para diversos tipos de processos químicos e físicos, como: desenvolvimento de novos materiais, sistemas catalíticos, sistemas moleculares excitados, etc. (COELHO *et al.* 1999; WINKLER *et al.* 2002; MAZEAU *et al.* 2003; BAPTISTA *et al.* 2008; WANG *et al.* 2014; BHATTACHARYYA *et al.* 2015; NUNES *et al.* 2015; HAMMAMI *et al.* 2015; FARIA *et al.* 2016; XIAO *et al.* 2017). Estudos teóricos permitem a investigação de conformações e interações intramoleculares presentes em sistemas, desde os mais simples, como etano e butano, até os mais complexos, como proteínas. Assim, a modelagem molecular é atualmente uma importante ferramenta para auxiliar na compreensão dos efeitos que influenciam a estabilidade conformacional de moléculas (SOLOMONS *et al.*, 2009).

Devido ao elevado custo computacional requerido para simular polissacarídeos em nível mecânico-quântico, diversos trabalhos que empregam modelagem molecular representam os mesmos em unidades de tamanho reduzido (monômeros, dímeros, trímeros, tetrâmeros etc.) (AGULHON *et al.*, 2012; AKMAN, 2017; EMMANUEL; POGREBNOI; POGREBNAYA, 2015; GAO *et al.*, 2017; ONOKA; POGREBNOI; POGREBNAYA, 2014; PLAZINSKI, 2011; PLAZINSKI; DRACH, 2013; SIKORSKI *et al.*, 2007; TERREUX *et al.*, 2006). Além de uma questão de relação entre viabilidade computacional e acurácia das propriedades obtidas, a estrutura amorfa apontada por alguns estudos para o hidrogel formado pelos polissacarídeos alginato e quitosana, faz do modelo reduzido uma alternativa de representação razoável para ser implementada na modelagem computacional (SMITHA; SRIDHAR; KHAN, 2005; WANG; WANG; HUANG, 2017).

As interações entre polieletrólitos são amplamente relatadas como predominantemente eletrostáticas (FAJARDO *et al.*, 2012; HARTIG *et al.*, 2007; KULKARNI *et al.*, 2016; LANKALAPALLI; KOLAPALLI, 2009; LI *et al.*, 2016; SARIKA; PAVITHRAN; JAMES, 2015; WANG *et al.*, 2017). Estudos mostram que a formação do hidrogel composto pelos polieletrólitos, alginato de sódio e quitosana, ocorre por meio da quebra das ligações de hidrogênio intramoleculares presentes entre os grupos amino e as hidroxilas dentro da quitosana, resultando numa estrutura amorfa para o complexo (WANG; WANG; HUANG, 2017). Entretanto, importantes evidências apontam para a influência de outras contribuições no

complexo formado, como ligações de hidrogênio e forças de van der Waals (ALSHARABASY; MOGHANNEM; EL-MAZNY, 2015; FOLCHMAN-WAGNER; ZARO; SHEN, 2017; PATWEKAR *et al.*, 2016). Trabalhos indicam que a ligação de cátions Ca^{2+} nas cadeias de alginato ocorre por meio de um modelo de caixa de ovo, envolvendo ligações de hidrogênio intermoleculares (BRACCINI; PÉREZ, 2001; PLAZINSKI, 2011; PLAZINSKI; DRACH, 2013; SIKORSKI *et al.*, 2007). Um estudo envolvendo síntese e caracterização de um biocompósito alginato/quitosana/sílica mostra que o complexo formado é estabilizado por ligações de hidrogênio formadas entre os grupos NH_3^+ e COO^- (BALAURE *et al.*, 2013).

Outro fator importante está no papel desempenhado pelo contra-íon na formação do complexo, ainda longe de estar bem definido na literatura. O motivo está na difícil determinação, tanto da sua posição dentro do PEC, como da extensão de sua participação no processo de complexação (FU; SCHLENOFF, 2016). Alguns estudos sugerem ainda que a presença dos contra-íons no meio deve diminuir o número das ligações peptídicas, que unem as unidades sacarídeas, devido aos mesmos interagirem com os grupos funcionais presentes (VOLODKIN; KLITZING, 2014). Este apontamento também corrobora com a ideia de um modelo teórico contendo poucas unidades sacarídeas como representativo da interação entre ALG e QUI.

Uma aplicação com elevado interesse para o complexo ALG:QUI está no uso do mesmo como material para a liberação controlada de herbicidas em plantações agrícolas (CARNEIRO *et al.*, 2015; MARUYAMA *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2011; TEIXEIRA *et al.*, 1990). A interação do herbicida com o polímero é provavelmente o fator preponderante no mecanismo de liberação bioativa (KARAVAS *et al.*, 2007). Alguns estudos teóricos indicam a possível presença de ligações de hidrogênio, que teriam importante contribuição neste processo (BAKAR; ADAM, 2017; MURGUÍA-FLORES *et al.*, 2016). Papadopoulos e Sigalas (2010) verificaram que a interação do fármaco fluvastatina com ι - e λ -carragenas é principalmente impulsionada por ligações de hidrogênio, que deverão contribuir efetivamente para o controle da taxa de liberação do medicamento.

Desta forma, para haver contribuição efetiva no entendimento do mecanismo de liberação bioativa, deve ser estudado inicialmente a interação entre os polímeros iônicos (como alginato de sódio e quitosana) presentes na formação do gel responsável pela liberação do herbicida. Assim, o estudo apresentado a seguir visa simular esta interação com auxílio de um modelo computacional que represente adequadamente os polissacarídeos ALG e QUI, e, posteriormente, avaliar as possíveis interações destes com o herbicida de interesse, o glifosato.

1.5. Métodos computacionais

Para estudar as energias envolvidas nas várias conformações de uma molécula são necessários cálculos teóricos extensos, um problema que tem sido resolvido com a evolução dos métodos na química computacional. Os métodos computacionais utilizados na análise conformacional podem ser divididos em quânticos e clássicos. Os métodos quânticos são baseados em resoluções aproximadas da Equação de Schrödinger independentemente do tempo ($H\Psi = E\Psi$) (SZABO, 1989). Métodos clássicos utilizam recursos da física clássica, onde a evolução temporal do sistema é obtida resolvendo-se equações de movimento de Newton (MORGON *et al.*, 2007). Nos itens a seguir, os métodos e as equações de onda (conjunto base), aplicados no estudo da interação entre os dímeros de alginato e de quitosana, e do complexo formado com a molécula de glifosato, são descritos de forma simplificada como o intuito de auxiliar o leitor em sua compreensão dos resultados que serão apresentados e discutidos posteriormente.

1.5.1. Teoria funcional de densidade (DFT)

A teoria do funcional de densidade (do inglês, *Density Functional Theory* – DFT), é um método que permite a descrição de sistemas multieletrônicos através do uso da variável densidade (ρ). O desenvolvimento desta teoria como é conhecida hoje agrupou as contribuições de muitos pesquisadores. Em 1927, Thomas e Fermi desenvolveram um modelo para o cálculo de propriedades atômicas baseadas puramente na densidade eletrônica (JONES, 2015), cuja definição pode ser obtida a partir da interpretação probabilística do quadrado da função de onda Ψ , que fornece a densidade eletrônica para um dado sistema. A grande vantagem desse método está na diminuição da demanda computacional (MONTE *et al.*, 2011).

Atualmente, diversos artigos têm sido publicados explorando a aplicabilidade desse método DFT e o crescente aumento da popularidade se deve principalmente a possibilidade de estudar sistemas moleculares maiores, visto a disponibilidade de computadores mais rápidos e códigos computacionais mais eficientes capazes de lidar com sistemas maiores (FRENCH *et al.*, 2012). Embora a química computacional seja uma ferramenta poderosa para a exploração de conformações estáveis de moléculas, a análise conformacional envolvendo polissacarídeos é

ainda muito difícil devido aos numerosos graus de liberdade, principalmente pelo fato de existirem inúmeras possibilidades de arranjos de ligações de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares (MIURA *et al.*, 2006).

1.5.2. Funcional híbrido B3LYP

Funcional muito popular entre os funcionais híbridos para descrever o termo de troca - correlação - EXC[ρ]. Foi primeiramente sugerido por Becke (1993), sendo um híbrido de um funcional de troca exato Hartree-Fock com termos de correlação e troca local e gradiente corrigido, conforme mostra a Equação 1.

$$E_{XC}^{B3LYP} = (1-a)E_X^{LSDA} + aE_X^{HF} + b\Delta E_X^B + (1-c)E_C^{LSDA} + c\Delta E_C^{LYP} \quad (1)$$

Recentemente, o funcional B3LYP foi reformulado por Stevens e colaboradores (1987), que substituíram o funcional de correlação de Perdew-Wang, PW91, pelo funcional de Lee-Yang-Parr, LYP (KOCH; HOLTHAUSEN, 2002).

O grande sucesso do funcional B3LYP se deve a sua boa performance no tratamento de muitos processos químicos, incluindo algumas áreas muito complexas como a química de metais de transição de camada aberta.

1.6. Conjunto base

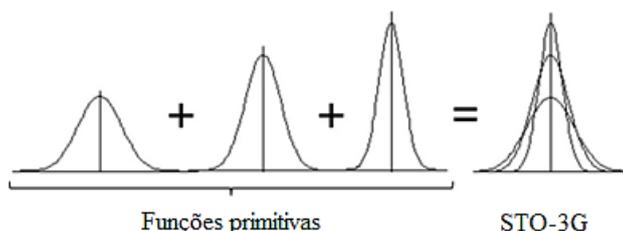
Conjunto base é um conjunto de funções matemáticas que quando combinadas fornecem uma descrição aproximada dos orbitais atômicos. Estas funções matemáticas são funções gaussianas que, quando somadas, geram uma função que se aproxima da função de Slater (STOs) (função que descreve o orbital do átomo de hidrogênio, encontrada diretamente pela equação de Schrödinger) (Figura 11). Esta função gerada por um grupo de gaussianas e multiplicada por uma função angular gera a simetria correta para o orbital (s,p,d etc.).

STO-3G é uma das bases popularmente conhecidas como conjunto base mínimo, ou seja, possui apenas o número de funções necessárias para descrever os orbitais ocupados de um átomo. Entretanto, para sistemas grandes e/ou que contenham átomos mais pesados, estes conjuntos base

não fornecem bons resultados.

Nesta Tese o conjunto base empregado é o 6-311+G(d,p). Esta notação significa que cada orbital interno (“core”) é descrito por seis funções gaussianas e os orbitais da camada de valência são descritos por três combinações de funções gaussianas, denominadas funções gaussianas contraídas (CGF’s). A primeira CGF é composta por uma combinação de três funções gaussianas primitivas e, as outras duas últimas contêm, cada uma, apenas uma gaussiana primitiva. Conjuntos base que possuem dois ou mais CGF’s para descrever orbitais da camada de valência são comumente denominados de “Split Valence”. Os conjuntos base 3-21G, 4-31G, 4-22G, 6-21G, 6-31G, etc., por exemplo, são chamados de *double zeta* por usar duas CGF’s para descrever os elétrons de valência (BINKLEY; POPLÉ; HEHRE, 1980; DITCHFIELD; HEHRE; POPLÉ, 1971), enquanto que a base 6-311G (KRISHNAN *et al.*, 1980) é chamada de *triple zeta* por usar três CGFs nesta mesma descrição.

Figura 11 - Representação gráfica da combinação de três funções gaussianas para representar uma função de Slater



Fonte: PRATES, 2017.

Alguns sistemas necessitam de maior flexibilidade para a descrição de certos processos ou propriedades, o que é obtido através da polarização das funções dos orbitais atômicos de valência, gerando as bases polarizadas. Com estas bases pode-se adicionar funções *p* para átomos de hidrogênio e funções *d* e *f* para átomos maiores, tais como carbono e oxigênio. Na notação destas bases, a função adicionada aparece entre parênteses ao lado do conjunto base (ex. 6-31G(d), 6-31(p), 3-21(d), etc.). Quando duas funções são adicionadas na mesma base, a primeira a ser colocada nos parênteses é relativa aos átomos mais pesados e a segunda aos mais leves. A notação com asterisco (*) também é comum, sendo que um asterisco representa adição de funções *d* para os átomos mais pesados e um segundo asterisco seria adição de funções *p* para os hidrogênios (ex. 6-31G* = 6-31G(d), 6-31G** = 6-31G(d,p)).

Para descrever orbitais que se estendem a distâncias muito grandes do núcleo, comumente são utilizadas funções de base difusas. Um sinal de “+” é adicionado na notação do conjunto base

para indicar que funções difusas foram adicionadas a átomos mais pesados do que o átomo de hidrogênio (ex. 6-31+G(d)). A presença de um segundo “+”, indica que funções difusas estão sendo acrescentadas para todos os átomos, inclusive o hidrogênio (ex. 6-31++G(d)) (LEACH, 2001).

1.7. Erro de superposição de base (BSSE)

A energia envolvida na interação entre duas espécies químicas A e B para a formação de um complexo AB pode ser obtida por meio do cálculo das energias absolutas das espécies individuais ($E(A)$ e $E(B)$) e também do complexo ($E(AB)$), como descrito pela Equação 2. Ressalta-se que energia absoluta é um termo utilizado para se referir à energia eletrônica obtida para uma dada espécie química por meio da resolução aproximada da equação de Schrödinger. Pode ser definida pelo somatório das energias cinéticas de todos os elétrons e de todas as energias envolvidas na atração elétron-núcleo e repulsão elétron-elétron e núcleo-núcleo (HAALAND, 2008).

$$E_{\text{int}(AB)} = E_{(AB)} - [E_A + E_B] \quad (2)$$

Onde, $E_{\text{int}(AB)}$ é a energia de interação intermolecular total envolvida no conjunto;

E_A refere-se à energia absoluta do dímero A e

E_B à energia absoluta do dímero B.

Na descrição das espécies A, B e AB pelo mesmo conjunto base, o complexo AB é descrito por um número de funções de base maior do que as espécies separadas. Como resultado, o valor da energia absoluta calculada para AB é superestimado, ou seja, mais negativo do que deveria ser e, conseqüentemente, a energia de interação também. A este erro é dado o nome de Erro de Superposição de Base (BSSE) e um dos métodos mais utilizados para a sua correção foi desenvolvido por Boys e Bernardi (1970).

1.8. Análise de Decomposição de Energia (EDA)

A análise de decomposição de energia (EDA) é uma ferramenta muito útil para ajudar no entendimento da natureza das interações intra e intermoleculares na formação de complexos (BAGUS; HERMANN; BAUSCHLICHER, 1984; GLENDENING; STREITWIESER, 1994; HIRAO, 2007; HOPFFGARTEN; FRENKING, 2012; KITAURA; MOROKUMA, 1976; MISQUITTA *et al.*, 2005; MO; GAO; PEYERIMHOFF, 2000; KHALIULLIN *et al.*, 2007; STEVENS; FINK, 1987; SU; LI, 2009; ZIEGLER; RAUK, 1979, 2002). No método EDA, a energia de interação total entre unidades, definidas como fragmentos (como por exemplo, monômeros), é obtida pelo cálculo da diferença entre a energia da supermolécula (conjunto de fragmentos) e a energia das unidades separadas (HOPFFGARTEN; FRENKING, 2012). Essa energia de interação total é então particionada em um conjunto de componentes que a integram: eletrostática, termos de Pauli, polarização e dispersão.

A parte referente à energia eletrostática pode ser definida como a interação entre as densidades de carga em cada fragmento dentro da supermolécula. Este termo inclui as interações de Coulomb atrativas, entre o núcleo de um fragmento com os elétrons do outro fragmento, e repulsivas, interações núcleo-núcleo e elétron-elétron existentes entre os fragmentos. A interação eletrostática total é normalmente atrativa.

O termo de Pauli contém as energias de troca e de repulsão, que são estabilizantes e desestabilizantes, respectivamente. A interação de troca tem sua origem na natureza antissimétrica da função de onda que permite a troca de elétrons entre os fragmentos. A interação de repulsão origina principalmente dos outros tipos de termos de integral de dois elétrons para os orbitais do fragmento.

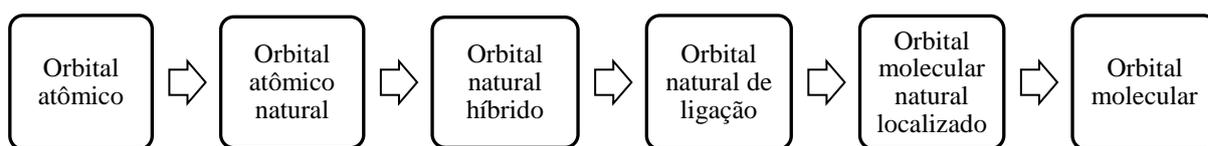
A componente da polarização, também conhecida como energia de relaxação orbital, é sempre atrativa e refere-se a um efeito estabilizante causado pela relaxação da função de onda que descreve a supermolécula. Este é o maior indicador da natureza covalente da interação entre os fragmentos (HOPFFGARTEN; FRENKING, 2012; SU; LI, 2009).

O termo de dispersão é atrativo e proveniente da correlação eletrônica (SU; LI, 2009). Quando o EDA decompõe energias DFT, este termo é definido como a diferença na energia de correlação entre a supermolécula e os fragmentos isolados. Assim, a qualidade deste termo é dependente da qualidade do funcional de correlação utilizado.

1.9. Orbitais naturais de ligação (NBO)

A análise dos orbitais naturais de ligação (no inglês, *Natural Bond Orbital – NBO*)(FOSTER; WEINHOLD, 1980; REED; CURTISS; WEINHOLD, 1988; REED; WEINHOLD, 1985) é um método que possibilita a quebra da densidade eletrônica total, para uma dada estrutura, em contribuições localizadas, que correspondem à pares isolados (um-centro) e envolvidos nas ligações entre pares de átomos (dois-centros). Os orbitais naturais de ligação são obtidos no cálculo de uma determinada etapa do processo de transformação dos orbitais atômicos (χ_i) em orbitais moleculares, conforme está apresentado na Figura 12.

Figura 12 - Processo de transformação de orbital atômico para orbital molecular



Fonte: PRATES, 2017.

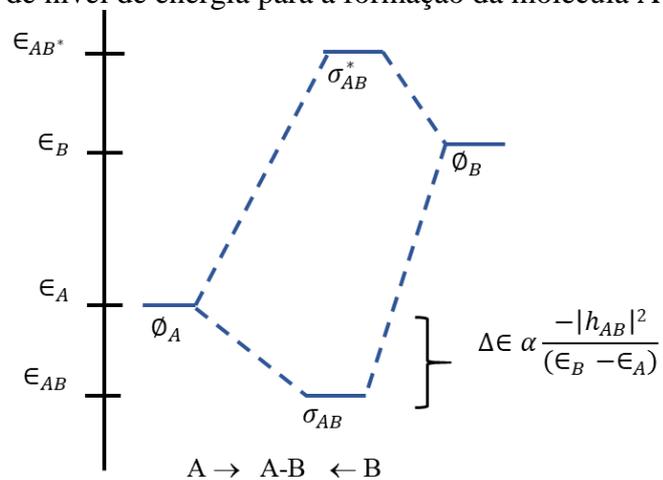
Os NBOs podem ser divididos em orbitais de caroço (internos), ligantes, antiligantes e de Rydberg (orbitais virtuais de alta energia, com densidade eletrônica praticamente nula). A estrutura de Lewis para uma dada molécula é representada pelos orbitais que descrevem as ligações, os pares isolados e os elétrons de caroço centrado nos átomos. A energia de estabilização (E^2) entre dois orbitais é mensurada pela deslocalização de elétrons entre um orbital doador (i) e um aceptor (j), via Teoria de Perturbação de Segunda-Ordem (MP2), segundo a Equação 3.

$$E^2 = \Delta E_{ij} = q_i \frac{F_{(ij)}^2}{\epsilon_j - \epsilon_i}, \quad (3)$$

onde q_i é a ocupação do doador, $F_{(ij)}^2$ é a matriz NBO de Fock entre i e j e $\epsilon_j - \epsilon_i$ é a diferença entre as energias dos NBOs j e i (CHANDRASEKARAN; KUMAR, 2015; CHOCHOLOUŠOVÁ; ŠPIRKO; HOBZA, 2004).

A Figura 13 apresenta um diagrama de nível de energia para a formação da molécula AB ($A + B \rightarrow AB$).

Figura 13 - Diagrama de nível de energia para a formação da molécula A



Fonte: WEINHOLD, 2012.

Onde: ϵ_A e ϵ_B – são níveis de energia para os orbitais naturais híbridos iniciais;

Φ_A e Φ_B ; ϵ_{AB} e ϵ_{AB^*} – níveis de energia para os orbitais naturais de ligação (NBO) ligante σ_{AB} e antiligante σ_{AB^*} e

$\Delta\epsilon$ – abaixamento da energia.

O abaixamento da energia ($\Delta\epsilon$) é estimado por meio de cálculo de aproximação perturbativa de segunda ordem (MP2) para a formação do orbital natural de ligação (NBO) ligante para a molécula hipotética AB, obtida por comparação aos orbitais naturais híbridos.

2. OBJETIVOS

Esta Tese teve como objetivo geral desenvolver um estudo computacional para se avaliar o mecanismo de interação responsável pela formação de um biohidrogel constituído por dois polissacarídeos (alginato de sódio e quitosana), que apresente alto grau de intumescimento (> 100 %), alta resistência à compressão (> 0,01 MPa) (CAMPESE *et al*, 2007) e que seja capaz de adsorver o herbicida glifosato, visando a sua posterior liberação gradativa. Além disso, por meio do estudo computacional foram avaliados os efeitos que influenciaram a estabilidade conformacional das macromoléculas; assim como, a interação do herbicida com os polímeros; e o fator preponderante no mecanismo de liberação bioativa.

2.1 Objetivos específicos

- Aplicar métodos mecânico-quânticos de modelagem molecular, para obter informações sobre parâmetros estruturais, eletrônicos e de energia para os polissacarídeos de interesse e propor possíveis mecanismos de interação entre eles e o glifosato;
- Estudar o mecanismo de gelificação do biohidrogel (ALG:QUI);
- Avaliar diferentes parâmetros na preparação dos bio-hidrogéis (pH, concentração das soluções, razão entre os polissacarídeos, temperatura e tempo de mistura);
- Avaliar o grau de intumescimento dos bio-hidrogéis em água;
- Avaliar a resistência mecânica (compressão) e a estabilidade térmica dos bio-hidrogéis obtidos;
- Realizar estudos sobre adsorção do glifosato por meio da variação de sua concentração e do tempo de contato;
- Avaliar a cinética de liberação do glifosato “*in vitro*”.

3. METODOLOGIA

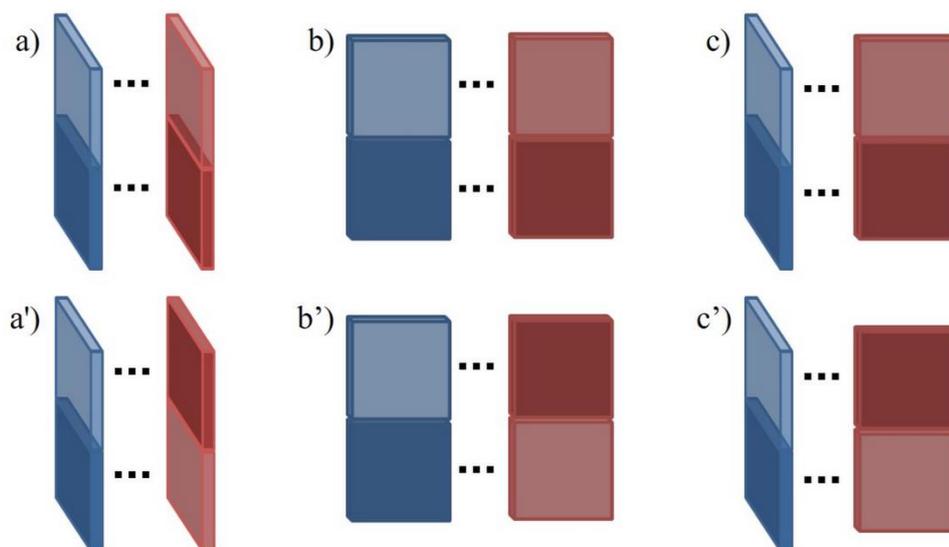
Nesta Tese, foram aplicados dois tipos de metodologias:

- Metodologia computacional e,
- Metodologia experimental.

3.1. Metodologia computacional

Como primeira etapa, foram obtidas as estruturas de mínimo de energia para as espécies isoladas: os dímeros de alginato e de quitosana, e a molécula de glifosato (Figura 14). Na etapa seguinte, os dímeros otimizados de alginato e quitosana foram aproximados entre si por diferentes orientações: pela face, pelos lados e perpendiculares entre si, conforme mostra o esquema abaixo.

Figura 14 – Modos de aproximação testados para a interação entre os dímeros otimizados de alginato e quitosana: a) pela face, b) lateral e c) perpendicular. O sobrescrito (') refere-se ao giro de 180° de uma das espécies, fornecendo uma nova orientação



Fonte: A autora, 2018.

Em cada conformação inicial preparada, um cátion sódio foi adicionado próximo de cada

grupamento COO^- mantendo o dímero de alginato neutro no conjunto formado. Feito isto, todas as coordenadas atômicas de cada uma das configurações iniciais (Figura 14), foram então relaxadas, num processo de otimização sem qualquer restrição estrutural ou imposta por simetria. Terminado o processo de otimização para os diferentes agregados alginato/ 2Na^+ /quitosana, o arranjo de mais baixa energia foi escolhido como representativo para o complexo formado entre os dímeros de alginato de sódio e quitosana. É importante esclarecer neste ponto do texto que os íons sódio foram inseridos somente na etapa de formação do complexo. Tal escolha deveu-se ao fato dados da literatura apontarem que o contra-íon é liberado durante o processo de formação do PEC, como fora mencionado anteriormente neste trabalho. Desta forma, caso os íons sódio fossem inseridos na etapa de otimização do alginato isolado, poderiam favorecer uma determinada conformação estrutural para o dímero que, por consequência, poderia privilegiar uma determinada orientação para a interação do mesmo com o dímero de quitosana.

Após a obtenção do complexo ALG:QUI um processo de microssolvatação foi simulado a partir da aproximação de duas moléculas de água, uma acima e outra abaixo do plano médio estrutural do complexo, formando o conjunto ALG:QUI.2H₂O. Sobre este novo conjunto, uma das moléculas de água foi então substituída pela molécula de glifosato, cuja estrutura fora otimizada anteriormente. Apenas por uma questão de simplificar sua representação no texto, este novo complexo será apresentado como ALG:QUI/GLP, omitindo-se a única molécula de água presente no complexo

Para cada geometria obtida, em cada processo de otimização estrutural realizado (estruturas isoladas e complexadas), cálculos de frequência vibracional foram empregados com o objetivo de checar se tais arranjos eram, de fato, estruturas de mínimo de energia na curva de energia potencial. Todos os cálculos foram realizados em nível da Teoria do Funcional de Densidade aplicando a metodologia B3LYP/6-311+G(d,p) (BECKE, 1992; KRISHNAN *et al.* 1980), com o programa adequado, Gaussian 03W (FRISCH *et al.*, 2003).

Para estimar a estabilidade dos complexos ALG:QUI, ALG:QUI.2H₂O e ALG:QUI/GLP, as respectivas energias de interação $E_{(I)}$, $E_{(II)}$ e $E_{(III)}$ foram obtidas segundo as equações 4, 5 e 6, abaixo:

$$E_{(I)} = E_{(ALG/QUI)} - (E_{(ALG)} + E_{(QUI)}) \quad (4)$$

$$E_{(II)} = E_{(ALG/QUI.2H_2O)} - (E_{(ALG)} + E_{(QUI)} + E_{(H_2O(a))} + E_{(H_2O(b))}) \quad (5)$$

$$E_{(III)} = E_{(ALG/QUI/GLP)} - (E_{(ALG)} + E_{(QUI)} + E_{(H_2O)} + E_{(GLP)}) \quad (6)$$

Onde: $E_{(ALG/QUI)}$, $E_{(ALG/QUI.2H_2O)}$, $E_{(ALG/QUI/GLP)}$ e $E_{(ALG)}$, $E_{(QUI)}$, $E_{(H_2O)}$, $E_{(GLP)}$ são os

termos referentes a energia absoluta dos complexos e das espécies isoladas (na mesma geometria da mesma dentro do complexo), respectivamente.

A contribuição da coordenação do cátion sódio na estabilidade do complexo também foi obtida, conforme a equação 7:

$$E_{coord} = E_{(ALG/QUI)} - (E_{(ALG/QUI-Na)} + E_{(Na)}) \quad (7)$$

O termo $E_{(ALG/QUI-Na)}$ corresponde a energia absoluta do complexo ALG:QUI, removendo o íon sódio envolvido na coordenação com os dímeros de alginato e quitosana. Para avaliar o grau de deformação estrutural dos dímeros após a complexação, a energia de deformação foi estimada, conforme a Equação 8:

$$E_{def(A)} = E_{(A)isol} - E_{(A)complexo} \quad (8)$$

Onde **A** é a espécie avaliada (**A** = alginato, quitosana, água ou glifosato) e, $E_{(A)complexo}$ e $E_{ref(A)}$, as energias absolutas para **A**, na mesma geometria observada em um complexo de interesse (ALG:QUI, ALG:QUI.2H₂O ou ALG:QUI/GLP) e em uma geometria utilizada como referência (isolada ou dentro de um dos complexos), respectivamente.

Todas as energias calculadas foram submetidas à correção devido ao erro de superposição de base (BSSE), com o método *counterpoise* (BOYS e BERNARDI, 1970; DUIJNEVELDT *et al.*, 1994). Além disso, o método LMOEDA (SU e LI, 2009), implementado no pacote GAMESS (versão R3 de 1º de outubro de 2010) (SCHMIDT *et al.*, 1993), foi usado para decompor a energia de estabilização do complexo ALG:QUI. Assim, essa energia foi dividida em cinco componentes: eletrostática; troca e repulsão (termos de Pauli); polarização e dispersão (SU e LI, 2009). Devido à alta quantidade de memória requerida pelo cálculo LMOEDA, foi necessário reduzir a base utilizada para alguns átomos. Desta forma os átomos que não estavam envolvidos diretamente na interação alginato-quitosana passaram a ser descritos pela base mínima STO-3G (COLLINS *et al.*, 1976; HEHRE *et al.*, 1969), enquanto os demais átomos tiveram suas descrições mantidas com 6-311+G(d,p) (KRISHNAN *et al.*, 1980).

A fim de avaliar a distribuição de carga, a natureza das interações e as respectivas energias envolvidas, um conjunto de cálculos dos orbitais naturais de ligação (NBO) foi realizado (FOSTER e WEINHOLD, 1980; REED *et al.*, 1988; REED, 1985). De acordo com a Teoria da Perturbação de Segunda Ordem, calculou-se a energia de interação hiperconjugativa entre um

orbital NBO ocupado (i) e um desocupado (j), conforme descrito na Equação 9.

$$E^2 = \Delta E_{ij} = q_i \frac{F_{(i,j)}^2}{\epsilon_j - \epsilon_i} \quad (9)$$

O termo q_i refere-se à ocupação eletrônica do orbital doador. $F_{(i,j)}$ é a matriz de Fock entre os orbitais naturais i e j, sendo o termo $(\epsilon_j - \epsilon_i)$, a diferença entre as energias destes orbitais (CHANDRASEKARAN e KUMAR, 2015; CHOCHOLOUŠOVÁ *et al.*, 2004). O método NBO fornece uma estrutura de Lewis precisa de uma molécula através da maior porcentagem possível de densidade eletrônica de um orbital, sendo uma ferramenta usual para a análise de interações intra e intermoleculares (LI *et al.*, 2015).

3.2. Metodologia experimental

A seguir serão descritos os principais materiais e equipamentos utilizados nesta Tese, assim como o procedimento experimental empregado para o desenvolvimento do trabalho.

3.2.1. Materiais

- Alginato de sódio- Procedência:Sigma-Aldrich Corporation;
- Quitosana - Procedência: Sigma-Aldrich Corporation;
- Água deionizada (obtida no laboratório);
- Ácido acético - Procedência: Vetec; grau de pureza: P.A., usado com recebido;
- NaOH – Procedência: Vetec; grau de pureza: P.A., usado com recebido;
- Ninidrina - Procedência:Sigma-Aldrich Corporation, MW: 178,14g mol⁻¹, usado com recebido;
- Molibdato de sódio - Procedência:Sigma-Aldrich Corporation, MW: 205,92g mol⁻¹, usado como recebido;
- GlifosatoPestanal® (N-(fosfometil)glicina) -Procedência: Sigma-Aldrich Corporation;

- Dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) - Procedência: Sigma-Aldrich Corporation;
- Isotiocianato de rodamina B(RdB)- Procedência: Sigma-Aldrich Corporation;

3.2.2. Equipamentos

Além dos equipamentos e vidrarias comuns de laboratório foram utilizados nesta Tese os seguintes aparelhos:

- Agitador Magnético com Aquecimento, modelo Ceramag Midi¹.
- Balança analítica marca Shimadzu, modelo AY220¹.
- Termômetro digital- IKA WERKE, modelo ETC 1, faixa de operação de 0 – 350°C¹.
- Medidor de pH portátil marca Tecnopon, modelo MPA 210¹.
- Liofilizador – Liofilizador de bancada marca Terroni, modelo Interprise I - D¹
- Espectrofotômetro – BIOSPECTRO, modelo SP-22, faixa de operação de 320 – 1000 nm¹.
- Espectrofotômetro eletrônica na região Ultravioleta- Visível (UV-VIS) – AGILENT, modelo 8453².
- Centrífuga SOLAB, modelo SL-700, 3600 rpm¹.
- Analisador Termogravimétrico (TGA) TA Instruments, modelo Q50 V6.4 Build 193³.
- Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier Perkin Elmer, modelo Spectrum One⁴.
- Microscópio Eletrônico de Varredura (SEM) The Inspect 550, marca: Fei Company⁵.
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN)– ¹³C CP-MAS NMR – Bruker Biospin GmbH Avance III 400 operando a 125.77 MHz⁶
- Analizador elementar –modelo VARIO MACRO CHNS, operando em temperatura de combustão de 1150°C⁷.
- Máquina Universal de Ensaio - Emic, DL2000⁸.
- Microscópio confocal de varredura à laser (CLSM)- LSM 510 META ZEISS⁹

¹Laboratório de Química de Polímeros- Instituto de Química/UERJ.

²Laboratório de Bioinorgânica e Compostos de Coordenação - Instituto de Química/UERJ.

³Laboratório de Reologia e Imagem- Instituto de Química/UERJ.

⁴Laboratório de Caracterização Instrumental I- Instituto de Química/UERJ.

⁵Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura- Instituto de Química/UERJ.

⁶Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear -Instituto de Química/UFRJ.

⁷Laboratório de Caracterização Instrumental II- Instituto de Química/UERJ.

⁸Laboratório de Processamento de Polímeros I- Instituto de Química/UERJ.

⁹Laboratório de Microscopia Eletronica e Confocal – Hospital Pedro Ernesto (HUPE)/UERJ.

3.3. Preparação dos biohidrogéis

A metodologia que foi empregada no preparo dos biohidrogéis consistiu das seguintes etapas: caracterização dos polissacarídeos; preparo das soluções dos polissacarídeos; preparo dos biohidrogéis; caracterização dos biohidrogéis; avaliação do biohidrogel em relação a adsorção e liberação com o herbicida.

3.3.1. Caracterização dos polissacarídeos puros

O alginato de sódio e a quitosana puros foram caracterizados por meio de rressonância magnética nuclear no estado sólido (^{13}C CP-MAS NMR) e análise elementar (CHN).

3.3.1.1. Ressonância magnética nuclear no estado sólido (^{13}C CP-MAS NMR)

A ^{13}C CP-MAS NMR é uma técnica capaz de informar sobre a homogeneidade da mistura. A técnica de MAS é usada para eliminar a interação dipolar (homo e heteronuclear), fazendo a amostra girar em torno de um certo ângulo denominado ângulo mágico. Além de eliminar as interações dipolares esta técnica elimina também anisotropias do deslocamento químico (JELINSKI, MELCHIOR, 2000).

Para superar os problemas relativos à baixa sensibilidade dos núcleos raros e seus longos tempos de relaxação spin-rede, foi proposto o método denominado “polarização cruzada” (CP). A polarização cruzada usa a intensa polarização de spins abundantes para aumentar, por transferência de polarização, a pequena polarização dos núcleos raros. Assim, essa técnica

fornece um sinal de maior intensidade para núcleos raros e grande redução em seus tempos de relaxação spin-rede.

A ^{13}C CP-MAS NMR foi empregada nesta Tese para a determinação dos teores de unidades M (resíduo do ácido manurônico) e unidades G (resíduo do ácido gulurônico) que compõem o alginato. A relação entre os blocos M/G do alginato foi determinada dividindo a soma das intensidades dos sinais de manuronato (bloco-M) pela soma das intensidades dos sinais de guluronato (bloco-G) (Equação 10), de acordo com SALOMONSEN *et al.*, 2009.

$$M/G = (E+F)/(D+G+H) \quad (10)$$

Aproximadamente 40 mg da amostra de alginato (pó) foram colocados em um rotor de zircônia (ZrO_2) a 15 kHz em espectrômetro Bruker AvanceTM III 400, operando a 125.77 MHz. O tempo de aquisição, reciclo e contato foram 10 ms, 2 s e 2 ms, respectivamente. Foram realizadas 1024 acumulações.

3.3.1.2. Análise elementar (CHN)

O grau de desacetilação (GD) foi determinado por análise elementar (CHN) (Equação 11), seguindo o método descrito em Tian *et al.* 2004. Foi utilizado um analisador elementar modelo Vario Macro em temperatura de combustão de 1150°C, com tempo e fluxo de dosagem 90s e 75 mL/min, respectivamente.

$$GD = \left[1 - \frac{\frac{C}{N} - 5,145}{1,722} \right] \times 100\% \quad (11)$$

Onde: GD = Grau de desacetilação;

C/N = razão entre carbono e nitrogênio;

A relação de C / N varia de 5,145 para a quitosana completamente desacetilada a 6,861 para polímero totalmente acetilado (6,861 – 5,145) (TIAN *et al.* 2004).

3.3.2. Preparadas soluções de polissacarídeos

Foram estudadas diferentes concentrações de cada solução de polissacarídeo (alginato de sódio - 1,0 e 3,0 % m/v e quitosana - 1,0 e 1,5 % m/v). Essas concentrações foram determinadas a partir de pesquisas anteriores realizadas no próprio laboratório e em referências bibliográficas pesquisadas (ARAUJO, 2014; BITTENCOURT, 2015; OLIVEIRA *et al.* 2009).

⇒ *Alginato de sódio (ALG)*

As soluções aquosas de alginato de sódio foram preparadas em bécheres nas concentrações de 1,0 e 3,0 % (m/v). Ao alginato foi adicionada água deionizada e deixado sob agitação magnética, durante 24 h, sob temperatura ambiente, até completa solubilização.

⇒ *Quitosana (QUI)*

As soluções ácidas de quitosana foram preparadas em bécheres nas concentrações de 1,0 e 1,5 % (m/v). À quitosana foi adicionada solução de ácido acético (CH_3COOH) a (2 % m/v), sob agitação magnética, durante 24 horas, sob temperatura ambiente até completa solubilização.

3.3.3. Preparo dos biohidrogéis

As soluções dos polissacarídeos (ALG e QUI), previamente preparadas, foram misturadas em bécheres, nas temperaturas de 25 e 50°C, por meio de banho de gelo e placa de aquecimento, respectivamente, de forma a se obter bio-hidrogéis constituídos por diferentes razões volumétricas das soluções dos polissacarídeos (Tabela 2). O pH foi ajustado, para cada concentração e razão, por meio da adição de ácido acético ou hidróxido de sódio. A mistura final foi deixada em repouso por 24 horas a temperatura ambiente. Após este tempo, as amostras foram lavadas com água deionizada, congeladas (-4°C) e liofilizadas em vácuo de aproximadamente 488 μHg e temperatura de -40°C durante 48 horas. A Tabela 2 mostra os parâmetros utilizados no preparo dos bio-hidrogéis e a Figura 15 apresenta esquematicamente o preparo dos biohidrogéis.

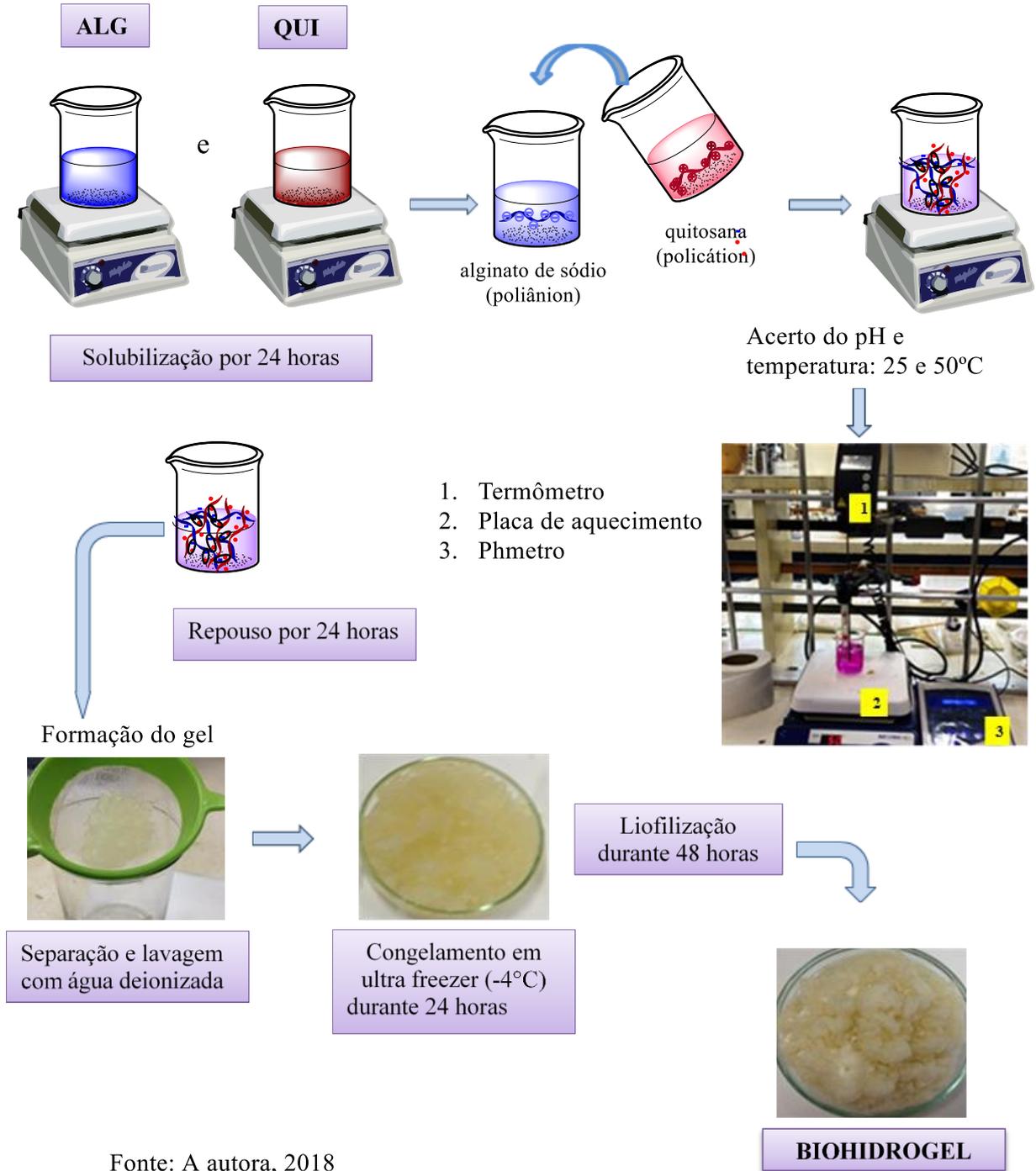
Tabela 2 – Parâmetros aplicados no preparo dos bio-hidrogéis

Concentração das soluções (% m/v) ALG:QUI	Razão, em volume, das soluções de polissacarídeos ALG:QUI	Razão, em massa, das soluções de polissacarídeos ALG:QUI	pH*	Temperatura °C		
3,0/1,5	1:1	2:1	4 a 9	25		
	1:2	1:1		50		
	2:1	4:1				
3,0/1,0	1:1	3:1		4 a 9	25	
	1:2	1,5: 1			50	
	2:1	6:1				
1,0/1,5	1:1	1: 1,5			4 a 9	25
	1:2	1:3				50
	2:1	1,3: 1				

Legenda: *Acerto de pH com ácido acético (CH₃COOH) a 2,0% e hidróxido de sódio (NaOH).

Fonte: A autora, 2018.

Figura 15- Esquema ilustrativo de preparação dos bio-hidrogéis



Fonte: A autora, 2018

3.3.4. Caracterização dos biohidrogéis

Os biohidrogéis foram caracterizados quanto ao grau de intumescimento; às propriedades morfológicas (SEM); à estabilidade térmica (TG); à composição química (FTIR e ^{13}C CP-MAS NMR) e às propriedades mecânicas (resistência à compressão).

3.3.4.1. Grau de intumescimento (GI)

Os biohidrogéis liofilizados foram pesados em uma balança analítica e colocados em bécheres de 50 mL de capacidade. Em seguida, foi adicionado um volume de água deionizada suficiente para cobrir toda a amostra. As amostras foram submetidas a tempos variados (1, 3, 6, 12 e 24h) de intumescimento. Papel filtro foi utilizado para retirada do excesso de água. O grau de intumescimento (GI) foi calculado conforme Equação 12 (COSTA *et al.*, 2016).

$$GI = \frac{M_f - M_o}{M_o} \times 100 \quad (12)$$

Onde “ M_f ” é a massa da amostra inchada no tempo t , e M_o é a massa inicial da amostra antes do inchamento.

Todas as medidas foram realizadas em triplicatas.

3.3.4.2. Caracterização morfológica

A morfologia dos biohidrogéis foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (SEM), em equipamento Jeol JSM 6460LV, com voltagem de operação de 15Kv. As amostras foram cortadas com uma lâmina para expor a estrutura interna do material e fixadas em suporte adequado e recobertas com ouro sob atmosfera de argônio. Em seguida, as superfícies foram analisadas.

Para a análise no microscópio confocal a laser (CLSM), o equipamento Zeiss LSM 510 META, usando uma objetiva EC Plan-Neofluar 10x/0.30 M27 foi empregado para observação.

Duas substâncias fluorescentes foram utilizadas para rotular cada polissacarídeo. Dihidroclorato de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), rotular o alginato de sódio, absorvendo luz numa faixa de 350 – 400nm e emitindo a coloração azul numa faixa de 420 – 461nm e isotiocianato de rodamina B (RdB), rotula a quitosana absorvendo luz numa faixa de 495 – 570nm e emitindo a coloração vermelha numa faixa de 525 – 590nm.

As substâncias fluorescentes foram incorporadas somente na amostra de biohidrogel considerada “ideal”, ou seja, somente na composição aonde será feita avaliação futura com o herbicida glifosato. Após ser cortada para expor a estrutura interna do material, a amostra foi fixada em uma lâmina. As imagens foram adquiridas com resolução de 512 x 512 pixels. Em seguida, a superfície foi analisada no CLSM para visualização das respectivas cadeias poliméricas.

3.3.4.3. Estabilidade térmica

A estabilidade térmica foi determinada por TGA, utilizando um analisador termogravimétrico TA *Instruments*, modelo Q500 V20. Build 39. Cerca de 10 mg de amostra foram colocados em cápsulas de platina, que foi aquecida em atmosfera de nitrogênio, com uma vazão de 100 mL/min, de 10 a 950°C a uma velocidade de 20°C/min.

Para determinar a temperatura inicial (T_{onset}) de degradação nas curvas de TG foi utilizado o método do ponto de intersecção entre a tangente na linha zero e a tangente traçada a partir da inflexão da curva no estágio subsequente à degradação ((NAKAMURA *et al.*, 1992). As temperaturas nas quais as velocidades dos respectivos estágios de degradação são máximas ($T_{\text{máx.}}$) foram determinadas nas curvas de DTG através da determinação do ponto máximo da derivada da massa em relação à temperatura.

3.3.4.4. Composição química

A composição química dos biohidrogéis foi analisada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, utilizando um espectrômetro FTIR Perkin Elmer

Spectrum 1000 com acessório de reflectância total atenuada (ATR). Todas as amostras foram analisadas na faixa espectral de 4000 – 500 cm⁻¹.

3.3.4.5. Propriedade mecânica – teste de compressão

A resistência mecânica dos biohidrogéis foi avaliada através de medidas de compressão em máquina universal de ensaio Emic, DL2000, com célula de carga de 500N e velocidade das placas de 12 mm/min. Os corpos de prova medindo cerca de 20 mm de comprimento x 20 mm de diâmetro (Figura 16), foram preparados em bécheres com capacidade de 10 mL. Eles foram liofilizados e ensaiados segundo a norma ASTM D 1621 – 00 (Test Method for Compressive Properties of Rigid Cellular Plastics) (Figura 17), adaptada para biomateriais à base de polissacarídeos (dimensões e carga foram diferentes). Os valores de tensão máxima de compressão ($\sigma_{\text{máx}}$) foram determinados medindo-se a força (f) necessária para comprimir os biohidrogéis. Cinco corpos de prova foram utilizados. Os valores de tensão (σ) foram determinados utilizando a Equação 13.

$$\sigma = \frac{f}{S_o} \quad (13)$$

Onde: f é o valor da força exercida,

S_o é a área do corpo de prova

Figura 16 - Fotografia digital dos corpos de prova utilizados no ensaio de compressão



Fonte: A autora, 2018.

Figura 17 – Ensaio de compressão em máquina universal de ensaio Emic DL 2000



Fonte: A autora, 2018.

3.3.4.6. Ressonância magnética nuclear no estado sólido (NMR - ^{13}C CP-MAS)

O espectro de ressonância magnética nuclear (NMR ^{13}C CP-MAS) da “composição ideal” de biohidrogel foi obtido utilizando um espectrômetro Bruker AvanceTM III 400, operando a 125,77 MHz (descrito na seção 4.2.6.)

3.3.5. Avaliação do biohidrogel na liberação gradativa do glifosato

Nesta fase, a composição do biohidrogel que melhor se adequou (composição ideal), por ter apresentado as propriedades: térmicas, mecânicas e morfológicas mais favoráveis.

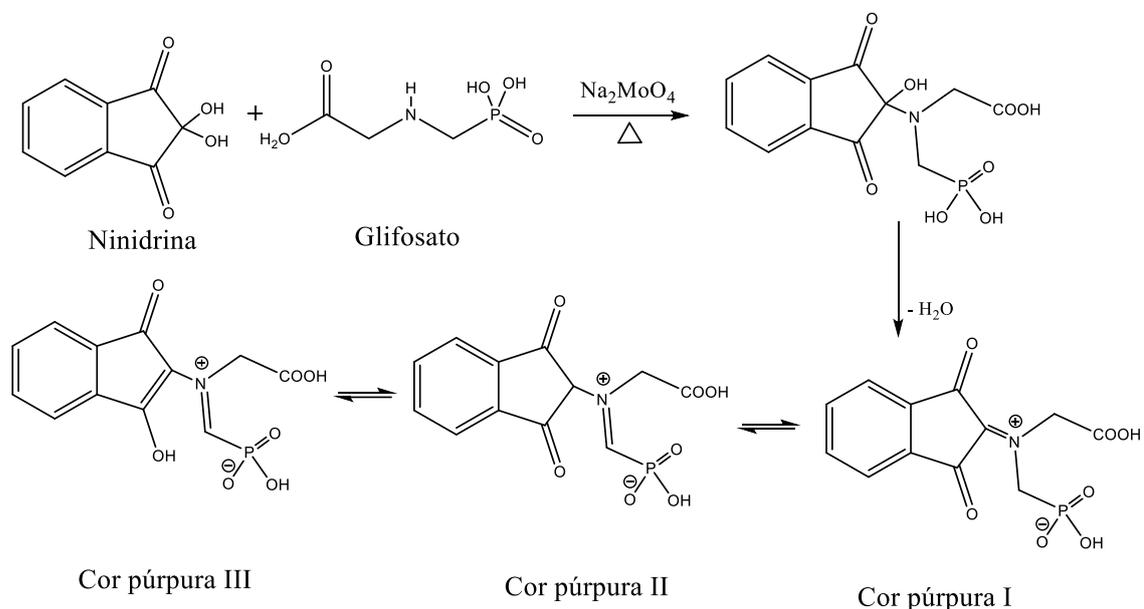
A etapa de aplicação do biohidrogel incluiu:

- Determinação do método de quantificação do glifosato em uma solução aquosa;
- Adsorção do glifosato pelo biohidrogel;
- Avaliação da liberação gradativa do glifosato *in vitro*.
- Caracterização das amostras de biohidrogel contendo o glifosato:
 - Morfologia por SEM e CLSM;
 - ^{13}C CP-MAS NMR;
 - Estabilidade térmica (TG);
 - FTIR;
 - Propriedade à compressão.

3.3.5.1. Quantificação de glifosato pelo método do púrpura de Ruhemann

A quantificação do glifosato presente em solução aquosa foi determinada por meio do método do púrpura de Ruhemann, pois a molécula de glifosato não possui grupos cromóforos, ou seja, o glifosato não absorve radiação eletromagnética no visível, não sendo detectado por métodos colorimétricos ou fluorescência e, portanto, sendo necessária a utilização de reagentes ninidrina e molibdato de sódio para ser quantificado pelo método do púrpura de Ruhemann.

Figura 18 - Reação proposta da obtenção do púrpura de Ruhemann a partir do glifosato com ninidrina na presença de molibdato de sódio



Fonte: BHASKARA *et al.*, 2006.

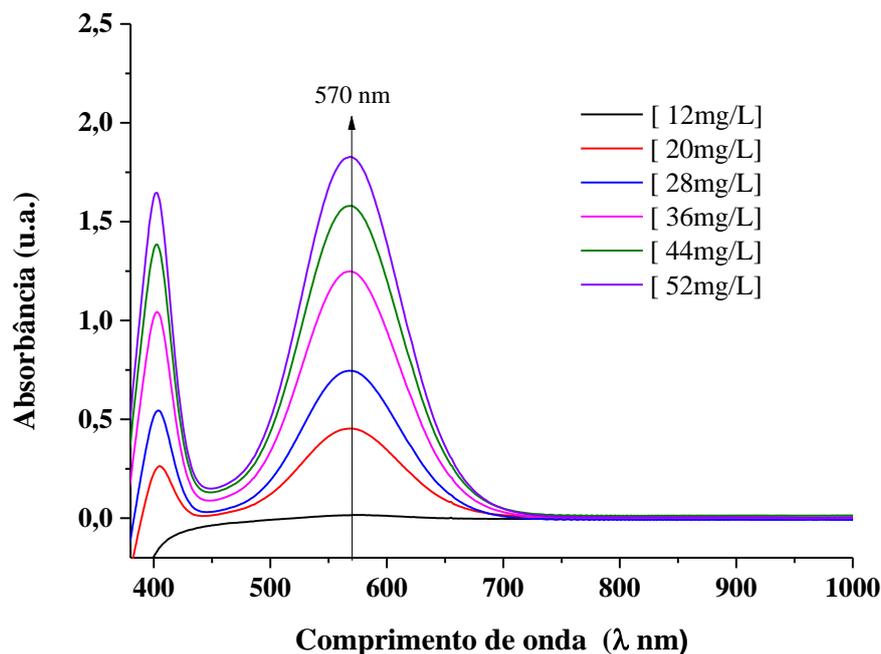
O púrpura de Ruhemann é um método de quantificação e determinação do glifosato, no qual um produto com absorção máxima em 570 nm é formado quando o glifosato é reagido com ninidrina, reagente cromogênico, na presença de molibdato de sódio em solução aquosa e aquecido a 100°C por 20 minutos (cor púrpura III) (BHASKARA *et al.*, 2006). A Figura 18 apresenta o esquema da reação proposta para o método do púrpura de Ruhemann.

As análises de adsorção foram realizadas a partir de solução aquosa com diferentes concentrações de glifosato (12, 20, 28, 36, 44 e 52 mg.L^{-1}).

Após cada intervalo de tempo (30 – 2880 min), 2 mL da solução contendo certa concentração de glifosato foi retirada e colocada em tubo para centrífuga de 15 mL. Em seguida, foi adicionado 1 mL de solução 1% de ninidrina e 1 mL de solução 1% de molibdato de sódio.

A solução resultante foi aquecida por 20 minutos em água a 100°C e acondicionadas em cubetas de quartzo. Essas cubetas foram levadas ao espectrofotômetro na região Ultravioleta- Visível (UV-VIS) para serem analisadas usando o comprimento de onda de 570 nm (cor púrpura III). Esse procedimento foi realizado em triplicata. A Figura 19 apresenta o espectro de absorção do herbicida glifosato para as diferentes concentrações de glifosato.

Figura 19–Espectro de absorção na região do visível do glifosato em diferentes concentrações.



Fonte: A autora, 2018.

3.3.5.2. Adsorção do glifosato pelo biohidrogel

O estudo do processo de adsorção do herbicida pelo biohidrogel foi realizado avaliando-se três concentrações diferentes da solução de glifosato ($C_0 = 20; 36$ e 52 mg.L^{-1}). Para concentrações inferiores a 20 mg.L^{-1} não foi possível medir a absorbância (Figura 19).

As soluções foram preparadas em bécheres de 50 mL com água deionizada e após total solubilização, uma determinada massa do biohidrogel previamente seca, foi adicionado em cada bécher, ficando em contato com a solução do glifosato por diferentes intervalos de tempo (30, 60, 120, 1440, 2880 e 4320 min). Após cada período, uma alíquota de 2 mL da solução foi retirada e adicionado 1 mL de solução de ninidrina e 1 mL de solução de molibdato de sódio. A

quantidade de glifosato no biohidrogel foi calculada pela diferença entre “C₀” e a concentração na solução após o tempo “t” (C_t). O valor de cada concentração de glifosato restante na solução foi determinado por meio de espectrometria, baseando-se em uma curva de calibração, previamente construída em 570 nm (Figura 43 – p. 128).

A quantidade de herbicida adsorvida foi determinada por meio da Equação 14.

$$q_t = \frac{[(C_0 - C_t)] \times V}{m} \quad (14)$$

Onde: q_t é a quantidade de herbicida adsorvida pelo biohidrogel por grama de biohidrogel seco (mg.g⁻¹);

C₀ e C_t (mg.L⁻¹) são as concentrações de herbicida na solução inicial e solução aquosa após o processo de absorção no tempo “t”, respectivamente;

V é o volume da fase aquosa;

m é a massa de biohidrogel seco adicionado (g).

Modelos cinéticos têm sido desenvolvidos para testar os dados experimentais (HO e MACKAY, 1998; DAI *et al.*, 2017). São geralmente utilizados dois tipos de modelos cinéticos: pseudo-primeira ordem e pseudo-segunda ordem.

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - K_1 t \quad (15)$$

Onde: k₁ é a constante de pseudo-primeira ordem (min⁻¹);

q_e é a quantidade máxima de herbicida adsorvido (mg.g⁻¹);

q_t é a quantidade de herbicida adsorvido em um determinado tempo (mg.g⁻¹).

t = tempo de reação (min)

A equação de pseudo-primeira ordem (k₁) proposta por Lagergren, 1898, é utilizada em processos de adsorção do soluto de uma solução líquida e está baseada na capacidade de adsorção de sólidos (HO e MACKAY, 1998; PIGNATELLO *et al.* 1995). É uma das mais utilizadas para avaliar a adsorção de solutos a partir de soluções líquidas (Equação 15).

O modelo cinético de pseudo-segunda ordem também é baseado na capacidade de adsorção da fase sólida e relata o comportamento do processo em toda a faixa de tempo de contato (Equação 16).

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{K_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e} \quad (16)$$

Onde k_2 é a constante de pseudo-segunda ordem ($\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$);

q_e é a quantidade máxima de herbicida adsorvido ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$);

q_t é a quantidade de herbicida adsorvido em um determinado tempo ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$);

t = tempo de reação (min).

3.3.5.3. Isotermas de adsorção

Em seguida, isotermas de adsorção baseadas nos modelos matemáticos de Langmuir e Freundlich foram construídas. A determinação dos parâmetros de adsorção dos modelos permite a otimização do mecanismo de adsorção (LARGITTE, 2016).

A isoterma de Langmuir é aplicada para adsorção em sistemas homogêneos, nos quais a adsorção de cada molécula de adsorbato na superfície adsorvida possui a mesma energia de adsorção. Supondo que a superfície do biohidrogel seja coberta por um grande número de sítios, cada sítio de adsorção passa a ser ocupado por apenas uma molécula do herbicida. Assim, todos os sítios de adsorção seriam equivalentes e as moléculas adsorvidas não sofrem interação entre si (ADAMSON, 1976). Portanto, o processo de adsorção se completaria quando todos os sítios fossem ocupados, o qual corresponderia a uma monocamada. O modelo de Langmuir pode ser representado pelas Equações 17 e 18.

$$q_{eq} = \frac{K_L C_{eq}}{1 + \alpha_L C_{eq}} \quad (17)$$

$$\frac{C_{eq}}{q_{eq}} = \frac{1}{K_L} + \frac{\alpha_L}{K_L} C_{eq} \quad (18)$$

onde q_{eq} é a adsorção de herbicida pelo biohidrogel no equilíbrio ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$);

C_{eq} é a concentração da solução de herbicida no equilíbrio ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$);

K_L e α_L ($\text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$) são constantes das isotermas de Langmuir.

Os dados de adsorção foram analisados a partir da forma linear da Equação 18, onde as constantes foram determinadas a partir da inclinação (coeficiente angular) e do intercepto (coeficiente linear) da equação.

A isoterma de Freundlich assume que o processo de adsorção ocorre em superfícies heterogêneas. Geralmente, em sistemas que seguem essa isoterma, o processo de adsorção ocorre com a formação de multicamadas (NG *et al.*, 2002). O modelo baseado na isoterma de Freundlich pode ser expresso pelas Equações 19 e 20.

$$q_{eq} = K_F C_{eq}^{1/n} \quad (19)$$

$$\ln q_{eq} = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_{eq} \quad (20)$$

onde K_F ($L \cdot g^{-1}$) e n ($mg \cdot L^{-1}$) são constantes que incorporam todos os fatores que refletem o processo de adsorção (capacidade e intensidade de adsorção).

Os valores de K_F e de n foram calculados a partir do intercepto e da inclinação da curva entre $\ln q_{eq}$ e $\ln C_{eq}$, respectivamente (LINHARES *et al.*, 2008; AOUADA, 2009).

3.3.5.4. Liberação gradativa do herbicida glifosato *in vitro*.

O estudo de liberação gradativa do glifosato foi realizado em meio aquoso e, para isso, utilizou-se a maior concentração deste herbicida ($52 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

O biohidrogel após ter permanecido durante 48h na solução aquosa de glifosato ($C_0 = 52 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), foi congelado e liofilizado em vácuo de aproximadamente $488 \text{ } \mu\text{Hg}$ e temperatura de -40°C por um período de 48 horas. Após a sua liofilização, o biohidrogel foi colocado em um bécher, contendo 50 mL de água. De tempos em tempos, durante um período de 60 dias, alíquotas de 2 mL foram retiradas e quantificadas pelo método colorimétrico utilizando curva de calibração previamente construída (comprimento de onda de absorção máxima, $\lambda = 570 \text{ nm}$). Esse teste foi realizado em triplicata.

A cinética de liberação foi avaliada em termos de porcentagem de liberação em função do tempo, baseando-se na Equação 21.

$$\text{Quantidade liberada}(\%) = (M_t/M) \times 100(21)$$

Onde: M_t é a quantidade de herbicida glifosato liberada pelo biohidrogel no tempo t e M é a quantidade total de herbicida no biohidrogel.

3.3.5.5. Caracterização das amostras de biohidrogel contendo o glifosato

Nesta etapa da Tese, a microscopia eletrônica de varredura (SEM) e a microscopia de fluorescência confocal a laser (CLSM) foram empregadas para a verificação da integridade da morfologia dos biohidrogéis com a presença do glifosato.

A presença do glifosato no biohidrogel foi confirmada pela análise de CLSM. Foi avaliado se a presença do glifosato poderia afetar a estabilidade térmica do biohidrogel. Para isso, as amostras foram caracterizadas, também, por termogravimetria. Também foi realizado um ensaio mecânico de compressão, com o objetivo de verificar se houve comprometimento da resistência mecânica com a presença do herbicida no biohidrogel.

As metodologias empregadas nessas técnicas já foram descritas anteriormente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente, serão discutidos os resultados referentes ao estudo computacional, com a finalidade de se entender melhor as interações que estabilizam o complexo eletrolítico (ALG:QUI) e, também as interações entre os polissacarídeos e o herbicida glifosato (ALG:QUI/GLP).

Em seguida, serão apresentados e discutidos os resultados experimentais que possibilitaram indicar a composição do “biohidrogel ideal”, ou seja, aquela que levou à produção do material com as melhores características para ser usado na liberação gradativa de glifosato.

4.1. Estudo computacional

Os resultados dos cálculos computacionais realizados segundo a metodologia descrita no item 3.1, serão apresentados em forma de tabelas, gráficos e figuras, e discutidos no decorrer desse item. Para ajudar na fluidez da leitura do texto, algumas tabelas contendo uma quantidade muito grande de valores, assim como, figuras complementares e de importância secundária aos principais apontamentos discutidos no texto, foram disponibilizados numa seção suplementar como material apêndice desta Tese.

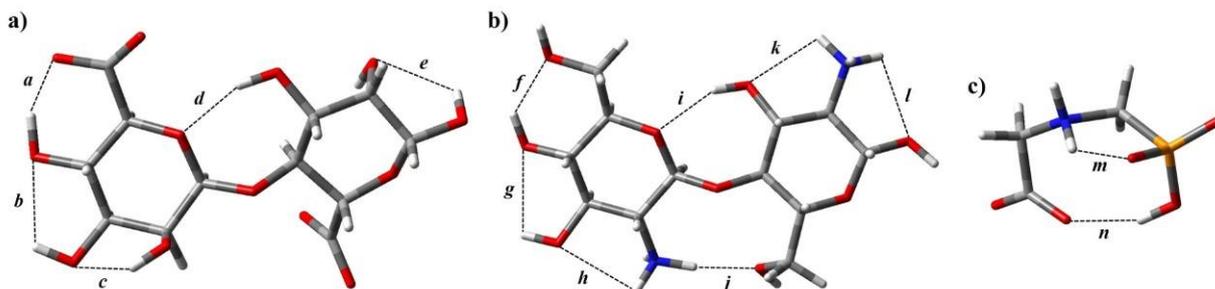
4.1.1. Estudo das espécies isoladas: dímero de alginato, de quitosana e molécula de glifosato

Estruturas diméricas de alginato e quitosana, e a molécula de glifosato, foram otimizadas isoladamente (Figura 20 (a), (b) e (c), respectivamente). Neste trabalho a conformação MM foi utilizada como ponto de partida para a otimização do dímero de alginato.

A Figura 21 exibe a numeração dos átomos nas estruturas otimizadas. Durante o texto, outras figuras também apresentaram numerações, no entanto, somente para determinados átomos de interesse dentro dos complexos obtidos. A numeração completa de todos os átomos nos complexos segue a mesma seqüência vista nas estruturas isoladas. Assim, o átomo de fósforo, por exemplo, que apresenta a numeração (102) na molécula de glifosato isolada, manterá a

mesma numeração (102) dentro do complexo ALG:QUI/GLP.

Figura 20 - Geometria preferencial das espécies isoladas



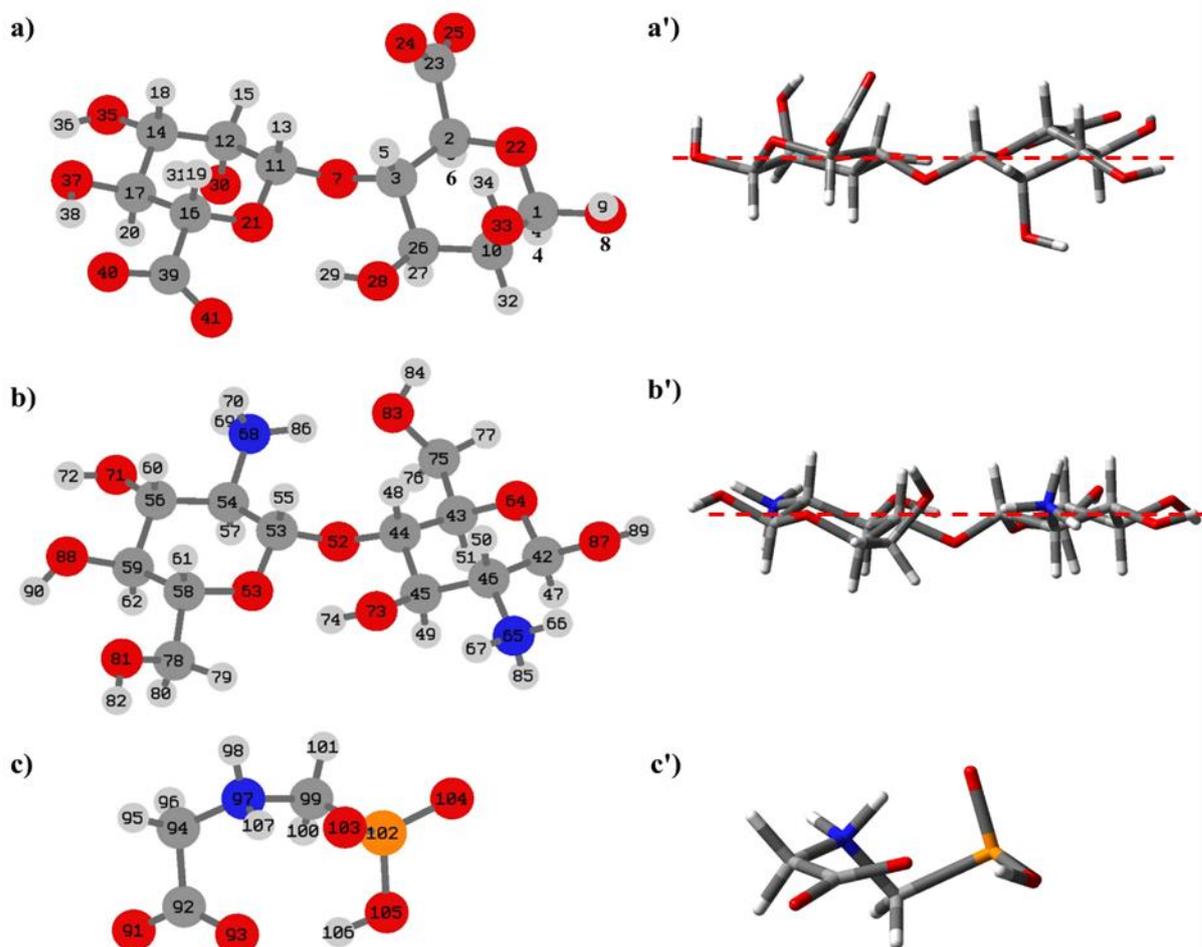
Legenda: (a) alginato MM, (b) quitosana protonada e (c) molécula de glifosato. As ligações-H formadas são ilustradas com linhas pontilhadas (a-n). Os átomos estão representados nas seguintes cores: hidrogênio em branco, carbono em cinza, oxigênio em vermelho, nitrogênio em azul e fósforo em laranja.

Fonte: A autora, 2018.

Embora MM não seja a conformação de mais baixa energia para o dímero de alginato isolado, esta forma foi utilizada, devido informações da literatura (LAWRIE *et al.*, 2007) além do alginato utilizado experimentalmente apresentar um teor predominante de blocos MM (62,8%) e possuir maior área específica disponível para interagir com a molécula de quitosana. As geometrias e os parâmetros estruturais das estruturas de mínimo de energia obtidos para os dímeros de alginato e quitosana, e para a molécula de glifosato, são exibidos nas Figuras 21 (a)–(c) e nas Tabelas 15–17 (APÊNDICE, p. 167 - 169), respectivamente.

Outro fator relevante a ser avaliado neste trabalho diz respeito a posição do contra-íon. Estudos mostram que a medida que o processo de complexação se inicia, o polieletrólito libera o contra-íon em um processo entropicamente favorecido (KULKARNI *et al.*, 2016). Com base nesta informação, optou-se por inserir o íon sódio somente na etapa de formação do complexo entre os dímeros de alginato e quitosana, como já mencionado anteriormente.

Figura 21 - Geometrias de mínimo de energia (com numeração nos átomos) obtidas com a metodologia B3LYP/6-311+G(d,p) para as espécies isoladas



Legenda: (a) alginato MM, (b) quitosana e (c) glifosato. O sobrescrito (') refere-se à vista que evidencia o plano médio estrutural (linha pontilhada).

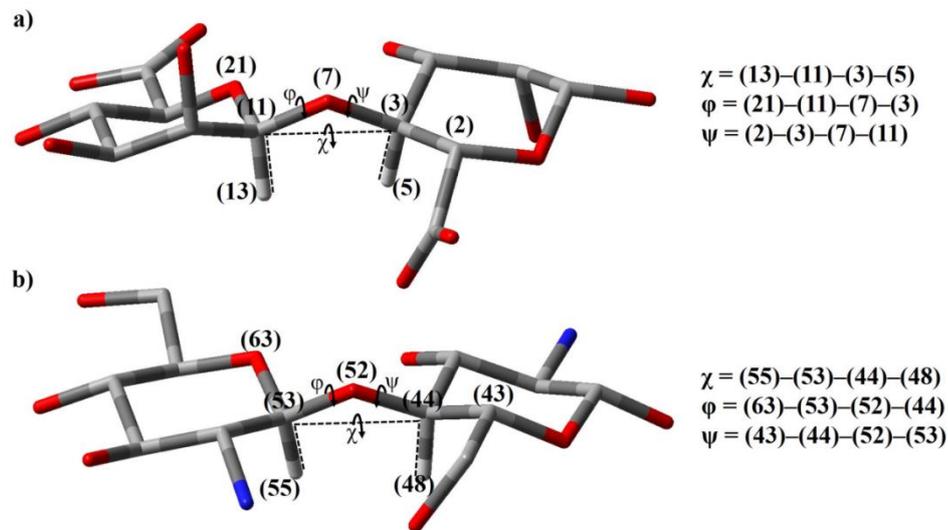
Fonte: A autora, 2018.

Após o processo de otimização, a conformação obtida para o dímero de alginato MM apresenta as duas unidades piranosídicas quase em um mesmo plano médio (Figura 21 a'). A rotação entre os anéis de piranose pôde ser avaliada por meio da observação do ângulo diedro representado pela letra grega χ , conforme mostra a Figura 22.

Este arranjo é estabilizado pela formação de cinco ligações H intramoleculares (Figura 20, (a)-(e)). A ligação-H mais curta, *a*, mede 1,660 Å e apresenta O(37)—H(38)⋯O(40) ângulo de ligação de 150,6°, envolvendo o grupo carboxila (Tabelas 15 e 16, p. 167 e 168). Essa interação mantém um dos grupos COO⁻ (O(40)—C(39)—O(41)) no plano médio, enquanto o outro (O(24)—C(23)—O(25)) gira cerca de 32,0° (Tabela 18). A segunda ligação de hidrogênio mais curta (*d* = 1,974 Å) favorece a formação de um anel de sete membros, ligando os dois anéis de piranose. O ângulo de ligação envolvendo O(28)—H(29)⋯O(21), *d*, é o maior entre todas as

ligações de hidrogênio formadas no dímero de alginato MM (153,7°). As demais ligações—H (*c*, *b* e *e*) envolvem apenas grupos hidroxila, com comprimento de ligação de 2,198 Å, 2,213 Å e 2,275 Å, respectivamente, e ângulos de ligação menores, variando de 114,1 a 116,0° (Tabela 18, p. 170).

Figura 22 – Definição dos ângulos diedros χ , ϕ e ψ para os dímeros de alginato (a) e de quitosana (b). Alguns átomos de hidrogênio foram omitidos para facilitar a visualização



Fonte: A autora, 2018.

As formas de dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos podem ser determinadas pelos ângulos de torção, ϕ e ψ (Figura 22), sobre as ligações de cada anel da unidade dissacarídica ao seu átomo de oxigênio glicosídico (FRENCH, 2015). Os ângulos ϕ e ψ no dímero MM otimizado do alginato apresentam valores de $-80,5^\circ$ e $-133,0^\circ$, respectivamente (Tabela 18). Estes valores são próximos aos encontrados por experimentos de cristalografia de raios-X para resíduos de MM em tetrassacarídeos de alginato linear ($\phi = -89,3^\circ$ e $\psi = 136,2^\circ$) (MISHIMA *et al.*, 2003).

A forma di-protonada do dímero de quitosana foi escolhida, devido estar na forma protonada utilizada experimentalmente, pH 2,8, para a produção do hidrogel ALG:QUI (ELSABEE *et al.*, 2009; KUMIRSKA *et al.*, 2011). A conformação de energia mais baixa (Figura 19 (b)) apresenta sete ligações H ($f = 1,990$ Å, $g = 2,465$ Å, $h = 2,507$ Å, $i = 1,998$ Å, $j = 1,832$ Å, $k = 2,371$ Å e $l = 2,484$ Å, Tabela 3). As ligações *i* e *j* ajudam a manter os dois anéis de piranosídicos no mesmo plano médio (Figura 20 (b')), como pode ser verificado pela pequena magnitude do ângulo diedro χ ($-11,3^\circ$, Tabela 18). Este valor é menor que o obtido no dímero de alginato ($20,1^\circ$, Tabela 20). Portanto, quando comparado ao alginato, o dímero de quitosana

apresenta maior planaridade entre suas unidades sacarídeas. No entanto, os valores de φ e ψ no dímero de quitosana são maiores do que os obtidos para o dímero de alginato ($-96,7^\circ$ e $-153,8^\circ$ contra $-80,5^\circ$ e $-133,0^\circ$, respectivamente).

Quando otimizada, a molécula de glifosato di-protonada deforma-se o suficiente para privilegiar a formação de duas ligações H ($m = 1,806 \text{ \AA}$ e $n = 1,930 \text{ \AA}$), adotando a geometria de um anel de oito membros (Figura20(c)). A forma di-protonada foi escolhida porque esta está presente em maior quantidade em meio levemente ácido (BARJA *et al.*, 1998; CARNEIRO *et al.*, 2015; PEIXOTO *et al.*, 2015).

Tabela 3 – Distância H \cdots O (em angstroms) e ângulo de ligação X–H \cdots O para as ligações de hidrogênio intramoleculares formadas ($a - n$) nas geometrias de mínimo de energia das espécies isoladas

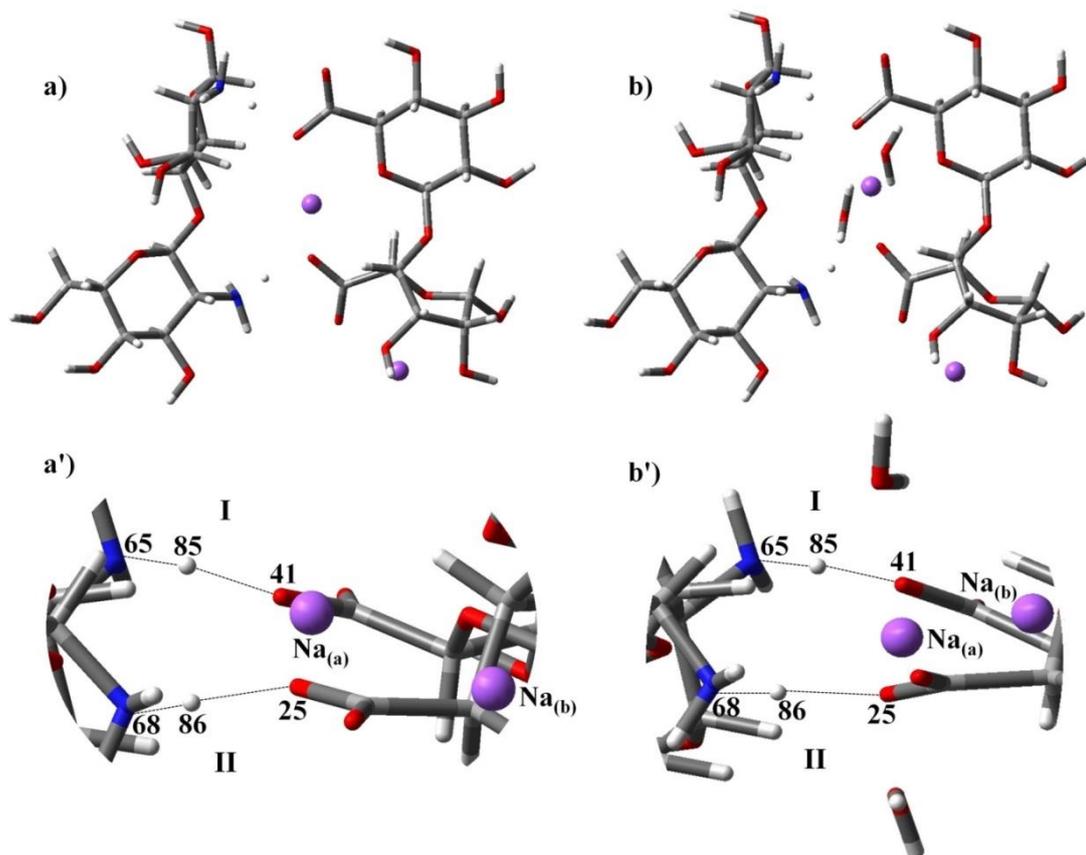
	<i>Ligação-H</i>	<i>Identificação</i>	Isolado	ALG:QUI	ALG:QUI.2H2O	ALG:QUI/GLP
$d_{(H\cdots O)}$	a	(37–38...40)	1,660	2,013	2,017	1,974
	b	(35–36...37)	2,275	2,499	2,499	2,456
	c	(30–31...35)	2,198	2,406	2,395	2,378
	d	(28–29...21)	1,974	5,959	5,823	5,954
	e	(8–9...33)	2,213	3,560	3,560	3,556
	f	(88–90...81)	1,990	1,990	1,988	1,988
	g	(71–72...88)	2,465	2,484	2,475	2,488
	h	(68–69...71)	2,507	2,507	2,258	2,284
	i	(73–74...63)	1,998	2,261	2,143	3,936
	j	(68–86...83)	1,832	5,225	5,383	5,939
	k	(65–67...73)	2,371	2,693	2,682	2,664
	l	(65–66...87)	2,484	2,564	2,530	2,521
	m	(97–107...103)	1,806			2,076
	n	(105–106...93)	1,930			1,698
$\alpha_{(X-H\cdots O)}$	a	(37–38...40)	150,59	130,59	131,34	134,97
	b	(35–36...37)	114,10	101,54	101,69	103,77
	c	(30–31...35)	115,96	106,41	106,74	108,29
	d	(28–29...21)	153,74	35,71	37,94	37,94
	e	(8–9...33)	114,11	2,27	2,38	3,92
	f	(88–90...81)	131,36	132,58	132,73	134,87
	g	(71–72...88)	102,66	102,62	102,79	102,16
	h	(68–69...71)	92,52	107,37	107,32	108,68
	i	(73–74...63)	149,23	147,95	146,78	75,01
	j	(68–86...83)	165,45	70,63	73,58	52,91
	k	(65–67...73)	102,14	93,78	93,23	88,84
	l	(65–66...87)	97,58	101,15	102,17	103,71
	m	(97–107...103)	128,98			119,74
	n	(105–106...93)	156,10			165,58

Fonte: A autora, 2018.

4.1.2. Avaliação das interações entre os dímeros de alginato de sódio e quitosana

Os dímeros de alginato e quitosana otimizados foram aproximados entre si por diferentes posições (face-a-face, lado-a-lado e perpendicular). Assim, um cátion sódio foi adicionado perto de cada grupo COO^- dentro dos arranjos de partida alginato/ 2Na^+ /quitosana, assegurando carga líquida neutra para o dímero de alginato. Em seguida todas as coordenadas atômicas de cada arranjo foram relaxadas, levando a duas conformações distintas ao complexo ALG:QUI (Figura 23). A conformação de energia mais baixa obtida é derivada da aproximação lado-a-lado (Figura 23 e 59(a)). Esse arranjo é $8,5 \text{ kcal mol}^{-1}$ mais estável do que aquele fornecido pela otimização da estrutura de partida face-a-face (Figura 59 (b)). O arranjo perpendicular foi convertido para o arranjo face-a-face. Durante a discussão dos resultados, apenas a conformação mais estável será considerada.

Figura 23 - Estruturas dos complexos (a e a') ALG:QUI e (b e b') ALG:QUI.2H₂O otimizados com a metodologia B3LYP/6-311+G(d,p): (a e b) vista superior e (a' e b') vista lateral ampliada. As linhas pontilhadas indicam as ligações-H intermoleculares (I e II)



Fonte: A autora, 2018.

É possível supor a formação de duas ligações-H intermoleculares (**I** e **II**) na conformação de energia mais baixa de ALG:QUI, que envolve o grupo $\sim\text{NH}_3^+$ da quitosana e o grupo COO^- do alginato ($\text{N}(68)\text{—H}(86)\cdots\text{O}(85)$ e $\text{N}(65)\text{—H}(85)\cdots\text{O}(41)$, respectivamente, (Figura 23(a')). Do ponto de vista clássico, as ligações-H são predominantemente de natureza eletrostática. Entretanto, elas podem apresentar alguma contribuição covalente e, também interações fracas, que nos casos limites têm caráter dispersivo-repulsivo considerável, derivando em interações de *van der Waals* (BAPTISTA *et al.*, 2008; DESIRAJU, 2002). Um estudo de dinâmica molecular de Born-Oppenheimer de aglomerados de ácido fórmico carregados mostra que esse tipo de ligação é importante para a estabilidade do aglomerado (BAPTISTA *et al.*, 2010). Neste estudo, a migração de um átomo de hidrogênio entre duas unidades de ácido fórmico estabiliza o aglomerado em fase gasosa. O presente caso mostra um padrão semelhante: os átomos de hidrogênio (86) e (85) podem migrar entre átomos de nitrogênio e oxigênio estabilizando o complexo ALG:QUI. A natureza das ligações-H formadas nos complexos ALG:QUI calculados será analisada mais profundamente com o auxílio dos métodos EDA e NBO.

Tabela 4 -Distância de ligação $\text{Na}_{(a)}\text{—O}$ em angstrom ($d_{\text{Na—O}(x)}$ sendo x = número do átomo envolvido), carga NBO em $\text{Na}_{(a)}$ (q_{Na} , em \bar{e}), energia de coordenação de $\text{Na}_{(a)}$ (E_{coord} , em kcal mol^{-1}) e sua porcentagem de contribuição ($\%C$) para a energia total de estabilização ($E_{\text{stab}(T)}$, em kcal mol^{-1}), nos complexos ALG:QUI, ALG:QUI.2H₂O e ALG:QUI/GLP

	ALG:QUI	ALG:QUI .2H ₂ O		ALG:QUI/GLP	
$d_{\text{Na—O}(x)}$	2,250 ⁽²⁵⁾	2,342 ⁽²⁵⁾	2,374 ^{(H₂O_(a))}	2,303 ⁽²⁵⁾	2,430 ⁽¹⁰⁴⁾
	2,197 ⁽⁴¹⁾	2,314 ⁽⁴¹⁾	2,349 ^{(H₂O_(b))}	2,433 ⁽⁴¹⁾	2,355 ⁽¹⁰⁵⁾
	2,372 ⁽²¹⁾	2,473 ⁽²¹⁾		2,589 ⁽²¹⁾	2,607 ^{(H₂O_(b))}
	3,590 ⁽⁵²⁾	3,387 ⁽⁵²⁾		3,817 ⁽⁵²⁾	
q_{Na}	+0,788	+0,645		+0,595	
E_{coord}	30,4	43,4		112,6	
$E_{\text{stab}(T)}$	81,9	105,5		256,7	
$\%C$	37,1	41,1		43,9	

Fonte: A autora, 2018.

Seguindo a Equação 1, a energia total envolvida na estabilização do complexo ALG:QUI é de 81,9 kcal mol^{-1} . A contribuição devida apenas à coordenação do cátion $\text{Na}(a)$ (Equação 4) é de 30,4 kcal mol^{-1} . Esse valor corresponde a 37,1% da energia total de estabilização do

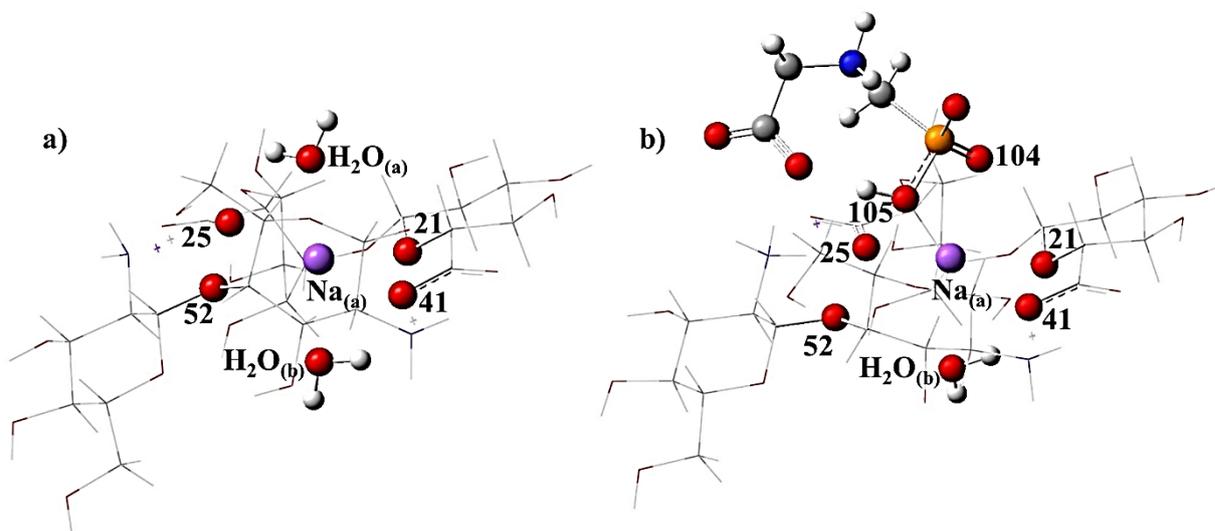
complexo ALG:QUI (Tabela 4). Consequentemente, outras interações importantes além desta devem contribuir para a energia estabilização.

Depois de analisar os parâmetros geométricos descritos acima é possível inferir que, após a formação do complexo ALG:QUI, o dímero de alginato sofre uma mudança bem mais significativa em sua geometria do que o de quitosana. Este fato é perfeitamente corroborado pela energia de deformação calculada (Equação 8); cerca de três vezes maior para o alginato em relação à quitosana (54,4 contra 16,0 kcal.mol⁻¹).

4.1.3. Análise do complexo ALG:QUI microssolvatado: adição de 2 moléculas de H₂O

Interações muito específicas entre soluto e solvente foram investigadas por uma abordagem de microsolvatação. Duas moléculas de água foram adicionadas ao complexo, a fim de completar a coordenação de Na_(a) e estudar a formação da ligação-H na presença da água. Este número pequeno de moléculas de água é um primeiro passo para descrever o efeito do solvente durante a formação de polieletrólitos, o que não pode ser conseguido usando modelos de solvatação contínuos. Quando duas moléculas de água são aproximadas ao complexo ALG:QUI, elas se movem em direção à esfera de coordenação do cátion sódio, formando um arranjo octaédrico em torno de Na_(a) (Figura 24 (a)). O ângulo diedro χ entre as unidades sacarídeas diminui ligeiramente (11,2 ° em alginato e 3,0 ° em quitosana, Tabelas 18 e 19). Da mesma forma, o comprimento e o ângulo das ligações glicosídicas, tanto no alginato como na quitosana, praticamente não se alteram. Assim, não há variações estruturais significativas em ambos os dímeros na presença de duas moléculas de água. Consequentemente, a energia de deformação para o dímero de alginato é alterada em apenas 4,1 kcal mol⁻¹ e a do dímero de quitosana praticamente não muda, à medida que o complexo microssolvatado ALG:QUI.2H₂O é formado (Tabela 20, p. 172). Contudo, a presença das duas moléculas de água promove um aumento de 23,6 kcal mol⁻¹ na energia total de estabilização do complexo (105,5 kcal mol⁻¹). A contribuição de Na_(a) aumenta em 13,0 kcal mol⁻¹, aumentando para 43,4 kcal mol⁻¹, o que corresponde a 41,1% da energia total de estabilização (ver Tabela 3).

Figura 24— Esfera de coordenação do cátion sódio nos complexos ALG:QUI.2H₂O (a) e ALG:QUI/ GLP (b)



Fonte: A autora, 2018.

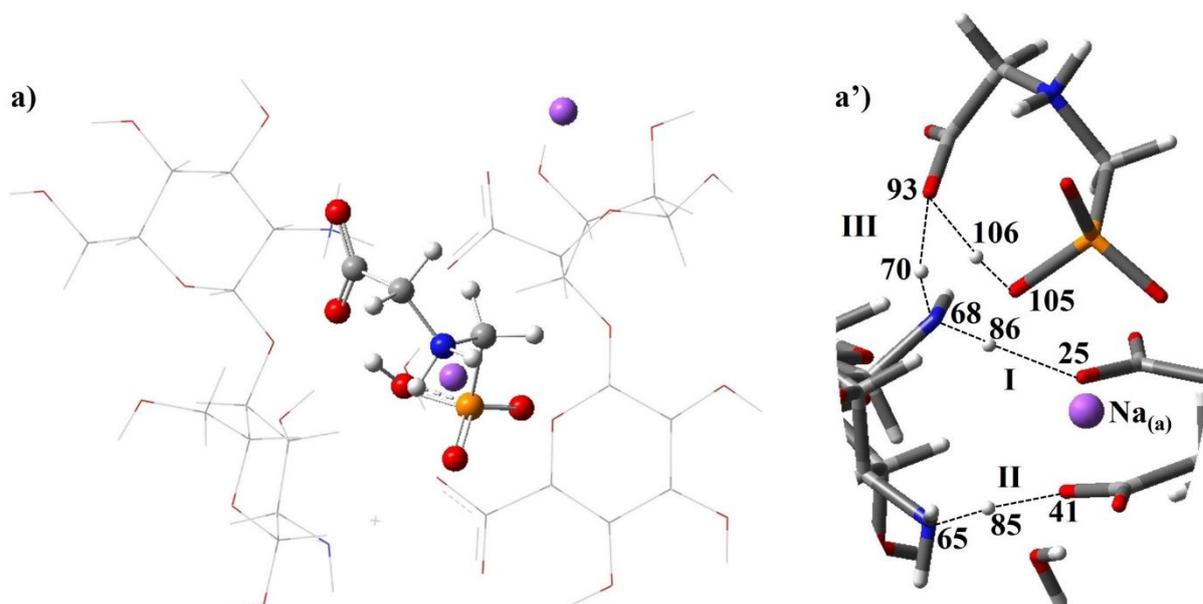
4.1.4. Interação entre o complexo ALG:QUI e a molécula de glifosato

A molécula de glifosato coordena em Na(a) pelos átomos de oxigênios (105) e (104) do grupo fosfato em um modo bidentado, permanecendo mais próximo do dímero de quitosana (Figura 25). Os comprimentos de ligação Na(a)—O envolvendo O(105) e O(104) medem 2,355 Å e 2,430 Å, respectivamente (Tabela 4). A presença de GLP causa um aumento no comprimento da ligação Na(a)—O para O(41), O(21) e O(52) de 2,314 Å, 2,473 Å e 3,387 Å para 2,433 Å, 2,589 Å e 3,817 Å, respectivamente. A exceção está em O(25), cujo valor diminui de 2,342 Å para 2,303 Å. O ângulo χ diedro sofre um aumento de 33,3 ° na quitosana e apenas 1,3° no alginato (de 50,1 ° para 83,4 ° e de -107,5 ° para -108,8 °, respectivamente, Tabelas 18 e 19). O mesmo comportamento é observado em φ e ψ , cujos valores apresentam uma grande mudança na quitosana (de -60,9° e -123,1° para -53,9° e -92,8° respectivamente) em comparação com alginato (de 62,8° e 63,2 ° para 67,6° e 55,5°, respectivamente).

A Figura 25(a') mostra uma terceira ligação-H, **III**, envolvendo o grupo carboxila da molécula de glifosato e o grupo amino do dímero de quitosana, surge à medida que o complexo ALG:QUI/GLP é formado. Além disso, as duas ligações-H intermoleculares ligando alginato e quitosana no complexo ALG:QUI são mantidas, mesmo na presença da molécula de glifosato. É interessante notar também que, após a formação da ligação-H **III**, ambas as ligações-H intramoleculares *m* e *n* na molécula de GLP são mantidas (Figura 25(a')). No entanto, *n* sofre um

encurtamento significativo (de 1,930 Å para 1,698 Å), enquanto *m* apresenta comportamento oposto, alongando de 1,806 Å a 2,076 Å. Os ângulos de ligação para as ligações *m* e *n* são ligeiramente modificados após a formação do complexo, o primeiro diminuindo de 129,0° para 119,7° e o último aumentando de 156,1° para 165,6° (Tabela 3).

Figura 25 - Estrutura de energia mínima do complexo ALG:QUI/GLP: (a) vista superior e (a) vista lateral estendida. Linhas pontilhadas representam as ligações H intermoleculares (I, II e III)



Fonte: A autora, 2018.

A presença de glifosato causa um aumento de 6,7 kcal mol⁻¹ na energia de deformação para quitosana, enquanto que para alginato, esta energia diminui em 3,9 kcal mol⁻¹ (Tabela 20). Estes resultados reforçam que a molécula de glifosato deve interagir com o dímero de quitosana mais fortemente do que com o dímero de alginato. Este resultado foi corroborado pela análise de microscopia de fluorescência realizada. A partir da análise de micrografias CLSM (Microscopia de Varredura Confocal a Laser) (Figura 54, p. 140) foi possível observar que, antes da incorporação do glifosato, os reagentes de fluorescência revelaram claramente os polissacarídeos alginato e quitosana (Figura 54(a)). No entanto, após a incorporação do glifosato, o polissacarídeo quitosana é aparentemente encoberto, um indicativo de que o herbicida glifosato deve se ligar mais fortemente a quitosana do que ao alginato.

A coordenação do Na_(a) contribui com 112,6 kcal mol⁻¹ para a energia total de estabilização do complexo ALG:QUI/GLP, cujo valor é de 256,7 kcal mol⁻¹. Esse valor corresponde a 44% da energia total de estabilização, percentual um pouco maior quando

comparado ao complexo contendo duas moléculas de água (41%) (Tabela 4).

4.1.5. Fragmentando a energia de estabilização no complexo ALG:QUI (EDA)

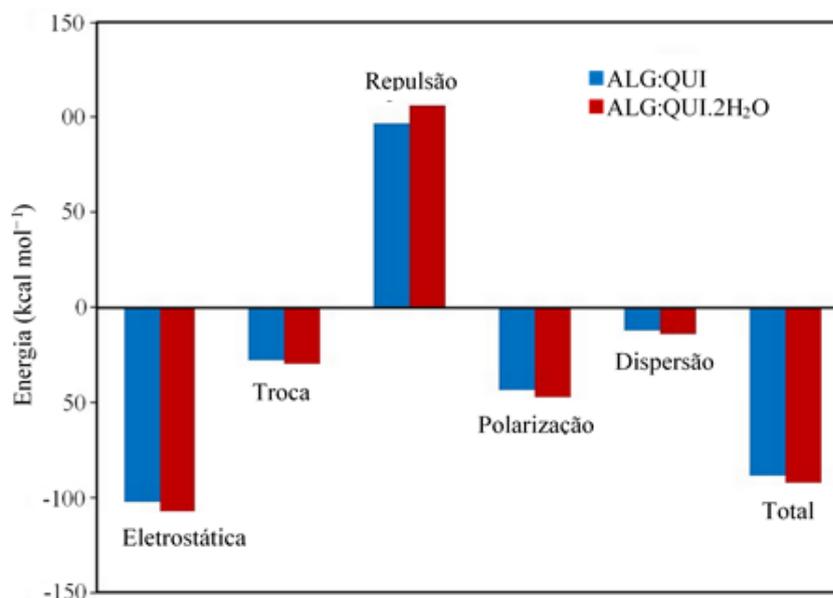
A energia de estabilização total envolvida na formação do complexo ALG:QUI foi decomposta usando o método LMOEDA (Análise de Decomposição de Energia para Orbitais Moleculares Localizados) (SU e LI, 2009) implementado no programa GAMESS (SCHMIDT *et al.*, 1993). Este método divide a energia total de estabilização em cinco componentes: eletrostática, contribuição de Pauli atrativa (troca) e repulsiva, dispersão e polarização. O termo eletrostático refere-se à interação quasi-clássica entre as cargas distribuídas em cada fragmento do complexo. Inclui a soma das interações de Coulomb atrativas (elétron-núcleo) e repulsivas (núcleo-núcleo e elétron-elétron) entre os monômeros; na maioria dos casos, uma contribuição atrativa. Os termos de Pauli são puramente quânticos, decorrentes da antissimetria e renormalização da função de onda do complexo. O primeiro resulta da ocorrência de troca de elétrons entre os fragmentos devido ao caráter antissimétrico da função de onda, enquanto o último é uma consequência de um procedimento de ortogonalização que adiciona nós extras aos orbitais, aumentando assim a energia cinética do sistema pela diminuição do volume disponível para cada elétron. A contribuição atrativa denominada energia de polarização vem do relaxamento da função de onda durante o processo de formação do complexo a partir de seus fragmentos. Este termo é um indicativo importante da natureza covalente da interação dentro do complexo. A componente dispersão, também atrativa, mede a diferença entre a energia de correlação do complexo e seus fragmentos (HORN, 2016; RAUPACH e TONNER, 2015; THELLAMUREGE e HIRAO, 2013). O resultado da análise de decomposição de energia é mostrado na Figura 26.

A análise LMOEDA aponta para a mesma direção que a maioria dos trabalhos relatados na literatura: a formação do complexo polieletrólito é predominantemente dominada pela contribuição eletrostática (FAJARDO *et al.*, 2012; HARTIG *et al.*, 2007; KULKARNI *et al.*, 2016). Este resultado pode ser visto na Figura 25, onde a contribuição eletrostática na formação do complexo ALG:QUI (barra azul) é de 102,1 kcal mol⁻¹. A energia total calculada neste método de fragmentação de energia tem valor de 88,9 kcal mol⁻¹.

O componente de polarização apresenta contribuição de 43,8 kcal mol⁻¹. Este é aproximadamente 40% do valor observado para a componente eletrostática. O termo de

polarização reflete o grau de modificação dos orbitais de fronteira em um fragmento devido à presença de outro em sua vizinhança. Portanto, quanto maior a contribuição desta componente, maior o caráter covalente na ligação entre os fragmentos (THELLAMUREGE e HIRAO, 2013).

Figura 26 -Análise de decomposição de energia de estabilização dos complexos ALG:QUI e ALG:QUI.2H₂O



Fonte: A autora, 2018.

A Figura 26 mostra que a presença de duas moléculas de água na esfera de coordenação do sódio aumenta todas as componentes da energia de estabilização. Analisando cada um deles individualmente, a repulsão é o termo mais influenciado (variando de 96,6 a 106,2 kcal mol⁻¹). No entanto, a soma de todas as componentes favoráveis à estabilização do complexo ALG:QUI.2H₂O supera o aumento observado no termo de repulsão de Pauli. Conseqüentemente, a presença de duas moléculas de água aumenta a energia total de estabilização em aproximadamente 3,4 kcal mol⁻¹ (de 88,8 para 92,2 kcal mol⁻¹).

Como mencionado anteriormente, o cálculo do LMOEDA aponta que a componente eletrostática é a principal contribuição no processo de complexação entre os dímeros de alginato e quitosana, no entanto, também indica uma contribuição importante da componente covalente, a ser investigada. Para elucidar a origem dessa contribuição, cálculos dos orbitais naturais de ligação (NBO) foi usado.

4.1.6. Análise dos Orbitais Naturais de Ligação (NBO)

A análise NBO aponta para a formação de ligações-H dentro dos dímeros isolados de alginato e quitosana. No alginato, a ligação-H mais curta, *a* (1,660 Å), é a mais forte, envolvendo uma energia de 24,3 kcal mol⁻¹. Já em quitosana, *j*, a segunda mais curta ligação-H (1,832 Å), apresenta a maior energia (12,7 kcal mol⁻¹), no entanto, quase a metade do valor visto para o dímero de alginato. Todas as outras ligações H em ambos os dímeros isolados apresentam energias muito menos significativas (2,8–3,1 kcal mol⁻¹). Tais energias mencionadas foram calculadas segundo a Equação 9, e as distâncias das ligações-H podem ser verificadas nas Tabela 3 com o auxílio da Figura 20.

Tabela 5 - Carga sobre os átomos de oxigênio e hidrogênio (em \bar{e}), distância O...H e ângulo de ligação N–H...O (em angstrom) e energia (kcal.mol⁻¹) envolvida nas ligações de hidrogênio formadas nos complexos ALG:QUI, ALG:QUI.2H₂O e ALG:QUI/GLP

<i>Complexo</i>	<i>Átomo</i>	<i>ALG:QUI</i>	<i>ALG:QUI .2H₂O</i>	<i>ALG:QUI/GLP</i>
<i>q(O)</i>	(25)	-0,854	-0,837	-0,788
	(41)	-0,888	-0,868	-0,855
	(93)			-0,845
<i>q(H)</i>	(86)	+0,472	+0,471	+0,468
	(85)	+0,470	+0,467	+0,466
	(70)			+0,454
<i>d(H...O)</i>	(86...25)	1,638	1,642	1,733
	(85...41)	1,667	1,619	1,570
	(70...93)			1,802
<i>a(N–H...O)</i>	(68–86...25)	170,54	167,25	173,50
	(65–85...41)	164,13	167,89	171,39
	(68–70...93)			162,61
<i>E_{H-bond}</i>	(86...25)	32,18	31,57	21,74
	(85...41)	29,69	35,79	42,28
	(70...93)			14,46

Fonte: A autora, 2018.

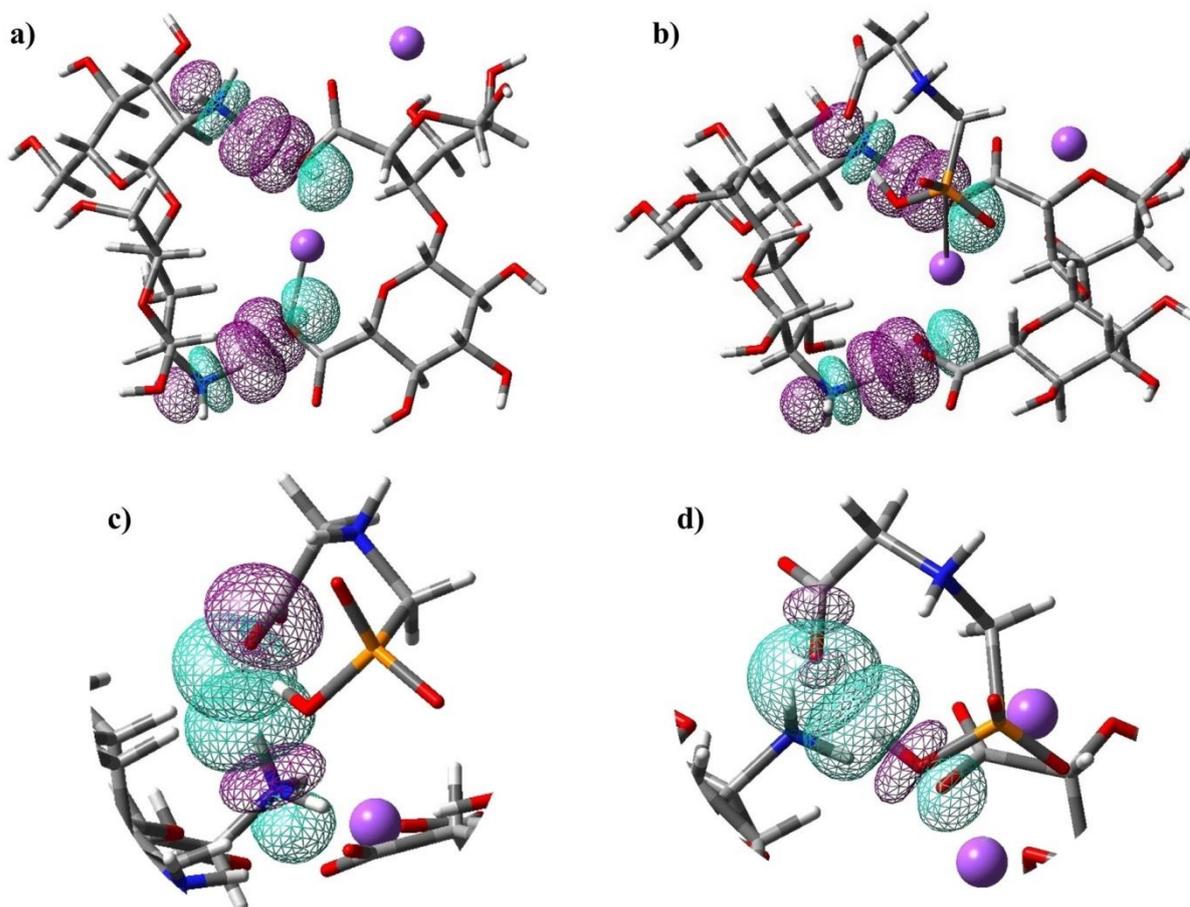
Após a formação do complexo ALG:QUI, *a* é mantida, mas uma considerável diminuição na sua energia (de 24,3 kcal mol⁻¹ para 4,0 kcal mol⁻¹), acompanhada do aumento do comprimento da ligação (de 1,660 Å para 2,013 Å), é observada. No entanto, a ligação-H mais

fraca, j , rompe completamente após a formação do complexo, aumentando seu comprimento de 1,832 Å para 5,225 Å. Consequentemente, o NBO não mostra energia de interação significativa para j dentro do complexo ALG:QUI. Quando a interação entre $\text{Na}_{(a)}$ e seus átomos de oxigênio coordenados é avaliada, a análise de NBO apresenta valores de energia em magnitude de interações de van der Waals (4,2–5,3 kcal mol⁻¹, Tabela 21 p.176). Consequentemente, as interações Na–O não devem contribuir efetivamente para o componente covalente relevante indicada pelo cálculo LMOEDA. Em contraste, a análise NBO aponta para energias de interação bem mais altas em **I** e **II**, indicando que essas ligações-H apresentam um caráter covalente significativo (32,2 kcal mol⁻¹ e 9,7 kcal mol⁻¹, respectivamente, Tabela 5). Ambas as ligações-H, **I** e **II**, ocorrem por meio da sobreposição de um par isolado com elevado caráter p (cerca de 89,0%) do átomo de oxigênio da carbonila presente no dímero de alginato, com o orbital $\sigma^*(\text{N}-\text{H})$ (hibridação $\text{sp}^{2,8}$) no grupamento NH_3^+ pertencente ao dímero de quitosana (Figura 27).

Os comprimentos de ligação em **I** e **II** medem 1.638 Å e 1.667 Å, respectivamente, e os ângulos de ligação N–H \cdots O, 164.2° e 170.5°, respectivamente (Tabela 5). Tipicamente, a transferência de carga $\text{Y}(\text{lp}) \rightarrow \sigma^*(\text{X}-\text{H})$ para um $\text{Y}\cdots\text{H}-\text{X}$ linear (ou quase linear), associado com a distância $\text{Y}\cdots\text{H}$ menor que 2,0 Å e energia de ligação de 15–40 kcal mol⁻¹, indica uma forte ligação-H (ANDREWS, 1997; HUNT *et al*, 2015). Portanto, a análise da NBO associada aos parâmetros geométricos observados indica que as ligações-H **I** e **II**, formadas entre os dímeros de alginato e quitosana, devem contribuir efetivamente para a estabilidade do complexo ALG:QUI. Além disso, essas ligações-H devem ser as principais responsáveis pela contribuição covalente expressiva observada no LMOEDA.

A análise de carga do NBO mostra um aumento na carga negativa em todos os átomos de oxigênio diretamente envolvidos na interação alginato–quitosana, após a formação de ALG:QUI (Tabelas 22 e 23). No entanto, essa modificação é mais pronunciada em O(25) e O(41), ambos pertencentes a grupos carboxila do dímero de alginato (de -0,767 e para -0,854 e de -0,710 e para -0,888 e, respectivamente). Esses átomos de oxigênio são aqueles envolvidos nas ligações-H intermoleculares e na coordenação $\text{Na}_{(a)}$, simultaneamente. Outros modelos calculados de análise populacional também preveem aumento para carga negativa em O(25) e O(41) após a formação do complexo: Mulliken (MULLIKEN, 1955), de -0,422 e para -0,495 e de -0,425 e para -0,496 e, respectivamente, e Merz-Kollman (BESLER *et al*, 1990; SINGH e KOLLMAN, 1984), de -0,813 e para -0,907 e e de -0,731 e para -0,853 e, respectivamente. Como O(25) e O(41) apresentam as cargas mais negativas e as menores distâncias de $\text{Na}_{(a)}$ –O no complexo, tais interações devem ser aquelas que mais contribuem, dentre as Na–O, para a interação eletrostática que estabiliza o complexo ALG:QUI.

Figura 27– Resultado NBO para a sobreposição $p_z-\sigma^*$ envolvida na formação de ligações-H entre dímeros de alginato e quitosana: (a) ALG:QUI; (b) ALG:QUI/GLP; (c) entre o dímero de quitosana e a molécula de glifosato e (d) ligação intramolecular m



Fonte: A autora, 2018.

Embora tenha sido verificado um aumento da carga negativa nos átomos de oxigênio que interagem diretamente com o dímero de quitosana e com o contraíon sódio após a formação do complexo ALG:QUI, observa-se uma transferência de carga do alginato para esses oxigênios. Este facto é confirmado pelo decréscimo da carga negativa total NBO no dímero de alginato (de $-2,000 \text{ e}$ para $-1,550 \text{ e}$) e pela diminuição da positiva sobre Na(a) e sobre o dímero de quitosana (de $+1,000 \text{ e}$ a $+0,788 \text{ e}$ e de $+2,000 \text{ e}$ para $+1,874 \text{ e}$, respectivamente).

Quando duas moléculas de água estão presentes na esfera de coordenação do complexo ALG:QUI, as energias em todas as interações $\text{Na}_{(a)}-\text{O}$ que envolvem alginato e quitosana aumentam (de $4,2-5,3 \text{ kcal mol}^{-1}$ para $8,6-10,6 \text{ kcal mol}^{-1}$, Tabela 22). Para a interação de $\text{Na}_{(a)}$ com os átomos de oxigênio das duas moléculas de água, estas energias são de $13,8 \text{ kcal mol}^{-1}$ para $\text{H}_2\text{O(a)}$ e $11,1 \text{ kcal mol}^{-1}$ para $\text{H}_2\text{O(b)}$, respectivamente.

A carga total nos dímeros de alginato e quitosana sofre pequena variação na presença de água, a primeira variando de $-1.550 \bar{e}$ para $-1.467 \bar{e}$ e a segunda de $+1.874 \bar{e}$ para $+1.857 \bar{e}$. No entanto, uma diminuição na carga positiva de $\text{Na}_{(a)}$ (de $+0,788 \bar{e}$ a $+0,645 \bar{e}$) e na carga negativa nos átomos de oxigênio coordenados é observada (Tabela 5). Além disso, as duas moléculas de água dentro da esfera de coordenação do sódio assumem cargas positivas ($+0,043 \bar{e}$ e $+0,048 \bar{e}$). Este comportamento da carga é consequência do aumento da energia envolvida na transferência de elétrons $\text{O} \rightarrow \text{Na}$ observada na análise NBO. Assim, a presença de água na esfera de coordenação dentro do complexo ALG:QUI promove um encurtamento das distâncias $\text{Na}-\text{O}$ para a maioria dos átomos de oxigênio diretamente coordenados (Tabela 5). No entanto, nenhuma mudança significativa nas energias envolvidas nas ligações-H intramoleculares é verificada (Tabela 5), bem como no modelo de hibridação para ligações H intermoleculares I e II, no complexo ALG:QUI.2H₂O. No entanto, as distâncias $\text{N}(68)-\text{O}(25)$ e $\text{N}(65)-\text{O}(41)$ diminuem de 2.702 \AA e 2.716 \AA para 2.698 \AA e 2.687 \AA , respectivamente. A energia de interação NBO envolvida em I aumenta em $3,8 \text{ kcal mol}^{-1}$, enquanto que em II diminui em $1,2 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Tabela 5). Assim, de acordo com os resultados da análise NBO, o aumento da interação $\text{Na}-\text{O}$ deve ser o responsável pelo aumento da energia de estabilização para o complexo hidratado ALG:QUI.2H₂O, quando comparado com o ALG:QUI.

Com a formação do complexo ALG:QUI/GLP, a ligação-H mais próxima da molécula de glifosato, I, aumenta seu comprimento de $1,638 \text{ \AA}$ para $1,733 \text{ \AA}$, enquanto o do lado oposto, II, diminui de $1,667 \text{ \AA}$ para $1,570 \text{ \AA}$ (Tabela 5). Os ângulos da ligação-H em I e II aumentam de $170,5^\circ$ e $164,1^\circ$ para $173,5^\circ$ e $171,4^\circ$, respectivamente. Consequentemente, verifica-se uma diminuição na energia envolvida em I (de $31,6$ para $21,7 \text{ kcal mol}^{-1}$) e um aumento em II (de $35,6$ para $42,3 \text{ kcal mol}^{-1}$) (Tabela 5). No entanto, mudanças significativas na hibridação dos orbitais envolvidos em I e II não são observadas.

A ligação-H observada entre a molécula de glifosato e o dímero de quitosana, **III**, apresenta energia menor que em I e II ($14,5 \text{ kcal mol}^{-1}$). Esta energia reflete o maior comprimento e menor ângulo verificados para a ligação-H III ($1,802 \text{ \AA}$ e $162,6^\circ$, respectivamente). As interações $\text{Na}_{(a)}-\text{O}$ diminuem em comparação com ALG:QUI.2H₂O ($4,3-7,8 \text{ kcal mol}^{-1}$), com exceção de O(21), que aumenta para $12,4 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Tabela 21 p. 176). Além disso, a coordenação do glifosato em $\text{Na}_{(a)}$ através de O(104) e O(105), envolvendo energias de $11,7 \text{ kcal mol}^{-1}$ e $12,5 \text{ kcal mol}^{-1}$, respectivamente, implica num aumento da transferência de elétrons $\text{O} \rightarrow \text{Na}$ e, consequentemente, na diminuição da carga positiva em $\text{Na}_{(a)}$ ($+0,595 \bar{e}$, Tabela 5) e na carga negativa na molécula de glifosato ($-0,806 \bar{e}$).

Os resultados discutidos estão restritos a um número mínimo de duas moléculas de água,

as quais foram escolhidas para representar um modelo de microsolvatação e também para completar o número de coordenação do sódio. Embora esta abordagem para representar o meio aquoso pareça ser muito simplista à primeira vista, esta permitiu observar um aumento na estabilização do complexo ALG:QUI, consequência da presença de água na esfera de coordenação de sódio. No entanto, mudanças estruturais mais significativas na conformação de dissacarídeos devem ocorrer na presença de um grande número de moléculas de água. Assim, os modelos de solvatação mais elaborados, ONIOM-PCM (Modelo Continuável Polarizável) (RE; 2004; VREVEN, 2001) e Monte Carlo / EFP Sequencial (Potencial Efetivo de Fragmentos) / DFT) (CHEN, 1996; COUTINHO, 1997, 2000; DAY *et al.* 1996) foram implementados para obter uma melhor compreensão do papel desempenhado pelo meio, porém seus resultados serão tema de um trabalho futuro.

4.1.7. Considerações finais do estudo teórico

A formação do complexo polieletrólito ALG:QUI foi investigado a partir de estruturas diméricas de alginato e quitosana. As estruturas otimizadas dos dímeros isolados são mantidas por ligações de hidrogênio intramoleculares. Os ângulos de torção calculados envolvendo a ligação glicosídica estão de acordo com aqueles encontrados na literatura por medidas de difração de raios-X (WADA *et al.*, 2009). A interação entre os dímeros de alginato e quitosana foi mediada pela adição de dois cátions Na^+ , porém apenas um deles permanece coordenado por ambos os dímeros. Também são formadas ligações de hidrogênio intermoleculares envolvendo os grupos COO^- e NH_3^+ , auxiliando na formação do complexo ALG:QUI. A inclusão de duas moléculas de água em ALG:QUI resulta em um arranjo octaédrico distorcido na esfera de coordenação do sódio. Quando uma molécula de água é substituída pela molécula de GLP, esta última se coordena com o sódio por dois átomos de oxigênio. Além disso, o GLP liga-se ao dímero de quitosana por uma ligação de hidrogênio com o grupo NH_3^+ , no entanto, enfraquecendo a ligação de hidrogênio responsável pela formação do complexo ALG:QUI. A extensão da participação do contra-íon sódio coordenado por ambos os dímeros variam em uma faixa de 37–44% de contribuição para a estabilidade do complexo ALG:QUI. A presença de duas moléculas de água aumenta a estabilidade do complexo em quase 24 kcal mol^{-1} . Por meio dos cálculos EDA, outras contribuições poderiam ser estimadas. A formação do complexo é regida por um caráter predominantemente eletrostático, conforme é relatado na literatura (ABREU *et al.*, 2018),

resultante da interação iônica entre os grupos COO^- e NH_3^+ . No entanto, os dois interagem por meio de ligações de hidrogênio e da coordenação com o íon sódio, que também contribuem efetivamente para o caráter eletrostático. Além disso, uma contribuição covalente significativa devido aos efeitos de polarização é verificada, sendo aproximadamente 40% em peso do valor da componente eletrostática. Esse resultado é corroborado pela análise NBO que aponta para um expressivo caráter covalente das ligações de hidrogênio por meio da sobreposição $\text{lp}(\text{O}) \rightarrow \sigma^*(\text{N}-\text{H})$, com energia média de 30 kcal mol^{-1} .

Resumindo, o complexo ALG:QUI formado por resíduos de dissacarídeos ocorre via coordenação do Na^+ e formação de duas ligações de hidrogênio com caráter covalente expressivo, somadas à interação iônica entre os grupos carregados COO^- e NH_3^+ . O papel do contra-íon foi estimado. Este contribui em uma faixa de 37–44% para a energia total de estabilização do complexo polieletrólítico. A presença de duas moléculas de água aumenta a estabilidade do complexo ALG:QUI. Quando uma molécula de água foi substituída por uma molécula de GLP, esta última não apenas se coordena ao contra-íon sódio, mas também interage com a quitosana por meio de uma ligação-H, entretanto mais fraca do que as formadas entre os dímeros de alginato e quitosana.

4.2. Estudo experimental

A primeira etapa desse estudo trata da caracterização dos polissacarídeos (alginato de sódio e quitosana) puros. A segunda etapa teve como objetivo o estudo sistemático de todas as composições de bio-hidrogéis preparadas à base de alginato de sódio e quitosana, onde foi investigada a influência de diferentes concentrações e razões volumétricas dos polissacarídeos, bem como a influência do pH do meio e da temperatura de preparo. O grau de intumescimento, a estabilidade térmica, a composição química, as propriedades morfológicas e mecânicas foram propriedades determinantes para a escolha da melhor amostra de biohidrogel (amostra ideal), a qual será avaliada na etapa seguinte.

Sendo assim, na terceira etapa desse estudo, a amostra a ideal foi avaliada quanto à sua eficiência na adsorção e na liberação gradativa do herbicida glifosato, bem quanto à sua estabilidade térmica, às propriedades morfológicas e mecânicas após a adsorção do glifosato.

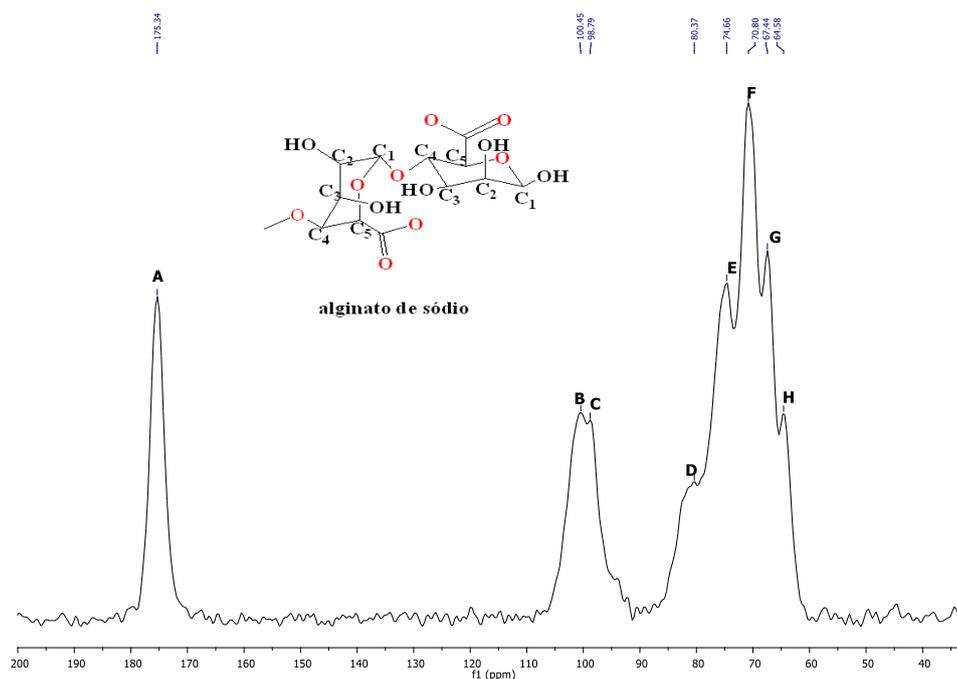
A Figura 28 mostra o espectro de ^{13}C CP-MAS NMR no estado sólido da amostra de alginato de sódio. A grande vantagem dessa técnica é ser não destrutiva e não necessitar de

nenhum preparo. A relação entre os blocos M/G do alginato foi determinada usando a soma das intensidades dos sinais de manuronato (bloco-M) pela soma das intensidades dos sinais de guluronato (bloco-G) (Equação 10 (p.61) e Tabela 6 (p.95)), de acordo com SALOMONSEN *etal.*, 2009.

O teor de unidades manuronato (M) foi estimado através dos sinais E e F do espectro mostrado na Figura 28 e o teor de unidades guluronato (G), pelos sinais D, G e H do espectro. Essa amostra de alginato de sódio apresentou 62,8 % de unidades M e 37,2 % de unidades G.

Ressalta-se, a partir desse resultado, que a conformação MM foi a utilizada como ponto de partida para a otimização do dímero de alginato de sódio, no estudo teórico, em virtude de a amostra que seria utilizada no estudo experimental conter maior teor de unidades M. Somado a isso, a conformação MM também possui maior área específica disponível para interagir com a molécula de quitosana no estudo computacional.

Figura 28 - Espectro de ^{13}C CP-MAS NMR do alginato de sódio



Fonte: A autora, 2018.

A determinação do grau de desacetilação da quitosana foi determinado por análise elementar (CHN), seguindo o método descrito em Tian *et al.*, 2004. A composição elementar da quitosana foi: carbono (39,19 %); hidrogênio (7,33 %) e nitrogênio (7,42 %). O grau de desacetilação foi calculado de acordo com a Equação 2 e o valor encontrado foi de 92 %.

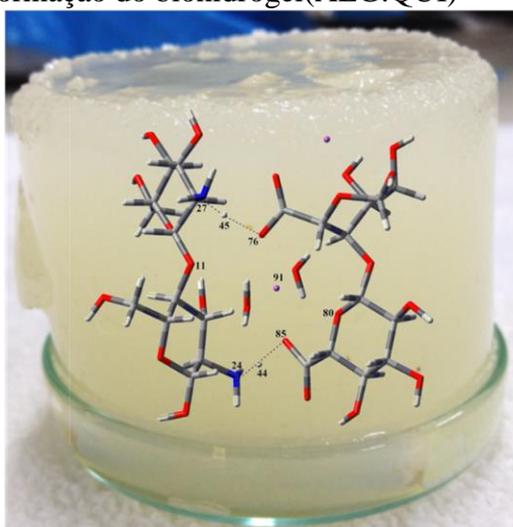
Tabela 6 - Atribuições do alginato no espectro de ^{13}C CP-MAS NMR

Atribuições	$\delta(\text{ppm})$ - literatura	Amostra analisada	
		δ (ppm)	Área
(A) C=O	177 - 178	179,9 – 175,5	13,3
(B) O-C ₁ -O (G1)	102	100,9	9,7
(C) O-C ₁ -O (M1)	99,5	98,8	8,0
(D) O-C ₄ (G4)	82,8	81,4	8,5
(E) O-C ₄ (M4)/O-C ₅ (M5)	76,4	75,1	17,8
(F) C ₃ (M3)/C ₂ (M2)	71,6	70,8	25,8
(G) C ₃ (G3)/C ₅ (G5)	68,4	67,6	10,8
(H) C ₂ (G2)	65,5	64,7	6,4

Fonte: A autora, 2018.

Nesta Tese, os bio-hidrogéis foram produzidos a partir da mistura física de dois polissacarídeos lineares (ALG:QUI), formando um complexo polieletrólítico (PEC). Essa mistura foi realizada a partir das respectivas soluções de cada polissacarídeo. O estudo teórico mostrou que o complexo PEC se forma através da coordenação do Na^+ e da formação de duas ligações de hidrogênio com caráter covalente expressivo, somadas à interação iônica entre os grupos iônicos do alginato (COO^-) e da quitosana (NH_3^+) (Figura 29).

Figura 29 - Representação da formação do biohidrogel(ALG:QUI)



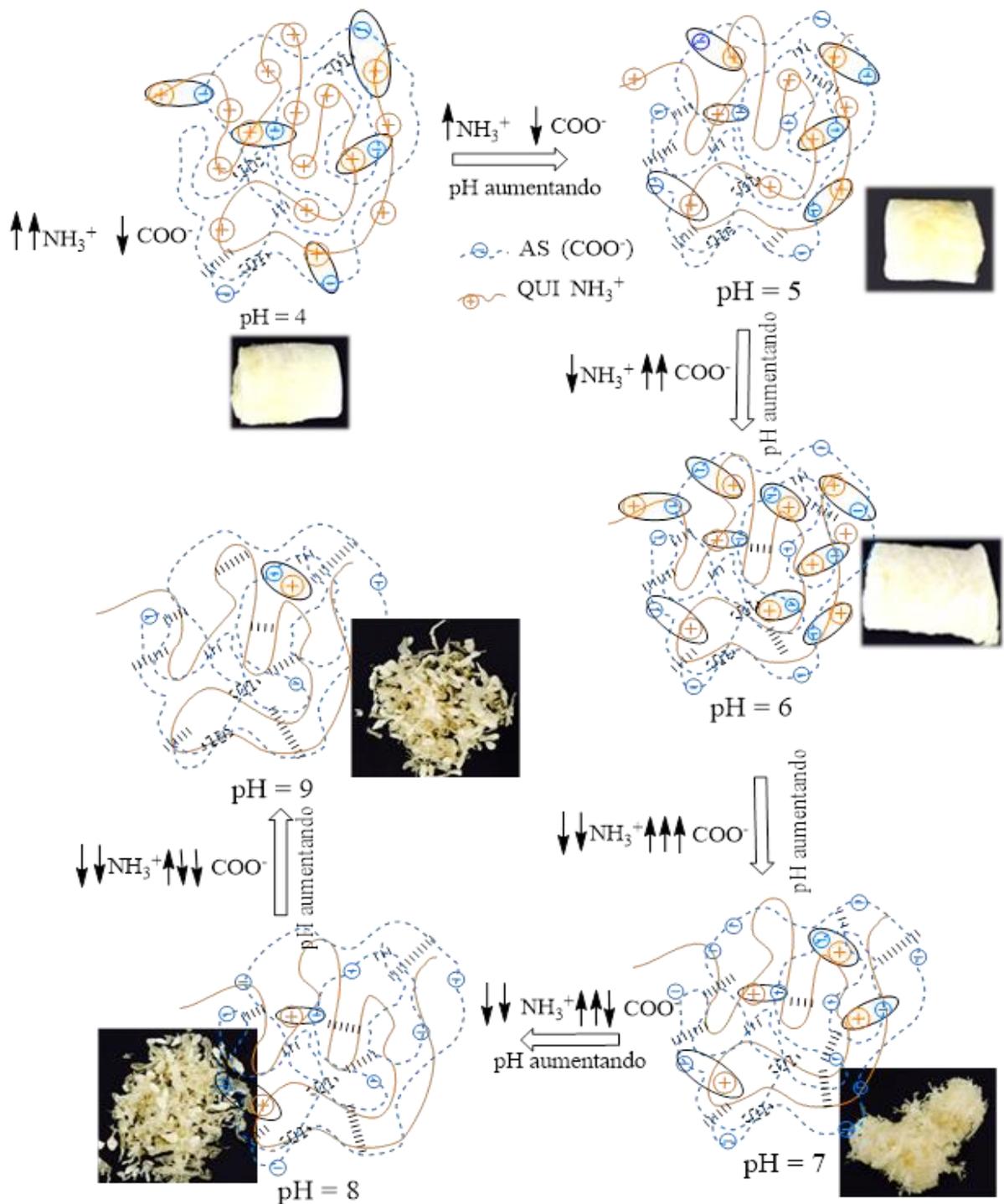
Fonte: A autora, 2018.

Os resultados mostrados e discutidos a seguir serão das amostras de bio-hidrogéis preparadas nas seguintes condições: razões volumétricas ALG:QUI de 1:1; 2:1 e 1:2, pH de 4 a

6 e temperatura de 25 e 50 °C. Os bio-hidrogéis preparados em pH 7, 8 e 9 não foram caracterizados, devido à forma irregular (inadequada) que se apresentaram, conforme mostrado nas fotografias digitais da Figura 30. Provavelmente, isso ocorreu, pois em meio neutro a alcalino, o desequilíbrio de grupos iônicos em ambos os polissacarídeos, impediu a formação do hidrogel, devido à ausência de interações iônicas atrativas suficientes (Figura 30).

Os cálculos teóricos realizados nesta Tese, com a base funcional B3LYP/6-311+G(d,p), permitiu verificar que, além das interações eletrostáticas, outras interações também foram responsáveis pela estabilização do complexo formado (ALG:QUI).

Figura 30 - Ilustração esquemática das vias de preparo dos complexos ALG : QUI e fotografia digital das amostras em cada um dos diferentes valores de pH



Legenda: ↑↑↑- elevadíssima concentração de íons; ↑↑- elevada concentração de íons;
 ↑- pouca concentração de íons; ↓↓↓- baixíssima concentração de íons;
 ↓↓- baixa concentração de íons; ↓- menor concentração de íons.

Fonte: A autora, 2018.

Os biohidrogéis produzidos foram caracterizados pelas seguintes técnicas: grau de intumescimento; SEM; TG; FTIR; ¹³C CP-MAS NMR; e resistência à compressão.

4.2.1. Grau de intumescimento (GI)

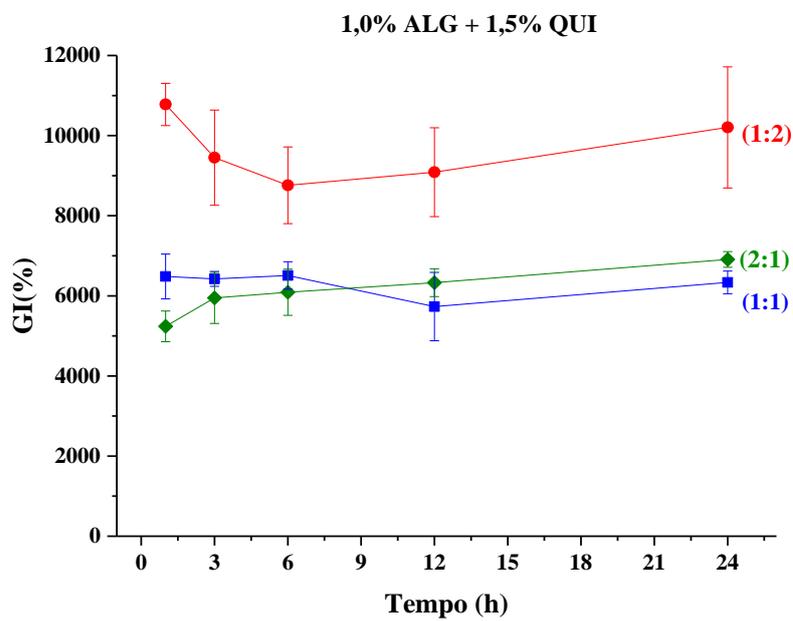
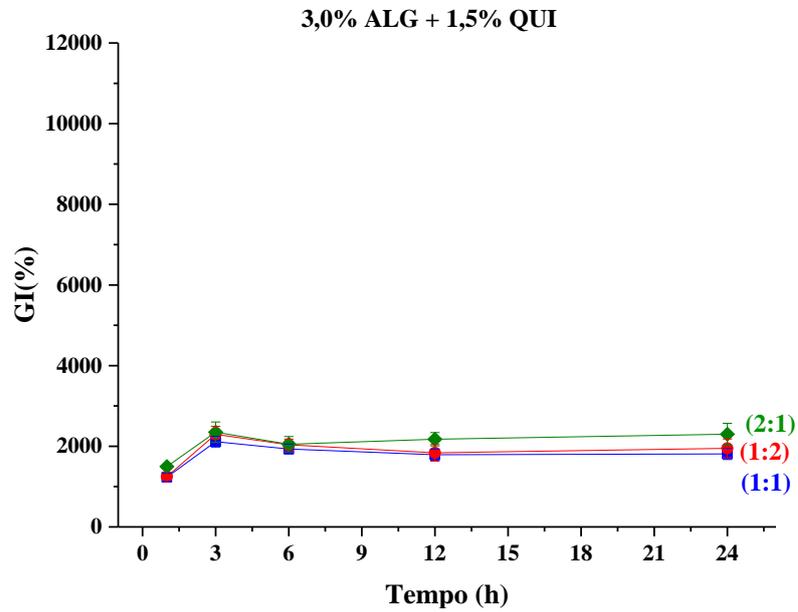
O estudo do intumescimento é muito importante para as aplicações dos bio-hidrogéis. Fatores, tais como, concentração das soluções dos polissacarídeos, razão volumétrica entre as soluções, pH e temperatura do meio, são parâmetros que podem influenciar, significativamente, no intumescimento. Da mesma forma, o balanço hidrofílico/hidrofóbico dos hidrogéis, o grau de reticulação e, especialmente, o grau de ionização e suas interações, são parâmetros importantes para o controle do equilíbrio de intumescimento, mudança dimensional e liberação de substâncias (GANJI *et al.*, 2010).

As moléculas de solvente, quando em contato com o hidrogel, no seu estado inicial (liofilizado), são absorvidas pela superfície do hidrogel e penetram no interior da rede polimérica, hidratando primeiro os grupos hidrofílicos e polares, fazendo, conseqüentemente, com que o hidrogel comece a se expandir. Os grupos apolares ficam expostos, interagindo, também, com as moléculas de água e assim, outra parcela de água irá entrar na estrutura do gel levada pelo efeito da força osmótica (FROIXE NELSON, 1975; HOFFMAN, 2002)

4.2.1.1. Influência da concentração das soluções de alginato de sódio e quitosana sobre o GI

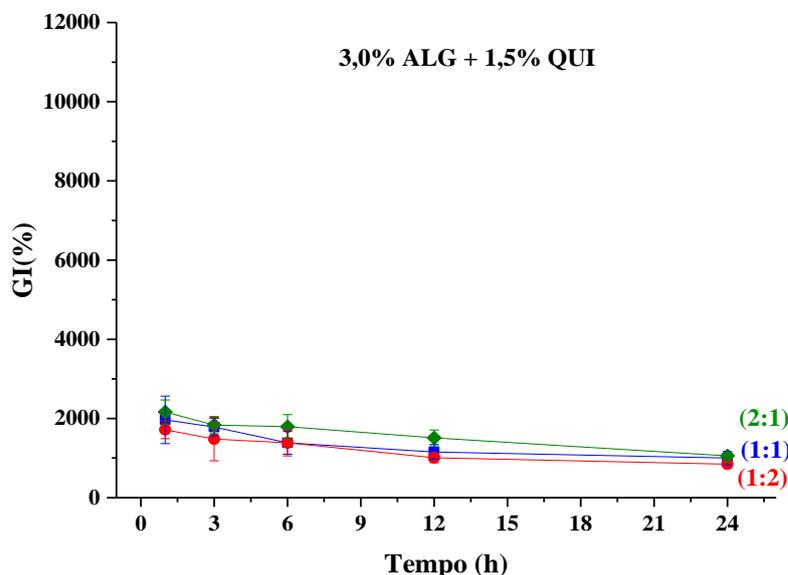
Biohidrogéis foram produzidos a partir das soluções de alginato de sódio e quitosana, em diferentes concentrações, que variaram de 3,0 a 1,5 % m/v. Os hidrogéis foram preparados em 25 °C e a 50 °C, e pH 4 (pH natural ao se misturar os dois polissacarídeos). A razão volumétrica entre os polissacarídeos foi de 1:1; 1:2 e 2:1. O grau de intumescimento foi avaliado em função do tempo (1, 3, 6, 12 e 24 h). A Figura 31 mostra os resultados provenientes dessas misturas nesse pH. Pode-se notar que todas as amostras de hidrogéis, avaliadas neste item, podem ser classificadas como materiais superabsorventes, pois o grau de intumescimento (GI) ficou muito acima de 1000 % (Figura 31) (GUILHERME *et al.*, 2015).

Figura 31 - Influência da concentração das soluções de polissacarídeos em cada razão volumétrica sobre o grau de intumescimento (GI) dos bio-hidrogéis em pH 4 e preparado em $T = 25^{\circ}\text{C}$ (continua)



Fonte: A autora, 2018.

Figura 31 - Influência da concentração das soluções de polissacarídeos em cada razão volumétrica sobre o grau de intumescimento (GI) dos bio-hidrogéis em pH 4 e preparado em $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (conclusão)



(c)

Fonte: A autora, 2018.

Foi observado que a concentração de quitosana parece ter um efeito significativo no grau de intumescimento dos bio-hidrogéis. As composições dos biohidrogéis com maior concentração de quitosana (1,5 %), tenderam a apresentar um maior grau de intumescimento. Este resultado pode ser causado pela elevada protonação dos grupos amino (NH_3^+), causada pelo pH do meio (pH 4).

Em pH 4, as cadeias de alginato contêm menos grupos carboxílicos ionizados (COO^-), uma vez que o pKa do alginato é em torno de 3,3. Já a quitosana, nesse mesmo pH, apresenta a maior parte dos grupos amino sob a forma protonada (NH_3^+). Dessa forma, em meio ácido, tende a ocorrer um afastamento entre as cadeias de quitosana, em função da repulsão eletrostática causada pelos grupos protonados, fazendo com que as cadeias fiquem mais estendidas (BERGER *et al*, 2004).

As amostras preparadas com a solução de alginato de sódio a 3,0 % m/v contém um maior número de cadeias poliméricas do que aquelas preparadas com solução de alginato de sódio a 1,0 % m/v. Logo, a solução a 3,0 % deve conter uma maior quantidade de grupamentos carboxilatos (COO^-), o que permite a ocorrência de reticulação iônica com os grupos protonados da quitosana (NH_3^+), dificultando assim, o intumescimento do hidrogel. Porém, em função da diferença de concentração entre as soluções e, por conseguinte, a diferença no número de grupos iônicos em ambos os polissacarídeos, é provável que tenha certa quantidade de grupos NH_3^+ livres na

amostra preparada com solução de 1,5 % m/v de quitosana, ou seja, sem participar da reticulação iônica. Isto pode ter provocado uma repulsão eletrostática desses grupos protonados, originando assim, trechos de cadeias de quitosana mais estendidas. Nesses trechos de cadeia, pode ocorrer uma maior interação da quitosana com as moléculas de água por meio de ligações de hidrogênio, propiciando dessa forma, um aumento no GI, em tempos maiores de intumescimento (Figuras 31a e 31b).

As amostras, preparadas com as soluções de alginato 1,0 % m/v e de quitosana 1,5 % m/v (Figura 31 b), contém um número maior de cadeias de quitosana em relação às do alginato. Assim, maior será o efeito da repulsão eletrostática intramolecular das cadeias de quitosana, as quais ficam mais estendidas quando em pH 4 e permitem maior interação com a água, apresentando assim, os mais altos valores de GI já na primeira hora do teste.

Ao analisar as amostras preparadas com soluções de alginato 3,0 % m/v e de quitosana 1,0 % m/v (Figura 31 c), pode-se notar que, inicialmente, o GI tendeu a aumentar, porém depois de 3 horas, o valor de GI tendeu a diminuir. Neste caso, a concentração da solução de alginato foi bem superior do que a de quitosana, o que pode ter originado a presença de um número de cadeias de alginato contendo grupos COO^- suficientes para promoverem um maior grau de reticulação iônica com os grupos aminos protonados da quitosana. Fato este, que pode explicar a diminuição do GI nessas amostras.

Analisando o grau de intumescimento em relação as razões volumétricas ALG:QUI das composições, o intumescimento máximo foi observado na razão **ALG:QUI = 1:2** (Figura 31b), devido à alta protonação dos grupos amino, em pH 4, os quais estão em quantidade ainda maior nas amostras preparadas com as soluções de ALG e QUI nas respectivas concentrações de 1,0 e 1,5 % m/v (Figura 31 b). Enquanto que, os menores intumescimentos tenderam a ocorrer na razão ALG:QUI = 1:1. Provavelmente, nessas condições, havia um teor considerável de grupos protonados, ao longo das cadeias de quitosana, que não participaram da reticulação, por não haver íons carboxilatos no alginato disponíveis para tal, uma vez que o alginato está em quantidade inferior à quitosana. Isto significa que trechos de cadeias da quitosana não participaram da reticulação iônica com as cadeias de alginato, ficando livres os grupos NH_3^+ . A presença desses grupos livres pode causar repulsão eletrostática entre esses trechos de cadeias da quitosana, provocando o afastamento dessas cadeias e assim, permitindo uma maior interação com a água por meio de ligações de hidrogênio. Fato este, que pode corroborar com um valor alto de GI (Figura 31b - (1:2)).

As amostras preparadas na razão volumétrica **ALG:QUI = 2:1** contém uma maior quantidade de cadeias de alginato, aumentando assim, a quantidade de grupos COO^- disponíveis

para reticularem ionicamente com os grupos protonados da quitosana. Isso faz com que as amostras de hidrogel, preparadas com as soluções dos polissacarídeos nas concentrações de 1,0 % de alginato e 1,5 % de quitosana, possam ficar mais reticuladas e com isso, apresentem menor percentual de intumescimento (Figura 31 b – (2:1)).

4.2.1.2. Influência da temperatura e do pH do meio sobre o GI

A influência do pH e da temperatura, nas condições avaliadas neste estudo, sobre a complexação entre os grupos amino (NH_3^+) da quitosana e os grupos carboxila ($-\text{COO}^-$) do alginato de sódio é mostrada na Figura 32. Pode-se observar que os efeitos causados sobre o grau de intumescimento dos bio-hidrogéis são bastante diferenciados.

Figura 32 -Influência da temperatura e do pH do biohidrogel sobre o grau de intumescimento (GI)(continua)

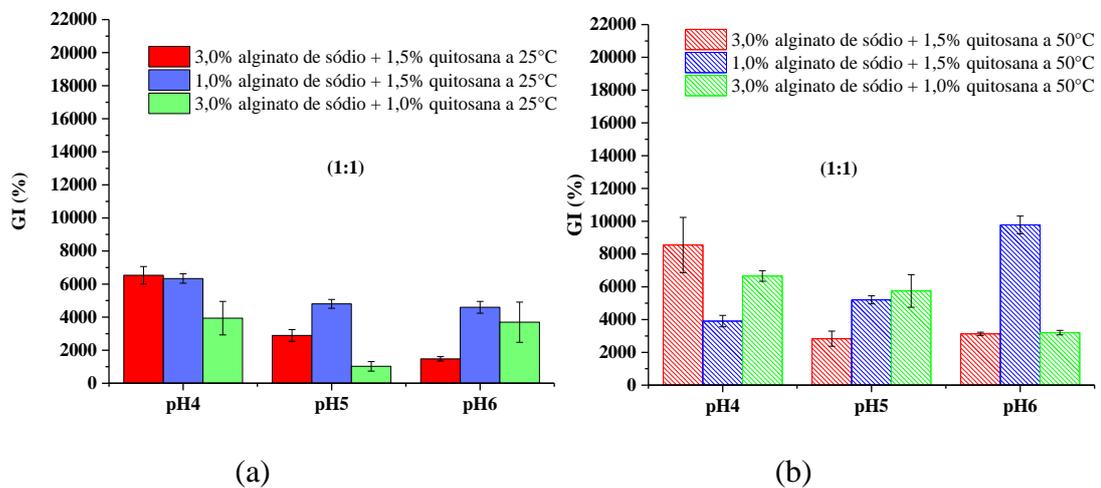
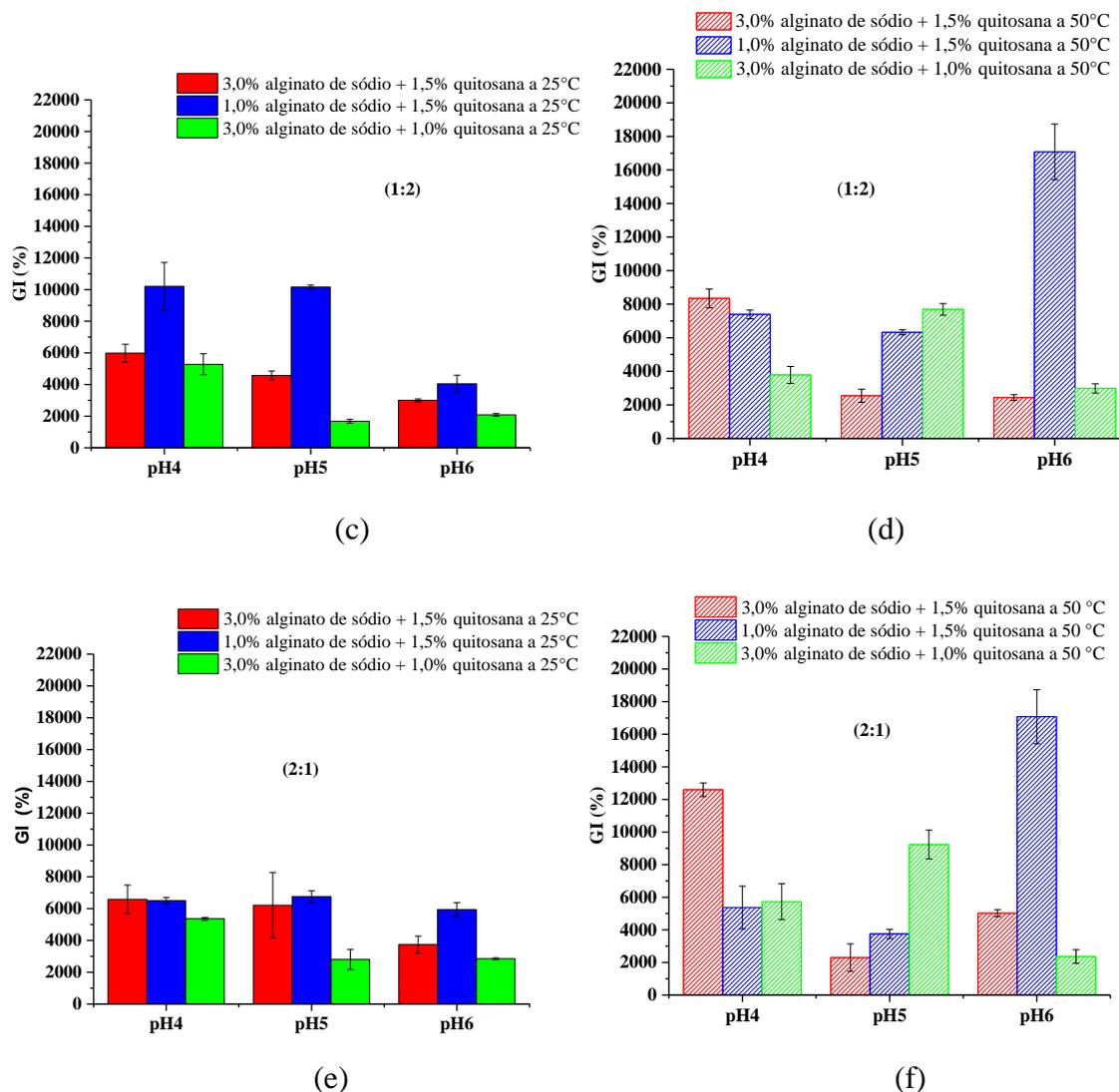


Figura 32 -Influência da temperatura e do pH do biohidrogel sobre o grau de intumescimento (GI)(conclusão)



Legenda: (a) ALG:QUI= 1:1 e T= 25°C; (b) ALG:QUI= 1:1 e T= 50°C; (c) ALG:QUI= 1:2 e T= 25°C; (d) ALG:QUI= 1:2 e T= 50°C; (e) ALG:QUI= 2:1 e T= 25°C; (f) ALG:QUI= 2:1 e T= 50°C.

Fonte: A autora, 2018.

Pode-se notar que, independente da razão volumétrica, do pH e da temperatura, todos os hidrogéis apresentaram um grau de intumescimento superior a 1000 %, resultado este que os classifica como materiais superabsorventes.

De uma forma geral, o aumento do pH tendeu a provocar uma diminuição do GI para as amostras preparadas a 25°C.

Sabe-se que o aumento do pH provoca uma diminuição da quantidade de íons NH_3^+ na quitosana, ao passo que no alginato, há um aumento da quantidade de íons $-\text{COO}^-$. Desta forma, em **pH 4**, ao se aumentar a concentração e/ou a razão volumétrica de quitosana na mistura ALG:QUI, há uma tendência de ocorrer o aumento da quantidade de íons NH_3^+ disponíveis, uma

vez que terão mais cadeias de quitosana presentes no meio. No item 4.2.1.1 (seção anterior), os resultados de GI das amostras preparadas em **pH 4 a 25°C** já foram discutidos. Quando se aumentou a temperatura de preparo dos hidrogéis para **50°C** e manteve-se o **pH 4** (Figuras 32b, 32d e 32f) foi possível verificar que houve uma tendência ao aumento do GI das amostras preparadas com uma menor quantidade de quitosana. Para as demais amostras, ou seja, aquelas onde a quantidade de cadeias de quitosana estaria em maior quantidade do que as de alginato, houve uma tendência de diminuição do GI ao se aumentar a temperatura para **50°C**, mantendo-se o **pH 4**. Isto pode ter acontecido devido a temperatura favorecer a diminuição do pH, ocorrendo assim, uma tendência ao aumento da quantidade de íons NH_3^+ para complexar com os íons -COO^- do alginato de sódio, conseqüentemente favorecendo a reticulação das cadeias poliméricas.

Ao se aumentar o **pH de 4 para 6**, houve uma diminuição no GI na maioria das composições, em ambas as temperaturas de preparo. O **pH 6**, favorece o aumento da concentração dos íons (COO^-) no alginato. Entretanto, os íons amino (NH_3^+) da quitosana se tornam menos protonados. Desta forma, supõem-se que em **pH 6** possa ter havido um balanço entre a quantidade de ânions e prótons presentes nos polissacarídeos, que foi favorável à reticulação entre as cadeias do alginato e da quitosana. Fato este, que pode explicar a diminuição do GI ao se aumentar o pH de 4 para 6.

A Figura 33 mostra duas fotografias digitais de uma amostra do biohidrogel seco e intumescimento em água.

Figura 33 -Fotografias digitais do biohidrogel seco e intumescido em água (solução de alginato = 3,0 % m/v; solução de quitosana = 1,5 % m/v; ALG:QUI = 1:1 e pH = 6)



Fonte: A autora, 2018.

4.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

De acordo com o trabalho realizado por Koetting *et al*, 2015, os hidrogéis podem adotar diferentes morfologias conforme os parâmetros empregados para sua formação (concentração; pH; temperatura; razão volumétrica e método de reticulação). Assim, a análise de SEM foi realizada com o objetivo de se investigar a morfologia dos bio-hidrogéis e agregar resultados significativos que irão colaborar para a escolha do melhor material.

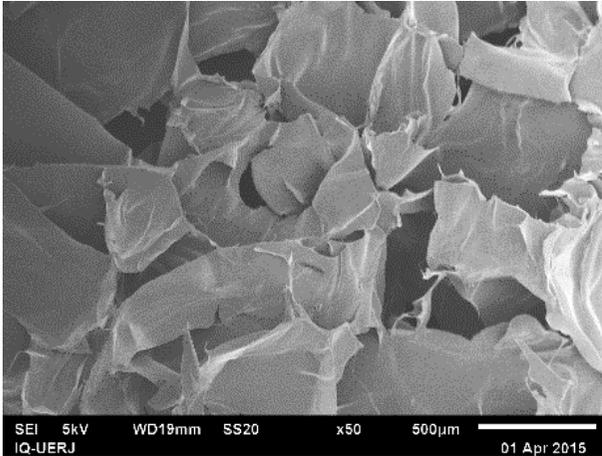
As micrografias da vista lateral dos bio-hidrogéis são apresentadas nas Figuras 34, 35 e 36, as quais foram agrupadas de acordo com as concentrações das soluções de cada polissacarídeo. A Figura 34 apresenta as micrografias dos bio-hidrogéis preparados na concentração de 3,0 % m/v de alginato de sódio e 1,5 % m/v de quitosana. A Figura 35 apresenta as micrografias dos bio-hidrogéis na concentração de 1,0 % de alginato de sódio e 1,5 % de quitosana e a Figura 36 apresenta as micrografias dos bio-hidrogéis preparados na concentração de 3,0 % de alginato de sódio e 1,0 % de quitosana. Todas as micrografias, também, foram analisadas em relação à temperatura de preparação dos hidrogéis (25 e 50°C) e ao pH (4, 5 e 6).

Figura 34 – Micrografias de SEM das amostras de biohidrogel preparadas com solução de: [ALG] = 3,0 % m/v e [QUI] = 1,5 % m/v (continua)

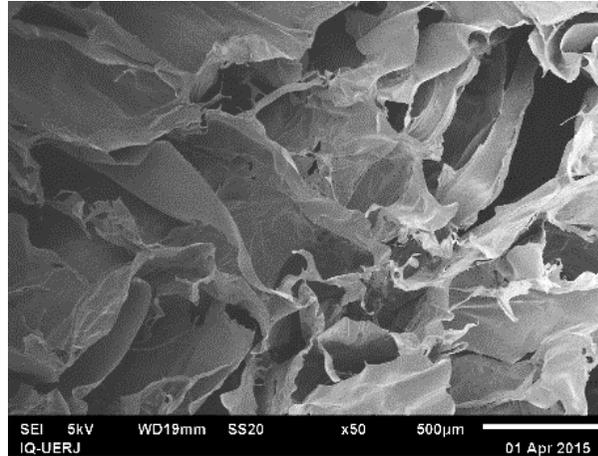
[ALG] = 3,0 % m/v e [QUI] = 1,5 % m/v

pH 4

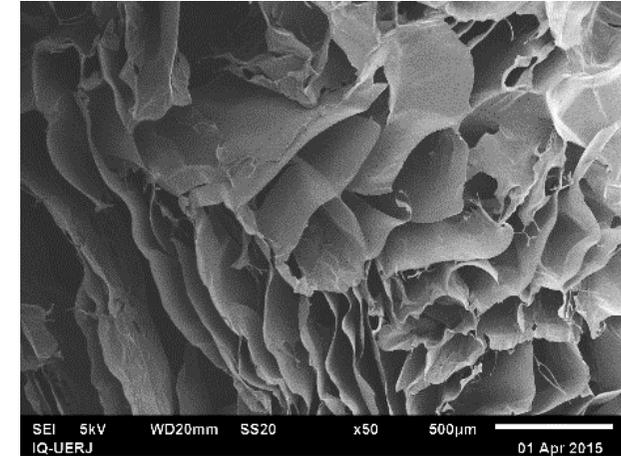
(1:1) 25°C



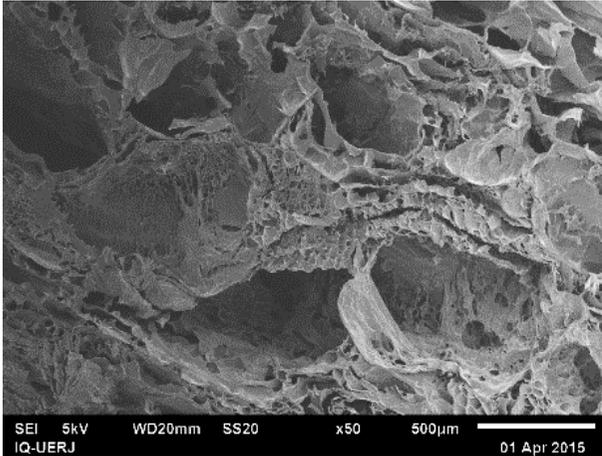
(1:2) 25°C



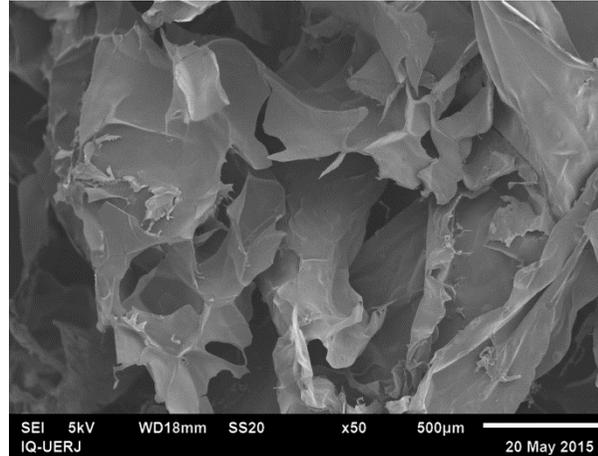
(2:1) 25°C



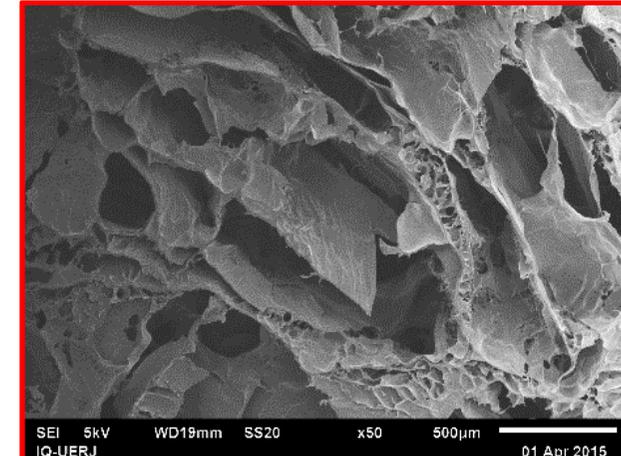
(1:1) 50°C



(1:2) 50°C

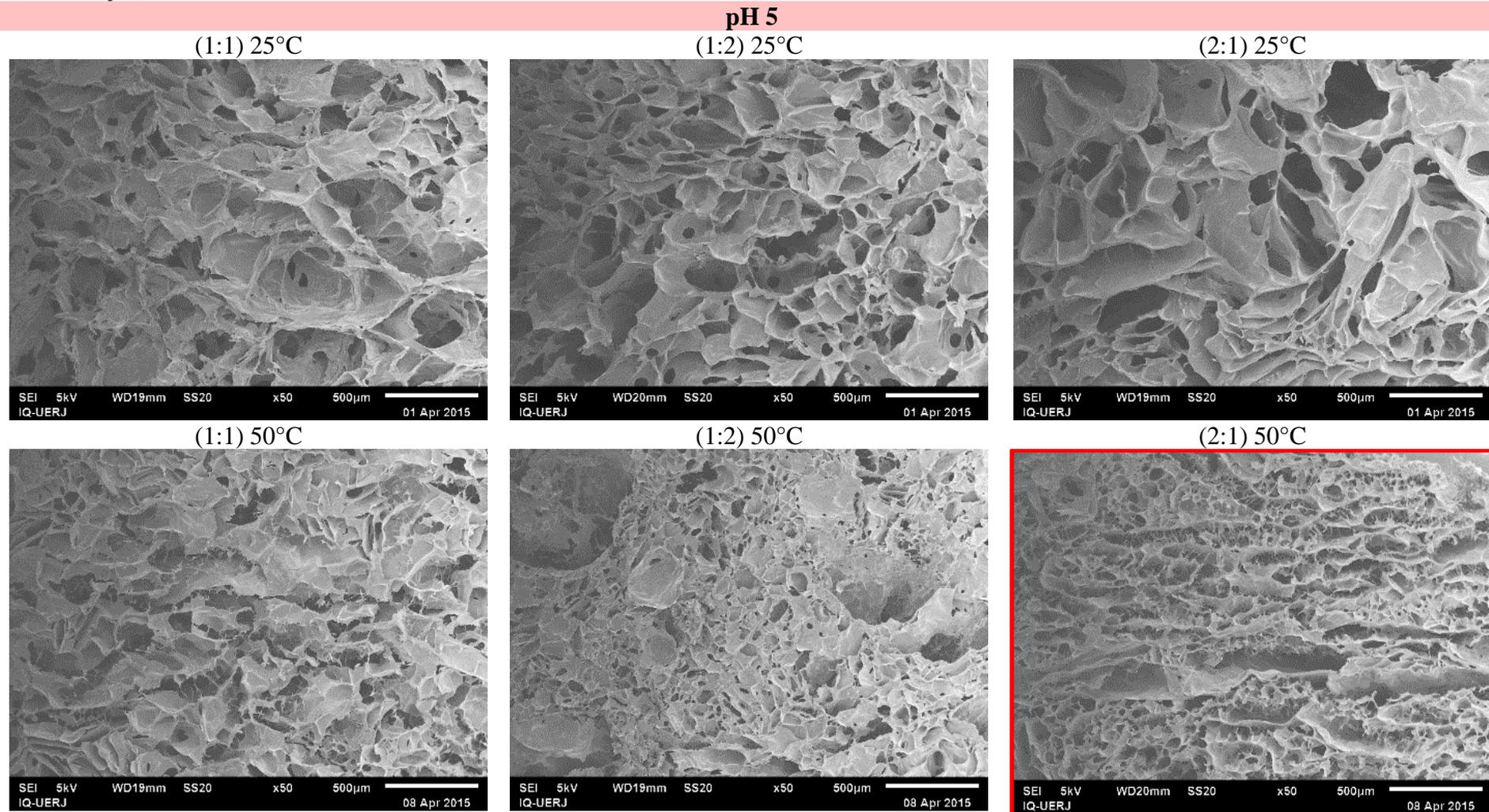


(2:1) 50°C



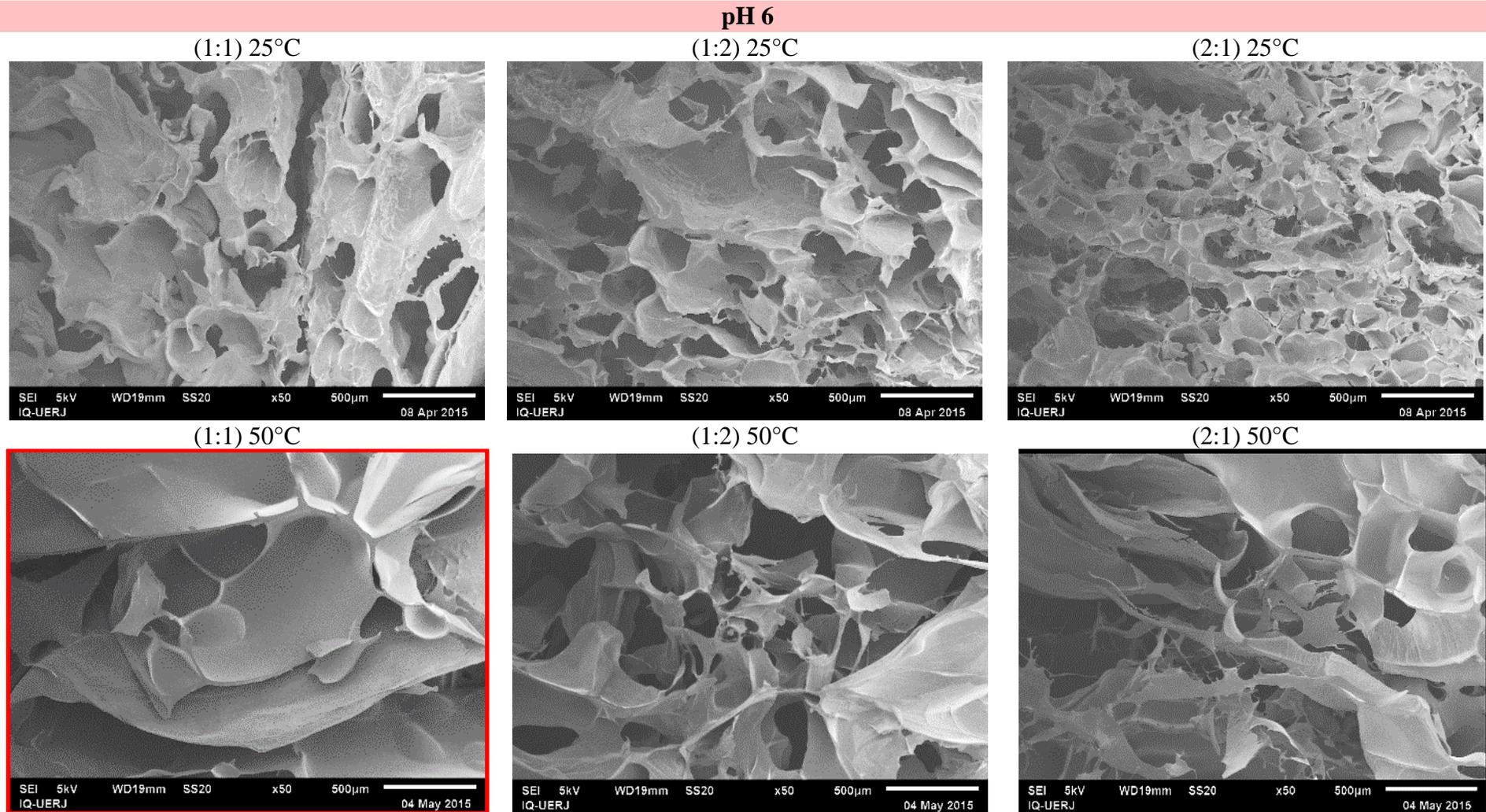
Fonte: A autora, 2018.

Figura 34 – Micrografias de SEM das amostras de biohidrogel preparadas com solução de alginato 3,0 % m/v e de quitosana 1,5 % m/v (continuação)



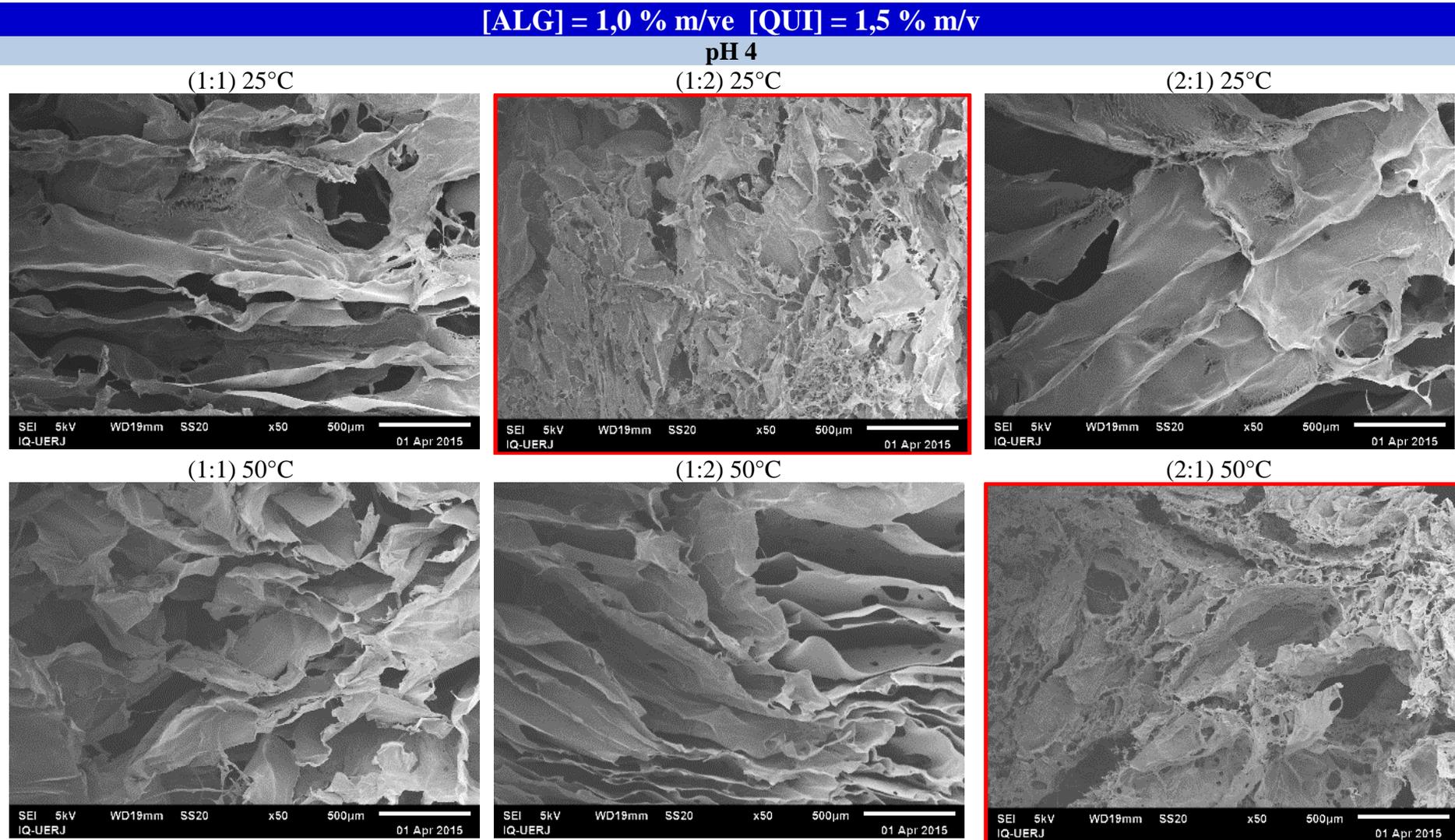
Fonte: A autora, 2018.

Figura 34 – Micrografias de SEM das amostras de biohidrogel preparadas com solução de alginato 3,0 % m/v e de quitosana 1,5 % m/v (conclusão)



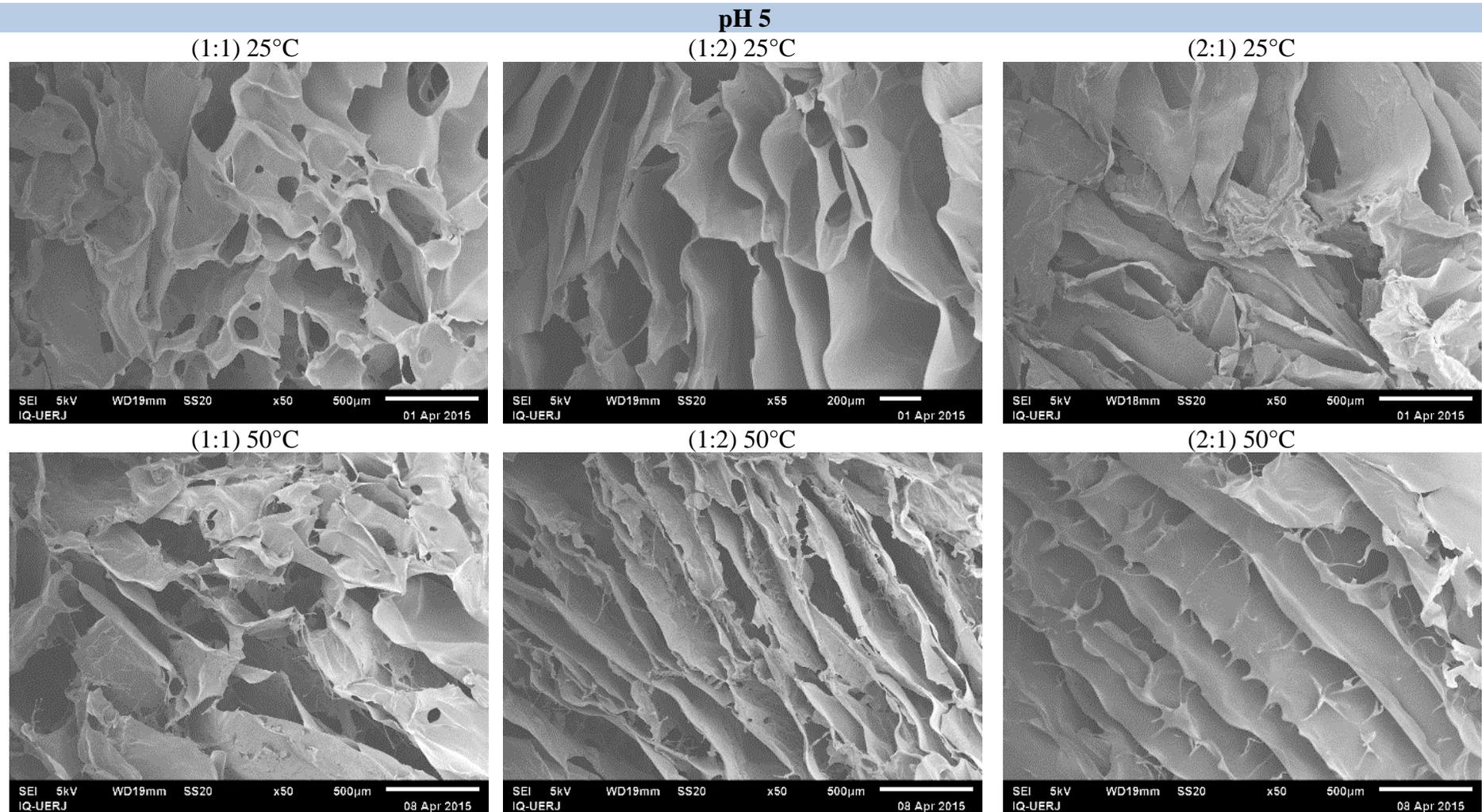
Fonte: A autora, 2018.

Figura 35 - Micrografias de SEM das amostras de biohidrogel preparadas com solução de: [ALG] = 1,0 % m/v e [QUI] = 1,5 % m/v (continua)



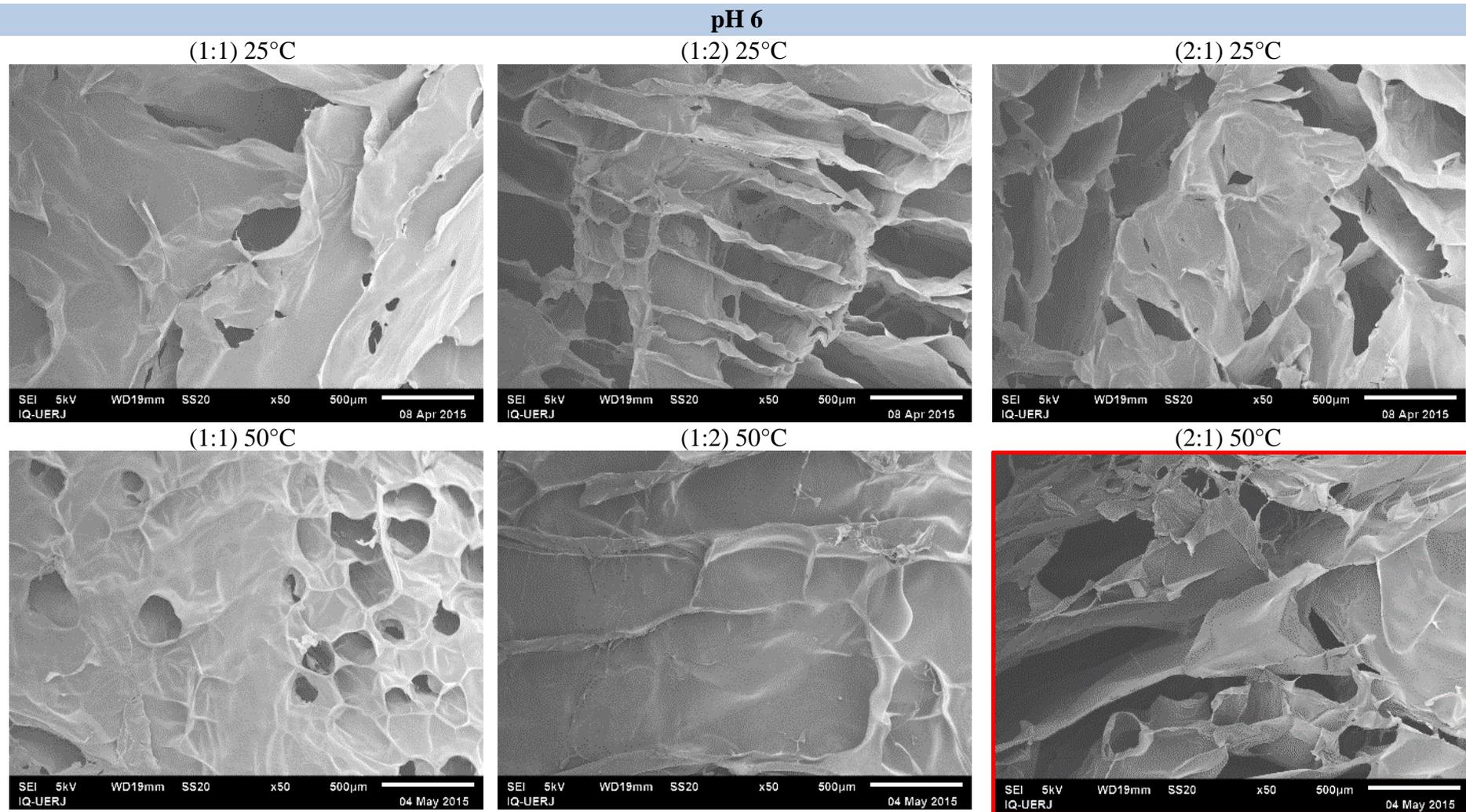
Fonte: A autora, 2018.

Figura 35 - Micrografias de SEM das amostras de biohidrogel preparadas com solução de alginato 1,0 % m/v e quitosana 1,5 % m/v (continuação)



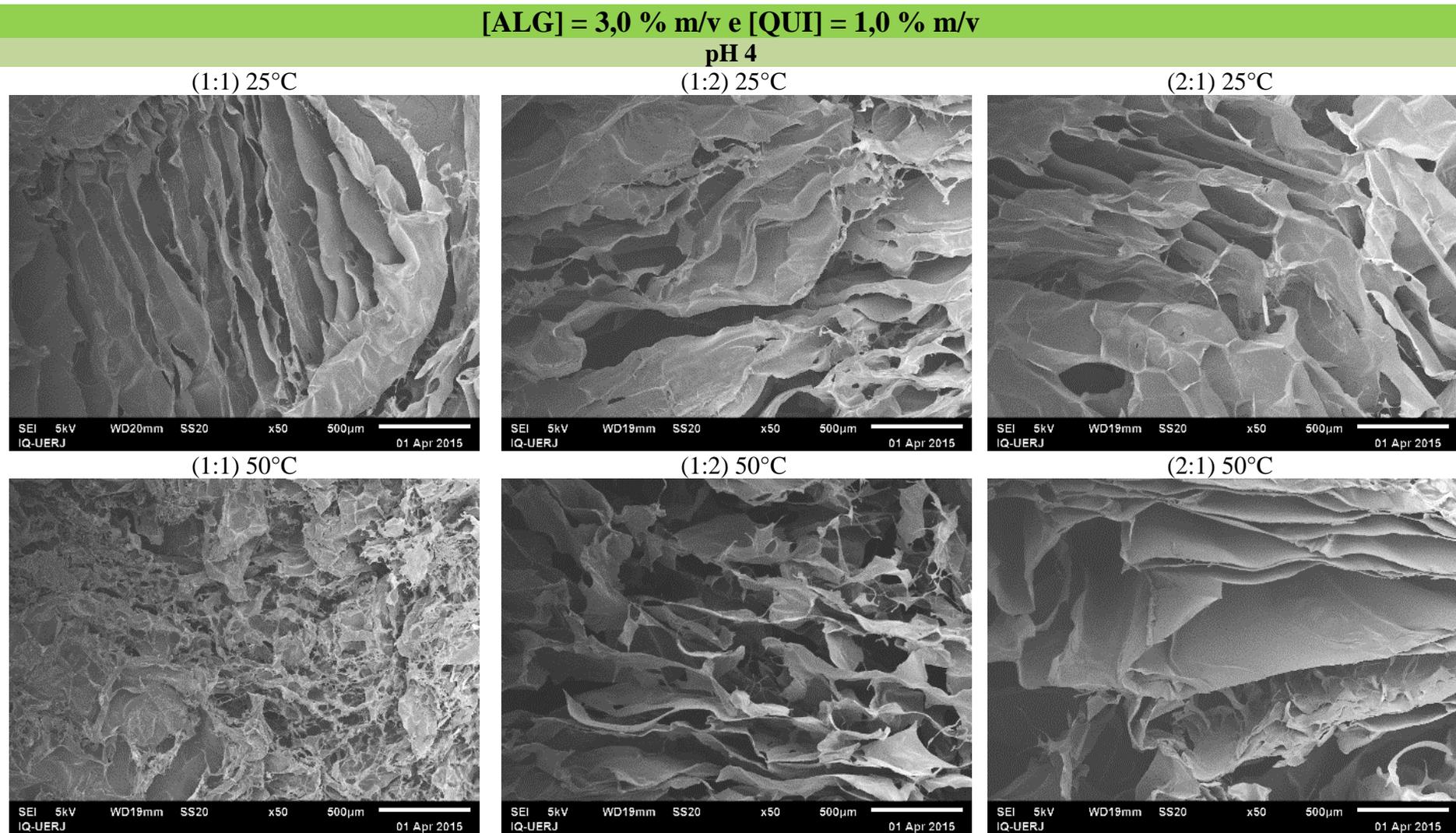
Fonte: A autora, 2018.

Figura 35 - Micrografias de SEM das amostras de biohidrogel preparadas com solução de alginato 1,0 % m/v e quitosana 1,5 % m/v (conclusão)



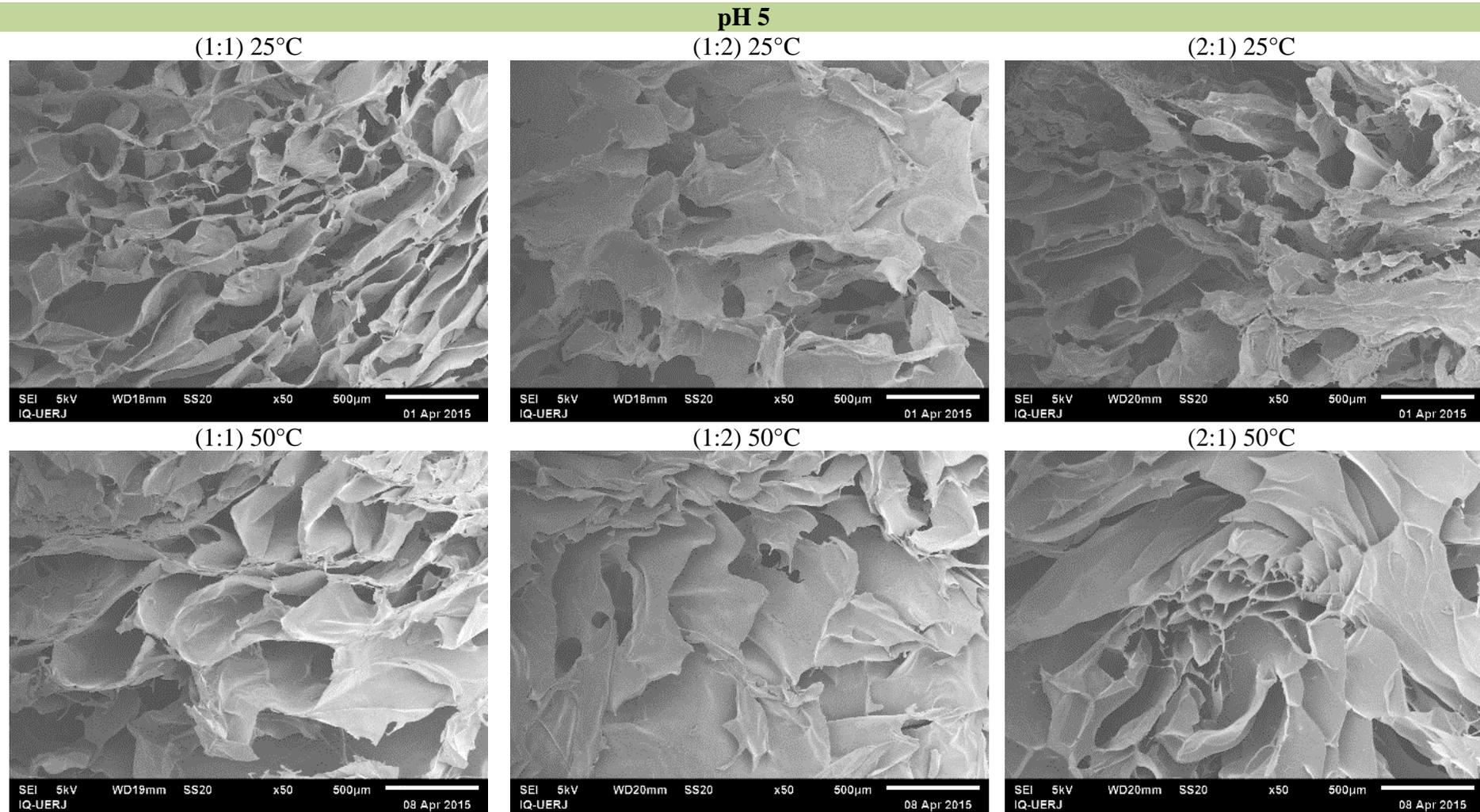
Fonte: A autora, 2018.

Figura 36 - Micrografias de SEM das amostras de biohidrogel preparadas com solução de: [ALG] = 3,0 % m/v e [QUI] = 1,0 % m/v (continua)



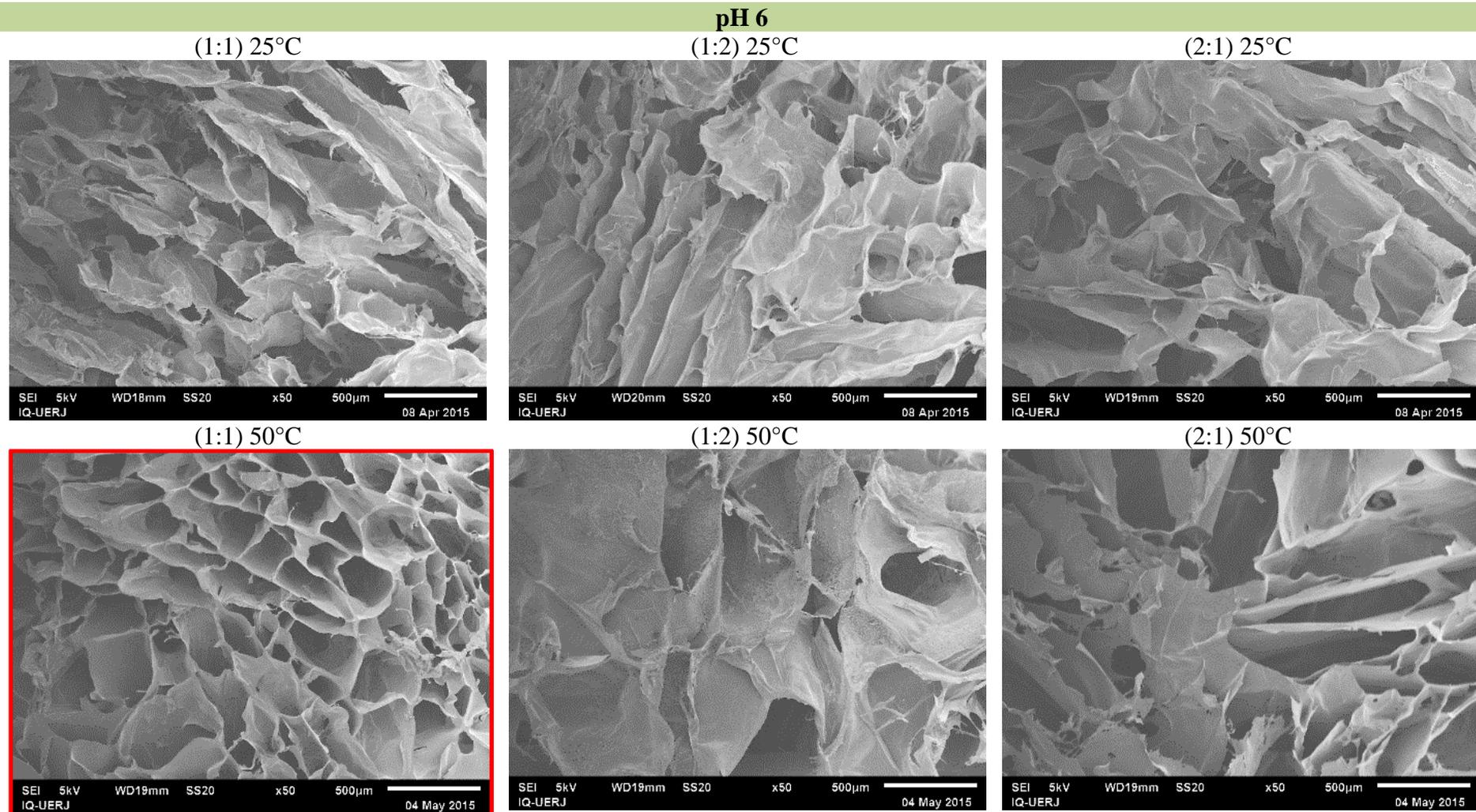
Fonte: A autora, 2018.

Figura 36 - Micrografias de SEM das amostras de biohidrogel preparadas com solução de alginato 3,0 % m/v e quitosana 1,0 % m/v (continuação)



Fonte: A autora, 2018.

Figura 36 - Micrografias de SEM das amostras de biohidrogel preparadas com solução de alginato 3,0 % m/v e quitosana 1,0 % m/v (conclusão)



Fonte: A autora, 2018.

Como já discutido no item 4.2.1, foi observado que o pH 4 favorece a protonação do grupo amino (NH_3^+); enquanto que, o alginato de sódio se torna menos aniônico. Através das micrografias de SEM, pode-se observar que à medida que o pH aumentou, houve uma tendência à diminuição de espaços vazios ou volume livre (poros) nas amostras, o que pode favorecer a reticulação entre os polissacarídeos, devido a maior proximidade das cadeias poliméricas. Esta suposição corrobora com a tendência observada nos resultados de GI, onde o aumento do pH tendeu a diminuir os valores desse parâmetro. No entanto, concentração, razão volumétrica e grau de desacetilação (GD) da quitosana (a utilizada nesta Tese apresentou GD = 92 %) são parâmetros que não podem ser desprezados, uma vez que podem influenciar, significativamente, no tamanho e forma dos poros. Se isso de fato aconteceu, espera-se obter uma melhoria nas propriedades mecânicas, ao se aumentar o pH do meio.

A maioria das micrografias apresentou uma estrutura irregular, com formato foliáceo ou lamelar, tanto as preparadas na temperatura de 25 °C, quanto às preparadas na temperatura de 50 °C.

As micrografias selecionadas em vermelho, apresentadas nas Figuras 34, 35 e 36, foram as amostras escolhidas para serem caracterizadas quanto à estabilidade térmica e resistência à compressão. A escolha foi realizada mediante alguns aspectos:

- Estrutura que apresentasse uma distribuição de “poros” com alguma uniformidade, os quais tivessem uma aparência de canalitos prolongados no biohidrogel;
- Estrutura de microporos, no qual se tenha uma superfície de contato maior com o solvente e, assim proporcionando um maior intumescimento;

Diante disso, na Figura 34, as amostras preparadas na razão volumétrica (ALG:QUI = 2:1), em pH 4 e 5, na temperatura de 50°C, foram escolhidas por apresentarem, respectivamente, uma estrutura foliácea envolta por poros heterogêneos e, aparentemente, com canais prolongados; e a outra uma estrutura com poros mais homogêneos; porém, ambas, capazes de absorverem uma boa quantidade de água. Além disso, a composição (ALG:QUI = 1:1) preparada em pH 6, também foi escolhida por se apresentar, aparentemente mais resistente, com estrutura foliácea prolongada.

Na Figura 35, as micrografias das amostras preparadas em pH 4, em sua maioria, apresentaram estrutura foliácea. Somente as razões de (1:2) e (2:1), em temperatura de 25°C e 50°C, respectivamente, apresentaram microporos bem distribuídos e com prolongamentos por toda a amostra. Assim, dentre estas, escolheu-se a amostra preparada na razão ALG:QUI (2:1) a 50°C, pois ela apresentou microporos e macroporos em sua estrutura. Na Figura 36, a micrografia

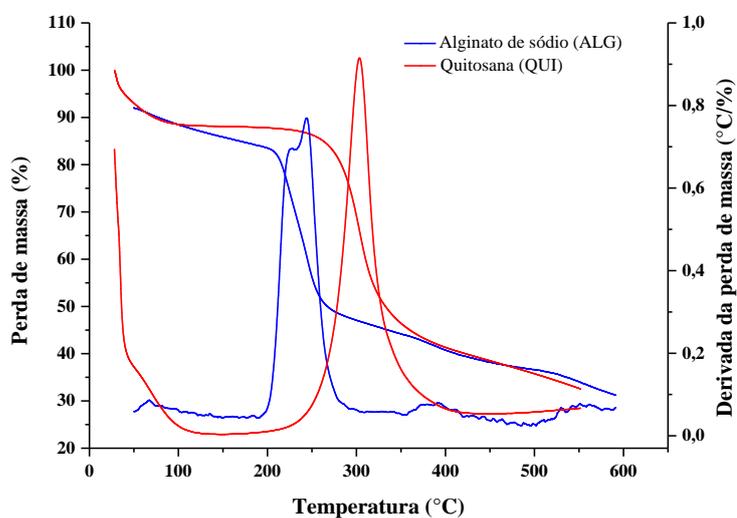
escolhida foi a da razão mássica (1:1) a 50°C, pH 6, por apresentar uma estrutura porosa, aparentemente homogênea, e possuir tamanho de poros com certa uniformidade.

Portanto, de acordo com os resultados da análise morfológica dos bio-hidrogéis, as composições que deram prosseguimento ao estudo, sendo caracterizadas por termogravimetria e resistência à compressão, foram as que tiveram suas respectivas micrografias destacadas em vermelho nas Figuras 34, 35 e 36.

4.2.3. Estabilidade térmica

A Figura 37 apresenta as curvas de TG-DTG dos polissacarídeos puros e a Tabela 7 apresenta as temperaturas de decomposição térmica, referentes às composições de bio-hidrogéis analisadas por termogravimetria.

Figura 37 - Curvas de TG e DTG dos polissacarídeos puros



Fonte: A autora, 2018.

A curva de TG da quitosana (Figura 37) apresenta duas etapas de perdas de massa para o intervalo de temperatura de 20 a 600 °C. A primeira etapa ocorre no intervalo de 50 a 150°C, com temperatura onde a velocidade de degradação é máxima ($T_{m\acute{a}x.}$) em torno de 70 °C e não é considerada decomposição térmica, refere-se à perda de água adsorvida pelo polissacarídeo. A segunda etapa ocorre no intervalo de 200 a 400 °C, com $T_{m\acute{a}x.}$ igual a 304 °C, e que corresponde

à decomposição (térmica e oxidativa) da quitosana. Em relação ao alginato de sódio, a primeira etapa ocorre em $T_{máx.}$ igual a 215°C e a segunda etapa em $T_{máx.}$ igual a 244°C .

Tabela 7 - Temperaturas de decomposição térmica dos polissacarídeos puros e dos bio-hidrogéis

Amostras	Temperaturas de decomposição			
	$T_{onset}^a(^{\circ}\text{C})$		$T_{máx.}^b(^{\circ}\text{C})$	
	T_1	T_2	T_1	T_2
Polissacarídeos puros				
Alginato de sódio	215	-	244	-
Quitosana	252	-	304	-
Biohidrogéis				
Concentração das soluções (% m/v):	$T_{onset} (^{\circ}\text{C})$		$T_{máx.} (^{\circ}\text{C})$	
alginato = 3,0 e quitosana = 1,5	T_1	T_2	T_1	T_2
ALG:QUI ^c = 2:1; pH 4; T = 50°C	227	268	238	281
ALG:QUI = 2:1; pH 5; T = 50°C	221	264	236	276
ALG:QUI = 1:1; pH 6; T = 50°C	248	-	283	-
Concentração das soluções (% m/v):	$T_{onset} (^{\circ}\text{C})$		$T_{máx.} (^{\circ}\text{C})$	
alginato = 3,0 e quitosana = 1,0	T_1	T_2	T_1	T_2
ALG:QUI = 1:1; pH 6; T = 50°C	235	-	262	-
Concentração das soluções (% m/v):	$T_{onset} (^{\circ}\text{C})$		$T_{máx.} (^{\circ}\text{C})$	
alginato = 1,0 e quitosana = 1,5	T_1	T_2	T_1	T_2
ALG:QUI = 1:2; pH 4; T = 25°C	242	-	274	-
ALG:QUI = 2:1; pH 4; T = 50°C	232	-	280	-

Legenda:^aTemperatura inicial de degradação; ^b Temperatura na qual a velocidade de degradação é máxima; ^c razão volumétrica

Fonte: A autora, 2018.

Em todas as composições de biohidrogéis, foi verificada uma perda de massa entre 50 e 150°C no primeiro estágio, devido à perda de água, indicando que as composições são higroscópicas (CHA *et al.*, 2012).

A Tabela 7 apresenta os parâmetros de perda de massa, temperatura inicial de degradação (T_{onset}) e a temperatura na qual a velocidade de degradação é máxima ($T_{máx.}$) referente aos estágios de decomposição térmica das cadeias dos polissacarídeos puros (alginato de sódio e quitosana) e das composições de bio-hidrogéis que foram selecionados de acordo com as

respectivas morfologias. Os resultados mostraram que não houve variação significativa na $T_{m\acute{a}x}$ dos bio-hidrogéis. No entanto, a temperatura inicial de degradação (T_{onset}) mostrou que a composição 3,0 %ALG:1,5% QUI (1:1) pH 6 T. 50°C apresentou uma maior resistência à degradação, em virtude de apresentar o maior valor de T_{onset} .

4.2.4. Composição química dos biohidrogéis

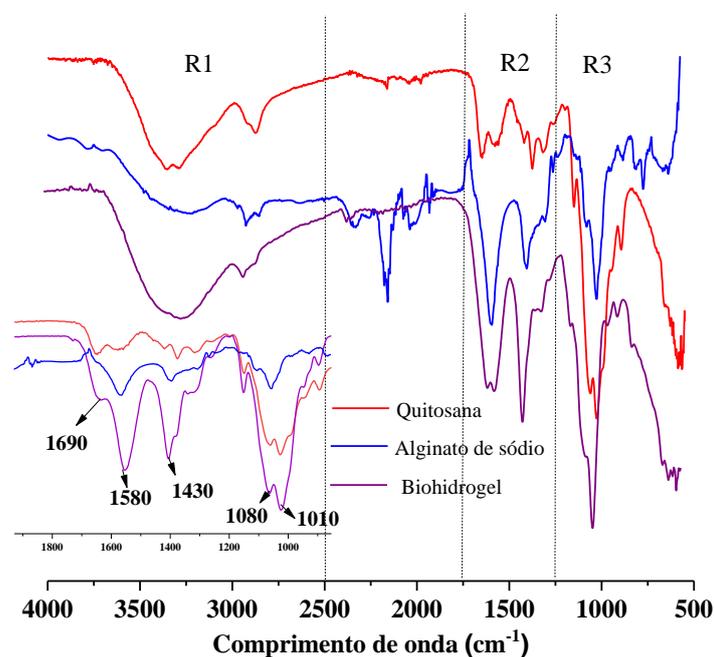
A análise de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) revela informações sobre a estrutura molecular dos compostos químicos, sendo uma ferramenta útil para a caracterização de biopolímeros. A formação do bio

hidrogel pode ser observada por mudanças vibracionais dos principais grupos funcionais característicos dos polissacarídeos que o compõe.

A Figura 38 apresenta os espectros de FTIR dos polissacarídeos puros (quitosana e alginato de sódio) e de uma amostra de biohidrogel preparada neste estudo, visto que todas as demais composições apresentaram o mesmo perfil. Enquanto que, a Tabela 8 apresenta as atribuições vibracionais para as principais bandas dos espectros dos polissacarídeos e do biohidrogel.

As principais bandas encontradas no espectro da Figura 38 são evidenciadas, primeiramente, na região de $3500 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ (R1), bandas atribuídas aos estiramentos dos grupamentos $-\text{OH}$ e NH_2 . O alargamento desta banda, no biohidrogel, indica a interação entre as cadeias de alginato e de quitosana. No espectro do alginato, observa-se uma banda na região de $1610 - 1580 \text{ cm}^{-1}$ característica do estiramento simétrico do ânion (COO^-). O espectro da quitosana apresenta bandas na região entre $1380-1265 \text{ cm}^{-1}$, referentes à deformação axial (C-N), identificadas como desdobramentos dos grupos aminos I, II e III (R2). Em torno de 1580 cm^{-1} , aparece a bandas de C=O de ácidos carboxílicos, e em 1430 cm^{-1} banda de estiramento do grupo C-O. Além disso, uma diminuição da banda na região de 3000 cm^{-1} , em relação à banda localizada em 1430 cm^{-1} sugere a ocorrência de interação entre os grupos catiônicos da quitosana e os grupos aniônicos do alginato (OSTROWSKA-CZUBENKO, J. e GIERSZEWSKA-DRUZYNSKA, M. 2009).

Figura 38 - Espectros de FT-IR dos polissacarídeos puros (alginato de sódio e quitosana) e do biohidrogel



Fonte: A autora, 2018.

Tabela 8 - Atribuições vibracionais para as principais bandas dos espectros dos polissacarídeos e do biohidrogel

Região do espectro		Comprimento de onda (cm ⁻¹)		
		Quitosana	Alginato de sódio	Biohidrogel
R1	Estir. (O – H)	3650-3200	3650-3200	3300
	Estir. (N – H)	3355	-----	3450
	Estir. (C – H)	2948 - 2878	3050-2930	2950 –2870
R2	Def.axial (N – H)	1648 –1570	-----	1690
	Estir.sim (COO ⁻)	-----	1610-1580	1580
	Estir.assim. (COO ⁻)	-----	1380	1430
	Def.ang. (C – H)	1421	1000-900	1375
	Def.axial (C – N) desdobramento dos aminos	1380-1265	-----	1250 amina I 1326 amina II 1380 amina III
R3	Def. (C – O)	1068-1027	1195-1060	1080
	Def. (C – O – C)	1150-890	1023 -820	900
	Def. (C – C)	750-500	875	650

Fonte: A autora, 2018.

4.2.5. Resistência à compressão

A avaliação da resistência mecânica dos biohidrogéis liofilizados (secos) foi avaliada por meio de medidas de compressão, em máquina universal de ensaio Emic, segundo metodologia descrita no item 3.3.4.5., p. 67. Os valores de tensão máxima de compressão ($\sigma_{\text{máx.}}$) foram determinados para cada mistura selecionada e estão listados na Tabela 9. Vale ressaltar, que o ensaio de compressão foi realizado, somente, nas amostras cujas micrografias foram selecionadas no item 4.2.2.

Pode ser observado que o aumento do pH e da temperatura são dependentes da concentração da quitosana, e contribuem para o aumento da força. De acordo com Ahmed E. M., 2015, a melhoria nas propriedades mecânicas de composições de ALG:QUI pode ser atribuída à formação de redes da quitosana e assim, aumentando a força com o aumento da concentração da quitosana, conseqüentemente aumentando a densidade de reticulação.

Tabela 9 -Valores de tensão máxima de compressão ($\sigma_{\text{máx.}}$) para os bio-hidrogéis secos

Concentração das soluções de polissacarídeos	Hidrogéis	$\sigma_{\text{máx.}}$ (MPa)
Alginato = 3,0 % m/v Quitosana = 1,5 % m/v	ALG:QUI ^a = 2:1; pH 4; T = 50°C	0,064 ± 0,006
	ALG:QUI = 2:1; pH 5; T = 50°C	0,029 ± 0,005
	ALG:QUI = 1:1; pH 6; T = 50°C	0,077 ± 0,002
Alginato = 3,0 % m/v Quitosana = 1,0 % m/v	ALG:QUI = 1:1; pH 6; T = 50°C	0,039 ± 0,003
Alginato = 1,0 % m/v Quitosana = 1,5 % m/v	ALG:QUI = 1:2; pH 4; T = 25°C	0,021 ± 0,007
	ALG:QUI = 2:1; pH 4; T = 50°C	0,020 ± 0,006

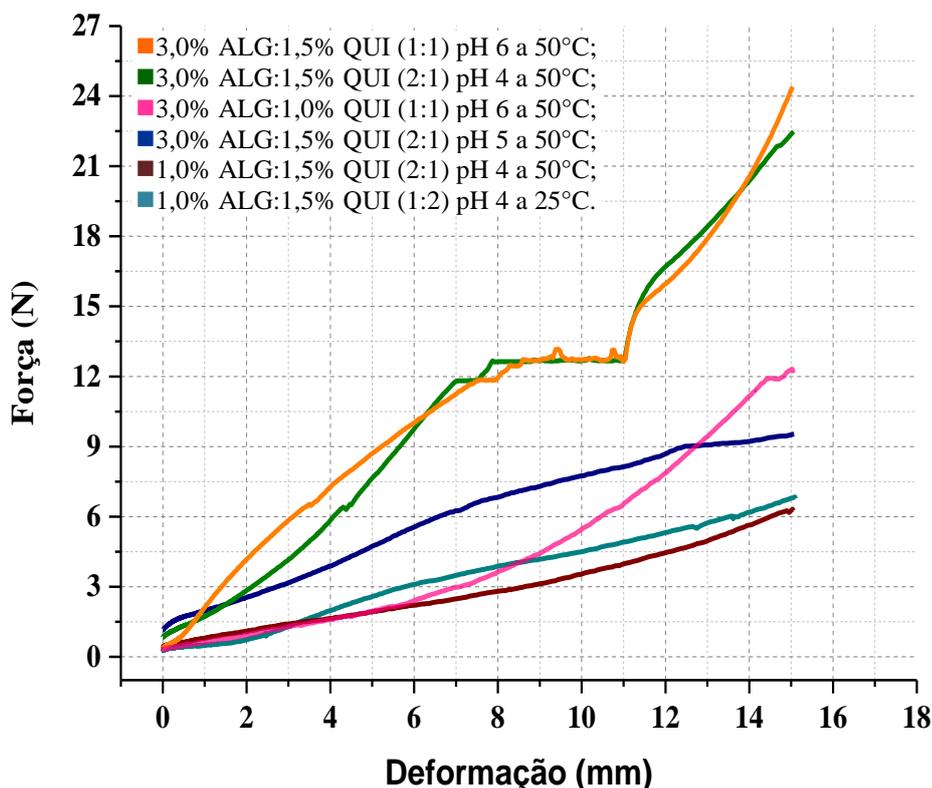
Legenda:^a Razão volumétrica

Fonte: A autora, 2018.

A Figura 39 mostra as curvas de força *versus* deformação para os diferentes bio-hidrogéis, onde se pode observar certa linearidade entre as propriedades. Isso caracteriza que a deformação do biohidrogel é elástica, ou seja, o biohidrogel retorna a sua conformação inicial quando a força é removida. Isso ocorre, porque quando uma força é aplicada para comprimir o hidrogel, as cadeias poliméricas são rearranjadas para acomodar a deformação. Ao mesmo tempo, forças elásticas contribuem para que o hidrogel retorne a sua forma original

(CALLISTER, 1999). A Figura 40 mostra a tensão máxima de compressão ($\sigma_{\text{máx.}}$) para cada composição de hidrogel. É possível verificar que a amostra que apresentou o maior valor de $\sigma_{\text{máx.}}$ foi a da composição **3,0 % ALG: 1,5 % QUI (1:1) pH 6 a 50°C**.

Figura 39 – Variação da força em função da taxa de deformação dos bio-hidrogéis secos

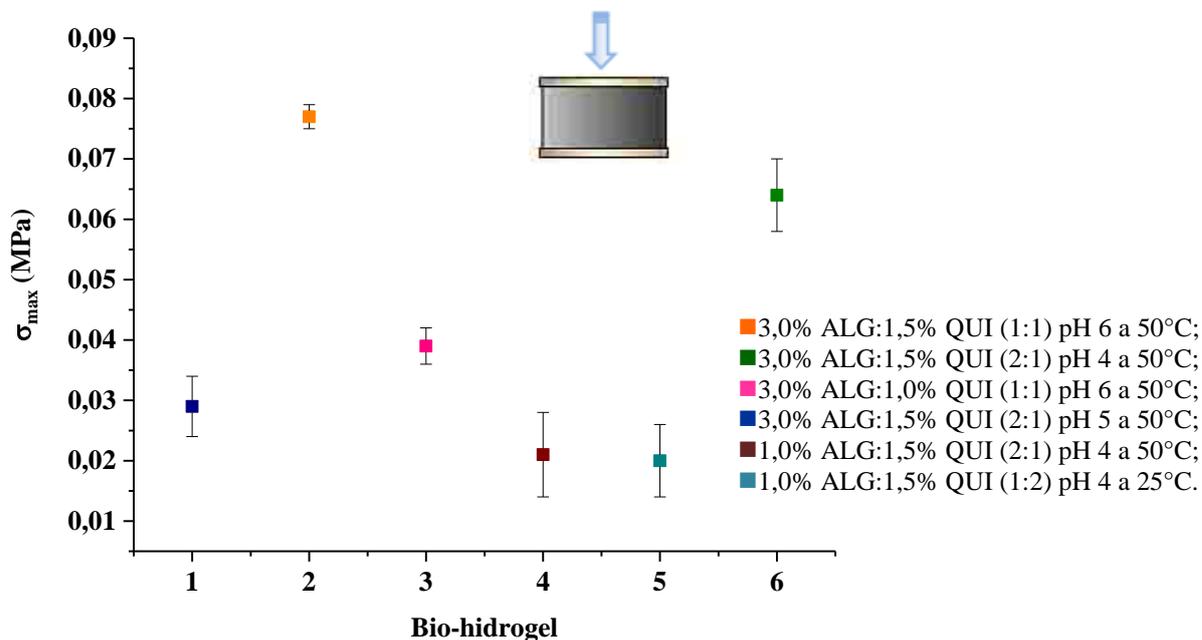


Fonte: A autora, 2018.

Os resultados obtidos por termogravimetria (item 4.2.3) e compressibilidade (item 4.2.5) confirmaram que as resistências, térmica e à compressão, são parâmetros fundamentais para definir a melhor composição dos biohidrogéis (composição ideal).

A Tabela 10 apresenta os resultados das principais caracterizações (grau de intumescimento, estabilidade térmica e resistência à compressão) dos bio-hidrogéis avaliados. Tal tabela foi criada para ajudar no entendimento da escolha da amostra considerada a composição ideal para ser testada na próxima etapa do estudo (aplicação do biohidrogel).

Comparando-se os valores de GI (Tabela 10), observa-se que a amostra de composição **3,0 % ALG: 1,5 % QUI (2:1) pH 4 a 50°C** foi a que apresentou o maior intumescimento, característica essa que é importante, uma vez que o objetivo de aplicação dos bio-hidrogéis é a liberação gradativa de herbicida. Logo, acredita-se que, quanto maior o GI, maior quantidade de herbicida ficará retida no interior do biohidrogel.

Figura 40 – Tensão máxima ($\sigma_{\text{máx.}}$) versus composição dos bio-hidrogéis secos

Fonte: A autora, 2018.

Tabela 10 - Valores de grau de intumescimento no estado de equilíbrio (GI_{eq}), temperatura inicial de degradação (T_{onset}), temperatura em que a velocidade de degradação é máxima ($T_{\text{máx.}}$) e tensão máxima de compressão ($\sigma_{\text{máx.}}$) para os bio-hidrogéis

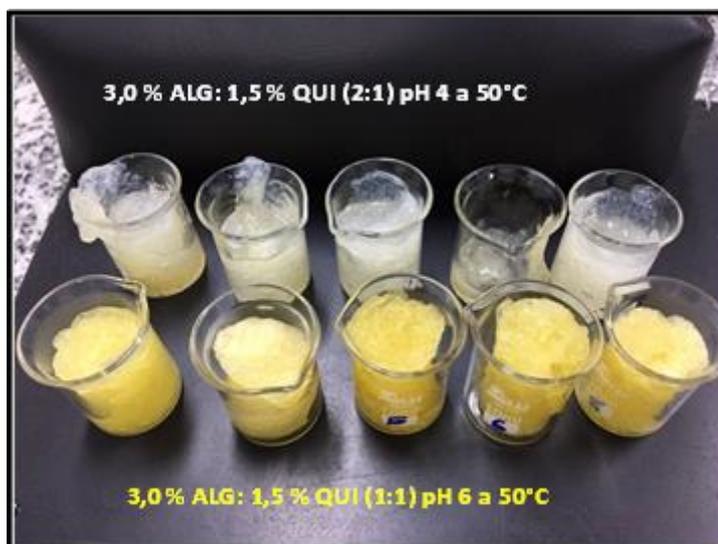
Hidrogéis	GI_{eq} (g/g)	T_{onset}	$T_{\text{máx.}}$	$\sigma_{\text{máx.}}$ (MPa)
3,0 % ALG:1,5 % QUI (1:1) pH 6 a 50°C	3132 ± 95	248	283	0,077 ± 0,002
3,0 % ALG:1,5 % QUI (2:1) pH 4 a 50°C	12598 ± 420	227	281	0,064 ± 0,006
3,0 % ALG:1,0 % QUI (1:1) pH 6 a 50°C	3203 ± 137	235	262	0,039 ± 0,003
3,0 % ALG:1,5 % QUI (2:1) pH 5 a 50°C	2297 ± 664	221	274	0,029 ± 0,005
1,0 % ALG:1,5 % QUI (2:1) pH 4 a 50°C	5369 ± 1312	232	280	0,020 ± 0,006
1,0 % ALG:1,5 % QUI (1:2) pH 4 a 25°C	10205 ± 1513	242	274	0,021 ± 0,007

Fonte: A autora, 2018.

Por outro lado, para essa aplicação, o biohidrogel carregado com o herbicida, ficará

enterrado no solo; assim, torna-se importante avaliar, também, a estabilidade térmica desse material, bem como a sua resistência à compressão. Comparando-se os valores de T_{onset} , verifica-se que a amostra de composição **3,0 % ALG: 1,5 % QUI (1:1) pH 6 a 50°C** foi a que apresentou maior T_{onset} , ou seja, maior resistência térmica. Entretanto, quando se compara os valores de tensão máxima de compressão ($\sigma_{m\acute{a}x}$), pode-se verificar, que ambas as amostras (**3,0 % ALG: 1,5 % QUI (2:1) pH 4 a 50°C** e **3,0 % ALG: 1,5 % QUI (1:1) pH 6 a 50°C**), não apresentaram diferença significativa no valor de $\sigma_{m\acute{a}x}$.

Figura 41 – Fotografia digital das amostras de bio-hidrogéis com composições 3,0 % ALG: 1,5 % QUI (2:1) pH 4 a 50°C e 3,0 % ALG: 1,5 % QUI (1:1) pH 6 a 50°C, intumescidas em água, após realização do ensaio de compressão



Fonte: A autora, 2018.

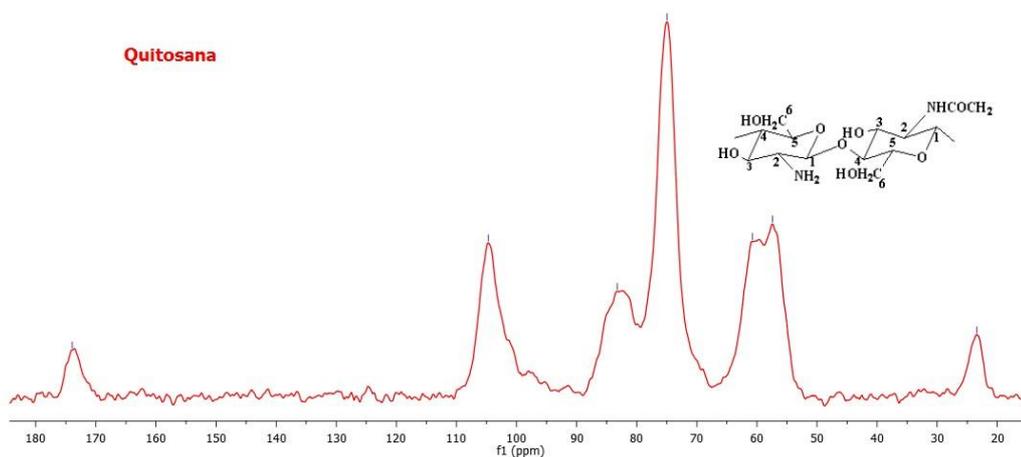
Mediante a esses resultados, decidiu-se realizar um novo ensaio de compressão; porém, dessa vez, somente para as composições **3,0 % ALG: 1,5 % QUI (2:1) pH 4 a 50°C** e **3,0 % ALG: 1,5 % QUI (1:1) pH 6 a 50°C**, e agora, as amostras estavam intumescidas com água, pois quando o biohidrogel for aplicado no solo, ele será intumescido a cada irrigação e, deverá apresentar resistência mecânica suficiente para não se desfazer, para que assim possa liberar gradativamente o herbicida. A Figura 41 mostra uma fotografia digital das amostras após realização do novo ensaio de compressão. Pode-se verificar que as amostras de composição **3,0 % ALG: 1,5 % QUI (2:1) pH 4 a 50°C**, se desfizeram durante o ensaio. O que não ocorreu com as amostras de composição **3,0 % ALG: 1,5 % QUI (1:1) pH 6 a 50°C**, que mantiveram-se íntegras, comprovando a sua maior resistência mecânica, tanto no estado seco (Tabela 10), como intumescidas (Figura 40) (0,003 MPa). Assim, concluiu-se que, dentre as composições

avaliadas nesta Tese, a ideal para prosseguir no estudo de aplicação do herbicida foi a amostra **3,0 % ALG: 1,5 % QUI (1:1) pH 6 a 50°C**.

4.2.6. Ressonância magnética nuclear no estado sólido (NMR¹³C CP-MAS)

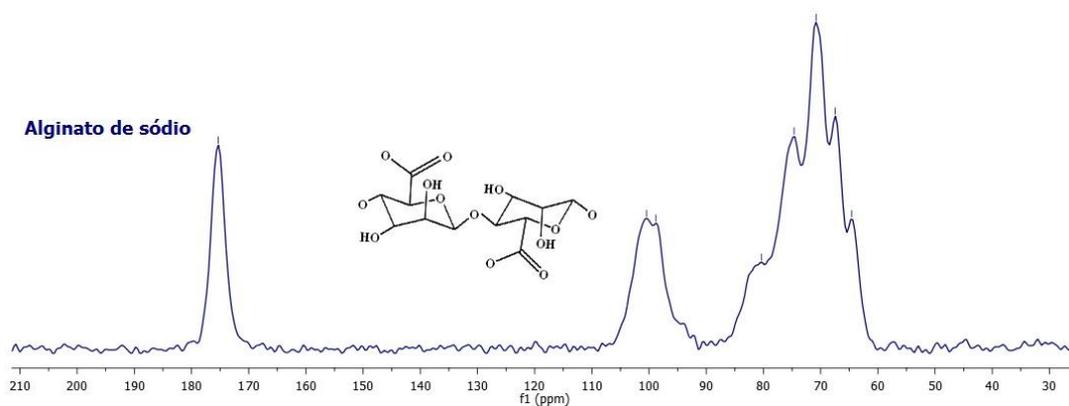
A Figura 42 apresenta os espectros de NMR¹³C CP-MAS dos polissacarídeos puros e do biohidrogel de composição ideal (3,0 % de alginato de sódio e 1,5 % de quitosana (1:1) pH 6 e T=50°C). A Tabela 11 apresenta as atribuições dos sinais observados nos espectros de NMR dos polissacarídeos puros e da interação entre eles, com formação do biohidrogel. Segundo Salomonsen et al. 2009, os espectros de ¹³C consistem em três regiões de sinais: piranose (60–90 ppm), anomérico (90–110 ppm) e carboxila (172–180 ppm). A interação entre os polieletrólitos, observada a 101,5 ppm, foi devida ao grupo acetila da quitosana e aos carbonos anoméricos do alginato. Na região de 50 – 90 ppm foi observada a interação entre os carbonos glucopiranosídicos da quitosana na qual se sobrepõem aos sinais dos carbonos gulurônicos e manurônicos do alginato (Figura 42).

Figura 42 - Espectros de NMR¹³C CP-MAS (Continua)

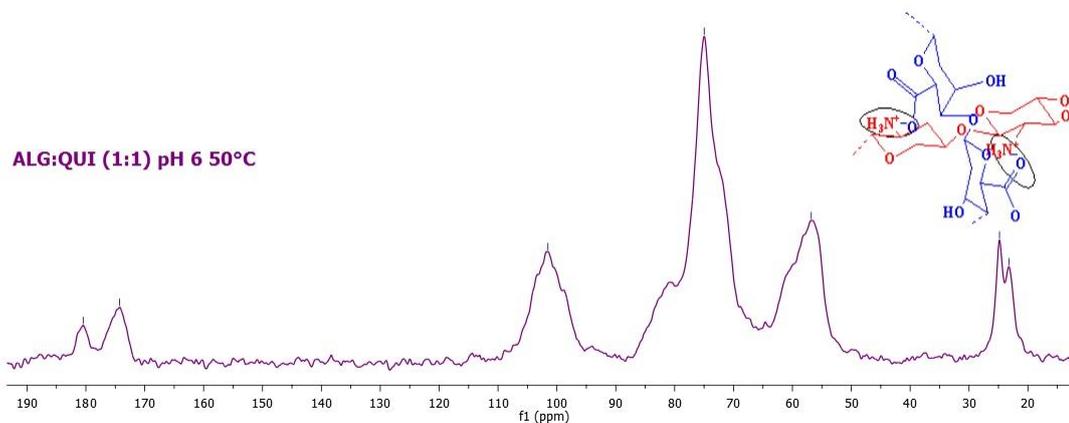


(a)

Figura 42 - Espectros de NMR¹³C CP-MAS (conclusão)



(b)



(c)

Legenda: (a) quitosana; (b) alginato de sódio e (c) biohidrogel.
Fonte: A autora, 2018.

Tabela 11 -Atribuições dos sinais observados nos espectros de NMR – CPMAS de ^{13}C dos biopolímeros puros e do biohidrogel

Atribuições	Amostra analisada		
	ALG	QUI	ALG:QUI
	δ (ppm)		
C=O	179,9 – 175,5	173,8	180,5 174,3
O-C ₁ -O	100,9 98,8	104,7	101,5
O-C ₄ -H	81,4 75,1	84,8	80,9
O-C _{3,5} - H	70,8	75,0	74,9
O-C ₂ - H	67,6	57,5	56,8
O-C ₆ - H ₂	64,7	61,0	59,8
CH ₃ – C		23,6	24,8 23,2

Fonte: A autora, 2018.

4.3. Avaliação das propriedades da composição “ideal” com o herbicida glifosato

Após a determinação da “composição ideal” do biohidrogel foram realizados estudos sobre a sua utilização como suporte para liberação gradativa do herbicida glifosato. Para isso, foram feitas as seguintes avaliações do biohidrogel na presença do glifosato:

- ⇒ Propriedades de adsorção;
- ⇒ Estabilidade térmica (TG);
- ⇒ Composição química (FTIR);
- ⇒ NMR no estado sólido da composição “ideal”;
- ⇒ Propriedades morfológicas (SEM e confocal (CLSM));
- ⇒ Propriedades mecânicas (biohidrogel intumescido com glifosato);
- ⇒ Liberação gradativa do glifosato.

Nesta etapa, a composição de 3,0 % de alginato de sódio e 1,5% de quitosana (1:1) pH 6 em temperatura de 50°C foi avaliada como sendo o biohidrogel “ideal”. Os testes a seguir serão realizados pertinentes a essa composição na presença do herbicida glifosato.

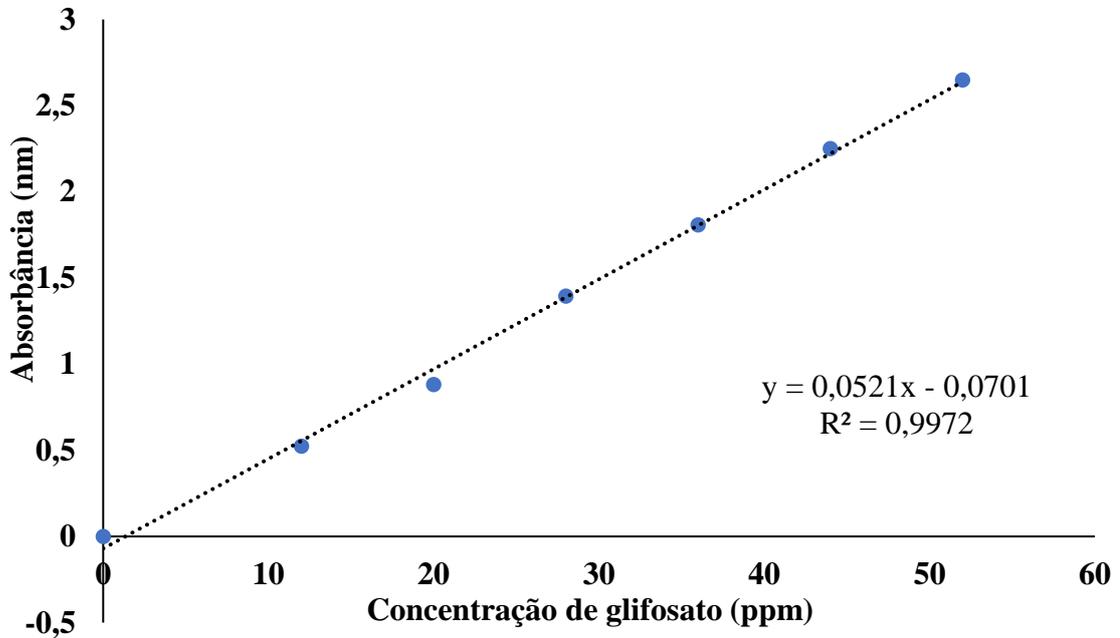
4.3.1. Curva de calibração do herbicida glifosato

O processo de adsorção nesta Tese foi empregado no intuito de verificar a capacidade do biohidrogel adsorver o herbicida de uma solução, portanto, avaliar a interação do glifosato com o biohidrogel.

A determinação quantitativa do glifosato pode ser feita por vários métodos, dentre eles destacam-se a cromatografia gasosa (CG) (ROY *et al.*, 1989), a eletroforese (RAMSTEDT *et al.*, 2004), a espectroscopia ultravioleta visível (UV-vis), mas a técnica mais frequente é a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (MORILLO *et al.*, 1997, 2004, BRASKARA *et al.*, 2006). Entretanto, nesta Tese, a determinação quantitativa do glifosato foi feita por colorimetria, com uso da solução de ninidrina/molibdato de sódio (MAMY *et al.*, 2005). O método aplicado neste trabalho possui como vantagem o fato de ser direto e simples. A curva de calibração do herbicida glifosato mostrada na Figura 43, foi construída tomando os valores

de absorção máxima ($\lambda = 570 \text{ nm}$) para cada concentração de herbicida analisado, segundo dado da Figura 19 (p. 70).

Figura 43 - Curva de calibração do glifosato ($\lambda = 570 \text{ nm}$)



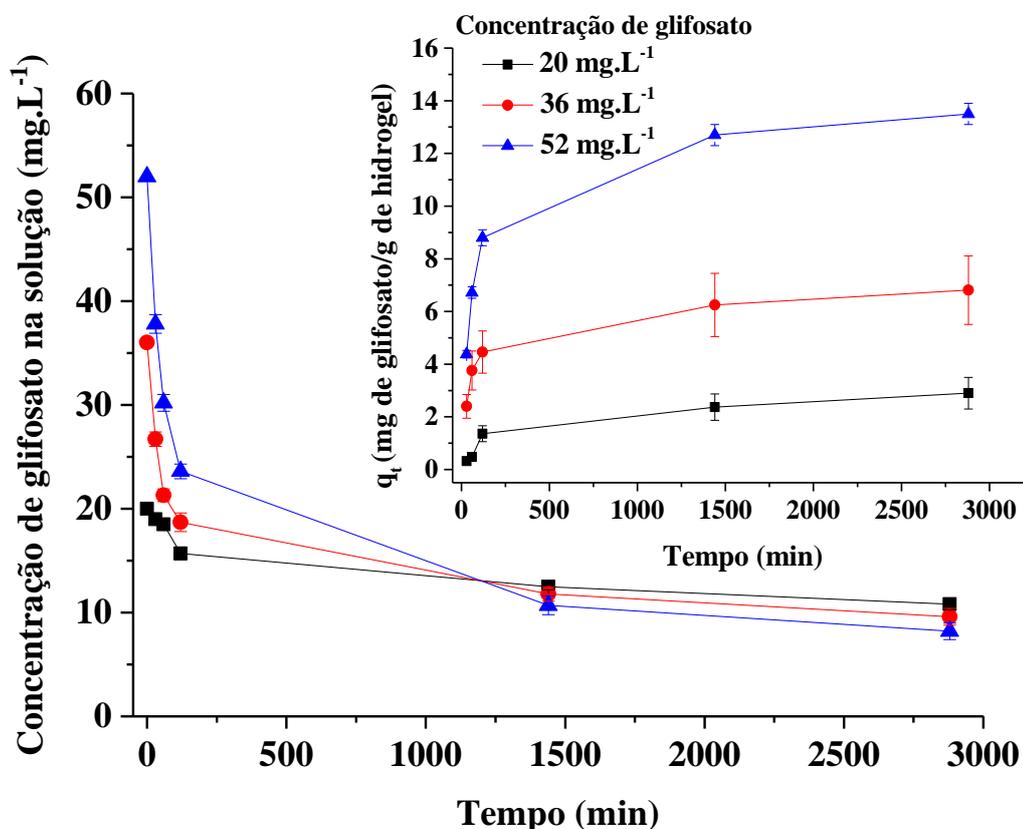
Fonte: A autora, 2018.

4.3.2. Avaliação do processo de adsorção do herbicida glifosato

Nesta etapa, o biohidrogel foi imerso em soluções de glifosato com diferentes concentrações (20; 36 e 52 mg. L^{-1}).

A Figura 44 apresenta as curvas de adsorção do herbicida glifosato e a quantidade de glifosato adsorvido (q_t) em mg/g de hidrogel em função do tempo. É possível observar uma diminuição da concentração de glifosato na solução com o aumento do tempo, para todas as soluções avaliadas, indicando a adsorção do herbicida pelo hidrogel.

Figura 44 - Curvas de adsorção e da quantidade de glifosato adsorvido (q_t) em mg/g de biohidrogel versus tempo



Fonte: A autora, 2018.

Os resultados apresentados na Figura 44, também, mostraram que a cinética de intumescimento tende a atingir o equilíbrio em 1440 min. A concentração inicial do glifosato, em cada solução, decresceu em torno de 46; 81 e 84 %, respectivamente, após o processo de adsorção. Isso significa que o biohidrogel adsorveu 9,2; 29,2 e 43,8 mg de glifosato/g de biohidrogel, após 48 horas imerso nas soluções de concentrações de 20; 36 e 52 mg.L⁻¹, respectivamente.

O pH da água utilizada no preparo das soluções foi de, aproximadamente 6,5, no qual o glifosato apresenta-se dissociado com três cargas negativas e uma carga positiva (ZHOU *et al.*, 2013; CARNEIRO *et al.*, 2015). Assim, as moléculas do glifosato foram adsorvidas pelo biohidrogel por meio de interações com os grupamentos NH₃⁺ da quitosana. Além disso, o estudo teórico mostrou a formação de uma ligação-H intermolecular de caráter covalente favorecendo a interação entre os oxigênios dos grupos fosfatos da molécula de glifosato e o NH₃⁺ da quitosana (Figura 25, p. 85).

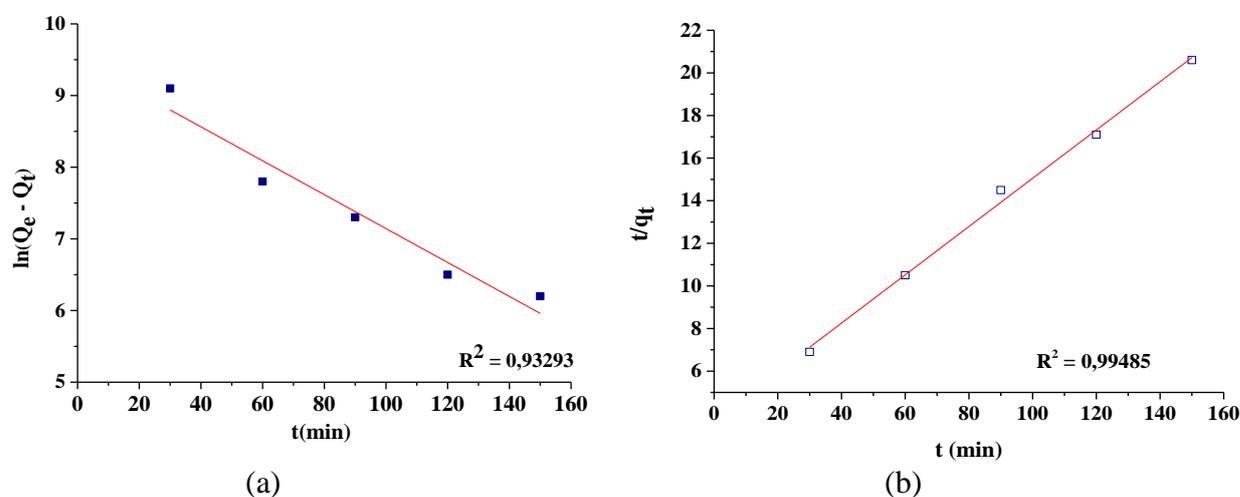
Um declive íngreme das curvas é observado durante o início do processo de adsorção

(Figura 44), o qual pode ser explicado, provavelmente, pelo fato de o biohidrogel, inicialmente, possuir cargas elétricas, ao longo das cadeias poliméricas que o constituem, disponíveis para interagir com as moléculas do herbicida. Somado a isso, assim que o biohidrogel é colocado em contato com a solução aquosa de glifosato, o seu intumescimento é favorecido em virtude do seu caráter hidrofílico e de sua morfologia conter espaços vazios (Figura 34 destacada em vermelho), que são preenchidos pela solução do herbicida ao longo do tempo, até atingir o equilíbrio.

4.3.3. Cinética de adsorção

Em geral, as avaliações sobre a capacidade de adsorção dos solutos no equilíbrio e sobre a cinética da adsorção são descritos usando vários modelos ou fórmulas empíricas. As cinéticas de adsorção são usualmente descritas pelos modelos de pseudo-primeira-ordem (LAGERGRÉN, 1898) e de pseudo-segunda-ordem (HO *et al.*, 1998), para a maioria dos sistemas adsorvente-adsorbato. A Figura 45 mostra a cinética de adsorção da solução de glifosato pelo biohidrogel, determinada por ambos os modelos. A Tabela 12 apresenta os resultados das constantes de primeira ordem (k_1) e de segunda ordem (k_2), obtidos pelas Equações 15 e 16.

Figura 45 - Cinética de adsorção da solução na concentração de 52 mg.L^{-1} de glifosato pelo biohidrogel



Legenda: (a) Pseudo-primeira-ordem e (b) Pseudo-segunda-ordem.
Fonte: A autora, 2018.

Tabela 12 -Parâmetros de pseudo primeira ordem (k_1) e pseudo segunda ordem (k_2) para adsorção do glifosato

Tempo de imersão do biohidrogel na solução de glifosato (min)	q_e^a (mg.g ⁻¹)	$\ln (q_e - q_t)^b$	t/q_t^c	k_1 (min ⁻¹)	k_2 (g.mg ⁻¹ .min ⁻¹)
30	13,5	9,1	6,9	0,02367	0,1133
60		7,8	10,5		
90		7,3	14,5		
120		6,5	17,1		
150		6,2	20,6		

Legenda:^a quantidade máxima de herbicida adsorvido (mg.g⁻¹);^bparâmetro para calcular parâmetro de pseudo-primeira ordem;^cparâmetro para calcular parâmetro de pseudo-segunda ordem.

Fonte: A autora, 2018.

O estudo cinético mostrou a aplicabilidade das Equações 15 e 16 para o sistema (biohidrogel e herbicida) nas condições aplicadas nesta Tese. As constantes (k_1) e de segunda ordem (k_2) foram determinadas pelo declive da reta (regressão linear). O coeficiente de correlação para a cinética de primeira ordem foi comparado com o calculado para a cinética de segunda ordem (Tabela 12). Como pode ser visto, o coeficiente de correlação da cinética de segunda ordem foi superior, mostrando que a adsorção do glifosato pelo biohidrogel, preparado na composição ideal, exibiu um comportamento de pseudo-segunda ordem.

4.3.4. Isoterma de adsorção

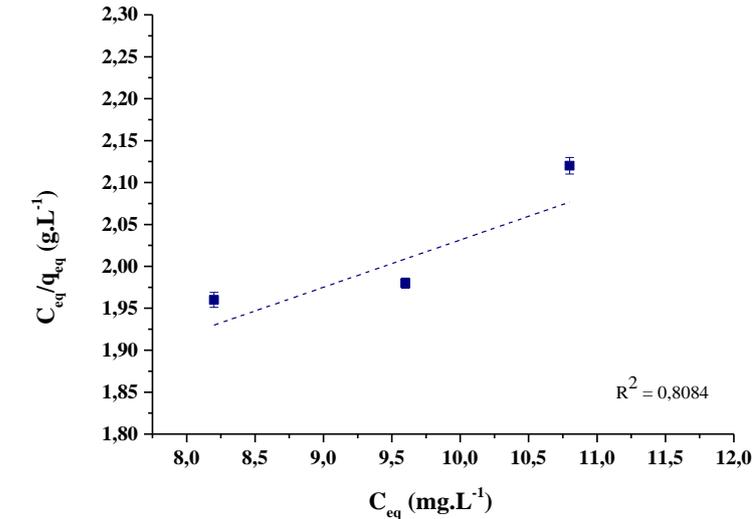
Com o objetivo de investigar o mecanismo de adsorção do herbicida glifosato pelo biohidrogel, dois modelos foram analisados: modelo de Langmuir e modelo de Freundlich.

As Figuras 46a e 46b apresentam os ajustes obtidos pelo biohidrogel usando os modelos de Langmuir e de Freundlich para o estudo de adsorção do herbicida glifosato (adsorbato) no biohidrogel (adsorvente). Os valores dos parâmetros de cada modelo são fornecidos na Tabela 13.

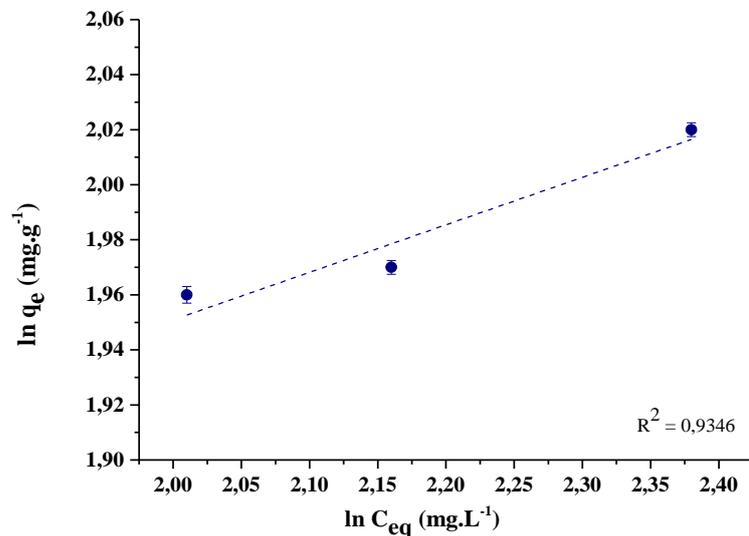
Analisando a Figura 45, observa-se o mesmo perfil em ambos os modelos. No entanto, o coeficiente de correlação (R^2) obtido, indicou que o modelo de Freundlich forneceu o melhor

ajuste. O resultado obtido pelo modelo de Langmuir demonstrou que a sorção do glifosato pelo biohidrogel não foi satisfatório, devido à formação de uma monocamada na superfície do biohidrogel. Neste caso, a adsorção ideal deve ser em uma superfície heterogênea que não se restrinja à formação de uma monocamada (CARNEIRO *et al.*, 2015, LINHARES *et al.*, 2008).

Figura 46 - Isotermas de adsorção do biohidrogel ALG:QUI pelo herbicida glifosato



(a)



(b)

Legenda: (a) modelo de Langmuir; (b) modelo de Freundlich.
Fonte: A autora, 2018.

A isoterma de Freundlich é função de dois parâmetros, K_F (constante relacionada com a energia de ligação), definida como um coeficiente de adsorção. O expoente $1/n$, é uma medida

de intensidade de adsorção em superfícies heterogêneas (TSAI *et al.*, 2004), cujo valor de **n** é qualitativamente relacionado com a distribuição de sítios energéticos (CARNEIRO *et al.*, 2015, GUILHERME *et al.*, 2015). O valor de **n** do modelo de Freundlich nos fornece informações sobre o processo de adsorção. Neste caso, o valor de **n** indicou uma maior afinidade entre o adsorvente e o adsorbato. De acordo com a Tabela 13, o valor de **n** foi de 1,170, indicando a presença de sítios altamente energéticos (LINHARES *et al.*, 2008). Esses resultados indicaram que houve interação entre o glifosato e o biohidrogel, e que a isoterma de adsorção mais adequada foi obtida pelo modelo de Freundlich.

Tabela 13 -Valores obtidos pelo ajuste da cinética de adsorção usando os modelos de Langmuir e Freundlich

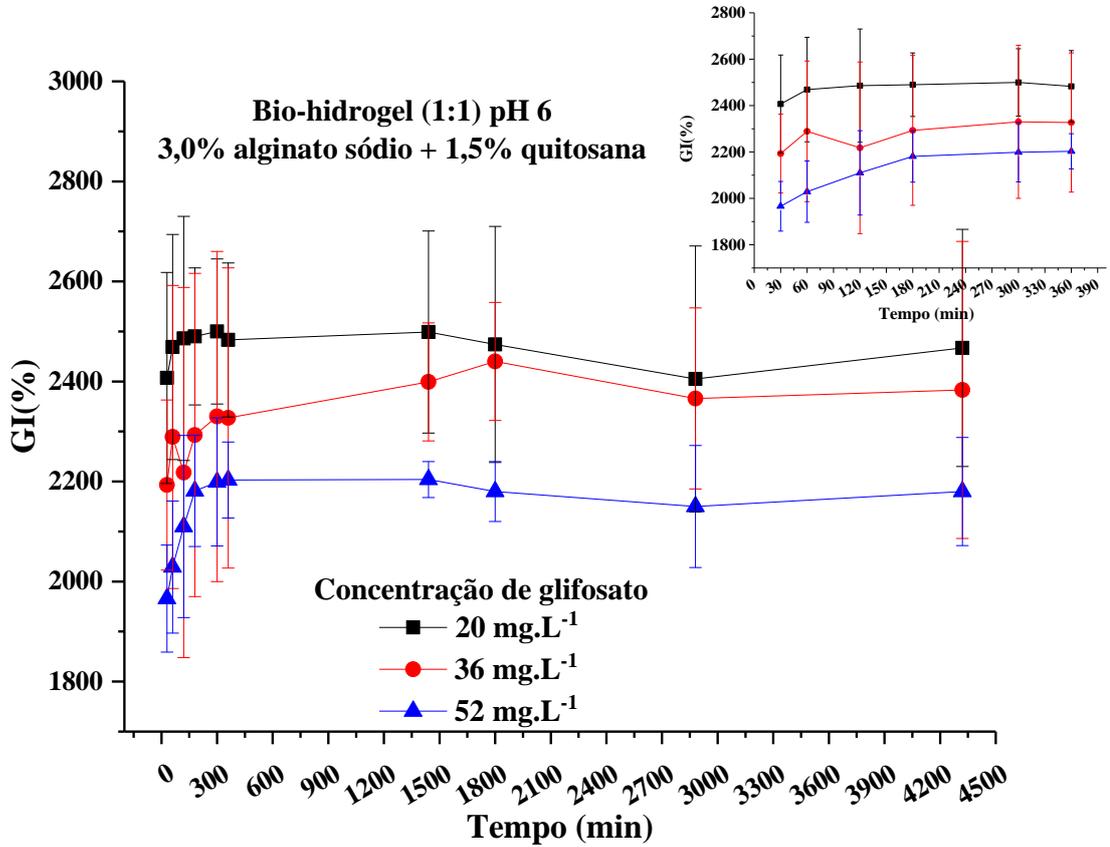
Langmuir			Freundlich			
	K_L (L.g ⁻¹)	α_L (L.g ⁻¹)	R ²	K_F (L.g ⁻¹)	1/n	R ²
ALG/QUI	0,692	0,042	0,8084	3,4810	0,8545	0,9346

Fonte: A autora, 2018.

4.3.5. Grau de intumescimento do biohidrogel na solução de glifosato

Nesta etapa, o grau de intumescimento teve como objetivo avaliar o comportamento do biohidrogel frente as três diferentes concentrações de glifosato (Figura 47). O resultado apresentado mostra que, em todas as concentrações de glifosato, o biohidrogel foi capaz de apresentar um intumescimento superior a 1000%. O equilíbrio foi alcançado após 6 h. Esse resultado indica que o biohidrogel é capaz de reter uma elevada quantidade da solução de glifosato em suas cadeias macromoleculares, devido ao elevado caráter hidrofílico do alginato, pela presença de grupos carboxílicos e hidroxílicos em sua estrutura. Por outro lado, o grau de intumescimento decresceu quando a concentração de glifosato foi aumentada, provavelmente, devido à quitosana estar em menor concentração em relação ao alginato, tornando difícil a interação do glifosato na estrutura do biohidrogel. Os resultados do estudo teórico, apresentado no item 4.1.4. (p.84), mostraram que a formação do complexo ALG:QUI/GLP favoreceu o aparecimento de ligação-Hintermolecular entre a molécula de glifosato e o grupo amino da quitosana. No entanto, estando a quitosana em menor concentração, haverá menor quantidade de grupos NH₃⁺ interagindo com os átomos de oxigênio pertencentes ao grupo fosfato do glifosato.

Figura 47 - Grau de intumescimento do biohidrogel ALG:QUI (1:1) em pH 6 em diferentes concentrações de glifosato



Fonte: A autora, 2018.

Como os biohidrogéis apresentaram um intumescimento superior a 1000 % em todas as soluções de glifosato testadas, independente da concentração, decidiu-se escolher para o estudo da liberação gradativa de glifosato, a solução com a maior concentração do herbicida (52 mg.L⁻¹). Assim a seção a seguir, apresenta a avaliação da liberação gradativa do herbicida glifosato *in vitro*, com a solução de maior concentração de glifosato, ou seja, 52 mg.L⁻¹.

4.3.6. Estudo da liberação gradativa do glifosato

O principal benefício de um sistema de liberação gradativa, visando a aplicabilidade na agricultura é aumentar a eficiência funcional de insumos sintetizados quimicamente (nutrientes e pesticidas), diminuindo custos devido à redução na quantidade de aplicações e o risco operacional, conseqüentemente reduzindo os riscos de toxidez para o homem quando utilizam concentrações elevadas na lavoura e de contaminação ambiental pelo o uso excessivo desses produtos (CAMPOS *et al.*, 2015).

A literatura já tem relatado diversos trabalhos de produção e caracterização de hidrogéis aplicados na agricultura como sistemas de liberação gradativa de insumos agrícolas. Hidrogéis formados por misturas entre polímeros sintéticos e naturais ou somente à base de polímeros naturais, neste último caso fazendo uso de algum agente reticulante (CaCl_2 , KCl, TPP) tem despertado grande atenção por parte da comunidade científica (SANTOS SILVA *et al.*, 2010; GUILHERME *et al.*, 2015, BORTOLIN *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2017; MARUYAMA *et al.*, 2016; GRILLO *et al.*, 2014; CAMPOS *et al.*, 2015).

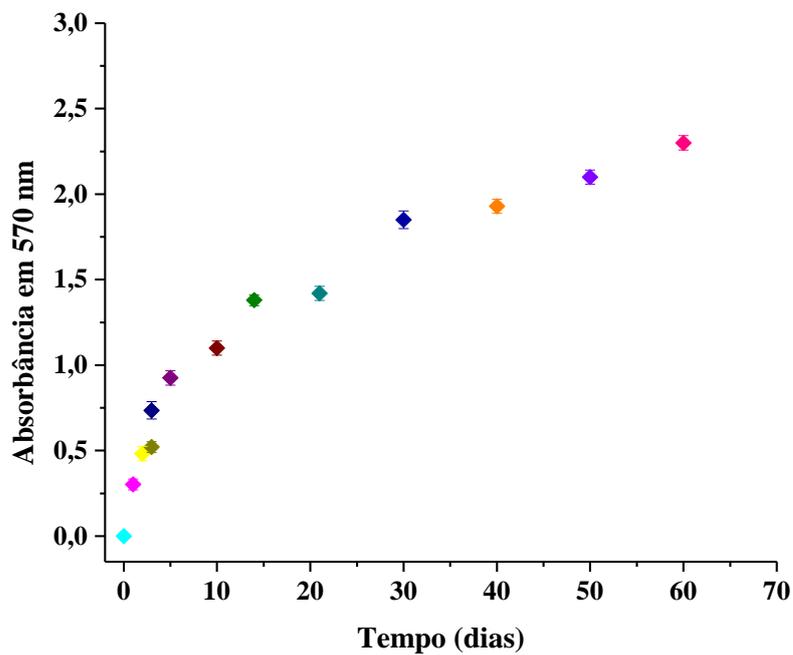
Vários parâmetros podem afetar a liberação de herbicidas, tais como, a reticulação e conseqüentemente, o tamanho dos poros, a massa molecular, pH, temperatura e a razão de polímeros (SIEPMANN *et al.*, 2001). Portanto ensaios de cinética de liberação são fundamentais para a caracterização desses materiais, pois fornece informações importantes quanto à interação herbicida-carreador e o mecanismo envolvido no processo de liberação (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010).

Nesta Tese, o estudo de liberação gradativa do herbicida glifosato foi investigado a partir da composição de biohidrogel considerada ideal, utilizando a técnica de colorimetria. O biohidrogel foi imerso em uma solução contendo 52 mg.L^{-1} de glifosato durante 48 h. A quantificação do herbicida foi realizada mediante a curva de calibração obtida na Figura 43 p. 128.

A Figura 48 apresenta o processo cinético de liberação do glifosato no comprimento de onda de absorção máxima ($\lambda = 570 \text{ nm}$) do biohidrogel.

Foi observado um máximo de aproximadamente 38 mg.L^{-1} da quantidade de glifosato liberada pelo biohidrogel. A cinética de liberação atingiu o estado de equilíbrio em torno de 30 a 35 dias.

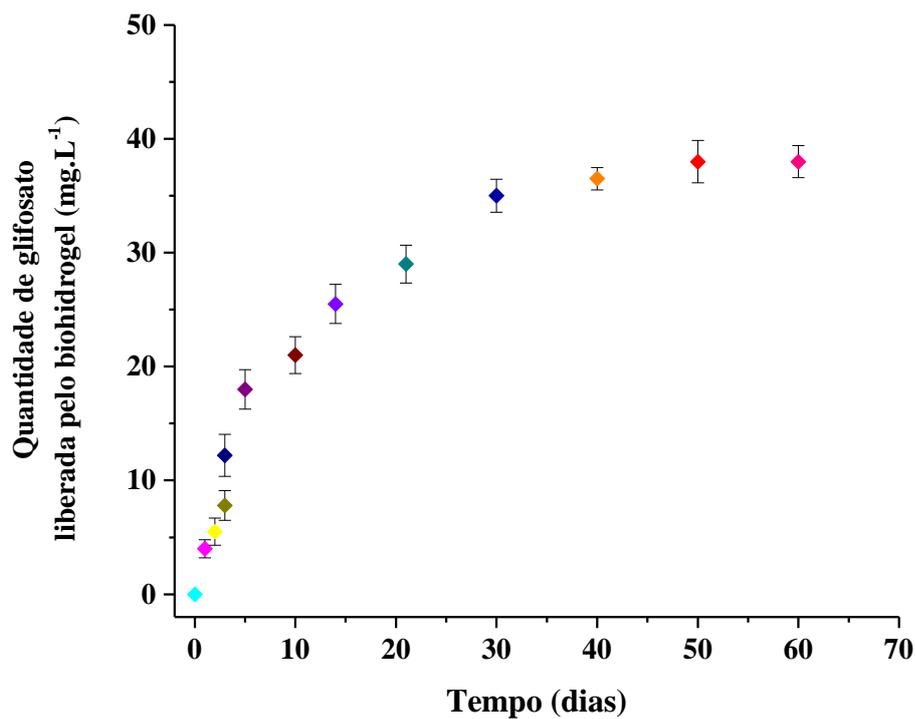
Figura 48 - Cinética de liberação do herbicida glifosato



Fonte: A autora, 2018.

A Figura 49 mostra a quantidade de glifosato liberada em função do tempo para o biohidrogel.

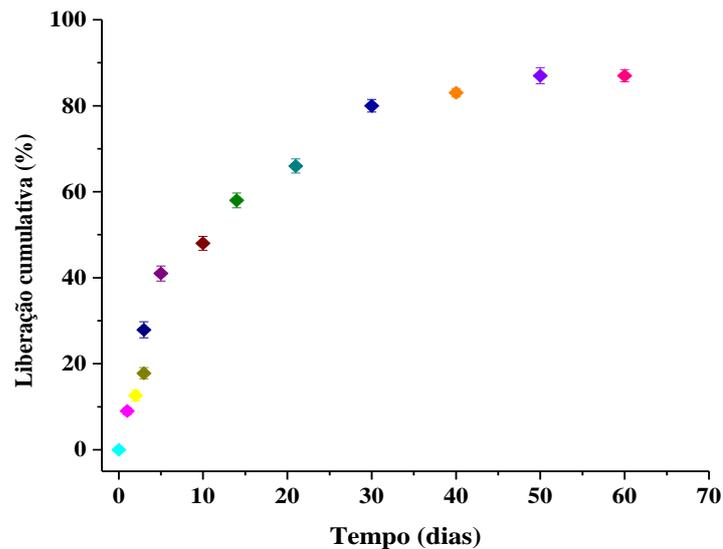
Figura49 - Quantidade de glifosato liberada em função do tempo para o biohidrogel



Fonte: A autora, 2018.

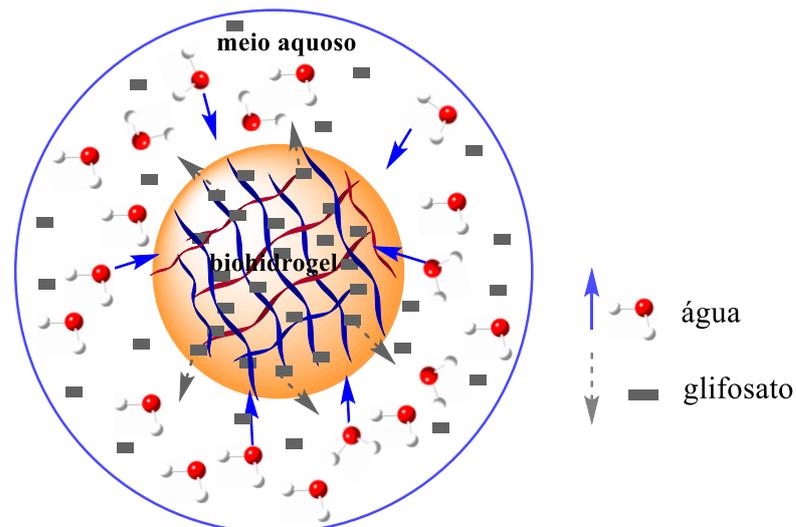
A Figura 50 apresenta a liberação cumulativa (%) do herbicida glifosato em função do tempo. A liberação cumulativa do biohidrogel foi determinada pela razão da quantidade liberada de herbicida em um determinado tempo pela quantidade total carregada, conforme apresentada na Equação 21.

Figura 50 - Liberação cumulativa (%) *versus* tempo (dias)



Fonte: A autora, 2018.

Figura 51 - Representação do biohidrogel (ALG:QUI) intumescido com solução de glifosato, representando o processo de liberação gradativa do herbicida glifosato



Fonte: A autora, 2018.

O biohidrogel carregado com o herbicida foi colocado em contato com a água, e por diferença de potencial químico, as moléculas de água tendem a difundir para o interior da matriz, através da interação com grupos hidroxilas do alginato e aminos da quitosana

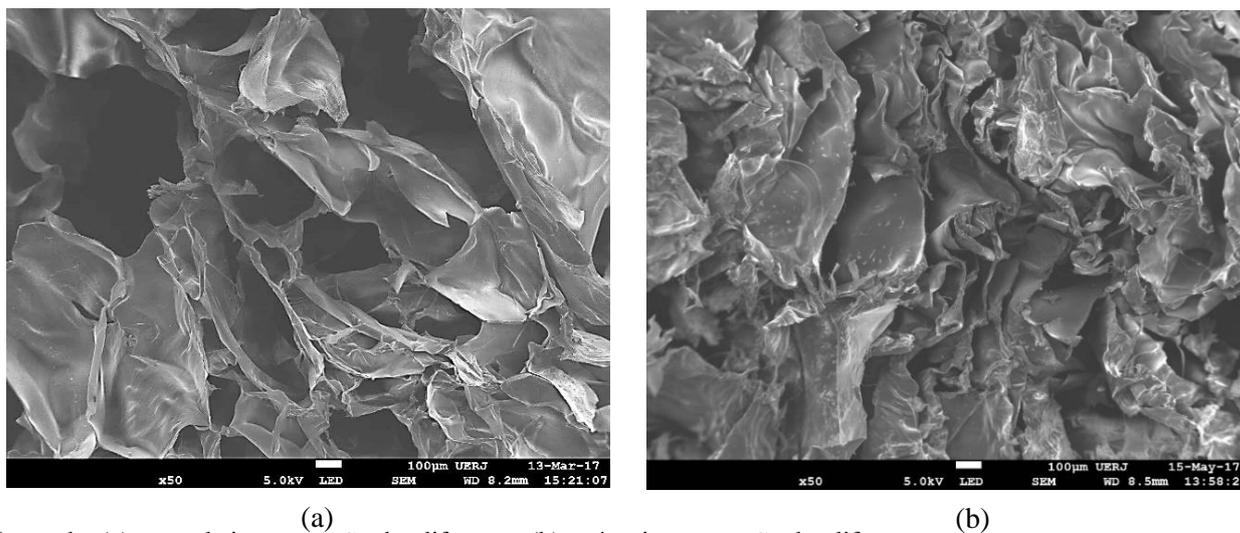
(GRILLO *et al.*, 2014). Acontece assim, uma competição entre herbicida/água e a matriz do biohidrogel, conseqüentemente, moléculas de herbicida são difundidas para fora da matriz (meio aquoso), ou seja, ocorrendo a liberação gradativa (Figura 51). A liberação ocorreu de forma gradativa e prolongada, ou seja, houve uma interação entre a matriz devido aos grupos catiônicos da quitosana e o herbicida glifosato, ou seja, algumas moléculas do herbicida ficaram retidas na rede do biohidrogel. A liberação cumulativa foi de, aproximadamente, 90% no final de 60 dias, atingindo o equilíbrio em um tempo de 50 dias. Resultados teóricos corroboram com esse resultado e nos permitiram afirmar que além das interações eletrostáticas, as ligações covalentes estão presentes na complexação entre a matriz do biohidrogel e o glifosato.

4.3.7. Microscopias eletrônicas de varredura e confocal a laser (SEM/ CLSM)

A Figura 52 apresenta as micrografias de SEM do biohidrogel, antes e após a incorporação do glifosato (a amostra ficou imersa em uma solução de glifosato de 52 mg.L^{-1} durante 24 horas, em seguida, foi congelada e liofilizada). Observa-se que a amostra sem o glifosato (Figura 52a) apresentou uma morfologia com poros de tamanhos variados. Enquanto que, a incorporação do glifosato ocasionou mudanças morfológicas significativas (Figura 52b). Neste caso, os poros tenderam a colapsar (fechar), sendo observada uma estrutura, aparentemente, mais rígida, ocasionada pela possível cristalização da molécula de glifosato no interior do biohidrogel, provavelmente, devido à secagem por liofilização. A diminuição dos poros, também, pode ter sido ocasionada pela interação do herbicida glifosato com o grupo NH_3^+ da quitosana que compõe o biohidrogel.

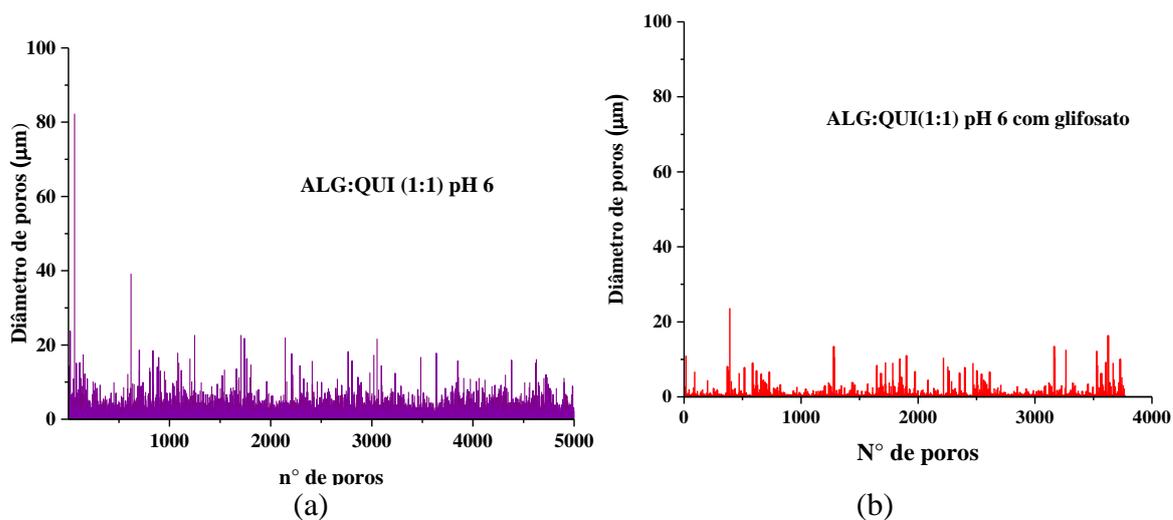
Com a utilização do *software* ImageJ-NIH, foi possível comprovar a ocorrência de diminuição do número e do tamanho dos poros existentes no biohidrogel após a incorporação do glifosato (Figura 53). No biohidrogel puro, os poros apresentaram tamanho médio de $20\text{a}25\mu\text{m}$ (Figura 53a); enquanto que, após a incorporação do herbicida, o biohidrogel apresentou poros entre $5\text{ e }10\mu\text{m}$ (Figura 53b).

Figura 52–Micrografias de SEM do biohidrogel



Legenda: (a) antes da incorporação do glifosato e (b) após a incorporação do glifosato.
Fonte: A autora, 2018.

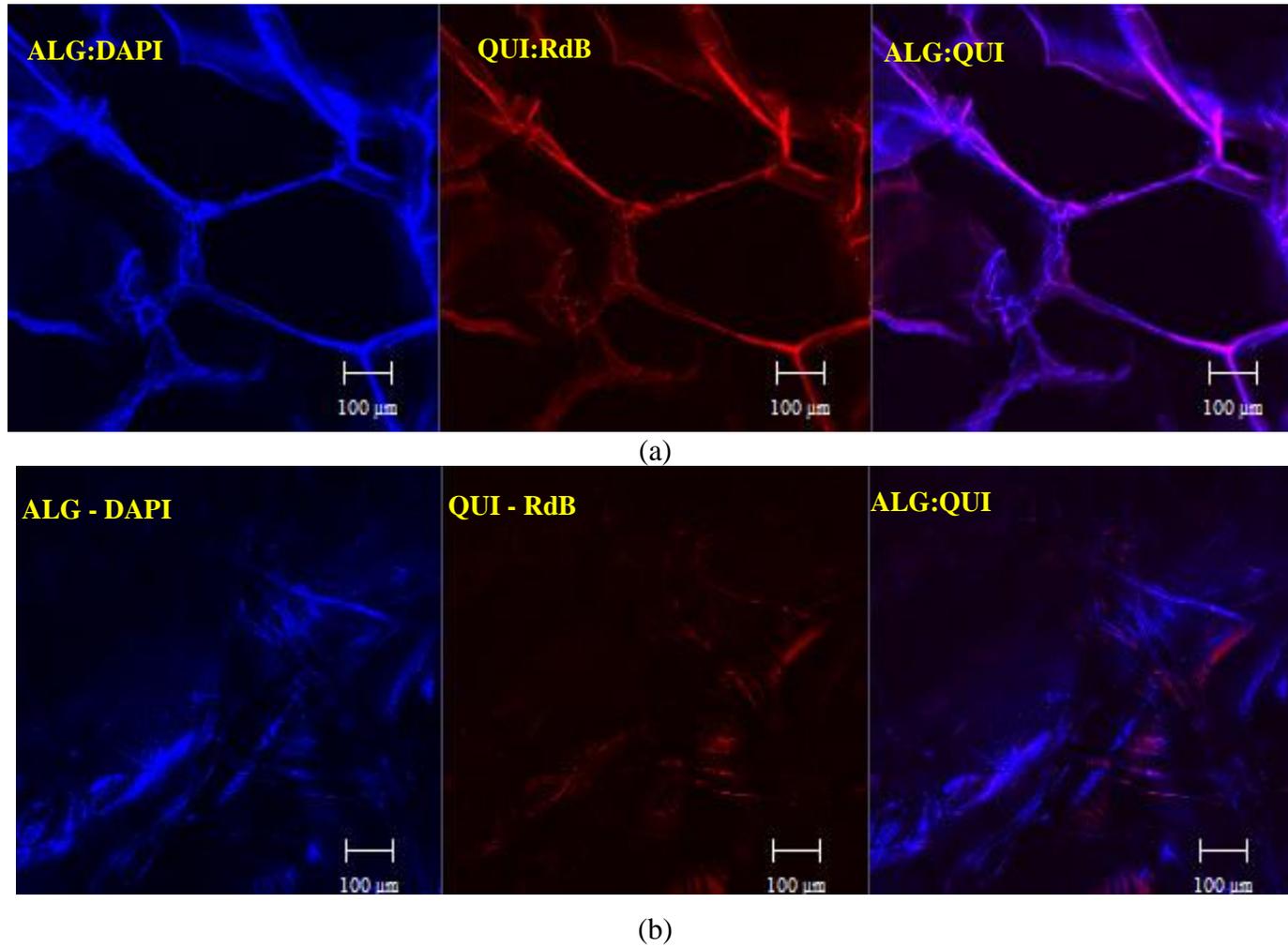
Figura 53 - Tamanho de poros *versus* número de poros do biohidrogel



Legenda: (a) antes da incorporação do glifosato e (b) após a incorporação do glifosato.
Fonte: A autora, 2018.

Recentemente, estudos têm aplicado a microscopia de fluorescência para investigação das interações estruturais em diferentes misturas poliméricas (LEE *et al.*, 2011; YU *et al.*, 2013). A Figura 54 apresenta as micrografias de microscopia confocal a laser (CLSM) do biohidrogel antes e após a incorporação com o glifosato.

Figura 54 -Micrografias de CLSM do biohidrogel

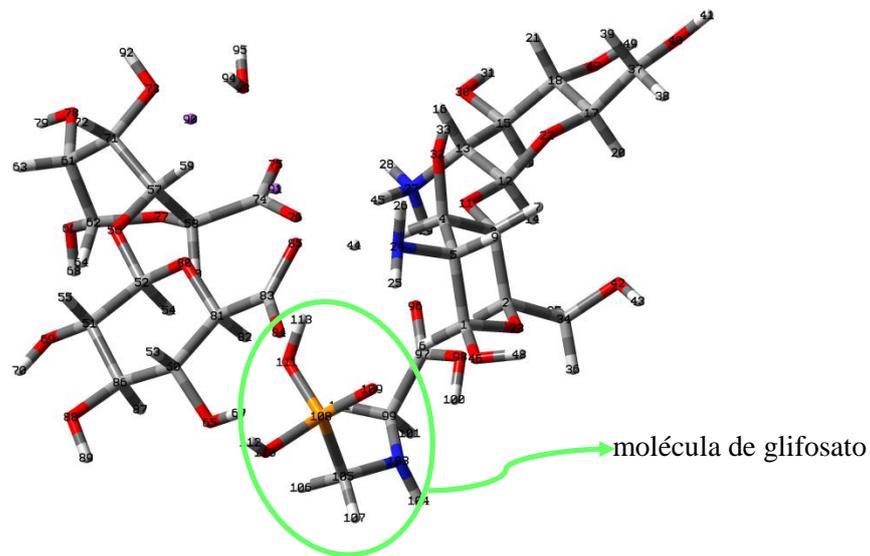


Legenda: (a) sem glifosato e (b) após a incorporação do glifosato.
Fonte: A autora, 2018.

As micrografias de CLSM revelaram a distribuição de cada polissacarídeo (ALG e QUI), que forma o biohidrogel. Similarmente à microscopia eletrônica de varredura (SEM), a Figura 54a revelou a presença de uma superfície porosa com canalitos profundos na superfície da amostra. Ambos os polissacarídeos (ALG - coloração azul e QUI - coloração vermelha) estão evidentes após o tingimento com DAPI, para alginato e RdB, para quitosana. Após o glifosato ter sido incorporado no biohidrogel, as imagens de CLSM revelaram como no SEM, uma superfície, com ausência de poros (Figura 54b). Foi observado, também, que a presença da quitosana parece ter ficado encoberta mediante a presença do glifosato. De fato, isso ocorreu, pois a molécula de glifosato, carregado negativamente, interage com a molécula de quitosana. Esse resultado foi corroborado pelo estudo teórico, no qual comprovou essa interação entre o glifosato e a quitosana (Figura 55).

O estudo teórico mostrou que o grupamento PO_3^{2-} da molécula de glifosato interage em maior proporção com o íon NH_3^+ da quitosana, devido as interações eletrostáticas entre esses grupos, favorecendo a estabilidade do complexo.

Figura 55 - Complexo polieletrólito (ALG:QUI) com o herbicida glifosato

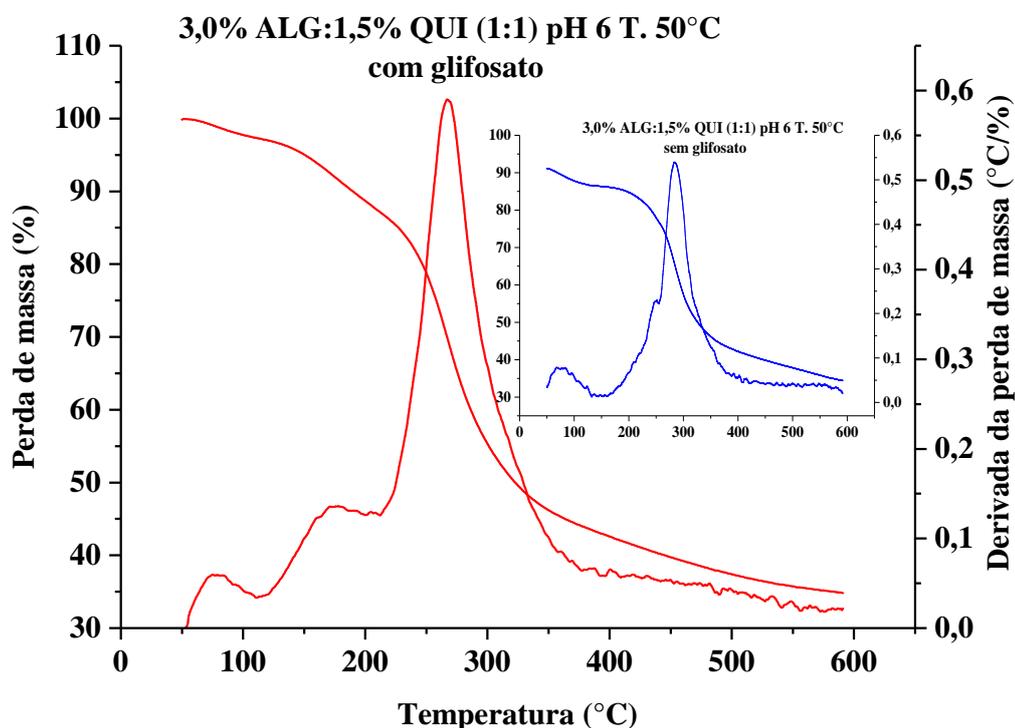


Fonte: A autora, 2018.

4.3.8. Estabilidade térmica (TGA)

Nesta etapa do trabalho foi avaliada a influência da incorporação do glifosato sobre a estabilidade térmica do biohidrogel. A Figura 56 apresenta as curvas de TG e DTG dos biohidrogéis antes e após a incorporação do herbicida.

Figura 56 – Curvas de TG e DTG do biohidrogel com e sem a incorporação do glifosato



Fonte: A autora, 2018.

Nas curvas da amostra sem glifosato (Figura 56 – curvas azuis) é possível verificar entre 50 e 200°C um único estágio de perda de massa, referente à evaporação de água, que indica que o biohidrogel é higroscópico. Enquanto que, na amostra de biohidrogel contendo glifosato, entre 50 e 200°C, é possível verificar dois estágios de perda de massa (Figura 56 – curvas vermelhas). Provavelmente, um desses estágios pode ser do glifosato (Tabela 14). O estágio de degradação referente às cadeias poliméricas do biohidrogel apresentou temperatura inicial de degradação (T_{onset}) em 247 °C, para a amostra sem glifosato, e T_{onset} em 245°C, para a amostra com glifosato. Isso significa que a presença do glifosato não provocou influência significativa na resistência à degradação térmica do biohidrogel.

Tabela 14 - Valores das temperaturas de degradação do herbicida glifosato e do biohidrogel

Glifosato	Temperatura de decomposição						Referência
	T_{onset} (°C)			T_{máx.}(°C)			
	T₁	T₂	T₃	T₁	T₂	T₃	CHEN et al, 2012
	198	230	261	220	253	349	
3% Alginato + 1.5 % Quitosana pH 6 – T.50°C							
Razão volumétrica (1:1)	Temperatura de decomposição					Resíduo	
	T_{onset} (°C)			T_{máx.}(°C)		(%)	(mg)
	T₁	T₂	T₁	T₂			
Sem glifosato		247,2	283,0			31,14	0,8898
Com glifosato	143,0	245,0	170,0	267,0		36,0	1,104

Fonte: A autora, 2018.

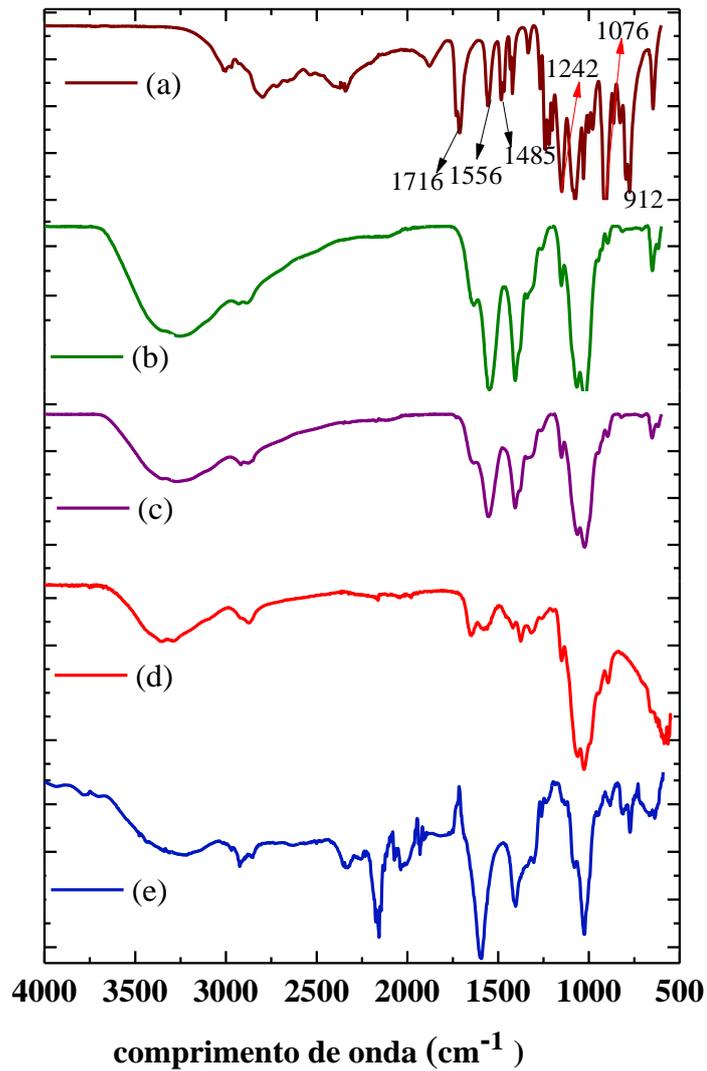
4.3.9. Composição química (FTIR)

A fim de verificar uma provável interação química entre os grupos funcionais de cargas opostas dos poliânions da composição (ALG:QUI) com o herbicida glifosato, foi utilizada a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). A Figura 57 apresenta os espectros de FTIR dos polissacarídeos puros, do herbicida glifosato e das amostras de biohidrogel antes e após a incorporação do herbicida glifosato.

O espectro do glifosato (Figura 57a) apresenta um perfil complexo, no qual as principais bandas são atribuídas aos sinais 1716 cm^{-1} , que corresponde ao estiramento dos grupos carboxílicos; as bandas de absorção em 1556 e 1485 cm^{-1} , são atribuídas à deformação angular da ligação N–H; o sinal em 1242 cm^{-1} corresponde à deformação angular da ligação P=O e os sinais em 1076 cm^{-1} e 912 cm^{-1} , são atribuídos aos estiramentos assimétricos e simétricos da ligação P–O do grupo fosfonato do glifosato.

Os espectros das Figuras 57c e 57b, antes e após a incorporação do herbicida, apresentaram um perfil semelhante, não sendo possível afirmar qualquer interação entre o herbicida com o biohidrogel. Provavelmente, isso ocorreu devido à baixa concentração da solução de glifosato, não sendo possível de ser detectada pela análise de espectroscopia de infravermelho.

Figura 57 – Espectro de FT-IR das amostras: (a) glifosato; (b) ALG:QUI com glifosato; (c) ALG:QUI sem glifosato; (d) quitosana e (e) alginato de sódio



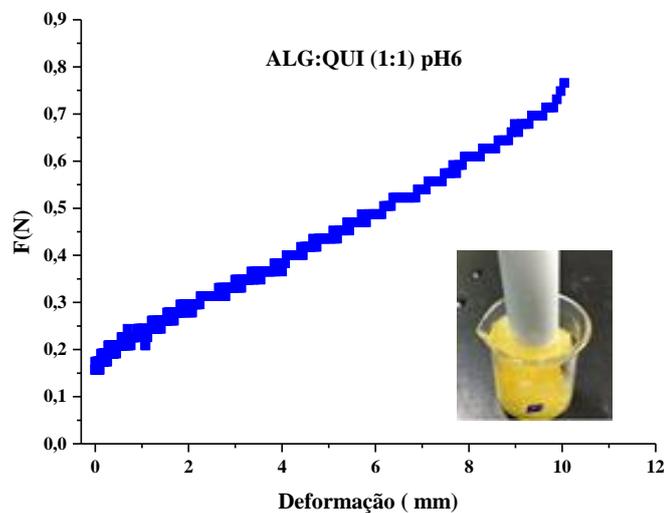
Fonte: A autora, 2018.

4.3.10. Propriedade mecânica do biohidrogel com glifosato

A avaliação da resistência mecânica do biohidrogel com o glifosato foi avaliada na amostra intumescida. A tensão máxima de compressão ($\sigma_{\text{máx.}}$) foi determinada e a curva representativa de força *versus* deformação para o biohidrogel à deformação uniaxial é mostrada na Figura 58.

Figura 58- Propriedade mecânica (compressão) do biohidrogel intumescido com glifosato:

Força (N) *versus* deformação (mm)



Fonte: A autora, 2018.

A curva representativa de força-deformação utilizando força uniaxial mostra uma linearidade entre as propriedades (Figura 58). Isso mostra que a deformação do biohidrogel foi elástica, ou seja, o biohidrogel retornou a sua conformação inicial quando a força foi removida. Provavelmente, este fato esteja relacionado com o elevado teor de blocos MM (blocos manurônicos) do alginato, que proporcionam uma maior flexibilidade às redes poliméricas e assim, contribuindo diretamente com a quantidade de água adsorvida pelo biohidrogel.

CONCLUSÕES

- Obteve-se uma composição de biohidrogel satisfatória, sem adição de agente de reticulação, com potencial de utilização na liberação gradativa de glifosato, nas seguintes condições: solução de 3,0 % de alginato de sódio e 1,5% de quitosana; razão volumétrica ALG:QUI 1:1, em pH 6 e na temperatura de 50°C;
- Os resultados experimentais demonstraram que os valores do grau de intumescimento estão relacionados à hidrofiliabilidade dos polissacarídeos e podem variar substancialmente com a variação das condições reacionais (pH, temperatura, razão entre os polissacarídeos). Foram obtidos materiais com grau de intumescimento superior a 1000%;
- A morfologia das amostras sofreu mudanças significativas de acordo com a variação das condições reacionais (pH, temperatura e razão entre os polissacarídeos);
- O ensaio de compressão mostrou que a maior concentração de alginato de sódio (3,0 % m/v) foi responsável pelo maior valor de tensão máxima de compressão;
- A cinética de adsorção do herbicida glifosato atingiu o seu estado de equilíbrio em 48 horas, apresentando uma adsorção da solução de glifosato de 86%;
- O teste de liberação gradativa, realizado *in vitro* (até 60 dias), revelou que aproximadamente 73% do herbicida foi liberado, atingindo o estado de equilíbrio em 30 – 35 dias de teste. A liberação cumulativa do herbicida atingiu 90% pelo biohidrogel, após 50 dias;
- Por meio das isotermas de adsorção foi possível identificar que o biohidrogel apresentou uma superfície heterogênea, sendo o modelo de Freundlich o mais adequado;
- A microscopia de fluorescência teve um papel importante nesta Tese. Por meio dela, foi possível comprovar as mudanças, na superfície do biohidrogel, causadas pelo herbicida, e também a interação do glifosato com a quitosana;
- O estudo teórico apresentado nesta Tese mostrou que a interação do complexo ALG:QUI, formado por resíduos de dissacarídeos, não é simplesmente eletrostática entre os grupamentos iônicos (COO^- e NH_3^+), mas possui um forte caráter covalente proveniente das ligações de hidrogênio;
- A molécula do herbicida glifosato não apenas se coordena ao contra-íon sódio, mas também, interage com a quitosana por meio de uma ligação-H, porém mais fraca do que as formadas entre os dímeros de alginato e quitosana.

REFERÊNCIAS

- ABREU, F.O. M.S. *et al.* Influence of the composition and preparation method on the morphology and swelling behavior of alginate-chitosan hydrogels. *Carbohydr. Polym.*, v. 74, p. 283 – 289, 2008.
- ABREU, F. O. M. S. *et al.* Chitosan and gum arabic nanoparticles for heavy metal adsorption. *Polímeros*, v.28(3), p. 231-238, 2018
- ADAMSON, A. W. & GAST, A. P. *Physical chemistry of surfaces*. John Wiley & Sons, New York, 6.ed, p. 804, 1997.
- AGULHON, P. *et al.* Structure of alginate gels: interaction of diuronate units with divalent cations from density functional calculations. *Biomacromolecules*, v. 13, n. 6, p. 1899–1907, 2012.
- AGUIAR, L. M. *et al.* Glyphosate-based herbicide causes antioxidante defence responses in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, v. 185-186, p. 94-101, 2016.
- AHMED, E. M. Hydrogel: preparation, characterization, and applications: a review. *J. Adv. Res.*, v. 6, p. 105 – 121, 2015.
- AKMAN, F. *Prediction* of chemical reactivity of cellulose and chitosan based on density functional theory. *Cellul. Chem. Technol.*, v. 51, n. (3-4), p. 253–262, 2017.
- ALEMZADEH, I. & VOSSOUGH, M. Controlled release of paraquat from poly vinyl alcohol hydrogel. *Chem. Eng. Proc.*, v. 41(8), p. 707-710, 2002.
- ALSHARABASY, A. M.; MOGHANNEM, S. A.; EL-MAZNY, W. N. *et al.* Physical preparation of alginate/chitosan polyelectrolyte complexes for biomedical applications. *J. Biomater. Appl.*, v. 30, n. 7, p. 1071–1079, 2015.
- ALTAF, M. A. *et al.* Ionic gelation controlled drug delivery systems for gastric-mucoadhesive microcapsules of captopril. *Indian J. Pharm. Sci.*, v. 70 (5), p. 655-658, 2008.
- ALVAREZ-LORENZO, C. *et al.* Crosslinked ionic polysaccharides for stimuli-sensitive drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v.65 (9), p. 1148-1171, 2013.
- AMARANTE JUNIOR, O. P. *et al.* Métodos de extração e determinação do herbicida glifosato: breve revisão. *Quim. Nova*, v. 25, p. 420-428, 2002.
- ANDREWS, J. G. *An Introduction to Hydrogen Bonding*. 1. ed. Oxford: Oxford University Press, 1997.
- ANSEL, H. C. *et al.* Formas farmacêuticas com velocidade controlada e sistemas de liberação de fármacos. In: *Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. São Paulo: Premier, cap. 9, p. 283-300, 2007.

AOUADA, F. A. et al. Síntese de Hidrogéis e cinética de liberação de amônio e potássio. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, p. 1643-1649, 2008.

AOUADA, F. A. *Síntese e caracterização de hidrogéis de poliacrilamida e metilcelulose para liberação controlada de pesticidas*. 2009. 141 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

ARAÚJO, L. S. *Preparação e avaliação de hidrogéis nanocompósitos à base de alginato na remoção de Cu(II) e Zn(II) de soluções aquosas*. 2014. 136 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, RJ.

ARGIN-SOYSAL, S. et al. Effect of complexation conditions on xanthan-chitosan polyelectrolyte complex gels. *Food Hydrocolloids*, v. 23(1), p. 202-209, 2009.

ATKINS, P.; DE PAULA, J. Processos em superfícies sólidas. In: *Fundamentos de físico-química*. 7. ed., RJ, v. 3, Cap. 28, p. 164-168, 2004.

AZEVEDO, T. L. F. et al. Uso de hidrogel na agricultura. *Rev. Prog. Ciênc. Agro-Ambientais, Alta Floresta*, v.1 (1) p.23-31, 2002.

BABU, V. R. et al. Development of semi-interpenetrating carbohydrate polymeric hydrogels embedded silver nanoparticles and its facile studies on E. coli. *Carbohydr. Polym.*, v. 81 (2), p.196-202, 2010.

BAGUS, P. S.; HERMANN, K.; BAUSCHLICHER Jr., C. W. A new analysis of charge transfer and polarization for ligand-metal bonding: model studies of Al_4CO and Al_4NH_3 . *J. Chem. Phys.*, v. 80, n. 9, p. 4378-4386, 1984.

BAIRD, D. D. et al. Introduction of a new broad spectrum postemergent herbicide class with utility for herbaceous perennial weed control. *Proceedings North Central Weed Control Conference*, v. 26, p. 64-68, 1971.

BAIRD, C. *Química ambiental: produtos orgânicos*. 4. ed. Porto Alegre: Ed. Bookman, p. 121-273, 2002.

BAKAR, S. H. A.; ADAM, F. Determination of physical crosslink between carrageenan and glyoxilic acid using density functional theory calculations. *Malaysian J. Anal. Sci.*, v. 21, n. 4, p. 979-985, 2017.

BALAURE, P. C. et al. Fabrication, characterization and in vitro profile based interaction with eukaryotic and prokaryotic cells of alginate-chitosan-silica biocomposite. *Int. J. Pharm.*, v. 441, n. 1-2, p. 555-561, 2013.

BAPTISTA, L. et al. Theoretical investigation on the stability of negatively charged formic acid clusters. *J. Phys. Chem. A*, v. 114, n. 26, p. 6917-6926, 2010.

BAPTISTA, L. et al. Theoretical investigation on the stability of ionic formic acid clusters. *J. Phys. Chem. A*, v. 112, n. 51, p. 13382-13392, 2008.

BARJA, B. C. et al. An ATR-FTIR study of glyphosate and its Fe(III) complex in aqueous

solution. *Environ. Sci. Technol.*, v. 32, n. 21, p. 3331–3335, 1998.

BAYSAL, K. et al. Chitosan/alginate crosslinked hydrogels: Preparation, characterization and application for cell growth purposes. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 59, p. 342–348, 2013.

BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry. I. The effect of the exchange-only gradient correction. *J. Chem. Phys.*, v. 96, n. 3, p. 2155–2160, 1992.

BECKE, A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *J. Chem. Phys.*, v. 98, n. 7, p. 5648-5652, 1993.

BELLINI, M. Z. et al. Comparison of the properties of compacted and porous lamellar chitosan-xanthan membranes as dressings na scaffolds for the treatment of skin lesions. *J. Appl. Polym. Sci.*, v. 125(), p. E421-E431, 2012.

BELLINI, M. Z. et al. Combinig xantan and chitosan membranes to multipotent mesenchymal stromal cells as bioactive dressings for dermo-epidermal wounds. *J. Biomat. Appl.*, v. 29 (8), p. 1155-1166, 2015.

BENACHOUR, N. et al. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chem. Res. Toxicol.*, v. 22(1), p. 97-105, 2009.

BERGER, J. et al. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 57, p. 35–52, 2004.

BERGER, J. et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 57, p. 19-34, 2004.

BESLER, B. H. et al. Atomic charges derived from semiempirical methods. *J. Comput. Chem.*, v. 11, n. 4, p. 431–439, 1990.

BHATTACHARYYA, P. KR.; DEKA, B. C. Understanding chitosan as a gene carrier: A DFT study. *Comput. Theor. Chem.*, v. 1051, p. 35–41, 2015.

BHASKARA, B. L.; NAGARAJA, P. *Direct sensitive spectrophotometric determination of glyphosate by using ninhydrin as a chromogenic reagent in formulations and environmental water samples. Helvetica Chimica Acta*, v. 89(11), p. 2686-2693, 2006.

BIGUCCI, F. et al. Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: Selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin. *Eur. J. Pharmac. Sci.*, v. 35, p. 435-441, 2008.

BINKLEY, J. S. et al. Self-consistent molecular orbital methods. 21. Small split-valence basis sets for first-row elements. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 102, n. 3, p. 939–947, 1980.

BITTENCOURT, R. F. *Síntese e avaliação de hidrogéis à base de alginato e nanopartículas magnéticas preparadas in situ para remoção de Mn(II) e Ni(II) de efluente industrial*. 2015. 99f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, RJ. 2015.

BOLOGNESI, C. et al. Genotoxic activity of glyphosate and its technical formulation roundup. *J. Agric. Food Chem.*, v. 45 (5), p. 1957–1962, 1997.

BORGOGNA, M. et al. Marine polysaccharides in microencapsulation and application to aquaculture: from sea to sea. *Mar. Drugs*, v. 9, p. 2572-2604, 2011.

BORTOLIN, A. et al. Investigação do processo de absorção de água de hidrogéis de polissacarídeo: efeito da carga iônica, presença de sais, concentrações de monômero e polissacarídeo. *Polímeros*, v. 22 (4), p. 311-317, 2012.

BOYS, S. F.; BERNARDI, F. The calculation of small molecular interactions by the differences of separate total energies. Some procedures with reduced errors. *Mol. Phys.*, v. 19, n. 4, p. 553–566, 1970.

BRANCCINI, I. et al. Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: a molecular modelling investigation. *Carbohydr. Res.*, v. 317, p. 119 – 130, 1999.

BRANCCINI, I.; PÉREZ, S. Molecular basis of Ca^{2+} -induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. *Biomacromolecules*, v. 2, p. 1089–1096, 2001.

BUENGER, D.; TOPUZ, F.; JUERGEN, G. Hydrogels in sensing applications. *Prog. Polym. Sci.*, v.37, p. 1678-1719, 2012.

BUWALDA, S. J. et al. Hydrogel in a history perspective: From simple networks to smart materials. *J. Controlled Release*, v. 190, p. 254-273, 2014.

CALLISTER, W. D. *Materials Science and Engineering: an introduction*, New York, Wiley, Fifty ed., 1999.

CAMPOS, E. V. R. et al. Polymeric and solid lipid nanoparticles for sustained release of carbendazim and tebuconazole in agricultural applications. *Sci. Rep.*, v.5, p. 1-14 ,2015.

CAMPESE, M. G. et al. Resistência mecânica de hidrogéis termo-sensíveis constituídos de Alginato- Ca^{2+} / PNIPAAm, tipo Semi-IPN. *Quim. Nova*, v. 30, p. 1649-1652, 2007.

CARNEIRO, R. T. A. et al. Removal of glyphosate herbicide from water using biopolymer membranes. *J. Environ. Manage.*, v. 151, p. 353–360, 2015.

CATTANI, D. et al. Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosatebased herbicide in immature rat hippocampus: involvement of glutamate excitotoxicity. *Toxicology*, v. 320, p.34-45, 2014.

CHA, R. et al. Preparation and characterization of thermal/pH sensitive hydrogel from carboxylated nanocrystalline cellulose. *Carbohydr. Polym.*, v. 88 (2), p. 713 – 718, 2012.

CHANDRASEKARAN, K. et al. Structural, spectral, thermodynamical, NLO, HOMO, LUMO and NBO analysis of fluconazole. *Spectrochim. Acta: Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, v. 150, p. 974–991, 2015.

CHEN, W., & GORDON, M. S. The effective fragment model for solvation: internal rotation in formamide. *The Journal of Chemical Physics*, v.105, p. 11081–11090, 1996.

CHOCHOLOUŠOVÁ, J. et al. First local minimum of the formic acid dimer exhibits simultaneously red-shifted O-H...O and improper blue-shifted C-H...O hydrogen bonds. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, v. 6, p. 37–41, 2004.

COELHO, L. W. et al. Aplicação de mecânica molecular em química inorgânica. *Química Nova*, v. 22(3), p. 396-404, 1999.

COIMBRA, P. M. A. *Preparação e caracterização de sistemas de libertação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural*. 2010. 268 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Portugal.

COIMBRA, P. et al. Preparation and chemical and biological characterization of pectin/chitosan polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 48, p. 112-118, 2011.

COLLINS, J. B. et al. Self-consistent molecular orbital methods. XVII. Geometries and binding energies of second-row molecules. A comparison of three basis sets. *J. Chem. Phys.*, v. 64, p. 5142, 1976.

COSTA, M. P. M. et al. New polyelectrolyte complex from pectin/chitosan and montmorillonite clay. *Carbohydr. Polym.*, v. 146, p. 123-130, 2016.

COUTINHO, K., & CANUTO, S. Solvent Effects from a Sequential Monte Carlo - Quantum Mechanical Approach. *Adv. Quantum Chem.*, v. 28, p. 89–105, 1997.

COUTINHO, K. et al. Monte Carlo-quantum mechanics study of the solvatochromic shifts of the lowest transition of benzene. *J. Chem. Phys.*, v.112, p. 9874–9880, 2000.

CUNHA, F. O. V. *Desenvolvimento de redes de polímeros interpenetrantes (IPN) para aplicação como eletrólito polimérico*. 2005. 223 f. Tese (Doutorado em Engenharia/PPGEM), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, R.S.

CUNHA, P. L. R. et al. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. *Quim. Nova*, v. 32 (3), p. 649-660, 2009.

DAKARA, S. L.; ANAJWALA, C. C. Polyelectrolyte complex: a pharmaceutical review. *Syst. Rev. Pharm.*, v. 1(2), p. 121-127, 2010.

DAI, R. et al. Hydrogel beads based on oxidized corn starch cross-linked with gelatin for tartrazine adsorption from aqueous environments. *Polym. J.*, v. 49, p. 549-555, 2017.

DASH, M. et al. Chitosa: a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.*, v 36 (8), p. 981-1014, 2011.

DAY, P. N. et al. An effective fragment method for modeling solvent effects in quantum mechanical calculations. *J. Chem. Phys.*, v. 105, p. 1968–1986, 1996.

DE BRITO RODRIGUES, L. et al. Ecotoxicological assessment of glyphosate-based herbicides:

Effects on different organisms. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 36(7), p. 1755-1763, 2017.

DESIRAJU, G. R. Hydrogen bridges in crystal engineering: interactions without borders. *Acc. Chem. Res.*, v. 35, p. 565–573, 2002.

DILL, G. M. et al. Glyphosate: discovery, development, applications, and properties. Chapter 1. In: NANDULA, V. K. *Glyphosate resistance in crops and weeds: history, development, and management*. New Jersey: Wiley, p. 1-33, 2010.

DITCHFIELD, R. et al. Self-consistent molecular-orbital methods. IX. An extended Gaussian-type basis for molecular-orbital studies of organic molecules. *J. Chem. Phys.*, v. 54, n. 2, p. 724–728, 1971.

DOMARD, A. et al. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*, v. 22 (3), p. 261-268, 2001.

DOMINGUÉZ, A. et al. Toxicity of AMPA to the earthworm *Eisenia andrei* Bouché, 1972 in tropical artificial soil. *Sci. Report.*, v. 6, p. 4691-4703, 2016.

DRAGAN, E. S. Design and applications of interpenetrating polymer network hydrogels. A review. *Chem. Eng. J.*, v. 243, p. 572–590, 2014.

DRURY, J. L.; MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, v. 24 (24), p. 4337-4351, 2003.

DUIJNEVELDT, F. B. et al. State of the art in counterpoise theory. *Chem. Rev.*, v. 94, p. 1873–1885, 1994.

DUTTA, J. Synthesis and characterization of γ -irradiated PVC/PEG/CaCl₂ hydrogel for wound dressing. *Am. J. Chem.*, v. 2(2), p. 6-11, 2012.

ELSABEE, M. Z. et al. Surface active properties of chitosan and its derivatives. *Colloids and Surf. B: Biointerfaces*, v. 74, p. 1–16, 2009.

EMMANUEL, M. et al. Theoretical study of the interaction between chitosan constituents (glucosamine and acetylglucosamine dimers) and Na⁺ ions. *Open Access Libr. J.*, v. 2, p. 1–14, 2015.

EZEONU C. S. et al. Biotechnological tools for environmental sustainability: prospects and challenges for environments in nigeria: a standard review. *Biotechnol. Res. Int.*, v. 2012, p. 1-26, 2012.

FAJARDO, A. R. et al. Polyelectrolyte complexes based on pectin-NH₂ and chondroitin sulfate. *Carbohydr. Polym.*, v. 87, n. 3, p. 1950–1955, 2012.

FARIA, R. R. et al. Computational study of polymorphic structures of α - and β -chitin and chitosan in aqueous solution. *J. Mol. Graph. Model.*, v. 63, p. 78-84, 2016.

FERNANDES, E. R. P. *Hidrogel e turno de rega no crescimento inicial de eucalipto*. 2010. 49 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, M. et al. Prevention of chloridazon and metribuzin pollution using lignin-based formulations. *Environ. Pollut.*, v. 158, p. 1412-1419, 2010.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, M. et al. Ethylcellulose and lignin as bearer polymers in controlled release formulations of chloridazon. *Carbohydr. Polym.*, v. 83, p. 1672–1679, 2011.

FOLCHMAN-WAGNER, Z.; ZARO, J.; SHEN, W. C. Characterization of polyelectrolyte complex formation between anionic and cationic poly(amino acids) and their potential applications in pH-dependent drug delivery. *Molecules*, v. 22(7), p. 1089-1103, 2017.

FOSTER, J. P.; WEINHOLD, F. Natural hybrid orbitals. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 102, n. 24, p. 7211–7218, 1980.

FRANZ, D. R. et al. Clinical recognition and management of patients exposed to biological warfare agents. *J. Am. Med. Assoc.*, v. 278(5), 399-411, 1997.

FRENCH, A. D. et al. Conformational analysis of cellobiose by electronic structure theories. *Carbohydr. Res.*, v. 350, p. 68-76, 2012.

FRENCH, A. D. Energy maps for glycosidic linkage conformations. in methods in molecular biology. *Clifton, N.J.*, v. 1273, p. 333–358 New York: Humana Press, 2015.

FRISCH, M. J. et al. *Gaussian 03*, Revision E.01. Pittsburgh: Gaussian, Inc, 2003.

FROIX, M. F. e NELSON, R. The interaction of water with cellulose from nuclear magnetic resonance relaxation times. *Macromolecules*, v. 8 (6), p. 726–730, 1975

FU, J.; SCHLENOFF, J. B. Driving forces for oppositely charged polyion association in aqueous solutions: enthalpic, entropic, but not electrostatic. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 138, n. 3, p. 980–990, 2016.

GANJI, F. et al. Theoretical description of hydrogel swelling: a review. *Iran. Polym. J.*, v. 19(5), p. 375-398, 2010.

GAO, X. et al. Reaction mechanism of chitosan/acrylamides dimer: A DFT study. *J. Phys. Org. Chem.*, p. e3775, 2017.

GIESY, J. P. et al. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, v. 167, p. 35-120, 2000.

GLENDENING, E. D.; STREITWIESER, A. Natural energy decomposition analysis: An energy partitioning procedure for molecular interactions with application to weak hydrogen bonding, strong ionic, and moderate donor–acceptor interactions. *J. Chem. Phys.*, v. 100, n. 4, p. 2900–2909, 1994.

GOMES, M. P. et al. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. *Journal of Experimental Botany*, v. 65, p. 4691–4703, 2014.

GONÇALVES et al. Diferentes estratégias para reticulação de quitosana. *Química Nova*, v.34, p. 1215-1223, 2011.

GRILLO, R. et al. Characterization of atrazine-loaded biodegradable poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) microspheres. *J Polym Environ.*, v. 18 (1), p. 26-32, 2010.

GRILLO, R. et al. Controlled release system for ametryn using polymer microspheres: preparation, characterization and release kinetics in water. *J Hazard Mater.*, v. 186(2-3), p.1645-1651, 2011.

GUILHERME, M. R. et al. Superabsorbent hydrogels based on polysaccharides for application in agriculture as soil conditioner and nutrient carrier: a review. *Eur. Polym. J.*, v. (72), p. 365-385, 2015.

GUPTA, P. et al. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discovery Today*, v. 7 (10), p. 569-579, 2002.

GUO, M. et al. Preparation and properties of a slow-release membrane-encapsulated urea fertilizer with superabsorbent and moisture preservation. *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 44 (12), p. 4206–4211, 2005.

HAALAND, A. *Molecules & models: the molecular structures of main group element compounds*. 1. ed. New York: Oxford University Press, 2008.

HAMMAN, J. H. Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. *Mar. Drugs*, v. 8, p. 1305-1322, 2010.

HAMMAMI, F.;GHALLA, H.; NASR, S. Intermolecular hydrogen bonds in urea–water complexes: DFT, NBO, and AIM analysis. *Comput. Theor. Chem.*, v. 1070 , p. 40–47, 2015.

HARTIG, S. M. et al. Multifunctional nanoparticulate polyelectrolyte complexes. *Pharm. Res.*, v. 24, n. 12, p. 2353–2369, 2007.

HECHT, H., SREBNIK, S. Structural characterization of sodium alginate and calcium alginate. *Biomacromolecules*, v. 17 (6), p. 2160-2167, 2016.

HEHRE, W. J. et al. Self-consistent molecular-orbital methods. i. use of gaussian expansions of Slater-type atomic orbitals. *J. Chem. Phys.*, v.51, p. 2657–2664, 1969.

HIRAO, H. Reactive bond orbitals: A localized resonance-structure approach to charge transfer. *Chem. Phys. Lett.*, v. 443, n. 1–3, p. 141–146, 2007.

HO, Y. S. et al. Sorption of dye from aqueous solution by peat. *Chem. Eng. J.*, v.70, p. 115-124, 1998.

HOARE, T. R. et al. Hydrogels in drug delivery: progress and challenges. *Polym.*, v. 49, (8), p. 1993-2007, 2008.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 54(1), p. 3-12, 2002.

HONARY, S. et al. The effect of chitosan molecular weight on the properties of alginate/chitosan microparticles containing prednisolone. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v.8, p. 53–61, 2009.

HONEY, P. J. et al. Smart polymers for the controlled delivery of drugs: a concise overview. *Acta Pharm Sin B*, v. 4(2), p. 120-127, 2014.

HOPFFGARTEN, M. VON; FRENKING, G. Energy decomposition analysis. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.*, v. 2, n. 1, p. 43–62, 2012.

HORN, P. R. et al. Defining the contributions of permanent electrostatics, Pauli repulsion, and dispersion in density functional theory calculations of intermolecular interaction energies. *The J. Chem. Phys.*, v. 144, p.114107, 2016.

HUNT, P. A. et al. Hydrogen bonding in ionic liquids. *Chem. Soc. Rev.*, v. 44, n. 5, p. 1257–1288, 2015.

HUTMACHER, D. W. Scaffold design and fabrication on technologies for engineering tissues-state of the art and future perspectives. *J Biomater Sci Polym Ed.*, v. 12(1), p.107-24, 2001.

IBAMA. *Boletim de comercialização de agrotóxicos e afins: histórico de vendas 2000 a 2012*. 42 p. 2013. Disponível em: <http://www.icict.fiocruz.br/sites/www.icict.fiocruz.br/files/IBAMA_boletim%20de%20comercializacao_2000_2012.pdf> Acesso em: 8 jul 15.

ISIKLAN, N. Controlled release study of carbaryl insecticide from calcium alginate and nickel alginate hydrogel beads. *J. Appl. Polym. Sci.*, v. 105, p. 718 – 725, 2007.

JELINSKI, L. W.; MELCHIOR, M. T. High resolution NMR of solids. *Appl. Spectrosc. Rev.*, v. 35, p. 23-93, 2000.

JIANG, Y. Y. et al. Preparation and enhanced mechanical properties of hybrid hydrogels comprising ultralong hydroxyapatite nanowires and sodium alginate. *J Colloid Interface Sci.*, v. 497, p. 266-275, 2017.

JONES, R. O. Density functional theory: its origins, rise to prominence, and future. *Rev. Mod. Phys.*, v. 87, n. 3, 2015.

KANG, B. et al. Dynamical modeling and experimental evidence on the swelling/deswelling behaviors of pH sensitive hydrogels. *Mater. Lett.*, v.62 (19), p. 3444-3446, 2008.

KARAVAS, E. et al. Application of density functional theory in combination with FTIR and DSC to characterize polymer drug interactions for the preparation of sustained release formulations between fluvastatin and carrageenans. *Int. J. Pharm.*, v. 466 (1-2), p. 211-222, 2014.

KARAVAS, E. et al. Investigation of the release mechanism of a sparingly water-soluble drug from solid dispersions in hydrophilic carriers based on physical state of drug, particle size distribution and drug-polymer interactions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 66(3), p. 334–347, 2007.

KASSAI, M. R. Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants

for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydr. Polym.*, v. 68 (3), p. 477–488, 2007.

KATTI, K. S. Biomaterials in total joint replacement. *Colloids Surf., B Biointerfaces*, v. 39 (3), p. 133-142, 2004.

KHALIULLIN, R. Z. et al. Unravelling the origin of intermolecular interactions using absolutely localized molecular orbitals. *J. Phys. Chem. A*, v.111 (36), p. 8753–8765, 2007.

KITAURA, K.; MOROKUMA, K. A new energy decomposition scheme for molecular interactions within the Hartree-Fock approximation. *Int. J. Quantum Chem.*, v. 10, n. 2, p. 325–340, 1976.

KOCH, W.; HOLTHAUSEN, M. C. *A chemist's guide to density functional theory*. 2. ed. Weinheim: Wiley-Vch, 2002.

Koetting, M. C., et al. Stimulus-responsive hydrogels: theory, modern advances, and applications. *Mater. Sci. Eng. R*, v. 93, p. 1-49, 2015.

KOPEČEK, J. Hydrogels from soft contact lenses and implants to self-assembled nanomaterials. *J Polym Sci A Polym Chem.*, v. 47(22), p. 5929–5946, 2009.

KRISHNAN, R. et al. Self-consistent molecular orbital methods. XX. A basis set for correlated wave functions. *J. Chem. Phys.*, v. 72, n. 1, p. 650–654, 1980.

KUBOTA, N. et al. A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. *Carbohydr. Res.*, v. 324 (4), p. 268-274, 2000.

KULIG, D. et al. Study on alginate–chitosan complex formed with different polymers ratio. *Polymers*, v.8 (5), p. 167-174, 2016.

KULKARNI, A. D. et al. Polyelectrolyte complexes: mechanisms, critical experimental aspects, and applications. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, v. 44(7), p. 1615–1625, 2016.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. *React. Funct. Polym.* v. 46 (1), p. 1-27, 2000.

KUMIRSKA, J. et al. Biomedical activity of chitin/chitosan based materials: influence of physicochemical properties apart from molecular weight and degree of n-acetylation. *Polymers*, v. 3, p. 1875–1901, 2011.

KUNDU, S. *Silk biomaterials for the tissue engineering and regenerative medicine*. Chapter 2: applications of silk biomaterials in tissue engineering and regenerative medicine. 1. ed. Cambridge, Woodhead Publishing, 2014.

LACERDA, C. et al. Hidrólise seletiva de carboxiamidas de resíduos de aspargina e glutamina em colágeno: preparação e caracterização de matrizes aniônicas para uso de biomateriais. *Quim. Nova*, v. 21 (3), p. 267-271, 1998.

LAGERGREN, S. *Theory of so-called adsorption of dissolved substances*. Handlingar, v. 24 (4), p. 1-39, 1998.

LANKALAPALLI, S.; KOLAPALLI, V. R. M. Polyelectrolyte complexes: a review of their applicability in drug delivery technology. *Indian J. Pharm. Sci.*, v. 71, n. 5, p. 481–487, 2009.

LARGITTE, T.; PASQUIER, R. A review of the kinetics adsorption models and their application to the adsorption of lead by an activated carbon. *Chem. Eng. Res. Des.*, v. 109, p. 495-504, 2016.

LAURIENZO, P. et al. The use of natural polysaccharides as biomaterials. *Biomed. Res. Int.*, v. 2015, p. 1-2, 2015.

LAWRIE, G. et al. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*, v. 8, n. 8, p. 2533–2541, 2007.

LEACH, A. R. *Molecular modelling: principles and applications*. 2. ed. Essex: Prentice Hall, 2001.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering. *Chem. Rev.*, v. 101 (7), p. 1869-1879, 2001.

LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.*, v. 37(1), p. 106-126, 2012.

LEE, Y-H. et al. Layered hydrogel of poly(γ -glutamic acid), sodium alginate, and chitosan: Fluorescence observation of structure and cytocompatibility. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, v. 86, p. 409-413, 2011.

LENARDÃO, E. J. et al. Green Chemistry: os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. *Quim. Nova*, V. 26(1), p. 123-129, 2003.

LI, G. et al. Dually pH-responsive polyelectrolyte complex hydrogel composed of polyacrylic acid and poly (2-(dimethylamino) ethyl methacrylate). *Polym. (United Kingdom)*, v. 107, p. 332–340, 2016.

LI, L. et. al. Density functional theory (DFT) and natural bond orbital (NBO) study of vibrational spectra and intramolecular hydrogen bond interaction of L-ornithine-L-aspartate. *Spectrochim. Acta A, Mol. Biomol. Spectrosc.*, v. 136, p. 338–346, 2015.

LI, Z. et al. Chitosan-alginate hidrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 26 (18), p. 3919-3928, 2005.

LIN, N.; GARRY, V. F. In vitro studies of cellular and molecular developmental toxicity of adjuvants, herbicides, and fungicides commonly used in Red River Valley, Minnesota. *J Toxicol. Environ. Health A*, v. 60(6), p. 423-439, 2000.

LINHARES, L. A. et al. Aplicação dos modelos de Langmuir e Freundlich na adsorção de cádmio e chumbo em diferentes classes de solos brasileiros. *Revista Tecnológica*, v. 17, p. 49-60, 2008.

LIU, C-M. et al. Degradation of the herbicide glyphosate by members of family Rhizobiaceae. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 57(6), p. 1799–1804, 1991.

LOBO, F. et al. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) microspheres loaded with atrazine

herbicide: screening of conditions for preparation, physico-chemical characterization, and in vitro release studies. *Polym. Bull.*, v. 67, p. 479–495, 2011.

LONGHINOTTI, E. et al. Adsorption of anionic dyes on the biopolymer chitin. *J. Bras. Chem. Soc.*, v. 9 (5), p. 435-440, 1998.

LYRA, M. A. M. et al. Sistemas matriciais hidrofílicos e mucoadesivos para liberação controlada de fármacos. *Lat. Am. J. Pharm.*, v. 26(5), p. 784-793, 2007.

MAMY, L.; BARRIUSO, E. Glyphosate adsorption in soils compared to herbicides replaced with the introduction of glyphosate resistant crops. *Chemosphere*, v. 61, p. 844–855, 2005.

MARRELLA, A. et al. Enhanced mechanical performances and bioactivity of cell laden-graphene oxide/alginate hydrogels open new scenario for articular tissue engineering applications. *Carbon*, v. 115, p.608-616, 2017.

MARTINSEN, A. et al. Comparison of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distribution of alginates. *Carbohydr. Polym.*, v. 15, p. 171-193, 1991.

MARUYAMA, C. R. et al. Nanoparticles Based on Chitosan as Carriers for the Combined Herbicides Imazapic and Imazapyr. *Sci. Rep.*, v. 6, p. 19768, 2016.

MAZEAU, K.; HEUX, L. Molecular dynamics simulations of bulk native crystalline and amorphous structures of cellulose. *J. Phys. Chem. B*, v. 107, p. 2394-2403, 2003.

MENG, X. et al. Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application. *J. Mater. sci. Mater. Med.*, v. 21 (5), p. 1751 - 1759, 2010.

MI, F.-L. et al. Chitin/PLGA blend microspheres as a biodegradable drug delivery system: a new delivery system for protein. *Biomaterials*, v. 24, p. 5023-5036, 2003.

MIRTCHI, A. et al. Calcium phosphate cements: Study of the β -tricalcium phosphate-dicalcium phosphate-calcite cements. *Biomaterials*, v. 11(2), p. 83–88, 1989.

MISHIMA, Y. et al. Crystal structure of AlgQ2, a macromolecule (Alginate)-binding protein of *Sphingomonas* sp. A1, complexed with an alginate Tetrasaccharide at 1.6-Å Resolution*. *J. Biol. Chem.*, v.278, p. 6552–6559, 2003.

MISQUITTA, A. J. et al. Intermolecular potentials based on symmetry-adapted perturbation theory with dispersion energies from time-dependent density-functional calculations. *J. Chem. Phys.*, v. 123(21), p. 214103, 2005.

MIURA, N. et al. A theoretical study of α - and β -D-glucopyranose conformations by the density functional theory. *Chem. Phys. Lett.*, v. 419(4-6), p. 326-332, 2006.

MO, Y.; GAO, J.; PEYERIMHOFF, S. D. Energy decomposition analysis of intermolecular interactions using a block-localized wave function approach. *J. Chem. Phys.*, v. 112, p. 5530, 2000.

MOGOSANU, G. D.; GRUMEZESCU, A. M. Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *Int. J. Pharm.*, v. 463 (2), p. 127-136, 2014.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. *Polymer-based nanocapsules for drug delivery*. *Int. J. Pharm.*, v. 385, p. 113–142, 2010.

MOREIRA, K. D. *Efeito do polímero hidratassolo sobre propriedades físico-químicas em solução nutritiva no desenvolvimento da cebolinha (Allium fistulosum L.)*. 2011. Monografia (Curso de Química) - Centro de Estudos Superiores de Caxias, Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, CESC .

MORGON, N. H.; COUTINHO, K. *Métodos de química teórica e modelagem molecular*. 1.ed. São Paulo: Livraria da Física, 2007.

MORILLO, E. et al. Adsorption of glyphosate on the clay mineral montmorillonite: effect of cu(ii) in solution and adsorbed on the mineral. *Environ. Sci. Technol.*, v. 31 (12), p. 3588–3592, 1997.

MOURA M. R. et al. Hidrogéis semi-IPN baseados em rede de alginato- Ca_2^+ com PNIPAAm entrelaçado: Propriedades hidrofílicas, morfológicas e mecânicas. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 18 (2), p. 132-137, 2008.

MÜLLER, J. M. et al. Produção de alginato por microorganismos. *Polímeros*, v.21(4), p.305-310, 2011.

MULLIKEN, R. S. *Electronic Population Analysis on LCAO-MO Molecular Wave Functions*. I. *J. Chem. Phys.*, v. 23(12), p. 1833–1840, 1955.

MURGUÍA-FLORES, D. A. et al. Protein adsorption through Chitosan: alginate membranes for potential applications. *Chem. Cent. J.*, v. 10(1), p. 26, 2016.

NAKAMURA, K.; HATAKEYAMA, T.; HATAKEYAMA, H. *Thermal properties of solvolysis lignin-derived polyurethanes*. *Polymer Adv. Techc.* Vol.3, p.151-155, 1992.

NG, C. et al. *Freundlich adsorption isotherms of agricultural by-product-based powdered activated carbons in a geosmin-water system*. *Bioresour. Technol.*, v. 85 (2), p. 131-135, 2002.

NIINOMI, M.; NAKAI, M.; HIEDA, J. Review: development of new metallic alloys for biomedical applications. *Acta Biomat.*, v. 8, p. 3888-3903, 2012.

NOGUEIRA, G. M. et al. Preparation and characterization of ethanol-treated silk fibroin dense membranes for biomaterials application using waste silk fibers as raw material. *Bioresour. Technol.*, v. 101, p. 8446-8451, 2010.

NUNES, S.C. C.; SKEPÖ, M.; PAIS, A. A. C. C. Confined polyelectrolytes: the complexity of a simple system. *J. Comput. Chem.*, v. 35, p. 1579–1586, 2015.

OGAWA, K.; YUI, T.; MIYA, M. Dependence on the preparation procedure of the polymorphism and crystallinity of chitosan membranes. *Biosci. Biotech. Biochem.*, v.56 (6), p. 858-862, 1992.

OGAWA, K.; OKA, M.; YUI, T. X-Ray study of chitosan transition-metal complexes. *Chem.*

Mat., v.5, p. 726-728, 1993.

OLIVEIRA, A. F. et al. Propriedades, caracterização e propriedades de filmes poliméricos com potencial aplicação no recobrimento de sementes. *Quím. Nova*, v. 32(7), p. 1845-1849, 2009.

ONOKA, I.; POGREBNOI, A.; POGREBNAYA, T. Geometrical Structure, Vibrational Spectra and Thermodynamic Properties of Chitosan Constituents by DFT Method. *Int. J. Mater. Sci. Appl.*, v. 3, n. 4, p. 121–128, 2014.

OSTROWSKA-CZUBENKO, J., GIERSZEWSKA-DRUZYNSKA, M. Effect of ionic crosslinking on the water state in hydrogel chitosan membranes. *Carbohydr. Polym.*, v. 77, p. 590-598, 2009.

PAGANELLI A. et al. Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chem Res Toxicol.*, v. 23(10), p. 1586-1595, 2010.

PAPADOPOULOS, A. G.; SIGALAS, M. P. Theoretical study of hydrogen bond interactions of fluvastatin with t- carrageenan and l-carrageenan. *J. Mol. Model.*, v. 7, p. 1669–1678, 2010.

PATEL, A.; MEQUANINT, K. Hydrogel biomaterials. In: *Biomedical Engineering: frontiers and Challenges*. Cap. 14, p. 275-296, 2011

PATWEKAR, S. L. et al. Review on polyelectrolyte complex as novel approach for drug delivery system. *Int. J. Pharm. Pharm. Res.*, v. 5(4), p. 97–109, 2016.

PEIXOTO, M. M. et al. Study of the stepwise deprotonation reactions of glyphosate and the corresponding pKa values in aqueous solution. *J. Phys. Chem. A*, v. 119(21), p. 5241–5249, 2015.

PEREIRA, A. E. S et al. Chitosan nanoparticles as carrier systems for the plant growth hormone gibberellic acid. *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 150, p. 141-152. , 2017.

PIGNATELLO, J. J. et al. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environ. Sci. Technol.*, v. 30(1), p. 1-11, 1995.

PLAZINSKI, W. Molecular basis of calcium binding by polyguluronate chains. Revising the egg-box model. *J. Comput. Chem.*, v. 32(14), p. 2988–2995, 2011.

PLAZINSKI, W. Conformational properties of acidic oligo- and disaccharides and their ability to bind calcium: a molecular modeling study. *Carbohydr. Res.*, v. 357, p. 111–117, 2012.

PLAZINSKI, W.; DRACH, M. Calcium- α -L-Guluronate Complexes: Ca²⁺ Binding Modes from DFT-MD Simulations. *J. Phys. Chem. B*, v. 117, p. 12105–12112, 2013.

PRATES, L. M. *Estudo computacional da adsorção da molécula de óxido nítrico em aglomerados de paládio suportados em um modelo de γ -alumina*. 2017. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, RJ.

RABEA, E. I. et al. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action: reviews. *Biomacromolecules*, v. 4(6), p. 1457-1465, 2003.

- RAMSTEDT, M. et al. Chemical speciation of N-(phosphonomethyl)glycine in solution and at mineral interfaces. *Surf. Interface Anal.*, v. 36, p. 1074–1077, 2004.
- RASHIDOVA, S. S. et al. Characteristics of interactions in the pectin-chitosan system. *Chromatogr.*, v. 59, p. 779–782, 2004.
- RASSU, G. et al. Composite chitosan/alginate hydrogel for controlled release of deferoxamine: A system to potentially treat iron dysregulation diseases. *Carbohydr. Polym.*, v. 136, p. 1338–1347, 2016.
- RAUPACH, M.; TONNER, R. A periodic energy decomposition analysis method for the investigation of chemical bonding in extended systems. *J. Chem. Phys.*, v. 142, p. 194105-1, 2015.
- RE, S.; MOROKUMA, K. Own N-layered integrated molecular orbital and molecular mechanics study of the reaction of OH⁻ with polychlorinated hydrocarbons CH_(4-n)Cl_n (n=2-4). *Theor. Chem. Acc.: Theory, Computation, and Modeling (Theoretica Chimica Acta)*, v. 112, p. 59–67, 2004.
- REED, A. E.; CURTISS, L. A.; WEINHOLD, F. *Intermolecular interactions from a natural bond orbital, donor-acceptor viewpoint*. *Chem. Rev.*, v. 88 (6), p. 899–926, 1988.
- REED, A. E.; WEINHOLD, F. Natural localized molecular orbitals. *J. Chem. Phys.*, v. 83(4), p. 1736–1740, 1985.
- RODRIGUES, A. P. et al. The influence of preparation conditions on the characteristics of chitosan-alginate dressings for skin lesions. *J. Appl. Polym. Sci.*, v. 109 (4), p. 2703-2710, 2008.
- ROY, D. N. et al. Persistence, movement, and degradation of glyphosate in selected Canadian boreal forest soils. *J. Agric. Food Chem.*, v. 37 (2), p. 437–440, 1989.
- RUVINOV, E.; COHEN, S. Alginate biomaterials for the treatment of myocardial infarction: Progress, translational strategies, and clinical outlook: from ocean algae to patient bedside. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 96, p. 54-76, 2016.
- SALOMONSEN, T. et al. Direct quantification of M/G ratio from ¹³C CP-MAS NMR spectra of alginate powders by multivariate curve resolution. *Carbohydr. Res.*, v. 344, p. 2014-2022, 2009.
- SANTOS SILVA, M. et al. Efeito da associação do herbicida clomazone a nanoesferas de Alg/Qui na sorção em solos. *Quim. Nova*, v. 35 (1), p. 102-107, 2012.
- SANTOS SILVA, M. et al. *Nanopartículas de alginato como sistema de liberação para o herbicida clomazone*. *Quim. Nova*, v. 33 (9), p. 1868-1873, 2010.
- SARIKA, P. R.; PAVITHRAN, A.; JAMES, N. R. Cationized gelatin/gum arabic polyelectrolyte complex: study of electrostatic interactions. *Food Hydrocoll.*, v. 49, p. 176–182, 2015.
- SCHMIDT, M. W. et al. General atomic and molecular electronic structure system. *J. Comput. Chem.*, v. 14 (11), p. 1347–1363, nov. 1993.
- SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modelling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 48, p. 139-157, 2001.

SIKORSKI, P. et al. Evidence for egg-box-compatible interactions in calcium-alginate gels from fiber x-ray diffraction. *Biomacromolecules*, v. 8, n. 7, p. 2098–2103, 2007.

SILVA, C. L. *Análise da vulnerabilidade ambiental aos principais pesticidas recomendados para os sistemas de produção de algodão, arroz, café, cana-de açúcar, citros, milho e soja*. 2010. 135 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

SILVA, M. S. et al. Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: preparation, characterization and soil sorption studies. *J. Hazard. Mater.*, v. 190 (1–3), p. 366–374, 2011.

SILVA, M. S. et al. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. *Ciênc. saúde coletiva*, v.10(4), p. 891-903, 2005.

SILVA, M. S. et al. Nanopartículas de alginato como sistema de liberação para o herbicida clomazone. *Quim. Nova*, v. 23 (9), p. 1868-1873, 2010.

SINGH, U. C.; KOLLMAN, P. A. An approach to computing electrostatic charges for molecules. *J. Comput. Chem.*, v. 5 (2), p. 129–145, 1984.

SMITHA, B.; Sridhar, S.; KHAN, A. A. Chitosan-sodium alginate polyion complexes as fuel cell membranes. *Eur. Polym. J.*, v. 41(8), p. 1859–1866, 2005.

SOUSA, A. *Híbridos de gel polimérico em sílica mesoporosa estruturalmente ordenada para liberação controlada de fármacos*. 2009. 175 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, M.G.

STEVENS, W. J.; FINK, W. H. Frozen fragment reduced variational space analysis of hydrogen bonding interactions. Application to the water dimer. *Chem. Phys. Lett.*, v. 139 (1), p. 15–22, 14 ago. 1987.

SU, P.; LI, H. Energy decomposition analysis of covalent bonds and intermolecular interactions. *J. Chem. Phys.*, v. 131(1), p. 1–15, 2009.

SZABO, A.; OSTLUND, N. S. *Modern quantum chemistry: introduction to advances electronic structure theory*. Dover Publications, INC Mineola, New York, 1989.

TEIXEIRA, M. A. et al. *Assessment of chitosan gels for the controlled release of agrochemicals*. *Ind. Eng. Chem. Res.*, v. 29(7), p. 1205–1209, 1990.

TERREUX, R. et al. Interactions study between the copper II ion and constitutive elements of chitosan structure by DFT calculation. *Biomacromolecules*, v. 7(1), p. 31–37, 2006.

TIAN F., et al. Study of the depolymerization behavior of chitosan by hydrogen peroxide. *Carbohydr. Polym.*, v. 57 (10), p. 31 – 37, 2004.

TONI, L. R. M. et al. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. *Quim. Nova*, v. 29 (4), p. 829-833, 2006.

TSAI, W. T.; LAI, C. W.; HSIEN, K. J. Adsorption kinetics of herbicide para quat from aqueous solution onto activated bleaching earth. *Chemosphere*, v. 55(6), p. 829-837, 2004.

TSUI, M. T.; CHU, L. M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, v. 52(7), p. 1189-1197, 2003.

UNAGOLLA, J. M.; ADIKARY, S. U. Adsorption characteristics of cadmium and lead heavy metals into locally synthesized chitosan biopolymer. *Trop. Agric. Res.*, v. 26 (2), p. 395 – 401, 2015.

VEIGA, I. G.; MORAES, A. M. Study of the swelling and stability properties of chitosan-xantan membranes. *J. Appl. Polym. Sci.*, v. 124 (S1), p. E154-E160, 2012.

VENUGOPAL, V. *Marine polysaccharides. polysaccharides: their characteristics and marine sources.* 1st ed., Boca Raton, FL, Taylor & Francis Group, 2011.

VOLODKIN, D.; KLITZING, R. VON. Competing mechanisms in polyelectrolyte multilayer formation and swelling : polycation–polyanion pairing vs. polyelectrolyte–ion pairing. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, v. 19, p. 25–31, 2014.

VREVEN, T. et al. The ONIOM-PCM method: combining the hybrid molecular orbital method and the polarizable continuum model for solvation. Application to the geometry and properties of a merocyanine in solution. *J. Chem. Phys.*, v.115, p. 62–72, 2001.

XIAO, J.; LI, Y.; HUAN, Q. Application of Monte Carlo simulation in addressing key issues of complex coacervation formed by polyelectrolytes and oppositely charged colloids. *Adv. Colloid Interface Sci.*, v. 239, p. 31-45, 2017.

WADA, M. et al. X-ray crystallographic, scanning microprobe X-ray diffraction, and cross-polarized/magic angle spinning ¹³C NMR studies of the structure of cellulose III_{II}. *Biomacromolecules*, v. 10, p. 302–309, 2009.

WANG, G.; WANG, X.; HUANG, L. Feasibility of chitosan-alginate (Chi-Alg) hydrogel used as scaffold for neural tissue engineering: a pilot study in vitro. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, v. 31(4), p. 766–773, 2017.

WANG, H. et al. Molecular dynamics study of the structure of an oppositely charged polyelectrolyte and an ionic surfactant at the air/water interface. *Colloids and Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, v. 454, p. 104–112, 2014.

WEBSTER, T. M. U. et al. Effects of glyphosate and its formulation, roundup, on reproduction in zebrafish (danio rerio). *Environ. Sci. Technol.*, v.48 (2), p. 1271–1279, 2014.

WEINHOLD, F. Natural bond orbital analysis : a critical overview of relationships to alternative bonding perspectives. *J. Comput. Chem.*, v. 33(30), p. 2363–2379, 2012.

WINKLER, R. G.; STEINHAUSER, M. O.; REINEKER, P. Complex formation in systems of oppositely charged polyelectrolytes: a molecular dynamics simulation study. *Physical Review E*, v. 66, 021802, 2002.

YANG, L. et al. Effects of superabsorbent polymers on infiltration and evaporation of soil moisture under point source drip irrigation. *Irrig. and Drain.*, v. 64, p. 1-8 , 2015.

YANG, J. M. et al. Evaluation of chitosan/PVA blended hydrogel membranes. *J. Membr. Sci.*, v. 236 (1–2), p. 39-51, 2004.

YU, C-C. et al. Electrospun scaffolds composing of alginate, chitosan, collagen and hydroxyapatite for applying in bone tissue engineering. *Mater. Lett.*, v. 93, p.133-136, 2013.

ZHOU, C. et al. *Subacute toxicity of copper and glyphosate and their interaction to earthworm (Eisenia fetida)*. *Environ. Pollut.*, v. 180, p. 71-77, 2013.

ZHUANG, P.- Y. et al. Modification of chitosan membrane with poly (vinyl alcohol) and biocompatibility evaluation. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 50 (3), Issue 3, p. 658-663, 2012.

ZIEGLER, T.; RAUK, A. A theoretical study of the ethylene-metal bond in complexes between copper(1+), silver(1+), gold(1+), platinum(0) or platinum(2+) and ethylene, based on the Hartree-Fock-Slater transition-state method. *Inorg. Chem.*, v. 18 (6), p. 1558–1565, 1979.

ZIEGLER, T.; RAUK, A. Carbon monoxide, carbon monosulfide, molecular nitrogen, phosphorus trifluoride, and methyl isocyanide as σ donors and π acceptors. A theoretical study by the Hartree-Fock-Slater transition-state method. *Inorg. Chem.*, 18 (7), p. 1755–1759, 1979.

ANEXO – Produção científica

Parte desta Tese foi publicada nos seguintes periódicos científicos:

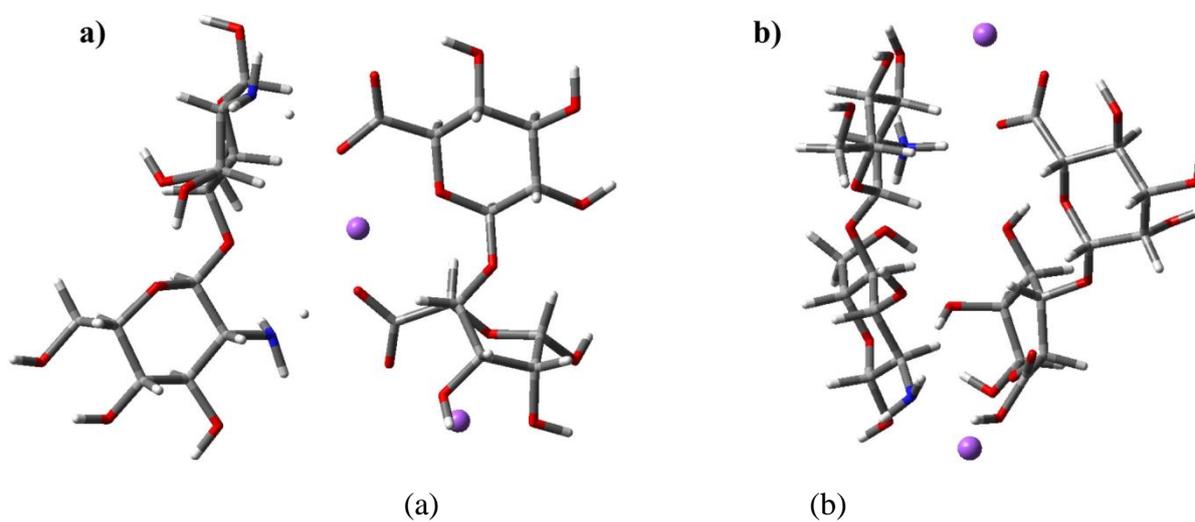
- Marcia M.P. Costa, Ivana L.M. Ferreira. “*Avaliação das propriedades de bio-hidrogéis à base de polissacarídeos e argila*”. Revista de Química Industrial, v. 747, p. 34-38(2015).
- Marcia Parente Melo da Costa, Marcia Cerqueira Delpech, Ivana Lourenço de Mello Ferreira, Maurício Tavares de Macedo Cruz, Jacira Aparecida Castanharo, Mariana Duarte Cruz. “*Evaluation of single-point equations to determine intrinsic viscosity of sodium alginate and chitosan with high deacetylation degree*”. Polymer Testing, v. 63, p. 427-433(2017).
- Marcia P. M. Costa, Letícia M. Prates, Leonardo Baptista, Mauricio T. M. Cruz, Ivana L. M. Ferreira. “*Interaction of polyelectrolyte complex between sodium alginate and chitosan dimers with a single glyphosate molecule: A DFT and NBO study*”. Carbohydrate Polymers, v. 198, p. 51-60 (2018).

Parte desta Tese foi apresentada nos seguintes eventos científicos:

- COSTA, M. P. M.; FERREIRA, I. L. M.; CRUZ, M. T. M.. Influência do pH e da temperatura sobre o grau de intumescimento e a morfologia de hidrogéis à base de alginato de sódio e quitosana. In: 14° Congresso Brasileiro de Polímeros, 2017, Águas de Lindóia. Anais do 14°CBPol, 2017.
- SILVA, G. M.; FERREIRA, I. L. M.; COSTA, M. P. M.; DELPECH, M. C.. Avaliação das propriedades viscosimétricas do polissacarídeo quitosana. In: 14° Congresso Brasileiro de Polímeros, 2017, Águas de Lindóia. Anais do 14°CBPol, 2017.

APÊNDICE– Material suplementar do estudo computacional

Figura 59– Estruturas de energia mais baixas do complexo ALG/QUI obtidas de aproximações iniciais



Legenda: (a) lado-a-lado e (b) face-a-face.
Fonte: O autor, 2018.

Tabela 15 – Distância de ligação (em angstrom) envolvendo alguns átomos do dímero de alginato MM, isolado e dentro dos complexos ALG/QUI, ALG/QUI.2H₂O e ALG/QUI/GLP

<i>ligação</i>	<i>isolado</i>	<i>ALG/QUI</i>	<i>ALG/QUI.2H₂O</i>	<i>ALG/QUI/GLP</i>
C(1)—O(22)	1,412	1,452	1,451	1,438
C(2)—O(22)	1,447	1,427	1,428	1,441
C(11)—O(21)	1,432	1,439	1,434	1,433
C(16)—O(21)	1,430	1,457	1,449	1,450
C(3)—O(7)	1,441	1,424	1,426	1,431
C(11)—O(7)	1,383	1,398	1,399	1,401
C(1)—O(8)	1,403	1,385	1,386	1,396
C(10)—O(33)	1,434	1,434	1,434	1,437
C(12)—O(30)	1,423	1,418	1,418	1,423
C(14)—O(35)	1,441	1,414	1,415	1,421
C(17)—O(37)	1,422	1,411	1,412	1,414
C(26)—O(28)	1,411	1,432	1,433	1,432
C(23)—O(24)	1,255	1,237	1,238	1,244
C(23)—O(25)	1,249	1,283	1,284	1,265
C(39)—O(40)	1,277	1,230	1,229	1,232
C(39)—O(41)	1,233	1,292	1,295	1,295
O(8)—H(9)	0,968	0,964	0,964	0,963
O(28)—H(29)	0,976	0,964	0,964	0,963
O(30)—H(31)	0,965	0,966	0,966	0,966
O(33)—H(34)	0,966	0,966	0,966	0,966
O(35)—H(36)	0,966	0,966	0,965	0,965
O(37)—H(38)	1,003	0,970	0,970	0,972
O(21)—H(29)	1,974	5,959	5,823	5,954
O(40)—H(38)	1,660	2,013	2,017	1,974

Fonte: O autor, 2018.

Tabela 16 – Distância de ligação (em angstrom) envolvendo alguns átomos do dímero de quitosana, isolado e dentro dos complexos ALG/QUI, ALG/QUI.2H₂O e ALG/QUI/GLP

<i>ligação</i>	<i>isolado</i>	<i>ALG/QUI</i>	<i>ALG/QUI.2H₂O</i>	<i>ALG/QUI/GLP</i>
C(42)—C(46)	1,533	1,541	1,538	1,534
C(43)—C(44)	1,540	1,537	1,538	1,547
C(44)—C(45)	1,540	1,530	1,534	1,533
C(45)—C(46)	1,525	1,530	1,528	1,526
C(53)—C(54)	1,530	1,531	1,533	1,534
C(54)—C(56)	1,518	1,522	1,523	1,525
C(56)—C(59)	1,528	1,532	1,531	1,529
C(58)—C(59)	1,544	1,545	1,545	1,543
C(46)—N(65)	1,515	1,505	1,505	1,504
C(54)—N(68)	1,518	1,499	1,500	1,496
C(42)—O(64)	1,417	1,412	1,411	1,408
C(43)—O(64)	1,436	1,431	1,434	1,447
C(44)—O(52)	1,424	1,452	1,455	1,440
C(53)—O(52)	1,400	1,393	1,390	1,391
C(53)—O(63)	1,415	1,419	1,420	1,415
C(58)—O(63)	1,458	1,449	1,448	1,434
C(75)—O(83)	1,442	1,419	1,419	1,424
C(78)—O(81)	1,421	1,424	1,424	1,431
N(65)—H(85)	1,025	1,074	1,083	1,092
N(68)—H(86)	1,045	1,072	1,072	1,055
O(71)—H(72)	0,968	0,967	0,967	0,965
O(73)—H(74)	0,974	0,968	0,968	0,972
O(81)—H(82)	0,963	0,963	0,963	0,962
O(83)—H(84)	0,964	0,963	0,963	0,963
O(87)—H(89)	0,967	0,967	0,967	0,966
O(88)—H(90)	0,970	0,970	0,970	0,968
O(63)—H(74)	1,998	2,230	2,143	3,936
O(81)—H(90)	1,990	1,990	1,988	1,988
O(83)—H(86)	1,832	5,225	5,383	5,939

Fonte: O autor, 2018.

Tabela 17 – Distância de ligação (em angstrom) envolvendo os átomos da molécula de glifosato, isolada e dentro do complexo ALG/QUI/GLP

<i>ligação</i>	<i>isolado</i>	<i>ALG/QUI/GLP</i>
C(92)—C(94)	1,569	1,548
C(94)—N(97)	1,497	1,504
C(99)—N(97)	1,516	1,523
C(92)—O(91)	1,239	1,226
C(92)—O(93)	1,253	1,280
C(99)—P(102)	1,895	1,873
N(97)—H(98)	1,018	1,021
N(97)—H(107)	1,055	1,036
O(105)—H(106)	0,978	0,986
P(102)—O(103)	1,526	1,502
P(102)—O(104)	1,495	1,510
P(102)—O(105)	1,636	1,653

Fonte: O autor, 2018.

Tabela 18 – Ângulos de ligação e ângulos diedros (ambos em grau) envolvendo alguns átomos do dímero de alginato MM, isolado e dentro dos complexos ALG/QUI, ALG/QUI.2H₂O e ALG/QUI/GLP

<i>ângulo</i>	<i>isolado</i>	<i>ALG/QUI</i>	<i>ALG/QUI.2H₂O</i>	<i>ALG/QUI/GLP</i>
C(2)—C(3)—C(26)	113,32	110,62	110,82	110,64
C(3)—C(26)—C(10)	111,43	111,86	112,02	111,15
C(12)—C(14)—C(17)	111,44	111,09	111,03	110,79
C(14)—C(17)—C(16)	109,97	108,95	108,84	108,18
C(3)—C(2)—O(22)	110,78	112,01	111,96	111,67
C(10)—C(1)—O(22)	108,20	107,56	107,43	108,12
C(12)—C(11)—O(21)	112,04	112,88	112,88	111,99
C(17)—C(16)—O(21)	108,47	111,16	111,60	110,31
C(1)—O(22)—C(2)	113,31	114,46	114,06	114,39
C(3)—O(7)—C(11)	116,99	122,69	121,38	121,83
C(11)—O(21)—C(16)	113,30	114,15	114,81	113,40
O(24)—C(23)—O(25)	129,86	125,19	125,00	126,78
O(40)—C(39)—O(41)	128,69	123,84	124,10	123,81
C(1)—C(10)—C(26)—C(3)	-50,54	-18,43	-18,44	-18,74
C(3)—C(2)—C(23)—C(24)	31,95	-112,08	-107,17	-116,87
C(11)—C(12)—C(14)—C(17)	-52,87	53,23	53,68	53,47
C(2)—C(3)—C(11)—O(21)	166,93	101,63	113,28	110,52
C(2)—C(3)—O(7)—C(11)	-133,05	50,11	63,19	55,46
C(1)—O(22)—C(2)—C(3)	59,33	-33,27	-35,03	-31,23
C(11)—O(21)—O(16)—C(17)	61,32	-56,51	-55,45	-59,96
O(21)—C(11)—C(3)—O(26)	20,15	-133,74	-117,70	-123,92
O(21)—C(16)—C(39)—O(41)	14,90	-33,92	-29,64	-32,82
O(22)—C(2)—C(23)—O(24)	-89,64	11,88	16,80	6,94
O(21)—C(11)—O(7)—C(3)	-80,49	62,83	62,80	67,65
H(5)—C(3)—C(11)—H(13)	19,57	-118,68	-107,50	-108,79

Fonte: O autor, 2018.

Tabela 19 – Ângulos de ligação e ângulos diedros (°) envolvendo alguns átomos do dímero de quitosana, isolado e dentro dos complexos ALG/QUI, ALG/QUI.2H₂O e ALG/QUI/GLP

<i>ângulo</i>	<i>isolado</i>	<i>ALG/QUI</i>	<i>ALG/QUI.2H₂O</i>	<i>ALG/QUI/GLP</i>
C(42)—C(46)—C(45)	112,53	113,29	112,81	112,21
C(43)—C(44)—C(45)	108,76	112,47	112,96	109,70
C(53)—C(54)—C(56)	112,05	109,15	109,12	108,12
C(56)—C(59)—C(58)	109,43	110,28	110,17	110,31
C(42)—O(64)—C(43)	112,55	112,30	112,42	112,64
C(44)—O(52)—C(53)	118,18	117,22	117,57	118,68
C(53)—O(63)—C(58)	116,78	113,50	113,58	112,86
C(75)—O(83)—H(84)	110,41	110,16	109,96	108,94
C(78)—O(81)—H(82)	110,69	110,59	110,62	109,89
C(46)—N(65)—H(85)	112,66	108,28	109,24	111,33
C(54)—N(68)—H(86)	113,65	112,02	112,48	112,42
C(42)—C(46)—C(45)—C(44)	-55,38	-39,18	-40,49	-48,29
C(53)—C(54)—C(56)—C(59)	-54,60	-57,35	-57,00	-56,26
C(43)—C(44)—C(53)—O(54)	-10,71	76,17	74,53	103,36
C(45)—C(44)—C(53)—O(63)	-11,35	51,69	48,96	85,88
C(43)—C(44)—O(52)—C(53)	-153,80	-118,09	-123,09	-92,82
C(42)—O(64)—C(43)—C(44)	67,08	68,45	66,76	67,91
C(53)—O(63)—C(58)—C(59)	56,64	61,36	62,06	62,21
O(63)—C(53)—O(52)—C(44)	-96,70	-63,60	-60,91	-53,90
H(48)—C(44)—C(53)—H(55)	-11,52	53,11	50,06	83,37

Fonte: O autor, 2018.

Tabela 20 – Energia absoluta (E_{abs} , em Hartree) da geometria das espécies, otimizadas isoladamente e dentro do complexo (dímeros de alginato e quitosana, glifosato (GLP) e moléculas de água), e dos complexos ALG/QUI, ALG/QUI.2H₂O e ALG/QUI/GLP, O termo E_{def} refere-se a energia de deformação (kcal mol⁻¹) das espécies após o processo de complexação

<i>Espécie</i>	<i>isolada</i>	<i>ALG/QUI</i>		<i>ALG/QUI.2H₂O</i>		<i>ALG/QUI/GLP</i>	
	E_{abs}	E_{abs}	E_{def}	E_{abs}	E_{def}	E_{abs}	E_{def}
Complex,		-3029,38583		-3182,34329		-3997,22487	
Alginato	-1445,33365	-1445,24700	+54,37	-1445,25352	+50,28	-1445,25978	+46,36
quitosana	-1259,26772	-1259,24369	+16,00	-1259,24422	+16,00	-1259,23412	+22,67
GLP	-891,11831					-891,11355	+6,63
H ₂ O _(a)	-76,45846			-76,46041	+1,22		
H ₂ O _(b)	-76,45846			-76,46029	+1,15	-76,46014	+1,05

Fonte: O autor, 2018.

Tabela 21 – Energia NBO (kcal mol⁻¹) envolvida nas ligações Na_(a)-O formadas nos complexos ALG/QUI, ALG/QUI.2H₂O e ALG/QUI/GLP

<i>Na_(a)-O</i>	<i>ALG/QUI</i>	<i>ALG/QUI.2H₂O</i>	<i>ALG/QUI/GLP</i>
O(21)	4,50	10,58	12,36
O(25)	4,20	8,58	6,13
O(41)	4,92	9,99	7,80
O(52)	5,27	9,55	4,31
O(H ₂ O _(a))		13,83	
O(H ₂ O _(b))		11,14	12,84
O(104)			11,73
O(105)			12,54

Fonte: O autor, 2018.

Tabela 22– Carga de NBO (em \bar{e}) em alguns átomos no dímero de alginato MM, isolado e dentro dos complexos ALG/QUI, ALG/QUI.2H₂O e ALG/QUI/GLP

<i>átomo</i>	<i>isolado</i>	<i>ALG/QUI</i>	<i>ALG/QUI.2H₂O</i>	<i>ALG/QUI /GLP</i>
O(40)	-0,818	-0,682	-0,677	-0,690
O(41)	-0,710	-0,888	-0,869	-0,855
O(21)	-0,631	-0,662	-0,635	-0,626
O(7)	-0,594	-0,592	-0,595	-0,605
O(24)	-0,790	-0,728	-0,731	-0,751
O(25)	-0,767	-0,854	-0,837	-0,788
O(22)	-0,624	-0,647	-0,648	-0,648
O(37)	-0,826	-0,748	-0,750	-0,759
O(30)	-0,740	-0,747	-0,746	-0,750
O(35)	-0,778	-0,742	-0,743	-0,752
O(28)	-0,767	-0,759	-0,759	-0,753
O(33)	-0,757	-0,772	-0,774	-0,773
O(8)	-0,742	-0,720	-0,722	-0,734
C(17)	+0,073	+0,081	+0,083	+0,088
C(12)	+0,084	+0,082	+0,083	+0,086
C(11)	+0,438	+0,448	+0,450	+0,430
C(3)	+0,065	+0,117	+0,101	+0,102
C(2)	+0,024	+0,019	+0,023	+0,003
C(10)	+0,076	+0,075	+0,075	+0,076
C(1)	+0,416	+0,390	+0,390	+0,386
C(26)	+0,090	+0,104	+0,106	+0,107
C(23)	+0,755	+0,811	+0,812	+0,798
C(16)	+0,012	+0,024	+0,026	+0,008
C(39)	+0,765	+0,793	+0,796	+0,809
C(14)	+0,092	+0,092	+0,093	+0,091

Fonte: O autor, 2018.

Tabela 23– Carga de NBO (em \bar{e}) em alguns átomos no dímero de quitosana, isolado e dentro dos complexos ALG/QUI, ALG/QUI.2H₂O e ALG/QUI/GLP

<i>átomo</i>	<i>isolado</i>	<i>ALG/QUI</i>	<i>ALG/QUI.2H₂O</i>	<i>ALG/QUI/GLP</i>
N(68)	-0,700	-0,711	-0,713	-0,751
N(65)	-0,679	-0,722	-0,724	-0,724
O(87)	-0,726	-0,712	-0,715	-0,724
O(64)	-0,598	-0,606	-0,608	-0,620
O(83)	-0,790	-0,746	-0,742	-0,741
O(73)	-0,766	-0,749	-0,751	-0,764
O(52)	-0,600	-0,614	-0,604	-0,596
O(63)	-0,635	-0,637	-0,638	-0,609
O(81)	-0,755	-0,759	-0,759	-0,762
O(88)	-0,745	-0,751	-0,752	-0,760
O(71)	-0,752	-0,757	-0,758	-0,750
H(86)	+0,470	+0,472	+0,471	+0,468
H(85)	+0,437	+0,470	+0,467	+0,466
C(42)	+0,426	+0,429	+0,430	+0,427
C(43)	+0,085	+0,089	+0,076	+0,065
C(44)	+0,095	+0,082	+0,083	+0,095
C(45)	+0,085	+0,097	+0,095	+0,097
C(46)	+0,065	-0,066	-0,065	-0,063
C(53)	+0,439	+0,440	+0,446	+0,449
C(54)	-0,061	-0,064	-0,066	-0,059
C(56)	+0,097	+0,101	+0,101	+0,101
C(58)	+0,092	+0,090	+0,090	+0,085
C(59)	+0,081	+0,085	+0,085	+0,086
C(75)	-0,041	-0,039	-0,037	-0,052
C(78)	-0,033	-0,033	-0,033	-0,030

Fonte: O autor, 2018.