



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Rafael Fernandes Pinto da Rocha

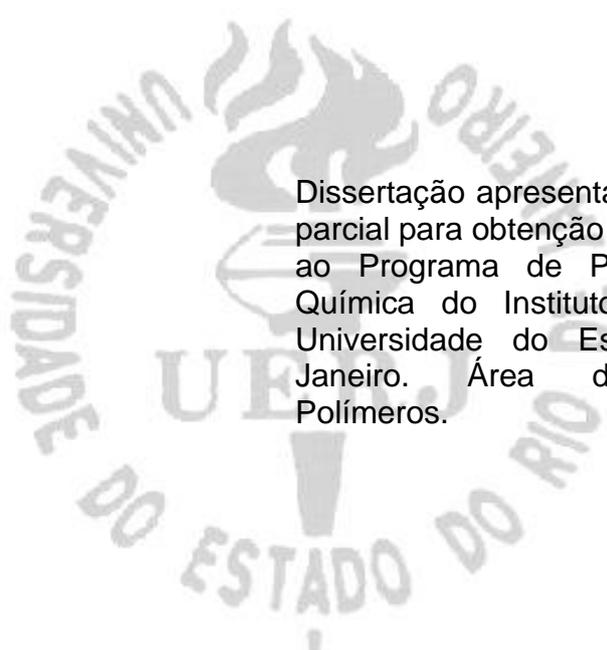
**Biodegradação de hidrogéis à base de alginato de sódio e
quitosana em solo argiloso**

Rio de Janeiro

2023

Rafael Fernandes Pinto da Rocha

Biodegradação de hidrogéis à base de alginato de sódio e quitosana em solo argiloso



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Polímeros.

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

Coorientador: Dra. Marcia Parente Melo da Costa

Coorientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa

Rio de Janeiro

2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/Q

R672 Rocha, Rafael Fernandes Pinto da.

Biodegradação de hidrogéis à base de alginato de sódio e quitosana em solo argiloso. – 2023.
103 f.

Orientador (a): Ivana Lourenço de Mello Ferreira
Coorientador (a): Marcia Parente Melo da Costa
Antonio Carlos Augusto da Costa

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Instituto de Química.

1. Biodegradação – Teses. 2. Hidrogel – Teses. I. Ferreira, Ivana Lourenço de Mello. II. Costa, Marcia Parente Melo da. III. Costa, Antonio Carlos Augusto da. IV. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. V. Título.

CDU 544.773.432

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Rafael Fernandes Pinto da Rocha
Assinatura

10/05/2023
Data

Rafael Fernandes Pinto da Rocha

Biodegradação de hidrogéis à base de alginato de sódio e quitosana em solo argiloso

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

Aprovada em 16 de FEVEREIRO de 2023.

Banca examinadora:

Ivana Lourenço de Mello Ferreira.

Prof.^a Dra. Ivana Lourenço de Mello Ferreira (Orientadora)

Instituto de Química – UERJ

Marcia Parente Melo da Costa

Prof.^a Dra. Marcia Parente Melo da Costa (Coorientadora)

Instituto de Química – UERJ

Antonio Carlos Augusto da Costa

Prof. Dr. Antonio Carlos Augusto da Costa (Coorientador)

Instituto de Química – UERJ

Alex da Silva Sirqueira

Prof. Dr. Alex da Silva Sirqueira

Centro de Tecnologia e Ciências – UERJ

Wendell Girard Dias

Prof. Dr. Wendell Girard Dias

Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2023

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e saúde ao longo de todos os anos da minha formação educacional e acadêmica.

Aos meus pais, Antonio Sergio e Euzimar, e ao meu irmão, Guilherme, pelo apoio e estrutura.

À minha namorada, Natasha, pelos anos de companheirismo e carinho.

À minha orientadora, Ivana, pela paciência, cuidado e atenção desde a minha entrada no Grupo de Pesquisas em Polímeros Naturais (GPPN), em dezembro de 2017. E também por nunca medir esforços para ajudar seus alunos a crescerem como pessoas e como profissionais. Os ensinamentos permanecerão comigo para sempre.

À minha coorientadora, Marcia, por toda ajuda e por ser sempre tão solícita comigo e com todos que pedem. Também agradeço pelas análises de Microscopia Confocal, realizadas na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Ao meu coorientador, Antonio Carlos, por aceitar me ajudar desde o primeiro momento em que recorri a ele. O estudo microbiológico contido nesta Dissertação não seria possível sem ele.

À minha avó, Maria, por gentilmente ceder o solo utilizado nesta Dissertação.

À minha família, por me ajudar a coletar o solo manualmente.

Ao técnico Arthur Ribeiro e ao professor Glaucio Braga, da Universidade Federal Fluminense (UFF), pelo auxílio nas análises de Espectroscopia Raman.

Ao técnico Leandro Lidizio, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), pelo auxílio nas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura dos materiais degradados.

Ao técnico Thiago Chaves, da UERJ, pelas análises de FTIR e TG.

Aos alunos de Doutorado do professor Antonio Carlos, Nazareth e Renato, pelo auxílio na parte microbiológica do estudo.

Ao professor Eduardo Torres, da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UERJ, pelo auxílio na metodologia da observação de fungos por Microscopia Eletrônica de Varredura.

À técnica Priscila Fernandes, do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), da UERJ, pelo auxílio nas observações de fungos por Microscopia Eletrônica de Varredura.

Aos mestres professores do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da UERJ, pelas disciplinas ministradas e ensinamentos transmitidos incansavelmente, semestre após semestre, aos estudantes.

Aos colegas do GPPN pelas trocas e apoios.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo fomento financeiro ao laboratório e pela bolsa de estudos.

Memento homo, quia pulvis es et in pulverem reverteris

Autor desconhecido

RESUMO

ROCHA, R. F. P. da. *Biodegradação de hidrogéis à base de alginato de sódio e quitosana em solo argiloso*. 2023. 103 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Nesta Dissertação foi investigada a biodegradação de hidrogéis à base de alginato de sódio e quitosana em solo argiloso. O solo foi obtido de uma propriedade privada situada no município de Campos dos Goytacazes, região norte fluminense do Estado do Rio de Janeiro, promissora para a expansão agrícola de soja e milho. Foram realizados ensaios de biodegradação, onde o pH e a umidade do solo foram monitorados. Os hidrogéis degradados foram analisados por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), espectroscopia Raman, termogravimetria (TG), microscopia eletrônica de varredura (SEM) e microscopia confocal de varredura a laser (CLSM). Com o objetivo de se obter mais informações a respeito dos microrganismos responsáveis pela biodegradação dos hidrogéis, foi feito um estudo microbiológico do solo. Os ensaios de biodegradabilidade revelaram que os hidrogéis foram completamente biodegradados em seis semanas. O solo com hidrogel se manteve mais úmido do que o solo sem hidrogel, após sete dias, até oito semanas. Tais resultados indicaram o potencial do material como condicionador de solo. Por meio do FTIR e do Raman, foi possível identificar a quebra das cadeias poliméricas através da ligação glicosídica, mesmo com os polissacarídeos reticulados eletrostaticamente. Análises de SEM e de microscopia confocal evidenciaram a fragmentação da estrutura do hidrogel, alterando assim a sua morfologia. Os ensaios microbiológicos comprovaram que os hidrogéis à base de alginato de sódio e quitosana foram utilizados como fonte de carbono por fungos isolados do solo argiloso utilizado, com indicativos de que os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cunninghamella*, além de leveduras, foram responsáveis, entre outros, por tal consumo.

Palavras-chave: Biodegradação. Hidrogel. Alginato de sódio. Quitosana. Solo argiloso.

ABSTRACT

ROCHA, R. F. P. da. *Biodegradation of sodium alginate and chitosan-based hydrogels in ultisol*. 2023. 103 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

In this dissertation, the biodegradation of hydrogels based on sodium alginate and chitosan in ultisol was investigated. The soil was obtained from a private property located in the municipality of Campos dos Goytacazes, in the northern region of the state of Rio de Janeiro, promising for the agricultural expansion of soybeans and corn. Biodegradation tests were carried out, where pH and soil moisture were monitored. The degraded hydrogels were analyzed by infrared spectroscopy (FTIR), Raman spectroscopy, thermogravimetry (TG), scanning electron microscopy (SEM) and confocal laser scanning microscopy (CLSM). In order to obtain more information about the microorganisms responsible for the biodegradation of the hydrogels, a microbiological study of the soil was carried out. Biodegradability tests revealed that the hydrogels were completely biodegraded within six weeks. Soil with hydrogel remained wetter than soil without hydrogel after seven days for up to eight weeks. Such results indicated the potential of the material as a soil conditioner. Using FTIR and Raman, it was possible to identify the breaking of polymeric chains through the glycosidic bond, even with electrostatically crosslinked polysaccharides. SEM and confocal microscopy analysis showed fragmentation of the hydrogel structure, thus altering its morphology. The microbiological tests proved that the hydrogels based on sodium alginate and chitosan were used as a source of carbon by fungi isolated from the clayey soil used, with indications that fungi of the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Cunninghamella*, in addition to yeasts, were responsible, among others, for such consumption.

Keywords: Biodegradation. Hydrogel. Sodium alginate. Chitosan. Ultisol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do alginato	21
Figura 2 – Estruturas químicas da quitina e da quitosana após desacetilação em meio básico.....	23
Figura 3 – Estruturas químicas da celulose (a) e do acetato de celulose (b).....	24
Figura 4 – Biodegradação completa de polímeros.....	26
Figura 5 – Degradação endo e exolítica do alginato.....	27
Figura 6 – Degradação endo e exolítica da quitosana.....	28
Figura 7 – Hidrogéis protegidos individualmente com filme de PVC.....	33
Figura 8 – Solo armazenado em bombonas plásticas.....	34
Figura 9 – Esquema metodológico dos ensaios de biodegradabilidade dos hidrogéis.....	35
Figura 10 – Recipientes com solo e hidrogel.....	37
Figura 11 – Esquema metodológico para a determinação do pH do solo ao longo do tempo.....	38
Figura 12 – Solo úmido em cápsulas metálicas.....	39
Figura 13 – Esquema da metodologia para observação de microrganismos em solo argiloso.....	44
Figura 14 – Pedacos de hidrogel utilizados para o preparo das placas de Petri....	48
Figura 15 – Hidrogel antes do enterro no solo (a); sendo removido do solo (b); lavado após o desenterro (c) e liofilizado após lavagem (d).....	55
Figura 16 – Variação do pH do solo, com e sem hidrogel, durante o ensaio de biodegradação.....	58
Figura 17 – Variação da umidade do solo, com e sem hidrogel, ao longo do tempo de ensaio.....	59
Figura 18 – Espectros de FTIR do hidrogel antes (H0D) e após duas semanas de biodegradação (H2S).....	61
Figura 19 – Amostras para análise Raman dos hidrogéis.....	64
Figura 20 – Espectros de espalhamento Raman dos hidrogéis degradados.....	65

Figura 21 – Curvas de TG e DTG para os hidrogéis biodegradados nos tempos: 0 dia (H0D) (a), 1 dia (H1D) (b), 2 dias (H2D) (c), 3 dias (H3D) (d), 4 dias (H4D) (e), 5 dias (H5D) (f), 1 semana (H1S) (g) e 2 semanas (H2S) (h).....	68
Figura 22 – Produtos de degradação térmica da quitosana e do alginato.....	69
Figura 23 – Micrografias de SEM do hidrogel: H0D (antes da biodegradação) com aumento de 500 vezes (a), H1D (após um dia de biodegradação) com aumento de 500 vezes (b) e H1D com aumento de 1.000 vezes (c).....	72
Figura 24 – Micrografias de SEM do hidrogel: H0D (antes da biodegradação) com aumento de 500 vezes (a), H5D (após cinco dias de biodegradação) com aumento de 500 vezes (b) e H5D com aumento de 1.000 vezes (c).....	73
Figura 25 – Micrografias de SEM do hidrogel: H0D (antes da biodegradação) com aumento de 500 vezes (a), H2S (após duas semanas de biodegradação) com aumento de 500 vezes (b) e H2S com aumento de 1.000 vezes (c).....	74
Figura 26 – Micrografias de SEM do hidrogel antes da biodegradação com aumento de 100 vezes (a) e após duas semanas de biodegradação com aumento de 100 vezes (b)	75
Figura 27 – Imagens de microscopia confocal dos materiais antes da biodegradação, (a) até (c), e após duas semanas de biodegradação, (d) até (f). Todas com aumento de 10x.....	76
Figura 28 – Placas de Petri preparadas, em triplicata, com os meios de cultura <i>Sabouraud</i> (S) e PCA (P), de acordo com as diluições sucessivas (0 a 5).....	78
Figura 29 – Crescimento fúngico em placas com meio <i>Sabouraud</i> , sem diluição (S0) até a 3ª diluição (S3).....	78
Figura 30 – Crescimento de fungos em meio PCA sem diluição (P0).....	79
Figura 31 – Crescimento de fungos em meio PCA: na 1ª diluição (P1) (a) e na 2ª diluição (P2) (b).....	80
Figura 32 – Fungos isolados das placas com meio <i>Sabouraud</i> sem diluição (S0).....	81
Figura 33 – Fungos isolados das placas com meio <i>Sabouraud</i> na: 1ª diluição (S1) (a) e 2ª diluição (S2) (b).....	82
Figura 34 – Fungos isolados, numerados de um a oito.....	83

Figura 35 – Crescimento fúngico em meio <i>Sabouraud</i> : (SF1-8) sem hidrogel e (SHF1-8) com hidrogel (placas em triplicata).....	84
Figura 36 – Crescimento fúngico em ágar: (AF1-8) sem hidrogel e (AHF1-8) com hidrogel (placas em triplicata).....	85
Figura 37 – Mecanismo de obtenção de energia pelos microrganismos através da quitosana.....	86
Figura 38 – Mecanismo de obtenção de energia pelos microrganismos através do alginato.....	88
Figura 39 – Micrografias de SEM do controle e das amostras de fungos isolados (1 – 8) mostrados na Figura 34: controle (a) e (b); fungo 1 (c) e (d); fungo 2 (e) e (f); fungo 3 (g) e (h); fungo 4 (i) e (j); fungo 5 (k) e (l); fungo 6 (m) e (n); fungo 7 (o) e (p); fungo 8 (q) e (r).....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições reacionais para o preparo dos hidrogéis à base de alginato de sódio e quitosana	32
Tabela 2 – Distribuição do tamanho de partículas do solo.....	35
Tabela 3 – Composição dos meios de cultura (formulação típica do fabricante)...	43
Tabela 4 – Organização das placas de Petri preparadas para observação do crescimento fúngico em meio de cultura deficiente em nutrientes.....	47
Tabela 5 – Resultados da análise física do solo antes e após oito semanas de ensaio.....	50
Tabela 6 – Resultados da análise química do solo antes e após oito semanas de ensaio.....	52
Tabela 7 – Resultados da análise microbiológica do solo antes e após oito semanas de ensaio.....	54
Tabela 8 – Identificação dos hidrogéis degradados.....	57
Tabela 9 – Atribuições vibracionais das bandas de absorção no FTIR do hidrogel à base de alginato de sódio e quitosana antes (H0D) e após a biodegradação (H2S).....	63
Tabela 10 – Atribuições vibracionais de Espalhamento Raman para o hidrogel à base de alginato de sódio e quitosana antes do ensaio de biodegradação (H0D).....	66
Tabela 11 – Temperaturas dos estágios de decomposição térmica dos hidrogéis de acordo com o tempo de biodegradação.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AF1	Fungo 1 inoculado em ágar
AF2	Fungo 2 inoculado em ágar
AF3	Fungo 3 inoculado em ágar
AF4	Fungo 4 inoculado em ágar
AF5	Fungo 5 inoculado em ágar
AF6	Fungo 6 inoculado em ágar
AF7	Fungo 7 inoculado em ágar
AF8	Fungo 8 inoculado em ágar
AHF1	Fungo 1 inoculado em ágar com hidrogel
AHF2	Fungo 2 inoculado em ágar com hidrogel
AHF3	Fungo 3 inoculado em ágar com hidrogel
AHF4	Fungo 4 inoculado em ágar com hidrogel
AHF5	Fungo 5 inoculado em ágar com hidrogel
AHF6	Fungo 6 inoculado em ágar com hidrogel
AHF7	Fungo 7 inoculado em ágar com hidrogel
AHF8	Fungo 8 inoculado em ágar com hidrogel
ALG	Alginato de sódio
ANOVA	Análise de variância
ATR	Reflexão total atenuada
CLSM	Microscopia confocal de varredura a laser
CTC	Capacidade de troca catiônica
DAPI	Dihidrocloreto de 4'-6-diamidino-2-fenilindole
DEHU	Ácido 4-desoxi-L- <i>erythro</i> -5-hexulose urônico
DTG	Termogravimetria derivada
ED2	Segundo estágio de degradação térmica
ED3	Terceiro estágio de degradação térmica
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FTIR	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho
GAP	Gliceraldeído-3-fosfato

GD	Grau de desacetilação
H ₀	Hipótese nula
H0D	Hidrogel antes do enterro no solo
H1D	Hidrogel após um dia de enterro no solo
H1S	Hidrogel após uma semana de enterro no solo
H2D	Hidrogel após dois dias de enterro no solo
H2S	Hidrogel após duas semanas de enterro no solo
H3D	Hidrogel após três dias de enterro no solo
H4D	Hidrogel após quatro dias de enterro no solo
H5D	Hidrogel após cinco dias de enterro no solo
KDG	2-ceto-3-desoxi-D-gluconato
KDPG	2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato
m _{água}	Massa de água
m _{cap.}	Massa da cápsula metálica
m _{cap+solo seco}	Massa da cápsula metálica e do solo seco
m _{cap+solo úmido}	Massa da cápsula metálica e do solo úmido
m _{solo seco}	Massa do solo seco
ND	Não detectado
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PEC	Complexo polieletrólítico
PVC	Poli(cloreto de vinila)
QUI	Quitosana
RdB	Isotiocianato de rodamina B
S	<i>Sabouraud</i>
S1	Meio <i>Sabouraud</i> com uma diluição
S2	Meio <i>Sabouraud</i> com duas diluições
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
SF1	Fungo 1 inoculado em <i>Sabouraud</i>
SF2	Fungo 2 inoculado em <i>Sabouraud</i>
SF3	Fungo 3 inoculado em <i>Sabouraud</i>
SF4	Fungo 4 inoculado em <i>Sabouraud</i>
SF5	Fungo 5 inoculado em <i>Sabouraud</i>
SF6	Fungo 6 inoculado em <i>Sabouraud</i>

SF7	Fungo 7 inoculado em <i>Sabouraud</i>
SF8	Fungo 8 inoculado em <i>Sabouraud</i>
SHF1	Fungo 1 inoculado em <i>Sabouraud</i> com hidrogel
SHF2	Fungo 2 inoculado em <i>Sabouraud</i> com hidrogel
SHF3	Fungo 3 inoculado em <i>Sabouraud</i> com hidrogel
SHF4	Fungo 4 inoculado em <i>Sabouraud</i> com hidrogel
SHF5	Fungo 5 inoculado em <i>Sabouraud</i> com hidrogel
SHF6	Fungo 6 inoculado em <i>Sabouraud</i> com hidrogel
SHF7	Fungo 7 inoculado em <i>Sabouraud</i> com hidrogel
SHF8	Fungo 8 inoculado em <i>Sabouraud</i> com hidrogel
TG	Termogravimetria
T _{máx.}	Temperatura na qual a velocidade de degradação térmica é máxima
T _{onset}	Temperatura inicial de degradação térmica
U	Umidade do solo
UV	Ultravioleta
WD	Distância de trabalho

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	OBJETIVO	19
1.1	Objetivos específicos	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	Polissacarídeos	20
2.1.1	<u>Alginato de sódio</u>	21
2.1.2	<u>Quitosana</u>	22
2.2	Biodegradação de hidrogéis à base de polissacarídeos	24
2.2.1	<u>Degradação enzimática de alginato</u>	26
2.2.1	<u>Degradação enzimática de quitosana</u>	28
3	METODOLOGIA	30
3.1	Materiais	30
3.1.1	<u>Equipamentos</u>	31
3.2	Preparo dos hidrogéis	32
3.3	Coleta e preparo do solo	33
3.4	Avaliação da biodegradabilidade dos hidrogéis em solo argiloso ..	36
3.4.1	<u>Ensaio de biodegradação</u>	36
3.5	Acompanhamento do solo ao longo da biodegradação	37
3.5.1	<u>Determinação do pH</u>	37
3.5.2	<u>Determinação da umidade</u>	38
3.6	Análise físico-química e microbiológica do solo antes e após o enterro do hidrogel	40
3.7	Caracterização dos hidrogéis antes e após a biodegradação	40
3.7.1	<u>Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)</u>	41
3.7.2	<u>Espectroscopia Raman</u>	41
3.7.3	<u>Termogravimetria (TG)</u>	41
3.7.4	<u>Microscopia eletrônica de varredura (SEM)</u>	42
3.7.5	<u>Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM)</u>	42
3.8	Estudo da população fúngica e bacteriana em solo argiloso	42
3.8.1	<u>Preparo das soluções salinas</u>	43

3.8.2	<u>Incorporação do solo em solução salina</u>	44
3.8.3	<u>Diluição da mistura de solo em solução salina</u>	45
3.8.4	<u>Preparo das placas para observação de fungos e bactérias</u>	45
3.8.5	<u>Isolamento dos fungos e bactérias</u>	46
3.8.6	<u>Observação do crescimento fúngico em meio de cultura deficiente em nutrientes</u>	47
3.8.7	<u>Observação morfológica dos fungos</u>	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1	Análise físico-química e microbiológica do solo antes e após o enterro do hidrogel	50
4.2	Avaliação da biodegradabilidade dos hidrogéis em solo argiloso	55
4.3	Acompanhamento do solo durante os ensaios de biodegradação	57
4.3.1	<u>Determinação do pH</u>	58
4.3.2	<u>Determinação da umidade</u>	59
4.4	Caracterização dos hidrogéis antes e após a biodegradação	61
4.4.1	<u>Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)</u>	61
4.4.2	<u>Espectroscopia Raman</u>	64
4.4.3	<u>Termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG)</u>	67
4.4.4	<u>Microscopia eletrônica de varredura (SEM)</u>	71
4.4.5	<u>Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM)</u>	75
4.5	Estudo da população fúngica e bacteriana em solo argiloso	77
4.5.1	<u>Preparo das placas para observação de fungos e bactérias</u>	77
4.5.2	<u>Isolamento dos fungos</u>	80
4.5.3	<u>Observação do crescimento fúngico em meio de cultura deficiente em nutrientes</u>	83
4.5.4	<u>Observação morfológica dos fungos</u>	89
	CONCLUSÃO	95
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
	APÊNDICE	103

INTRODUÇÃO

Em solo brasileiro, a soja é responsável pela maior parte da produtividade agrícola, com potencial crescimento para as próximas décadas. No futuro, o desafio será crescer a produção mundial de grãos e alimentos de forma sustentável, para atender toda a população sem gerar mais danos ao meio ambiente (CATTELAN; DALL'AGNOL, 2018). No Rio de Janeiro, particularmente a região norte fluminense é a mais promissora para o crescimento do cultivo de soja e milho, com destaque, pela maior quantidade percentual, para solos argilosos (EMBRAPA, 2021).

Fortes aliados da agricultura sustentável, os hidrogéis surgem como potenciais condicionadores de solo, de modo que o crescimento de culturas é favorecido pelo seu uso (GUILHERME *et al.*, 2015; MONTESANO *et al.*, 2015; NASCIMENTO *et al.*, 2021). Outro motivo pelo qual os hidrogéis são muito utilizados na agricultura é sua capacidade de liberar controladamente, isto é, de forma gradativa, insumos agrícolas (substâncias que auxiliam o crescimento das plantas ou impedem a proliferação de pragas) ou água (SARUCHI *et al.*, 2019; SENNA; BOTARO, 2017).

Hidrogéis podem ser definidos como redes tridimensionais formadas por polímeros, naturais ou sintéticos, reticulados, capazes de reter grandes quantidades de água ou soluções aquosas (CHATTERJEE; CHI-LEUNG HUI, 2019). Tal retenção possibilita a liberação gradativa de substâncias em diferentes sistemas, tais como: em água, no corpo humano ou em solos, ampliando as possibilidades de aplicação de tais materiais (KAUR; JINDAL; JINDAL, 2020). Hidrogéis quando constituídos apenas por polímeros naturais, tais como os polissacarídeos, podem ser biodegradáveis, ou seja, degradados pela ação de microrganismos (WARREN, 1996).

Uma das maneiras de se obter uma agricultura sustentável é regulando-se o consumo de água pela irrigação. Neste sentido, os hidrogéis também contribuem para a retenção de água, aumentando os intervalos de irrigação (SARUCHI *et al.*, 2019; SENNA; BOTARO, 2017). Sabe-se que, mundialmente, o maior gasto percentual de água ocorre pela prática da irrigação em culturas agrícolas (ANA, 2019). De acordo com projeções da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2018), a projeção para a safra de 2026/27 indica um aumento da área plantada, produção e exportação de muitos produtos agrícolas. A partir desses dados, pode-se prever que haverá um aumento significativo no gasto de água usada na irrigação.

Neste contexto, os hidrogéis tornam-se uma alternativa importante para alcançar uma agricultura sustentável. A absorção de água pelas cadeias poliméricas dos hidrogéis se dá através da interação entre as moléculas de água e os grupamentos hidrofílicos, como carboxilato (COO^-) do alginato, amino (NH_2) da quitosana e hidroxila (OH) de ambos, por exemplo. Uma vez que a degradação do hidrogel pode influenciar na sua capacidade de retenção de água, estudos sobre seu tempo de atuação no solo são de suma importância para a compreensão da potencial aplicação real dos hidrogéis em culturas agrícolas.

Estudos indicam a biodegradabilidade de hidrogéis à base de alginato de sódio e quitosana por enzimas isoladas (LI *et al.*, 2009; KAPAREKAR *et al.*, 2021) e a biodegradabilidade de diversos tipos de hidrogéis, naturais ou sintéticos, em solo simulado (solo preparado a partir de outro solo coletado, areia, esterco e água) (SENNA; BOTARO, 2017) ou solo retirado de uma plantação (ARAFÁ *et al.*, 2022). Porém, até o presente momento, não foram encontrados, na literatura, estudos a respeito da influência da biodegradação sobre o tempo de aplicação dos hidrogéis formados pelo complexo polieletrólítico à base de alginato de sódio e quitosana em um solo argiloso.

Nesta Dissertação, o solo utilizado foi retirado de uma região estudada para o desenvolvimento agrícola de soja e milho, localizado no norte fluminense do Estado do Rio de Janeiro. De acordo com EMBRAPA (2021), da área total considerada como potencial para a expansão da cultura de soja e milho, 156.657 hectares, correspondente a 48,91%, são caracterizados como solo argiloso, o que justifica o tipo de solo utilizado neste estudo.

O inevitável aumento da produção agrícola de soja poderá implicar no aumento do uso de hidrogéis nesta cultura como meio alternativo de aplicação de herbicida, como o glifosato, altamente danoso à saúde humana e ambiental, e ainda permitido o seu uso no Brasil. De acordo com estudos anteriores, realizados pelo Grupo de Pesquisas em Polímeros Naturais no qual o autor desta Dissertação está inserido, hidrogéis à base de alginato de sódio e quitosana conseguiram, de forma efetiva, liberar gradativamente glifosato *in vitro* (meio aquoso) durante um longo período de tempo (COSTA *et al.*, 2022). A partir desse resultado, decidiu-se que seria importante investigar o processo de biodegradação dos hidrogéis à base de alginato e quitosana em solo argiloso. Tal decisão motivou o tema desta Dissertação.

1. OBJETIVO

Avaliar a durabilidade de hidrogéis à base de alginato de sódio e quitosana enterrados em solo argiloso, através da investigação do processo de biodegradação, bem como identificar o gênero de fungos e bactérias que estariam atuando sobre este processo.

1.1. Objetivos específicos

São objetivos específicos desta Dissertação:

- Avaliar a biodegradabilidade dos hidrogéis em solo argiloso com acompanhamento da perda de massa e da morfologia;
- Estudar a influência do pH e da umidade do solo sobre a biodegradação dos hidrogéis;
- Avaliar, através de ensaios de umidade do solo, a aplicabilidade dos hidrogéis como condicionadores de solo;
- Acompanhar possíveis alterações na composição química dos hidrogéis ao longo da biodegradação;
- Investigar o crescimento de fungos e bactérias nos hidrogéis visando identificá-los.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Hidrogéis são formados por polímeros hidrofílicos, capazes de absorver e reter grandes quantidades de água ou soluções aquosas, cujas cadeias estão reticuladas tridimensionalmente através de ligações cruzadas. Existem dois importantes modos de se classificar os hidrogéis: em relação à ocorrência de seu(s) polímero(s), sendo natural(is) ou sintético(s), e à natureza das interações que mantêm a estrutura de sua rede, sendo física (rede polimérica mantida por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas ou forças de Van der Waals) ou química (rede polimérica mantida por ligações covalentes) (FRACHINI; PETRI, 2019).

Comercialmente, a utilização de hidrogéis é extremamente variada. Nas indústrias farmacêutica e biomédica, por exemplo, os hidrogéis são usados para a encapsulação e liberação controlada de fármacos (HIEW *et al.*, 2021) e no tratamento para cicatrização de pele (KAPAREKAR *et al.*, 2021).

Quando hidrogéis são formados a partir de interações eletrostáticas entre dois polissacarídeos diferentes, os mesmos recebem o nome de complexos polieletrólíticos (PEC). Tal nomenclatura é concebida a partir do conceito de polieletrólitos, polímeros que apresentam cargas, positivas ou negativas, ao longo de suas cadeias (HE *et al.*, 2020). É importante destacar que, quando as cargas são provenientes da ionização de grupos funcionais, o grau de reticulação do hidrogel será diretamente influenciado pelo pH do meio (CHATTERJEE; CHI-LEUNG HUI, 2019). Nesta Dissertação, foram utilizados complexos polieletrólíticos formados a partir de dois polissacarídeos: alginato de sódio e quitosana.

2.1. Polissacarídeos

Por definição, polissacarídeos são polímeros naturais formados por unidades menores ligadas entre si por ligações glicosídicas (WOLF; TAMBOURGI; PAULINO, 2021). O modo como tais ligações ocorrem influencia nas propriedades físico-químicas destas substâncias, assim como em sua interação com enzimas. O grande interesse científico nos polissacarídeos pode ser justificado pelas suas propriedades, como a biodegradabilidade, alta biocompatibilidade, fácil aquisição, pela grande

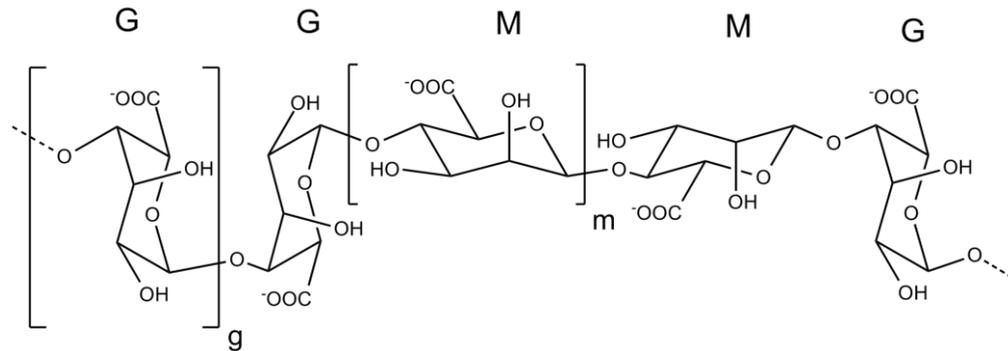
quantidade disponível na natureza, e baixo custo (em relação a substâncias sintéticas com mesmas finalidades).

A grande característica de biodegradabilidade de hidrogéis à base de polissacarídeos é conhecida pela ação das enzimas produzidas por microrganismos, como amilases, celulasas, hemicelulasas e quitinases. Tal ação é influenciada pela estrutura que o polímero natural possui. Por exemplo, pela similaridade estrutural entre celulose e quitina, algumas enzimas conseguem hidrolisar tanto um polímero quanto o outro (POLMAN *et al*, 2021). De acordo com Warren (1996), alguns microrganismos capazes de hidrolisar a quitina, por produzirem quitinases, são: *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens* (bactérias gram-negativas), *Streptomyces lividans*, *Streptomyces plicatus*, *Streptomyces olivaceoviridis*, *Streptomyces thermoviolaceus*, *Bacillus circulans* (bactérias gram-positivas) e *Rhizopus oligosporus* (fungo). Existe, ainda, uma variada gama de microrganismos que produzem enzimas capazes de degradar especificamente a quitosana, chamadas de quitosanases.

2.1.1. Alginato de sódio

Em forma sódica, o polissacarídeo alginato é um copolímero natural em bloco, cujas unidades, que determinam sua estrutura, são: ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulurônico (G), ligadas por ligação glicosídica do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ (Figura 1). Por conter grupos carboxila em sua estrutura, o alginato de sódio é considerado um polieletrólito aniônico (SANCHEZ-BALLESTER; BATAILLE; SOULAIROL, 2021).

Figura 1 – Estrutura química do alginato.



Fonte: O autor, 2023.

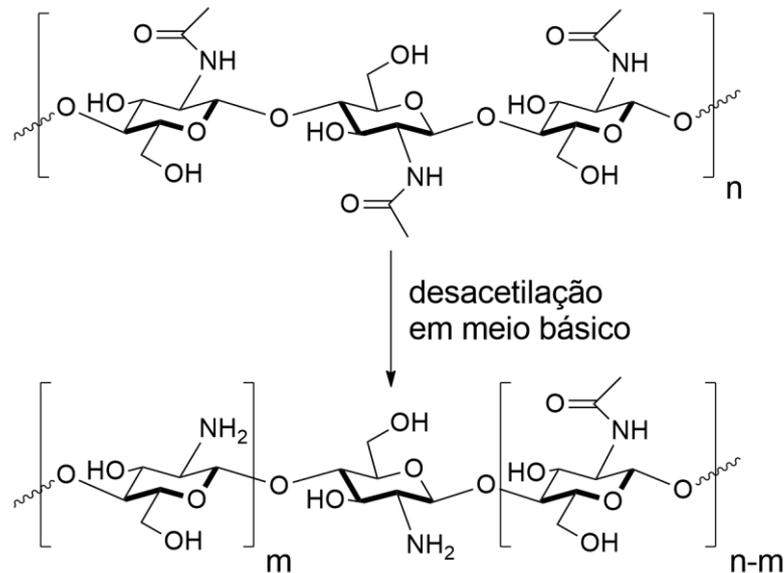
A proporção dos grupamentos M e G são de suma importância para a resistência mecânica da cadeia polimérica. Amostras que apresentam teores maiores de blocos GG apresentam maior rigidez em suas cadeias. A principal fonte de extração do alginato são as algas marrons (*Phaeophyceae*); entretanto, outras fontes, como, por exemplo, a bactéria *Azotobacter*, podem produzir alginato em concentrações ainda maiores do bloco G (HAY *et al.*, 2010).

Hidrogéis à base de alginato de sódio são amplamente utilizados devido às vantagens oferecidas por suas propriedades biológicas, como não-toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade e abundância natural, além de sua alta hidrofiliabilidade. Sua variada aplicação envolve desde sistemas de liberação de fármacos e engenharia de tecidos, ambos da área biomédica (GUARINO *et al.*, 2015; SANCHEZ-BALLESTER; BATAILLE; SOULAIROL, 2021), até a produção de filmes superparamagnéticos capazes de filtrar soluções aquosas de impurezas metálicas, como no tratamento de água (KLOSTER *et al.*, 2021).

2.1.2. Quitosana

A quitosana é um polímero natural, linear, constituído de unidades desacetiladas [$\beta(1\rightarrow4)$ -D-glucosamina] e acetiladas (N-acetil-D-glucosamina) (Figura 2), obtido a partir da reação de N-desacetilação da quitina (KHAJAVIAN *et al.*, 2022), segundo polissacarídeo mais abundante na Terra, após a celulose, extraída da carapaça de crustáceos e da parede celular de fungos (JOSEPH *et al.*, 2021).

Figura 2 – Estruturas químicas da quitina e da quitosana após desacetilação em meio básico.



Fonte: O autor, 2023.

Além de sua grande disponibilidade e fonte renovável, outras características da quitosana, que alavancam sua importância, são: atividade antimicrobiana, biodegradabilidade, atividade imunológica, biocompatibilidade e não-toxicidade. Assim, a quitosana possui variadas aplicações como: engenharia de tecido, liberação controlada de fármacos, remoção de metais pesados de efluentes industriais, adsorção de tintas e corantes, e fertilizantes (HEBBAR; ISLOOR; WAHAB MOHAMMAD, 2018; MICHALIK; WANDZIK, 2020).

O grau de desacetilação (GD) da quitosana influencia na quantidade de grupamentos amino (NH_3^+), o que, por sua vez, altera a estabilidade do complexo polieletrólítico, já que a formação do complexo ocorre, majoritariamente, através de interações eletrostáticas.

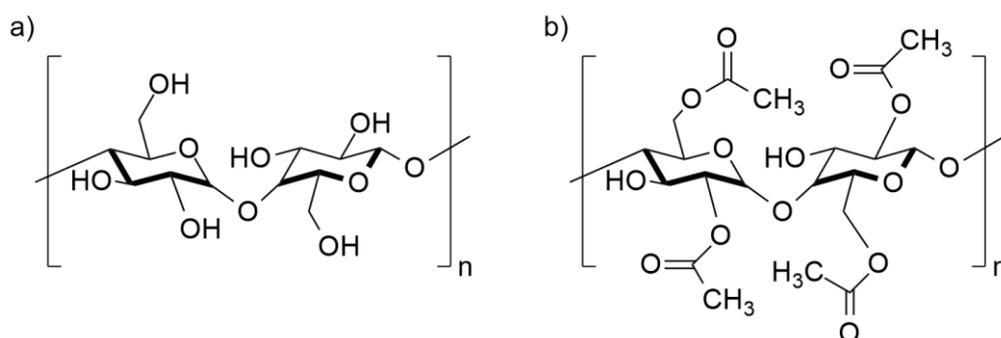
Conforme já mencionado nesta Dissertação, hidrogéis à base de polissacarídeos podem ser aplicados no setor agrícola, visando diferentes finalidades: condicionamento de solos (melhoria da irrigação) e sistemas de liberação gradativa de agroquímicos (BAULI *et al.*, 2021; GUILHERME *et al.*, 2015; SARUCHI *et al.*, 2019). Em virtude de os polissacarídeos, em sua maioria, serem considerados biodegradáveis, torna-se importante estudar a biodegradação de seus hidrogéis, principalmente, quando estes forem aplicados em locais que podem conter microrganismos.

2.2. Biodegradação de hidrogéis à base de polissacarídeos

A conversão de um substrato em produtos menores, ou dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O) ao final, pela ação de enzimas geradas por microrganismos, como fungos e bactérias, é um processo conhecido como biodegradação. Tratando-se de polissacarídeos, a biodegradação ocorre pela hidrólise das ligações glicosídicas. Em um primeiro momento, a degradação ocorre fora do microrganismo, pelo tamanho excessivo das macromoléculas a serem degradadas. Em seguida, os produtos menores, como os oligômeros, são carregados para dentro do microrganismo, onde terminam de ser degradados e transformados em CO_2 e H_2O (WARREN, 1996).

Segundo Polman *et al.* (2021), a degradação de biopolímeros por enzimas não é influenciada por eventuais modificações estruturais. Isto é, as enzimas que degradam a celulose, chamadas celulasas, também são capazes de degradar, por exemplo, o acetato de celulose. A diferença entre a estrutura da celulose e do acetato de celulose é a introdução de grupos acetil (Figura 3). Portanto, enzimas que hidrolisam cadeias de quitina possuem alta eficiência na degradação de quitosana.

Figura 3 – Estruturas químicas da celulose (a) e do acetato de celulose (b).



Fonte: O autor, 2023.

Saruchi *et al.* (2015) avaliaram a biodegradação de hidrogéis à base de goma de tragacanto e ácido acrílico através de ensaios de imersão em solo e em compostagem. A avaliação foi feita através de medidas de perda de massa ao longo do tempo. Foi constatado pelos autores que, em 77 dias, os hidrogéis perderam 92,29% de sua massa em solo, enquanto os hidrogéis que foram imersos em compostagem foram completamente biodegradados, neste mesmo tempo. De acordo com os autores, esta diferença pode ser explicada pelo fato de que em compostagem

há maior presença de microrganismos em relação ao solo comum. Tais microrganismos são os responsáveis pela biodegradação dos hidrogéis em questão. Foi avaliado, também, como a biodegradação destes materiais pode contribuir para o crescimento das plantas, elevando níveis de carbono orgânico, fósforo e potássio do solo.

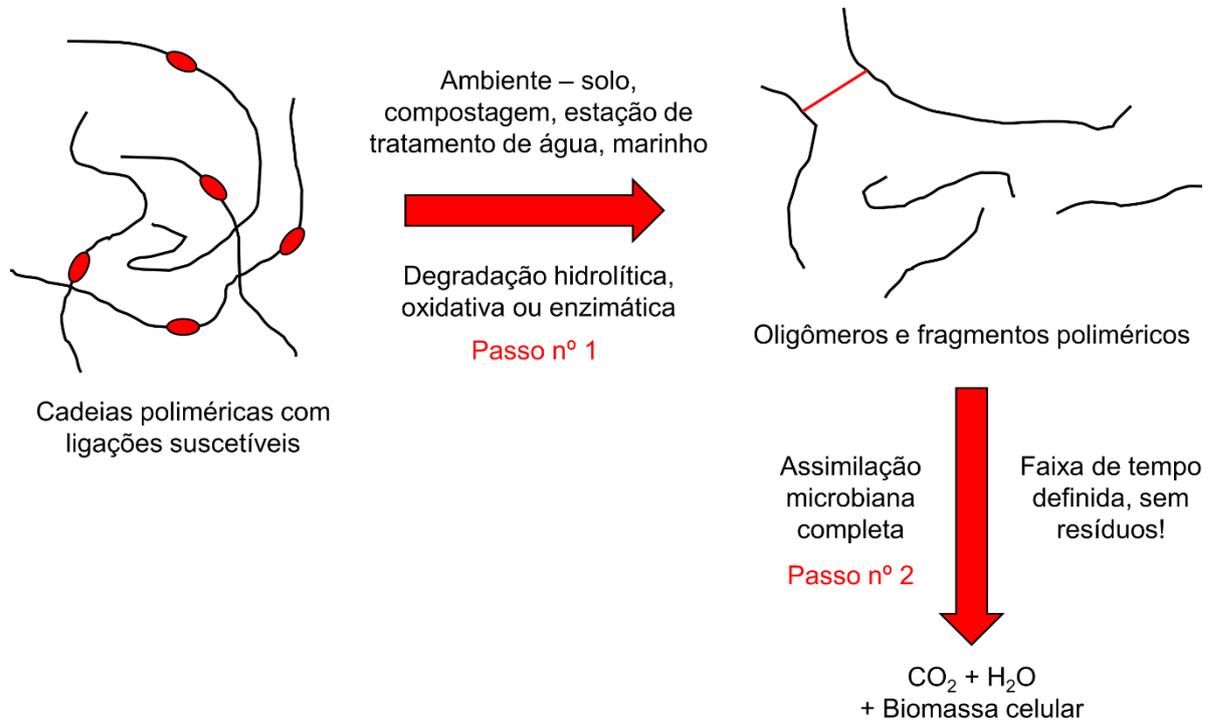
Kaur, Jindal e Jindal (2020) sintetizaram hidrogéis à base de quitosana e gelatina para liberação controlada de vitamina B₁. Com o intuito de aprimorar a retenção da vitamina B₁, os autores introduziram β -ciclodextrina na cadeia polimérica. Tanto os hidrogéis com, quanto os hidrogéis sem β -ciclodextrina foram avaliados em relação às suas biodegradabilidades através dos métodos de imersão em solo e em compostagem durante 70 dias, pela perda percentual de massa. Em compostagem, a perda de massa para hidrogéis, com e sem β -ciclodextrina, foi de 83,5% e 82,2%, respectivamente. Enquanto que a perda de massa em solo para hidrogéis, com e sem β -ciclodextrina, foi de 75% e 73%, respectivamente. Segundo os autores, a maior perda de massa em compostagem pode ser justificada pela presença de mais microrganismos, em relação ao solo comum. A pequena diferença percentual entre as perdas de massas dos hidrogéis, com e sem β -ciclodextrina, pode ser explicada pelo fato desta substância ser também biodegradável, não influenciando no mecanismo de biodegradação do hidrogel como um todo, isto é, não aumentando ou diminuindo significativamente as perdas percentuais de massa.

Li *et al.* (2009) desenvolveram complexos polieletrólíticos à base de alginato e quitosana e os avaliaram em relação à sua biodegradabilidade em solução aquosa de NaCl 0,9% contendo 0,5 mg/mL de lisozima, proteína capaz de hidrolisar alguns polissacarídeos. Para isto, utilizaram amostras de quitosana com diferentes graus de desacetilação, sendo eles 95% e 62%. Avaliou-se a perda percentual de massa da quitosana pura e dos complexos polieletrólíticos. Os complexos polieletrólíticos e a quitosana pura com 95% de grau de desacetilação não obtiveram degradação consideráveis, apenas as amostras de quitosana com 62% de grau de desacetilação. De acordo com os autores, a lisozima não foi capaz de degradar os complexos polieletrólíticos de modo satisfatório, pela forte interação entre o alginato e a quitosana.

Até o presente momento, não foram encontrados na literatura estudos sobre a biodegradabilidade de complexos polieletrólíticos à base de alginato e quitosana em solo.

Sabe-se que, isoladamente, tanto o alginato quanto a quitosana são biodegradáveis pela ação de enzimas geradas por microrganismos, seguindo o mesmo processo da biodegradação de macromoléculas (Figura 4) (RUJNIC-SOKELE; PILIPOVIĆ, 2017).

Figura 4 – Biodegradação completa de polímeros.



Fonte: O autor, 2023 (adaptado de Narayan, 2009).

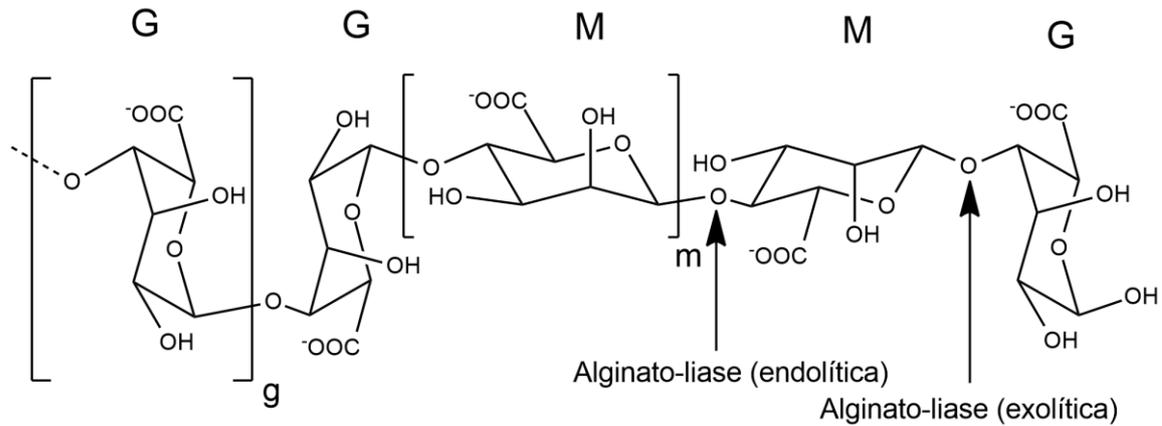
2.2.1. Degradação enzimática de alginato

Alginase, ou alginato-liase, é uma classe de enzimas capaz de degradar naturalmente a cadeia carbônica de alginato pela quebra da ligação glicosídica (clivagem). São isoladas de diversas fontes naturais: algas, fungos, vírus animais e bactérias (em meio marinho) e bactérias gram-negativas e gram-positivas (em solo) (BARZKAR *et al.*, 2022).

Essas enzimas são específicas para cada tipo de clivagem. As clivagens endolíticas ocorrem em pontos aleatórios das cadeias poliméricas, e estas enzimas são responsáveis pela formação dos oligossacarídeos, enquanto as clivagens exolíticas, as quais ocorrem nas extremidades das cadeias são responsáveis pela formação de unidades mono, di ou trissacarídicas (BARZKAR *et al.*, 2022) (Figura 5).

Alginases endolíticas podem possuir especificidade em relação aos blocos do alginato, ocorrendo como enzimas específicas de blocos MM, blocos GG e blocos MG (KIM; LEE; LEE, 2011).

Figura 5 – Degradação endo e exolítica do alginato.



Fonte: O autor, 2023.

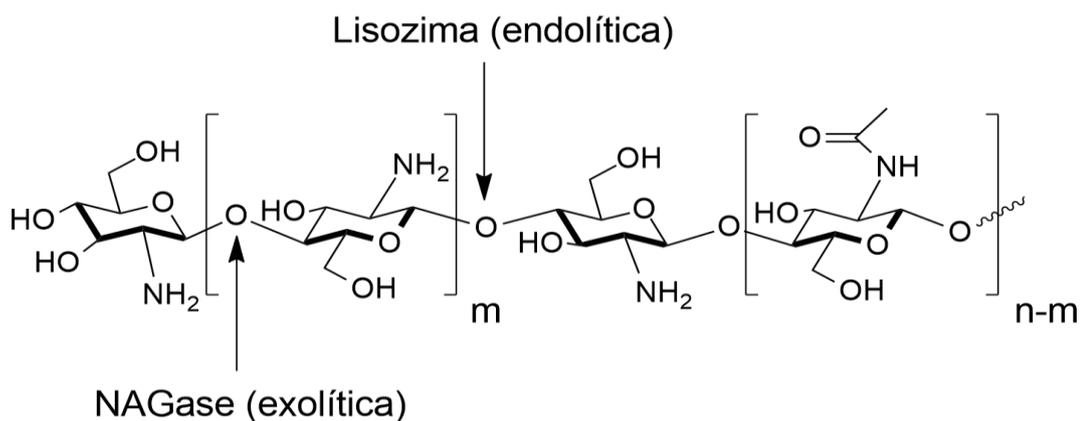
Phang *et al.* (2011) estudaram a degradação enzimática *in vitro* de materiais superabsorventes à base de alginato de sódio, acrilamida, ácido itacônico e ácido acrílico. Para a formação do material, os autores utilizaram cloreto de cálcio diidratado. Os ensaios de biodegradação foram realizados com diferentes solos utilizando dois métodos: imersão em solução sobrenadante dos solos, com e sem adição de nutrientes, e enterro em solo. Em ambos os métodos, os autores avaliaram a perda de massa dos materiais a cada 10 dias, até o total de 40 dias, utilizando 0,1 g do material. Após a retirada do material da solução sobrenadante ou do solo, o mesmo foi lavado com água deionizada, seco em estufa a 60 °C e colocados em dessecador até voltarem a temperatura ambiente. De acordo com os autores, o dessecador foi utilizado para evitar a absorção de umidade atmosférica durante o processo de resfriamento natural. Para isto, os autores utilizaram diferentes tipos de solo, entre eles, o solo no qual o material alcançou a maior porcentagem de perda de massa, proveniente de uma fazenda orgânica (a agricultura orgânica é caracterizada pela não utilização de agrotóxicos e fertilizantes sintéticos). A perda de massa alcançada foi de 83% no sobrenadante, enquanto que para os outros solos variou de 53,7 a 69,9%. Os autores argumentaram que a maior perda de massa se deu pela maior presença de microrganismos apropriados para a degradação enzimática de alginato neste tipo de solo.

2.2.2. Degradação enzimática de quitosana

A degradação enzimática de quitosana ocorre através da clivagem das ligações glicosídicas entre as unidades glucosamina-glucosamina, glucosamina-N-acetil-glucosamina e N-acetil-glucosamina-N-acetil-glucosamina. Apesar de as enzimas responsáveis pela degradação de quitosana também serem capazes de degradar unidades de quitina, e vice-versa, a taxa de degradação da quitosana é inversamente proporcional ao seu grau de desacetilação (GUARINO *et al.*, 2015).

Primeiramente, a quitosana é degradada pela lisozima, produzindo oligossacarídeos, de forma endolítica. Em seguida, as frações remanescentes são degradadas a monossacarídeos pela enzima N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAGase), de modo exolítico (Figura 6).

Figura 6 – Degradação endo e exolítica da quitosana.



Fonte: O autor, 2023.

Lončarević, Ivanković e Rogina (2017) estudaram a influência do pH do meio na degradação *in vitro* de materiais à base de quitosana pela enzima lisozima. Para isto, os autores imergiram o material em solução tampão de fosfato em pH 7,4 e em água destilada. O método adotado para se avaliar a biodegradação foi a perda de massa. Ao longo de 4 semanas, os autores monitoraram a degradação enzimática do material, medindo sua diferença de massa. A cada 3 dias, a solução de lisozima era reintroduzida no sistema, de modo que a enzima estivesse sempre disponível no meio. A cada semana, as amostras eram retiradas, lavadas com água destilada e secas em estufa a 50 °C até massa constante. Os autores realizaram os mesmos ensaios sem a lisozima, como controle. Além da perda de massa, os autores

utilizaram técnicas como a espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR), para analisar a composição química, e microscopia eletrônica de varredura (SEM), para analisar a morfologia do material. Através do FTIR, os autores constataram que a lisozima estava aderindo ao material de quitosana, o que possibilita a clivagem da ligação glicosídica (efeito da lisozima). As análises morfológicas não revelaram significativa diferença nos materiais em solução tampão e em água, entretanto, o material em solução tampão se apresentou com irregularidades na estrutura e sinais de quebra, o que indica a degradação. Portanto, os autores atribuíram ao pH a diferença de atividade da lisozima, uma vez que, em pH maior, a ação da mesma é incentivada. Os ensaios de perda de massa não demonstraram significativa diferença.

Até o presente momento, a literatura carece de estudos no solo que tratem sobre a degradação enzimática de materiais à base de quitosana e também de alginato.

Nesta Dissertação foi realizado o estudo da biodegradabilidade, em solo argiloso, de hidrogéis formados pelo complexo polieletrólítico constituído por ambos polissacarídeos (alginato e quitosana), além da investigação do gênero dos microrganismos que estariam atuando sobre a biodegradação.

3. METODOLOGIA

Nesta Dissertação, além das vidrarias comumente utilizadas em laboratório, foram utilizados os seguintes materiais e equipamentos, seguindo a metodologia explicitada.

3.1. Materiais

- Alginato de sódio - Procedência: Sigma-Aldrich Corporation; massa molecular: 500.000 – 2000.000 Da;
- Quitosana - Procedência: Sigma-Aldrich Corporation; massa molecular: 190.000 – 310.000 Da;
- Ácido acético - Procedência: Vetec; grau de pureza: P.A., foi usado como recebido;
- NaOH – Procedência: Vetec; grau de pureza: P.A., foi usado como recebido;
- CaCl₂ – Procedência: Proquimios; grau de pureza: P.A., foi usado como recebido;
- Solo argiloso obtido de uma propriedade privada da região norte fluminense do Estado do Rio de Janeiro;
- NaCl – Procedência: Vetec; grau de pureza: P.A., foi usado como recebido;
- Meio de cultura *Sabouraud* – Procedência: Kasvi, foi usado como recebido;
- Meio de cultura *Plate Count Agar* (PCA) – Procedência: Himedia, foi usado como recebido;
- Dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) – Procedência: Sigma-Aldrich Corporation;
- Isotiocianato de rodamina B (RdB) – Procedência: Sigma-Aldrich Corporation;
- Etanol – Procedência: Vetec; grau de pureza: P.A., foi usado diluído e como recebido;
- Formaldeído – Procedência: Electron Microscopy Sciences; solução aquosa 32% m/v, foi usado diluído;
- Glutaraldeído – Procedência: Electron Microscopy Sciences; solução aquosa 25% m/m, foi usado diluído;
- Cacodilato de sódio tri-hidratado – Procedência: Electron Microscopy Sciences; grau de pureza: P.A., foi usado em solução tampão;

- Tetróxido de ósmio – Procedência: Polysciences; grau de pureza: 99,95%, foi usado em solução 0,2%;
- Ferrocianeto de potássio – Procedência: Sigma Aldrich; grau de pureza: P.A., foi usado diluído.

3.1.1. Equipamentos

- Agitador magnético com aquecimento, modelo Ceramag Midi¹;
- Agitador mecânico¹
- Balança analítica – Shimadzu, modelo AY220¹;
- Medidor de pH portátil – Tecnopon, modelo MPA 210¹;
- Liofilizador de bancada – Terroni, modelo Interprise I - D¹;
- Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier – Perkin Elmer, modelo Spectrum One²;
- Analisador Termogravimétrico (TGA) – TA Instruments, modelo Q50 V6.7 Build 203²;
- Microscópio Eletrônico de Varredura (SEM) – JEOL, modelo JSM-6510LV³;
- Espectrômetro FT-Raman – Bruker, modelo MultiRAM⁴;
- Microscópio confocal – Leica, modelo TCS-SPE⁵;
- Autoclave vertical – Phoenix, modelo AV 75⁶;
- Estufa de incubação – Fanem, modelo 347 CDG⁶;
- Estufa para cultivo bacteriano – Nova ética, modelo D-411⁶;
- *Shaker* orbital – Tecnal, modelo TE-420⁶;
- Ponto crítico automático de CO₂ – Leica, modelo EM CPD300³;
- Microscópio Eletrônico de Varredura (SEM) – Zeiss, modelo Auriga Compact⁷;
- Microscópio Ótico Biológico Trinocular – modelo DI-136T⁸

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

²Laboratório de Caracterização Instrumental I - Instituto de Química/UERJ;

³Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura - Instituto de Química/UERJ;

⁴Laboratório Multiusuário de Espectroscopia – Instituto de Química/UFF;

⁵Unidade Multiusuária de Microscopia Confocal – ICB/FCM/UFRJ;

⁶Laboratório de Bioprocessos – Instituto de Química/UERJ;

⁷Unidade de Pesquisa Urogenital – IBRAG/UERJ;

⁸LaborSolo – Londrina/PR.

3.2. Preparo dos hidrogéis

O preparo dos hidrogéis à base de alginato de sódio (ALG) e quitosana (QUI) se deu de acordo com a metodologia e as melhores condições reacionais obtidas por Costa (2018) (Tabela 1). A proporção molar utilizada (ALG:QUI) foi de 4,68 (ROCHA; SILVA; FERREIRA, 2019). O alginato de sódio utilizado apresentou 62,8% de unidades M e 37,2% de unidades G (COSTA *et al.*, 2017) e a quitosana apresentou grau de desacetilação (GD) igual a 94% (COSTA; FERREIRA; CRUZ, 2016).

Tabela 1 – Condições reacionais para o preparo dos hidrogéis à base de alginato de sódio e quitosana.

Proporção ALG:QUI (% m/v)	Razão volumétrica	pH*	Temperatura (°C)
3,0:1,5	1:1	6	50

*Ajuste de pH com solução de NaOH 1,0 mol/L.

Fonte: O autor, 2023.

Os hidrogéis produzidos foram acondicionados em béqueres de 10 mL e envolvidos individualmente com filme de poli(cloreto de vinila) (PVC), com o intuito de manter as dimensões dos mesmos mais próximas possíveis umas das outras (Figura 7). As dimensões dos hidrogéis liofilizados, em forma cilíndrica, foram de, aproximadamente, 3 cm de altura e 1,5 cm de diâmetro.

Figura 7 – Hidrogéis protegidos individualmente com filme de PVC.



Fonte: O autor, 2023.

3.3. Coleta e preparo do solo

O solo foi coletado manualmente, com auxílio de ferramentas comuns, de uma propriedade situada no município de Campos dos Goytacazes, região norte fluminense do Estado do Rio de Janeiro (latitude $21^{\circ}14'55''$ Sul e longitude $41^{\circ}19'23''$ Oeste), durante o verão do ano de 2022, e armazenado em bombonas plásticas de 50 L de capacidade (Figura 8). Durante a coleta, o solo estava úmido e precisou ser posteriormente exposto ao ar para secagem.

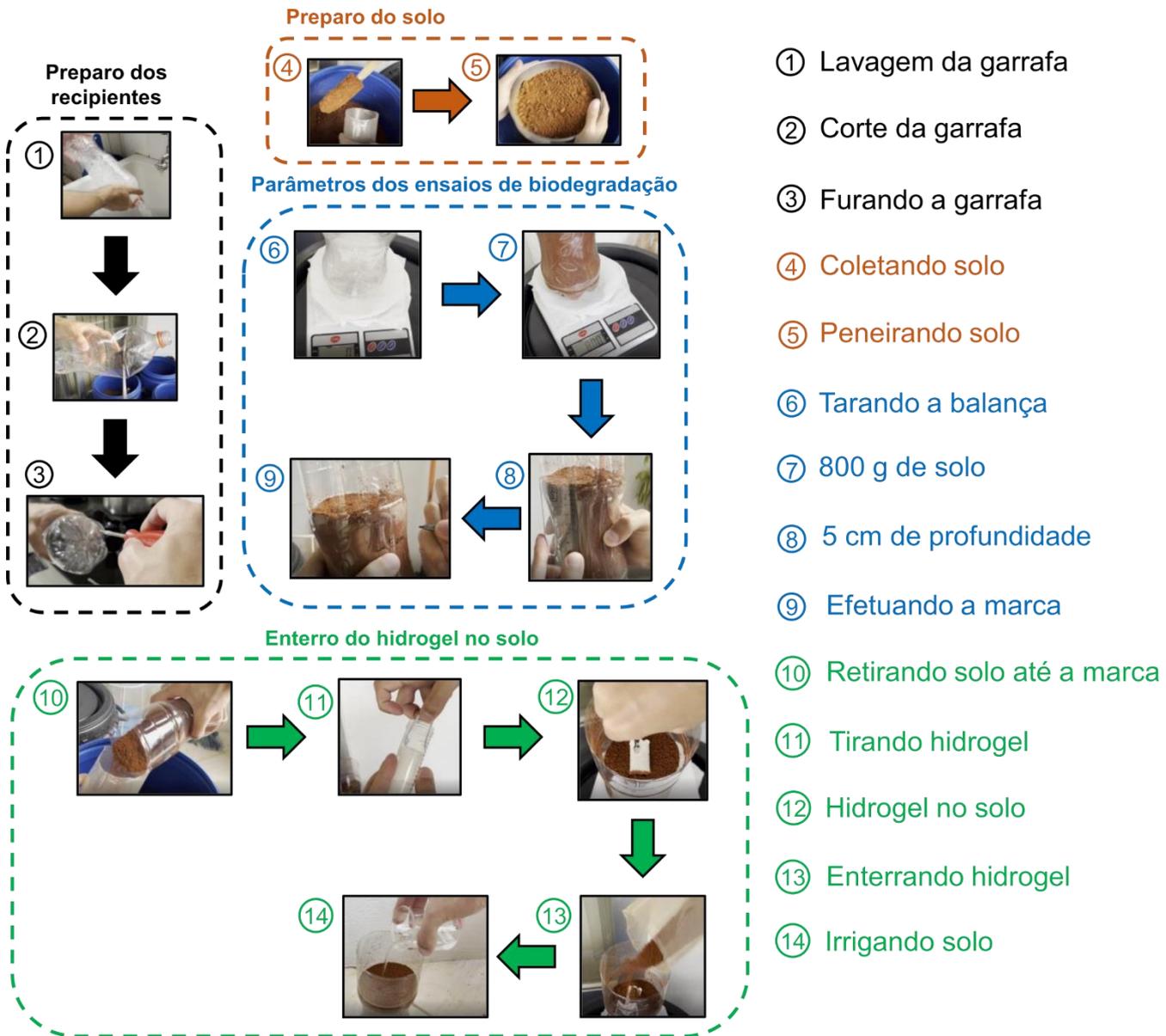
Figura 8 – Solo armazenado em bombonas plásticas.



Fonte: O autor, 2023.

Após a coleta e secagem ao ar, o solo foi peneirado com peneira granulométrica em aço inox de malha ASTM 10 – Tyler 9 *mesh* – 2 mm (Figura 9 – Preparo do solo). Tal procedimento foi adotado como meio para homogeneizar o solo fisicamente, com o intuito de se considerar os sistemas similares uns aos outros. A malha de 2 mm foi escolhida para se excluir pedras, pedregulhos e outros objetos do solo que possam interferir na percolação da água de irrigação, como raízes soltas, por exemplo, de acordo com a norma 6502/95 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT/NBR) (Tabela 2).

Figura 9 – Esquema metodológico dos ensaios de biodegradabilidade dos hidrogéis.



Fonte: O autor, 2023.

Tabela 2 – Distribuição do tamanho de partículas do solo.

Classificação	Diâmetro médio dos grãos (mm)
Pedregulho	60 - 2,0
Areia	2,0 - 0,06
Silte	0,06 – 0,002
Argila	< 0,002

Fonte: O autor, 2023.

3.4. Avaliação da biodegradabilidade dos hidrogéis em solo argiloso

A biodegradabilidade em solo foi estudada através do enterro direto das amostras de hidrogéis em sistemas individuais.

3.4.1. Ensaio de biodegradação

Primeiramente, os recipientes, usados nos ensaios de biodegradação, foram lavados com detergente, recortados e furados cinco vezes no fundo, para se evitar o acúmulo de água ao longo da irrigação (Figura 9 – Preparo dos recipientes).

Em seguida, 800 gramas de solo, coletado e preparado de acordo com o item 3.3, foram adicionados ao recipiente e uma profundidade de 5 cm foi registrada com régua e caneta.

Por último, retirou-se parte do solo até a marca previamente registrada, o hidrogel foi cuidadosamente adicionado ao solo na posição horizontal e o solo retirado foi recolocado por cima do hidrogel, enterrando-o apropriadamente (SENNA; BOTARO, 2017). Os sistemas foram irrigados diariamente com 30 mL de água da torneira, com o objetivo de manter o solo friável (situação na qual o solo não está seco nem úmido) (EMBRAPA, 1993) (Figura 9 – Enterro do hidrogel no solo).

Os parâmetros utilizados nestes ensaios, 800 g de solo e 5 cm de profundidade de enterro, foram escolhidos de acordo com a massa de solo necessária para as análises físico-química e microbiológica realizadas pela empresa LaborSolo; e a profundidade média de enterro de sementes de soja, respectivamente.

Para a avaliação da biodegradação, as amostras de hidrogel foram retiradas do solo após diferentes tempos (1, 2, 3, 4, 5 e 7 dias. Após o sétimo dia, os hidrogéis foram retirados a cada semana). Em seguida, as amostras foram lavadas apropriadamente, tomando cuidado para que o material não fosse perdido, e liofilizadas durante 48 horas.

Os recipientes com solo foram mantidos em local aberto, porém sem incidência direta de luz solar durante a maior parte do dia. Tais experimentos de enterro em solo foram realizados em triplicata para cada tempo determinado (Figura 10).

Figura 10 – Recipientes com solo e hidrogel.



Fonte: O autor, 2023.

3.5. Acompanhamento do solo ao longo da biodegradação

Com o objetivo de se avaliar a influência da variação do pH do solo, durante o tempo dos ensaios de biodegradação, bem como a influência da umidade do solo, tais parâmetros foram determinados ao longo de todo tempo de ensaio.

3.5.1. Determinação do pH

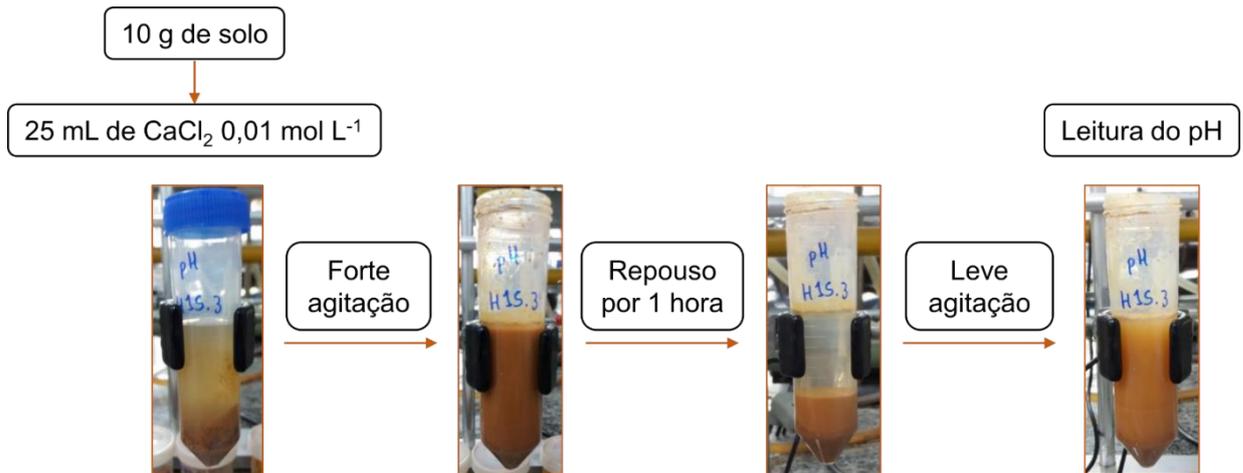
O pH do solo ao longo do tempo foi determinado de acordo com a metodologia utilizada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) (2017), na proporção 1:2,5 em solução de CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

Primeiramente, 10 g de solo são adicionados em 25 mL de solução aquosa de CaCl_2 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e a mistura é agitada fortemente. Após a agitação, deixou-se em repouso a mistura durante uma hora. Após o tempo, uma leve agitação fez-se necessária, para homogeneizar a suspensão, onde a leitura de pH foi realizada com

o auxílio de um pHmetro de bancada. A Figura 11 ilustra o processo metodológico utilizado.

Este procedimento foi realizado em triplicata, tanto para o solo com hidrogel, quanto para o solo sem hidrogel (branco).

Figura 11 – Esquema metodológico para a determinação do pH do solo ao longo do tempo.



Fonte: O autor, 2023.

3.5.2. Determinação da umidade

A umidade do solo ao longo dos ensaios de biodegradação foi determinada de acordo com a norma ABNT/NBR 6457/2016, onde foi empregado o método da estufa. Este método consiste em determinar, através de uma balança analítica, a massa da amostra de solo úmido e a massa da mesma amostra após secagem em estufa a 110 °C durante 16 a 24 horas.

Para isto, amostras de 30 gramas de solo foram retiradas após os tempos pré-determinados de biodegradação dos hidrogéis e postos em cápsulas metálicas ($m_{\text{cap.}}$) (Figura 12).

Figura 12 – Solo úmido em cápsulas metálicas.



Fonte: O autor, 2023.

Em seguida, a massa total foi medida ($m_{\text{cap.} + \text{solo úmido}}$) e a cápsula com solo foi levada à estufa a 110 °C durante 16 a 24 horas. Após a completa secagem, a massa foi novamente medida em balança analítica ($m_{\text{cap.} + \text{solo seco}}$). Com estes valores registrados, o teor de umidade (U %) do solo pôde ser calculado através das Equações 1, 2 e 3.

$$m_{\text{água}} = m_{\text{cap.} + \text{solo úmido}} - m_{\text{cap.} + \text{solo seco}} \quad (1)$$

$$m_{\text{solo seco}} = m_{\text{cap.} + \text{solo seco}} - m_{\text{cap.}} \quad (2)$$

$$U (\%) = \frac{m_{\text{água}}}{m_{\text{solo seco}}} \times 100 \% \quad (3)$$

Este procedimento foi realizado em triplicata, tanto para o solo com hidrogel quanto para o solo sem hidrogel (branco).

Com o objetivo de determinar o *plateau* dos valores de umidade, foi realizada análise estatística ANOVA de fator único com 95% de nível de confiança. Neste caso, a hipótese nula (H_0) indica que as médias utilizadas possuem diferenças significativas entre si. Por outro lado, quando a análise ANOVA concebe valores de p acima de 0,05, as médias das amostras são consideradas, com 95% de confiança, iguais. Neste trabalho, tal análise pode ser realizada para se observar a partir de quanto

tempo os valores de umidade do solo, com e sem hidrogel, podem ser considerados similares, ou seja, quando o *plateau* é alcançado.

3.6. Análise físico-química e microbiológica do solo antes e após o enterro do hidrogel

O solo coletado foi analisado, antes e depois do tempo máximo de ensaio de biodegradação, para se avaliar alguns parâmetros importantes, como o teor de carbono orgânico, níveis de fósforo, potássio, entre outros. As análises físico-química e microbiológica do solo foram conduzidas pela empresa Laborsolo (Londrina, PR).

Em relação às análises microbiológicas, foi utilizado o microscópio ótico, realizando a contagem manual de fungos e bactérias de acordo com os parâmetros utilizados pelo operador (tamanho da lamínula, quantidade de amostra e diluições utilizadas na análise).

3.7. Caracterização dos hidrogéis antes e após a biodegradação

Os hidrogéis, antes e após a biodegradação, foram caracterizados pelas seguintes técnicas:

- Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), para observar possíveis mudanças na composição química do hidrogel;
- Espectroscopia Raman, com o mesmo objetivo das análises de FTIR, porém, sendo uma técnica complementar pela diferente regra de seleção;
- Análise termogravimétrica (TG), objetivando estudar a mudança, ou não, na resistência térmica dos hidrogéis de acordo com a biodegradação;
- Microscopia eletrônica de varredura (SEM), a fim de se observar mudanças na morfologia do hidrogel de acordo com a biodegradação;
- Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM), como técnica complementar ao SEM.

3.7.1. Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

A composição química dos hidrogéis, antes e após a biodegradação, foi analisada por espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier com acessório de reflectância total atenuada (ATR). As análises foram feitas na faixa espectral de $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$ (COSTA *et al.*, 2022).

3.7.2. Espectroscopia Raman

Os hidrogéis, antes e após a biodegradação, foram analisados, em termos de suas composições químicas, através da Espectroscopia Raman. O equipamento utilizado foi o Espectrômetro MultiRAM FT-Raman – Bruker, com detector de germânio e fonte de excitação a laser de 1064 nm.

3.7.3. Termogravimetria (TG)

Os hidrogéis, antes e após a biodegradação, tiveram as temperaturas de seus estágios de degradação determinadas por TG, utilizando um analisador termogravimétrico TA *Instruments*, modelo Q50 V6.7 Build 203, através do 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 (T_{onset} – temperatura inicial de degradação térmica), e através do ponto máximo da curva de DTG para determinado pico ($T_{\text{máx.}}$ – temperatura na qual a degradação térmica atinge a velocidade máxima) (NAKAMURA *et al.*, 1992). As amostras foram aquecidas de 50 a 800 °C, a 20 °C/min em atmosfera de nitrogênio (fluxo de 100 mL/min).

3.7.4. Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

A morfologia dos hidrogéis, antes e após a biodegradação, foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (SEM) com voltagem de operação de 5kV e distância de trabalho (WD) de 12 mm, sob atmosfera de nitrogênio. As amostras liofilizadas foram cortadas com uma lâmina, com o intuito de se observar a parte interna, fixadas em suporte adequado com fita de carbono e analisadas em microscópio eletrônico JEOL, modelo JSM-6510LV e não necessitaram de metalização (COSTA *et al.*, 2022).

3.7.5. Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM)

Os hidrogéis após a biodegradação foram analisados por microscopia confocal pelo equipamento LEICA modelo TCS-SPE, com laser de iodo. Com o intuito de se rotular os polissacarídeos, foram utilizadas as substâncias 4'-6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), para o alginato de sódio, e isotiocianato de rodamina B (RdB), para a quitosana. O DAPI absorve luz entre 350 e 400 nm, emitindo coloração azul entre 420 e 461 nm, enquanto o RdB absorve luz entre 495 e 570 nm, emitindo coloração vermelha entre 525 e 590 nm, aproximadamente (COSTA *et al.*, 2022). A fonte de excitação foi usada em 405 nm para o DAPI e em 532 nm para o RdB.

3.8. Estudo da população fúngica e bacteriana em solo argiloso

O estudo da população fúngica e bacteriana em solo argiloso foi feito de acordo com as seguintes etapas:

- Preparo das soluções salinas
- Incorporação do solo em solução salina
- Diluição da mistura de solo em solução salina
- Preparo das placas para observação de fungos e bactérias
- Isolamento dos fungos

- Observação do crescimento fúngico em meio de cultura deficiente em nutrientes
- Observação morfológica dos fungos

3.8.1. Preparo das soluções salinas

Primeiramente, foram preparados 600 mL de solução de cloreto de sódio 3,5 % (m/v) em água destilada, visando minimizar efeitos osmóticos durante a remoção dos microrganismos do solo para a fração líquida. Desta solução, 200 mL foram utilizados para se preparar o meio de cultura *Sabouraud*, que favorece o crescimento de fungos, e 200 mL foram utilizados para se preparar o meio de cultura *Plate Count Agar* (PCA), que favorece o crescimento de bactérias. Cabe ressaltar que essa “preferência” microbiana não exclui a possibilidade de crescimento de um tipo de microrganismo em outro meio de cultura. Outros 90 mL foram utilizados para a incorporação do solo, enquanto 45 mL foram distribuídos em cinco tubos de ensaio, isto é, 9 mL para cada tubo.

A composição dos meios de cultura pode ser evidenciada na Tabela 3.

Tabela 3 – Composição dos meios de cultura (formulação típica do fabricante).

Componente	Meio <i>Sabouraud</i> (g/L)	Meio PCA (g/L)
Dextrose	40,0	1,0
Peptona	5,0	---
Caseína	5,0	5,0
Ágar	15,0	15,0
Extrato de levedura	---	2,5

Fonte: O autor, 2023.

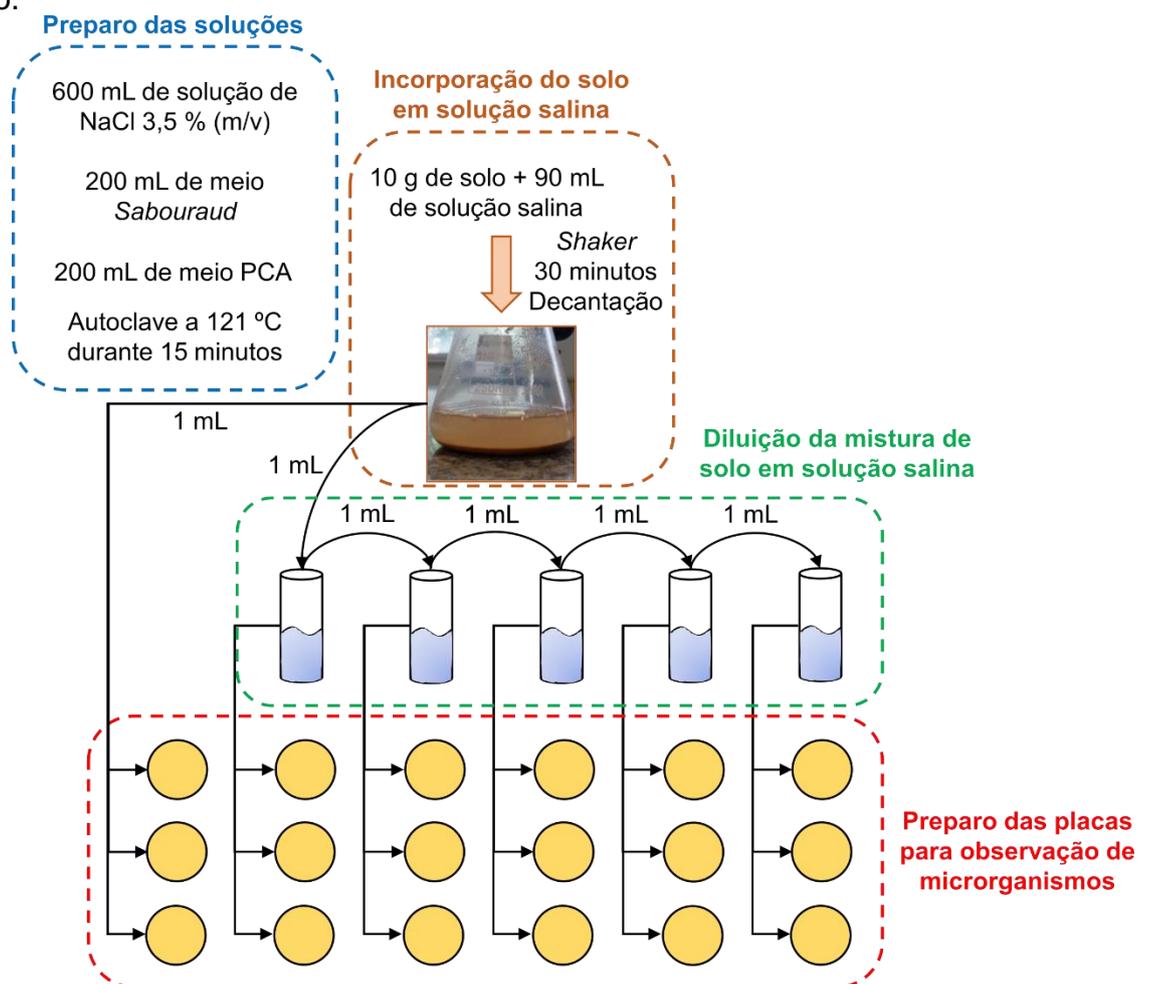
Após o preparo, os dois meios de cultura, a solução salina, os tubos de ensaio e 15 pipetas de 1 mL cada foram introduzidos em autoclave à 121°C durante 15 minutos, com o intuito de se esterilizar todos os materiais a serem utilizados.

3.8.2. Incorporação do solo em solução salina

O objetivo deste procedimento é fazer com que os possíveis microrganismos do solo passem para a fração líquida (solução salina), facilitando, assim, o trabalho de detecção de fungos e bactérias no solo, que passa então a ser feito na fração líquida.

Para a incorporação do solo em solução salina, utilizou-se 10 g de solo argiloso e 90 mL da solução salina preparada e esterilizada. A mistura foi feita em Erlenmeyer de volume apropriado e a agitação foi realizada durante 30 minutos a 100 rpm em *shaker* orbital sem controle de temperatura. A mistura obtida foi deixada em repouso, a fim de se decantar o excesso de solo (Figura 13 – Incorporação do solo em solução salina).

Figura 13 – Esquema da metodologia para observação de microrganismos em solo argiloso.



3.8.3. Diluição da mistura de solo em solução salina

A solução salina esterilizada foi utilizada para a diluição sucessiva da mistura de solo em solução salina. Esse procedimento objetiva evitar o crescimento excessivo dos microrganismos numa única placa de Petri, impedindo a adequada avaliação do crescimento microbiano. Tal passo é necessário pela complexidade e riqueza de microrganismos comumente presentes em solo. Logo, de acordo com a diluição sucessiva, espera-se que os microrganismos cresçam de forma mais moderada em relação à mistura pouco diluída.

Após aproximadamente 30 minutos, para a decantação do excesso de solo, foi retirado 1 mL da fração aquosa e adicionado no primeiro tubo de ensaio. Em seguida, após curta agitação manual, 1 mL do primeiro tubo de ensaio foi retirado e adicionado ao segundo tubo de ensaio, e assim sucessivamente até a quinta diluição (Figura 13 – Diluição da mistura de solo em solução salina). Convém lembrar que cada tubo de ensaio continha 9 mL de solução salina, portanto, a mistura resultante do segundo tubo de ensaio é dez vezes mais diluída que a solução do primeiro tubo de ensaio. Tal procedimento foi continuado até o quinto tubo de ensaio. Todo esse processo foi feito em câmara de fluxo laminar, previamente esterilizada com radiação UV.

3.8.4. Preparo das placas para observação de fungos e bactérias

O preparo das placas foi realizado em triplicata, para cada diluição, e utilizando-se a técnica de *pour-plate*, vertendo-se a fração aquosa do solo sobre a placa vazia e, em seguida, o meio de cultura sobre a mistura com os microrganismos (Figura 13 – Preparo das placas para observação de microrganismos). Tal procedimento é mais vantajoso, em relação à ordem contrária (fração aquosa do solo sobre o meio de cultura), porque aumenta a possibilidade do desenvolvimento de microrganismos que não possuem boa relação com o oxigênio.

Primeiramente, as placas de Petri, esterilizadas, foram identificadas em relação ao meio (PCA ou *Sabouraud*) e em relação à diluição sucessiva em tubos de ensaio (0, para nenhuma diluição, até 5, para cinco diluições). Em seguida, utilizando-se as pipetas esterilizadas em autoclave, 1 mL da fração aquosa original foi

adicionado em três placas de Petri. O mesmo procedimento foi realizado com o tubo de ensaio 10 vezes diluído, porém em outras três placas de Petri. Repetiu-se o procedimento com todos os tubos de ensaio, originando, portanto, dezoito placas de Petri com meio *Sabouraud* e outras dezoito placas de Petri com meio PCA.

As placas com os meios foram, então, acondicionadas em incubadoras com temperatura adequada para o crescimento de fungos e bactérias. Para o crescimento de fungos, as placas com meio *Sabouraud* foram colocadas em incubadora a 20 °C, e para o crescimento de bactérias, as placas com meio PCA foram colocadas em incubadora a 30 °C.

Convém lembrar que todo o preparo das placas foi realizado em câmara de fluxo laminar previamente esterilizada com UV, para evitar a contaminação das mesmas, a fim de se assegurar que os fungos e bactérias observados posteriormente fossem realmente provenientes do solo utilizado.

3.8.5. Isolamento dos fungos e bactérias

Após uma semana de incubação, as placas de Petri (em triplicata) foram avaliadas quanto ao crescimento de fungos e bactérias. É de se esperar, nessa etapa do trabalho, que vários fungos e bactérias cresçam de forma simultânea numa mesma placa de Petri. Isso acontece pois os meios PCA e *Sabouraud* são adequados para o crescimento bacteriano e fúngico, respectivamente. Isso, entretanto, não significa que esses meios sejam seletivos ou específicos para esses grupos microbianos.

Dessa forma, para cada placa de Petri, onde se observou crescimento microbiano (fúngico ou bacteriano), conforme descrito na etapa anterior, os fungos foram então transferidos, individualmente, para novas placas de Petri contendo meio *Sabouraud*. O procedimento foi feito em câmara de fluxo laminar com o auxílio de *swabs* estéreis para retirada de cada fungo crescido que então foi individualmente transferido para novas placas de Petri. Uma vez feita a transferência dos fungos, as placas foram novamente incubadas a 20 °C por uma semana.

3.8.6. Observação do crescimento fúngico em meio de cultura deficiente em nutrientes

Com o objetivo de se observar a influência dos hidrogéis no crescimento dos fungos isolados, foram preparadas placas de Petri em quatro diferentes situações, organizadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Organização das placas de Petri preparadas para observação do crescimento fúngico em meio de cultura deficiente em nutrientes.

Meio utilizado	Presença do material	Identificação
<i>Sabouraud</i>	Sem hidrogel	SF
<i>Sabouraud</i>	Com hidrogel	SHF
Ágar	Sem hidrogel	AF
Ágar	Com hidrogel	AHF

Fonte: O autor, 2023.

As placas identificadas como SHF contiveram meio *Sabouraud*, hidrogel e os fungos isolados. O objetivo do preparo destas placas foi de observar a influência da presença do hidrogel no crescimento destes fungos, isto é, se o hidrogel permite, inibe ou estimula o crescimento. Para fins de comparação, foram preparadas, também, placas com meio *Sabouraud* sem hidrogel, utilizadas como controle positivo, uma vez que o crescimento destes fungos já tinha sido observado em experimentos anteriores.

Para observar se o hidrogel permite o crescimento destes fungos em um meio sem nutrientes, foram preparadas placas com ágar e com o hidrogel. Desta vez, o objetivo foi de observar se o crescimento fúngico era possível apenas às custas dos componentes do hidrogel (alginato de sódio e quitosana). Como controle negativo, foram preparadas placas contendo apenas meio ágar e os fungos. Foi possível utilizar estas placas como controle negativo pelo fato de o ágar não ser utilizado como fonte de carbono para microrganismos, de forma geral, logo, a diferença do crescimento fúngico entre essas duas placas (ágar com hidrogel e ágar sem hidrogel) provaria que os fungos isolados do solo estão utilizando os hidrogéis à base de alginato de sódio e quitosana como fonte de carbono.

Para o preparo das placas com hidrogel, o material foi recortado em lâminas com o auxílio de uma tesoura. Os pedaços de hidrogel, como foram colocados nas placas, podem ser visualizados na Figura 14.

Figura 14 – Pedaços de hidrogel utilizados para o preparo das placas de Petri.



Fonte: O autor, 2023.

Os pedaços de hidrogel recortados foram postos nas placas, mantidos no centro por um cotonete e o meio (ágar ou *Sabouraud*) foi vertido por cima. As soluções de *Sabouraud* (65,0 g/L) e ágar (20,0 g/L) foram preparadas e devidamente esterilizadas em autoclave a 121 °C, 1 atm, durante 15 minutos. Todo o processo de preparo das placas foi realizado em câmara de fluxo laminar, esterilizada com UV.

É importante lembrar que o ágar, sem hidrogel, é utilizado como controle negativo pelo fato de os microrganismos, de modo geral, não utilizarem o mesmo como fonte nutritiva para crescimento. Todas as placas, para cada um dos fungos, foram preparadas em triplicata, totalizando noventa e seis placas.

3.8.7. Observação morfológica dos fungos

As placas contendo hidrogel e fungo em ágar foram analisadas por SEM com o intuito de se observar características morfológicas dos fungos, bem como a interação dos mesmos com o material, quando possível. Para isto, as placas permaneceram em estufa de incubação durante sete dias, para crescimento dos fungos. Em seguida, o hidrogel foi cortado em forma de trapézios (para se observar qual é o lado de cima depois do procedimento) e colocado em solução de Karnovsky

(4,0% formaldeído + 2,5% glutaraldeído em tampão cacodilato 0,1 M em Ph 7,2), para a fixação dos fungos, durante 24 horas. Em seguida, as amostras foram lavadas com tampão cacodilato e pós-fixadas com tetróxido de ósmio (OsO_4) 0,2% em ferrocianeto 1:1 em água durante 40 minutos. Após esta etapa, as amostras foram lavadas em água e desidratadas em concentrações crescentes de etanol (30%, 40%, 50%, 70% e 100%), durante 10 minutos para cada concentração. A desidratação com álcool absoluto (100%) foi realizada três vezes. As amostras foram secas por ponto crítico de CO_2 , fixadas em suporte adequado, metalizadas com ouro e analisadas por SEM a 3,00 Kv, com variadas distâncias de trabalho, de acordo com a necessidade da análise, utilizando microscópio eletrônico Zeiss, modelo Auriga Compact (TORRES *et al.*, 2020). As imagens foram obtidas com detector de elétrons secundários.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão discutidos os resultados obtidos em relação à degradação do hidrogel, ao solo e suas modificações ao longo do estudo e a avaliação microbiológica.

4.1. Análise físico-química e microbiológica do solo antes e após o enterro do hidrogel

As análises físico-química e microbiológica do solo, antes e após oito semanas de enterro do hidrogel, foram realizadas pela empresa LaborSolo – Londrina/PR.

Os resultados da análise física do solo estão evidenciados na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados da análise física do solo antes e após oito semanas de ensaio.

Solo	Classe textural	Granulometria		
		Areia total (%)	Silte (%)	Argila (%)
Antes da biodegradação	Argiloso	18	22	60
Após a biodegradação	Argiloso	30	16	54

Fonte: O autor, 2023.

O solo em estudo, teve sua classe textural comprovada, através da análise física, como argiloso, devido ao alto teor de argila.

A fertilidade do solo é influenciada diretamente pela disponibilidade de nutrientes no mesmo. Neste sentido, existem os macronutrientes, primários e secundários, catiônicos e aniônicos, e os micronutrientes. Os macronutrientes primários são necessários em maiores quantidades para o crescimento das plantas do que os macronutrientes secundários e micronutrientes.

Os macronutrientes primários são: nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K). Os secundários são: cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S). Os micronutrientes, por sua vez, são: boro (B), cloro (Cl), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), molibdênio (Mo) e zinco (Zn). Existem outros nutrientes, ainda, considerados essenciais para

algumas plantas, como: sódio (Na), cobalto (Co), vanádio (V), níquel (Ni) e silício (Si) (LOPES, 1998). Os resultados da análise química do solo, antes e após o enterro dos hidrogéis, estão mostrados na Tabela 6.

Tal análise foi importante para averiguar se a degradação do hidrogel poderia influenciar na fertilidade do solo.

Tanto os macronutrientes quanto os micronutrientes são essenciais para a fertilidade do solo, porém, os macronutrientes primários geralmente se tornam deficientes antes dos macronutrientes secundários e micronutrientes, pelo maior consumo.

A diminuição do nível de P, tanto pelo método Mehlich 1 quanto pelo Mehlich 3 (Tabela 6), indica o consumo deste macronutriente aniônico. Por outro lado, o aumento do enxofre, como sulfato (SO_4^{2-}), pode ser proveniente dos próprios microrganismos, o que indicaria um aumento na população microbiana do solo.

Em relação aos macronutrientes catiônicos analisados, o sutil aumento no nível de Na^+ pode ser proveniente da degradação do alginato de sódio, constituinte do hidrogel utilizado para os ensaios.

Destaca-se, entre os micronutrientes, o elevado nível de Fe^{2+} , o que indica a característica avermelhada do solo (argissolo vermelho), encontrado em maior proporção na região de onde foi retirado o solo argiloso utilizado nesta Dissertação (EMBRAPA, 2021). Esta coloração está relacionada à presença de óxidos de ferro, como a hematita (Fe_2O_3). Apesar de o nível indicado ser de Fe^{2+} , o mesmo pode ser facilmente oxidado a Fe^{3+} .

Os ânions presentes no solo, como o SO_4^{2-} e o fósforo, são responsáveis por atrair e reter as partículas positivas, os cátions. Estes cátions podem ser trocados entre si. Por exemplo, o Ca^{2+} retido em uma partícula de SO_4^{2-} pode ser trocado por outra partícula de K^+ . A capacidade de troca de cátions (CTC) é a reflexão do número total de cátions encontrados no solo, distribuídos em macro e micronutrientes.

A CTC em pH 7,0 é o valor encontrado neste pH, enquanto a CTC efetiva é o valor no pH natural em que o solo se encontra. Em ambos os casos, houve a diminuição na CTC (Tabela 6), o que indica uma diminuição na fertilidade do solo, uma vez que quanto maior o nível de CTC, maior é considerada a fertilidade do solo.

Tabela 6 – Resultados da análise química do solo antes e após oito semanas de ensaio.

Solo	Macronutrientes aniônicos (mg/dm ³)			Macronutrientes catiônicos (cmol _d /dm ³)				
	Fósforo Mehlich 1	Fósforo Mehlich 3	SO ₄ ²⁻	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	
Antes da biodegradação	5,37	0,11	12,16	1,39	2,04	0,08	0,02	
Após a biodegradação	4,01	N.D.*	29,71	1,41	1,46	0,07	0,07	
Solo	CTC ¹ (cmol _d /dm ³)			Micronutrientes (mg/dm ³)				
	Matéria orgânica (g/dm ³)	pH 7,0	Efetiva ²	B	Cu ²⁺	Fe ²⁺	Mn ²⁺	Zn ²⁺
Antes da biodegradação	6,34	7,06	3,53	0,38	0,41	143,18	150,97	1,51
Após a biodegradação	4,23	6,36	3,01	0,42	0,26	115,62	117,11	1,11

* N.D. = Não detectado;

¹ CTC = capacidade de troca de cátions;

² CTC efetiva = capacidade de troca de cátions no pH natural do solo.

Fonte: O autor, 2023.

Outro fator importante para a fertilidade do solo é o teor de matéria orgânica. Na Tabela 6, foi possível observar a diminuição deste nível, o que também indica uma queda na fertilidade.

A lixiviação pela irrigação diária pode ser apontada como o principal fator da queda dos nutrientes. Além disto, a irrigação manteve ativo os microrganismos do solo, consumindo a matéria orgânica presente, ou seja, diminuindo seu nível.

A Tabela 7 evidencia os resultados das análises microbiológicas realizadas pela LaborSolo antes e após oito semanas de ensaio. Foi possível observar, de modo geral, um aumento significativo tanto no nível de bactérias quanto no nível de fungos. A população de bactérias, em $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ aumentou em, aproximadamente, 67 vezes. Enquanto a população de fungos benéficos aumentou em, aproximadamente, 9 vezes e a de fungos potencialmente patogênicos, capazes de causar doenças infecciosas, não foi detectada antes (N.D.) e passou a ser detectada após as 8 semanas de ensaio em $204 \mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Os esporos de fungos, antes não detectados (N.D.) e detectados com 270.489 indivíduos/ cm^3 após as 8 semanas de ensaio, são estruturas produzidas durante a reprodução, capazes de gerar novos indivíduos. O aumento no nível dos esporos de fungos pode ser justificado pelo próprio aumento dos fungos.

O aumento significativo, de modo geral, nos níveis microbianos pode ser justificado tanto pela adição diária de água, utilizado pelos microrganismos para seu crescimento, como pela adição dos hidrogéis em solo, que podem estar sendo utilizados pelos microrganismos como fonte de carbono.

Uma vez que a presença de microrganismos, em quantidades consideráveis, foi comprovada no solo, pode-se afirmar que o consumo dos hidrogéis durante os ensaios de enterro no solo se tratarão de uma biodegradação.

Tabela 7 – Resultados da análise microbiológica do solo antes e após oito semanas de ensaio.

Solo	Bactérias ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	Fungos benéficos ¹ ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	Fungos potencialmente patogênicos ² ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)	Relação Fungo:Bactéria (F:B)	Esporos de fungo (indiv./ cm^3)
Antes da biodegradação	10.094	11	N.D.*	0,001	N.D.
Após a biodegradação	677.041	100	204	0,0001	270.489

* N.D. = Não detectado.

¹ Fungos com coloração bem definida, sob o microscópio óptico, que possuem septos uniformes e distribuídos por toda hifa, além de citoplasma e estrutura das hifas bem uniformes.

² Fungos incolores, sob o microscópio óptico, que possuem septos e estrutura de hifas irregulares.

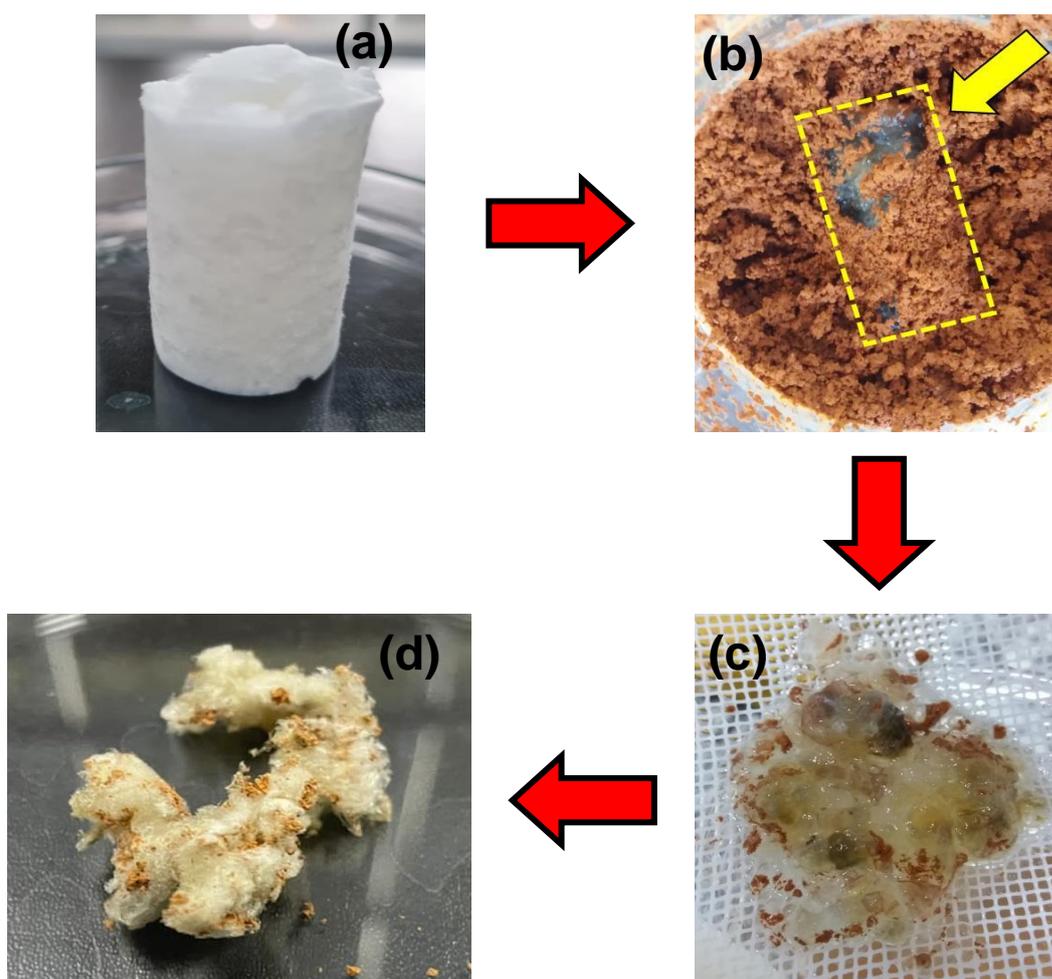
Fonte: O autor, 2023.

4.2. Avaliação da biodegradabilidade dos hidrogéis em solo argiloso

Ao longo de todo o estudo, os hidrogéis enterrados em solo argiloso foram sendo degradados, conforme a irrigação diária. A degradação enzimática da matéria orgânica utilizada pelos microrganismos é favorecida pela entrada de água. Portanto, hidrogéis feitos de polissacarídeos hidrofílicos (com grande quantidade de grupamentos polares, como COO^- , para o alginato, e $-\text{NH}_2$, para a quitosana) podem ser rapidamente biodegradados.

Nos tempos estudados, os hidrogéis foram removidos do solo, apropriadamente lavados e liofilizados (Figura 15).

Figura 15 – Hidrogel antes do enterro no solo (a); sendo removido do solo (b); lavado após o desenterro (c) e liofilizado após lavagem (d).



Fonte: O autor, 2023.

No período de tempo de um dia até duas semanas após o enterro no solo, conseguiu-se remover e lavar os hidrogéis, de forma que o solo fosse apropriadamente removido. Tornando possível assim, caracterizar as amostras desenterradas pelas respectivas técnicas: FTIR, Raman, TG, SEM e microscopia confocal.

Entre a terceira e a sexta semanas, foi possível retirar os hidrogéis do solo, porém, as amostras foram inteiramente perdidas durante a lavagem, não podendo ser recuperadas. Tal fato ocorreu, provavelmente, em função da degradação avançada das cadeias poliméricas.

Após a sexta semana, os hidrogéis estavam totalmente degradados, não sendo mais encontrados no solo.

Portanto, três situações foram evidenciadas: o hidrogel foi encontrado e pôde ser lavado sem ser desfeito (até 2 semanas de teste); o hidrogel foi encontrado, mas ao ser lavado, foi desfeito (3 até 6 semanas) e o hidrogel não foi encontrado (após 6 semanas).

Pode-se observar um efeito sinérgico entre o intumescimento (entrada de água) e a biodegradação sofrida pelo hidrogel. Quanto maior for o intumescimento, mais microrganismos tendem a entrar e ficar acoplados às paredes internas do hidrogel, favorecendo a biodegradação. Possivelmente, em duas semanas, a biodegradação sofrida pelo hidrogel não tenha sido suficiente para provocar o colapso das cadeias poliméricas. Entretanto, durante o período de três até seis semanas, com o avanço da biodegradação, foi possível observar nos hidrogéis, após serem desenterrados e lavados, o colapso das amostras. Após a sexta semana, foi observado um colapso intenso das cadeias pela biodegradação, consequência de um contato maior entre a superfície do material e os microrganismos, acelerando o consumo enzimático do hidrogel, isto é, sendo completamente biodegradado.

Os hidrogéis que puderam ser desenterrados com sucesso foram lavados, liofilizados, armazenados em dessecador para evitar a absorção de água da atmosfera e identificados de acordo com seus respectivos tempos de enterro no solo argiloso (Tabela 8).

Tabela 8 – Identificação dos hidrogéis degradados.

Hidrogéis degradados	
Tempo de enterro	Sigla
0 dia	H0D
1 dia	H1D
2 dias	H2D
3 dias	H3D
4 dias	H4D
5 dias	H5D
1 semana	H1S
2 semanas	H2S

Fonte: O autor, 2023.

Como visto no item 4.1. – *Análise físico-química e microbiológica do solo antes e após o enterro do hidrogel*, o fato da argila ser a fração do solo de menor granulometria corroborou com a impossibilidade de se calcular a perda de massa dos hidrogéis, gerando erros consideráveis nas medidas.

A perda de massa, inicialmente, deveria ser avaliada nos hidrogéis retirados do solo em um período de até duas semanas. Entretanto, isto não foi possível; dois fatores corroboraram para este resultado: a elevada porosidade do material e a granulometria do solo argiloso utilizado.

Por se tratar de um hidrogel altamente poroso em contato com um solo argiloso, a incorporação deste no interior dos poros foi extremamente elevada, ocasionando erros na medida da massa do hidrogel, mesmo após a sua lavagem. Em outras palavras, o hidrogel desenterrado permaneceu com resquícios de solo em seu interior, dificultando assim, o cálculo da perda de massa, o qual não pôde ser realizado.

4.3. Acompanhamento do solo durante os ensaios de biodegradação

O hidrogel utilizado nesta Dissertação, por ser um complexo polieletrólítico, tem a sua estabilidade intimamente relacionada ao pH do meio, uma vez que a proporção entre grupamentos ionizados de cada polissacarídeo influencia diretamente no grau

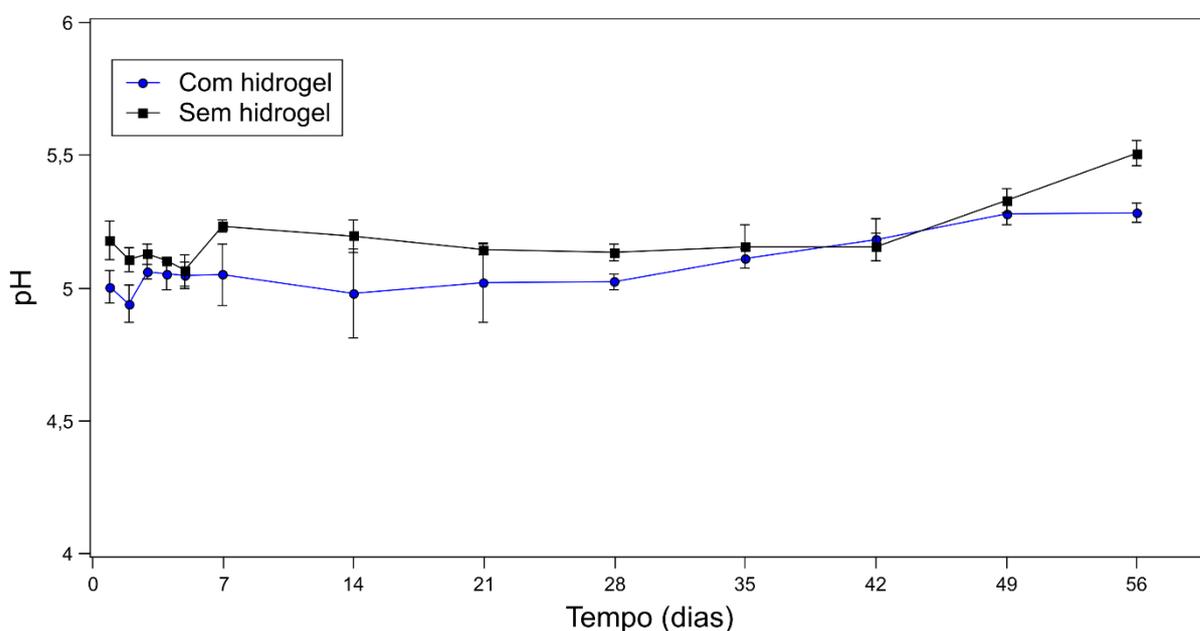
de reticulação do material. Portanto, a necessidade de um acompanhamento mais minucioso do pH do solo e da umidade do solo ao longo da biodegradação, se fez necessário.

Em ambos os estudos (determinação do pH e da umidade do solo), o acompanhamento foi realizado até o tempo total de oito semanas, mesmo que o hidrogel tenha sido completamente degradado (após seis semanas).

4.3.1. Determinação do pH

A Figura 16 ilustra a variação do pH do solo, com e sem hidrogel, ao longo do tempo do ensaio de biodegradação.

Figura 16 – Variação do pH do solo, com e sem hidrogel, durante o ensaio de biodegradação.



Fonte: O autor, 2023.

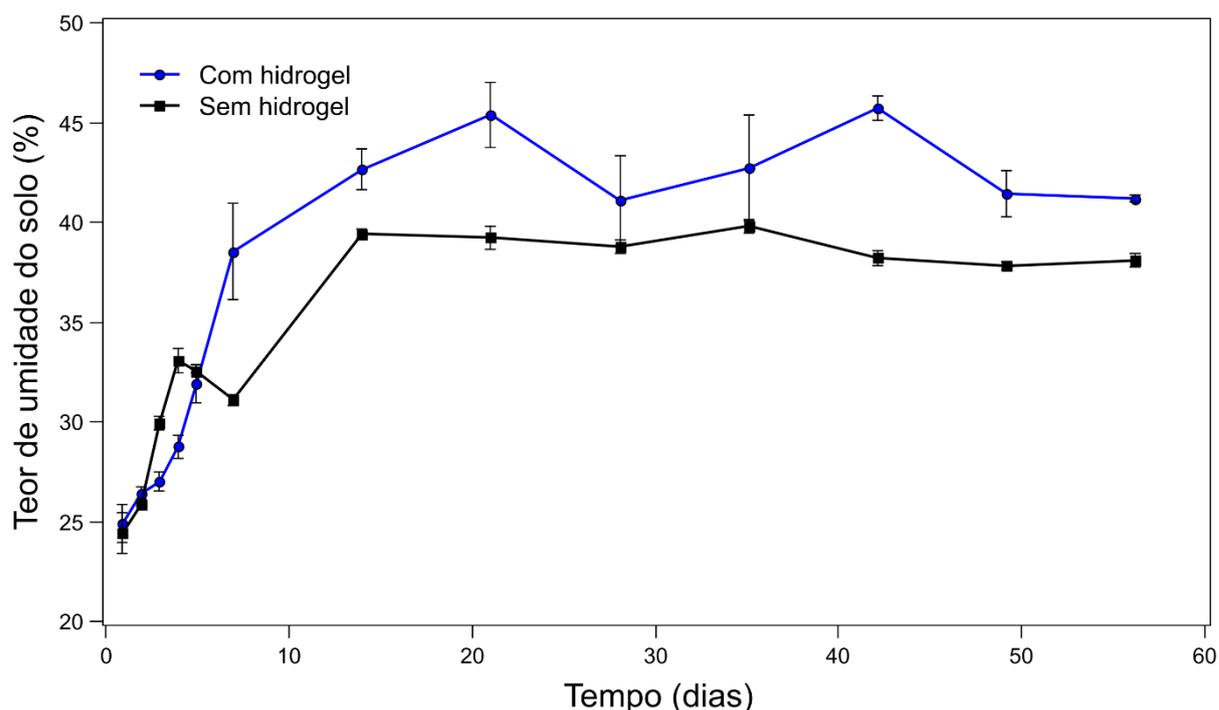
Foi possível observar que o pH do solo se manteve em uma faixa considerada não prejudicial na estabilidade do complexo polieletrólítico utilizado, uma vez que se encontrou entre 4,7 (pKa de grupos carboxílicos) e 6,5 (pKa de grupos amino) (WOLF;

TAMBOURGI; PAULINO, 2021; VLEUGELS *et al.*, 2018). Logo, o colapso das cadeias poliméricas não foi provocado por uma possível variação do pH do solo.

4.3.2. Determinação da umidade

A biodegradação é favorecida pela presença de água no interior da amostra de hidrogel (PRADO; AIROLDI, 1999; LIANG; DAS; McCLENDON, 2003). Assim, o monitoramento da umidade do solo, ao longo do tempo de ensaio (Figura 17), se fez necessário em virtude de os hidrogéis serem materiais altamente hidrofílicos e, por isso, absorverem água.

Figura 17 – Variação da umidade do solo, com e sem hidrogel, durante o tempo de ensaio.



Fonte: O autor, 2023.

Foi possível observar que, de uma maneira geral, a umidade do solo com hidrogel permaneceu acima da umidade do solo sem hidrogel, indicando assim, a capacidade de absorção e retenção de água pelo hidrogel, o que o torna apto, inclusive para ser aplicado em condicionamento de solo.

Durante os primeiros cinco dias, foi possível observar que a umidade do solo com hidrogel permaneceu abaixo da umidade do solo sem hidrogel, indicando assim, a capacidade de absorção e retenção de água pelo hidrogel em um primeiro momento.

A presença do hidrogel favoreceu o solo a se manter mais úmido a partir do 7º dia de enterro (Figura 17). Somente após a sexta semana (42 dias) que não foi possível mais encontrar o hidrogel no solo. Logo, esperava-se que não teria como manter o solo úmido, porém o gráfico mostra o contrário. A umidade continua maior da 6ª até a 8ª semana de ensaio, sendo sim uma consequência da presença do hidrogel no solo antes dele ser todo degradado.

A maior diferença de umidade foi observada para o tempo de 7 dias, onde o solo com hidrogel apresentou-se, aproximadamente, 7% mais úmido que o solo sem hidrogel.

Análises estatísticas por ANOVA de fator único mostraram que o *plateau* foi atingido, no solo com hidrogel, após 4 semanas ($p = 0,089$). Tal tratamento estatístico não se mostrou adequado para o solo sem hidrogel, pelo fato de o desvio padrão ser considerado pequeno em relação às respectivas médias. Neste caso, pode-se observar uma tendência da umidade do solo a permanecer a mesma a partir de 2 semanas. Portanto, estes resultados indicam o potencial do hidrogel à base de alginato de sódio e quitosana no condicionamento do solo argiloso utilizado. Potencial este, que faz com que o sistema solo/hidrogel permaneça úmido e, por consequência favoreça a entrada, no hidrogel, dos microrganismos presentes no solo.

Solos argilosos são naturalmente capazes de reter água, porém, mesmo com esta característica, o uso de hidrogéis enterrados neste tipo de solo, aumentou ainda mais tal capacidade, comprovando assim que esses hidrogéis são capazes de atuarem como condicionadores de solo mesmo em solos que possuam alta capacidade de retenção de água (HASIJA *et al.*, 2018). Somado a isso, tal característica do solo argiloso pode propiciar a biodegradação da amostra.

A adição do hidrogel, mesmo ocorrendo a sua biodegradação, fez com que a umidade do solo permanecesse maior durante o período estudado. Provavelmente, deve chegar um período de tempo após a degradação completa da amostra, em que a umidade do solo seja equiparada ao solo sem hidrogel.

4.4. Caracterização dos hidrogéis antes e após a biodegradação

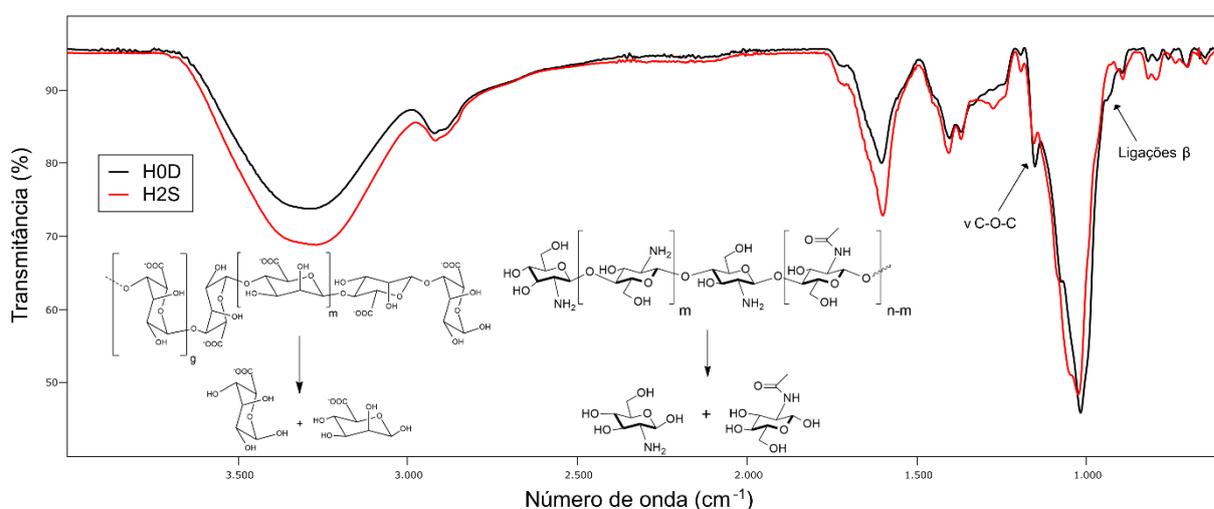
Nesta seção serão discutidas as mudanças na composição química e na morfologia dos hidrogéis ao longo dos ensaios de biodegradação, bem como a sua estabilidade térmica.

4.4.1. Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

Com o objetivo de se compreender o que ocorre quimicamente de acordo com a biodegradação dos hidrogéis à base de alginato de sódio e quitosana em solo argiloso, foi empregada a técnica de FTIR.

A Figura 18 apresenta os espectros sobrepostos do hidrogel antes e após duas semanas enterrados no solo, identificados como H0D e H2S, respectivamente. Comparando-se os espectros, é possível observar tendências em quais ligações estão sendo clivadas.

Figura 18 – Espectros de FTIR do hidrogel antes (H0D) e após duas semanas de biodegradação (H2S).



Fonte: O autor, 2023.

Na Figura 18, para a amostra H0D, pode-se observar as principais regiões e bandas espectrais referentes aos polissacarídeos alginato e quitosana: Estiramento O-H e N-H na região em torno de 3.300 cm^{-1} , estiramentos C-H de CH_2 e CH terciários em 2.922 cm^{-1} , na região espectral em torno de 1.604 cm^{-1} , há sobreposição de bandas como estiramento assimétrico de COO^- , deformação N-H de amida, deformação $-\text{NH}_2$ de amina primária (OSTROWSKA-CZUBENKO; GIERSZEWSKA-DRUZYNSKA, 2009) e estiramento C=O de amida, estiramento simétrico de COO^- em 1.404 cm^{-1} , deformações de CH_2 no plano do anel piranosídicos em 1.370 cm^{-1} , estiramento da ligação C-O-C dos anéis piranosídicos em 1.152 cm^{-1} , estiramentos C-O na cadeia polimérica em 1.074 e 1.018 cm^{-1} (OSTROWSKA-CZUBENKO; GIERSZEWSKA-DRUZYNSKA, 2009), vibração de ligação β -glicosídica de anéis piranosídicos em 940 cm^{-1} (KLOSTER *et al.*, 2021) e estiramento C-H dentro do anel piranosídico em 895 cm^{-1} (KAYA; BARAN, 2015).

Foi possível observar, no espectro da amostra H2S, a diminuição de intensidade em algumas bandas (1.152 , 1.074 , 1.018 e 940 cm^{-1}), e o aumento de intensidade em outras bandas (3.300 , 2.922 , 1.604 , 1.404 , 1.370 , 1.275 e 895 cm^{-1}). Além disto, houve deslocamento de bandas do espectro do hidrogel antes da biodegradação (H0D) para o espectro do hidrogel biodegradado (H2S). Estes deslocamentos foram observados em: 3.268 cm^{-1} (estiramentos de O-H e N-H), 2.918 cm^{-1} (estiramentos C-H de CH_2 e CH terciários), 1.600 cm^{-1} (região espectral com sobreposição de bandas provenientes do estiramento assimétrico de COO^- , deformação de amida de N-H, deformação de amina primária de $-\text{NH}_2$ e estiramento C=O de amida), 1.406 cm^{-1} (estiramento simétrico de COO^-), 1.155 cm^{-1} (estiramento da ligação C-O-C) e 1.047 e 1.024 cm^{-1} (estiramentos C-O na cadeia polimérica) (Tabela 9).

A banda localizada em 1.275 cm^{-1} aumentou de intensidade de acordo com a biodegradação e pode ser atribuída à vibração do grupamento acetil (NHCO) (SOON *et al.*, 2018), o que pode ser um indicativo de maior proporção destes grupamentos no hidrogel após duas semanas de biodegradação.

Tabela 9 – Atribuições vibracionais das bandas de absorção no FTIR do hidrogel à base de alginato de sódio e quitosana antes (H0D) e após a biodegradação (H2S).

Modo vibracional *	Número de onda (cm ⁻¹)	
	H0D	H2S
v O-H	3.300	3.268
v N-H		
v C-H (CH ₂ e CH terciários)	2.922	2.918
v assim. COO ⁻	1.604	1.600
δ N-H (amida)		
δ N-H (amina primária)		
v C=O (amida)		
v sim. COO ⁻	1.404	1.406
δ CH ₂ (no plano do anel piranosídico)	1.370	1.370
v NHCO	1.275	1.275
v C-O-C	1.152	1.155
v C-O (na cadeia polimérica)	1.074	1.047
	1.018	1.024
Ligação β de anéis piranosídicos	940	-----
v C-H (no anel piranosídico)	895	893

* v = Estiramento; δ = Deformação angular; assim. = assimétrico; sim. = simétrico.

Fonte: O autor, 2023.

A diminuição da intensidade da banda em 1.152 cm⁻¹, referente ao estiramento da ligação C-O-C sugere que a degradação ocorreu por esta região (HASIJA *et al.*, 2018). De acordo com a literatura (WARREN, 1996), a degradação enzimática ocorre pela quebra das ligações glicosídicas, formando, em maior proporção, oligossacarídeos, através das enzimas endolíticas, e, em menor proporção, mono, di e trissacarídeos, através das enzimas exolíticas, responsáveis pela quebra da cadeia polimérica em pontos mais próximos das extremidades (BARZKAR *et al.*, 2022). Outra banda, que reforça a quebra de ligações glicosídicas, se localiza em torno de 940 cm⁻¹, referente às ligações β dos anéis glicosídicos, e está presente no espectro do hidrogel H0D, não aparecendo no espectro do hidrogel após a biodegradação (H2S).

Com a clivagem da ligação glicosídica e consequente formação de “pontas” nas cadeias poliméricas de alginato e quitosana, há um aumento na quantidade de hidroxilas. De acordo com Ostrowska-Czubenko e Gierszewska-Druzynska (2009), após a formação do complexo polieletrólítico de alginato de sódio e quitosana, a banda em torno de 3.300 cm⁻¹, referente à sobreposição de bandas de estiramento O-H e N-H, decresce em intensidade, indicando que as ligações de hidrogênio existentes na quitosana são desfeitas e substituídas por novas ligações de hidrogênio entre o alginato e a quitosana, menos intensas. Portanto, com a separação das cadeias em

unidades menores (oligossacarídeos, em maior proporção), a maior incidência de grupamentos hidroxila pode proporcionar um aumento na intensidade das ligações de hidrogênio, aumentando, então, a intensidade da banda nesta região espectral de acordo com o andamento da biodegradação.

4.4.2. Espectroscopia Raman

Enquanto o FTIR registra bandas de absorção de infravermelho pelo modo vibracional das ligações químicas, o Raman registra a intensidade do espalhamento inelástico da radiação incidente. A espectroscopia Raman é uma técnica complementar ao FTIR, uma vez que a regra de seleção é diferente para as duas técnicas. Para o FTIR, os modos vibracionais ativos são aqueles nos quais há variação do momento dipolar da ligação, enquanto o Raman registra modos vibracionais onde há variação da polarizabilidade (SALA, 2011). Portanto, existem modos vibracionais ativos apenas no FTIR, outros apenas no Raman, e, ainda, modos ativos tanto em uma técnica quanto na outra, o que as torna complementares.

A Figura 19 apresenta as amostras utilizadas para a análise Raman.

Figura 19 – Amostras para análise Raman dos hidrogéis.



H0D (0 dia de degradação), H1D (após 1 dia de degradação), H2D (após 2 dias), H3D (após 3 dias), H4D (após 4 dias), H5D (após 5 dias), H1S (após 1 semana) e H2S (após 2 semanas).

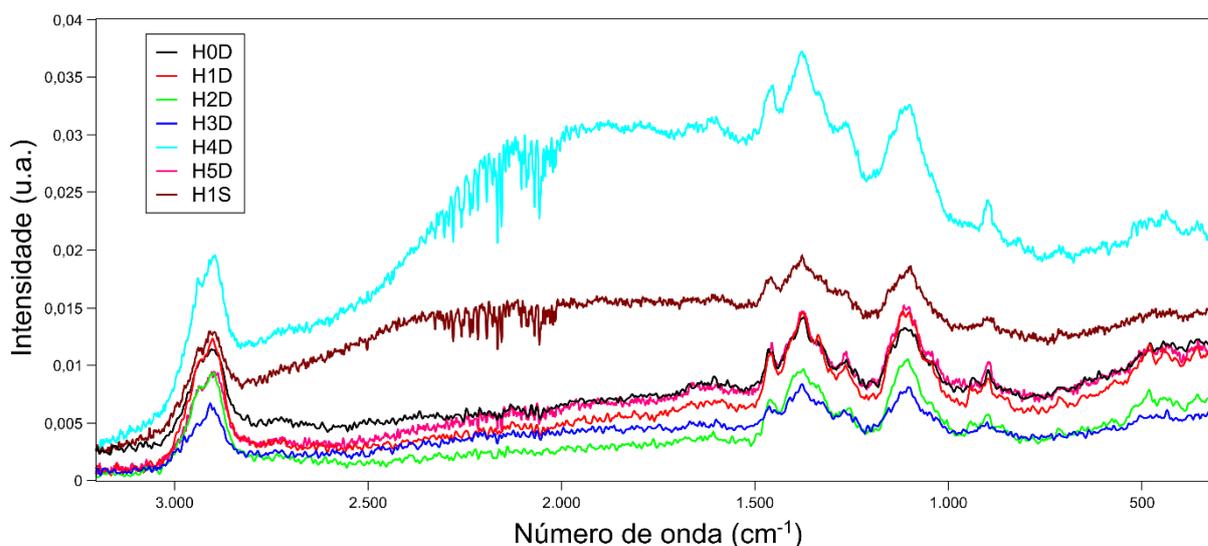
Fonte: O autor, 2023.

As amostras H0D, H1D, H2D e H3D foram analisadas com 300 mW de potência do laser, porém, ao realizar a análise da amostra H3D com essa potência, a mesma queimou (Figura 19). Possivelmente, essa amostra estava em um estágio de degradação que não permitiu o material resistir ao laser nessa potência.

Dessa forma, decidiu-se analisar todas as amostras (H0D, H1D, H2D, H3D, H4D, H5D, H1S e H2S) em uma potência menor, 180 mW. Porém, a amostra (H2S) apresentou erro de equipamento, não podendo registrar as suas bandas. Então, o mesmo procedimento foi repetido, para a amostra H2S, em uma potência ainda mais baixa, 50 mW, no entanto, o erro persistiu. Assim, não foi possível analisar essa amostra. Provavelmente, isso aconteceu por causa do seu estágio avançado de degradação, que não espalhou radiação, nem mesmo em potências menores do laser de excitação.

Os espectros obtidos são mostrados na Figura 20.

Figura 20 – Espectros de espalhamento Raman dos hidrogéis degradados.



H0D (0 dia de degradação), H1D (após 1 dia de degradação), H2D (após 2 dias), H3D (após 3 dias), H4D (após 4 dias), H5D (após 5 dias) e H1S (após 1 semana).

Fonte: O autor, 2023.

Em 2.941 cm^{-1} e 2.905 cm^{-1} foi possível observar as bandas de espalhamento referentes ao estiramento das ligações em CH_3 e CH_2 do anel piranosídico, respectivamente, com alta intensidade. As bandas de intensidade mediana correspondem aos modos vibracionais: deformação angular CH_2 no plano, deformação angular CH no plano, deformação angular OH no plano e estiramento do

anel piranosídico (1.378 cm^{-1}); estiramento CN e deformação angular CH no plano (1.341 cm^{-1}); estiramento C-O-C (ligação glicosídica), estiramento do anel piranosídico, estiramento C-OH, estiramento C-CH₂ e deformação angular CH no plano (1.126 , 1.106 e 1.088 cm^{-1}); deformação angular C-O-C no plano (480 cm^{-1}). As bandas de intensidade baixa foram observadas com os seguintes modos vibracionais: deformação angular CH no plano, deformação angular CH₂ fora do plano, deformação angular OH no plano e, somando à estas bandas, estiramento simétrico COO⁻ (1.460 cm^{-1}); estiramento simétrico COO⁻ ou estiramento CO de ligação simples (1.273 cm^{-1}); deformação angular OH...O (ligação de hidrogênio), estiramento C-C, estiramento C-O de ligação simples e deformação angular CH no plano (1.264 cm^{-1}); estiramento CN (937 cm^{-1}) e estiramento C-C-O (853 cm^{-1}) (SCHMID *et al.*, 2008; ZAJĄC *et al.*, 2015).

A Tabela 10 evidencia os modos vibracionais atribuídos aos números de onda de espalhamento Raman, vistos na Figura 20, para o hidrogel antes da biodegradação (H0D).

Tabela 10 – Atribuições vibracionais de Espalhamento Raman para o hidrogel à base de alginato de sódio e quitosana antes do ensaio de biodegradação (H0D).

Modo vibracional *	Número de onda (cm^{-1})
v CH ₃	2.941
v CH ₂	2.905
δ (CH) + ω (CH ₂) + δ (OH)	1.460
v COO ⁻ sim.	
δ (CH ₂) + δ (CH) + δ (OH) + v (φ)	1.378
v (CN) + δ (CH)	1.341
v COO ⁻ sim. ou v CO simples	1.273
δ (OH...O) + v (C-C) + v (C-O) + δ (CH)	1.264
v (C-O-C) + v (φ) + v (C-OH) + v (C-CH ₂) + δ (CH)	1.126
	1.106
	1.088
v (CN)	937
v (C-C-O)	853
δ (C-O-C)	480

* v = Estiramento; δ = Deformação angular no plano; ω = Deformação angular fora do plano; φ = Anel piranosídico; sim. = simétrico.

Fonte: O autor, 2023.

Pelos espectros da Figura 20, é possível observar uma diminuição significativa nas bandas referentes às vibrações CH₃ e CH₂ dos anéis piranosídicos, situadas em

2.941 e 2.905 cm^{-1} , respectivamente. Isto indica uma menor disponibilidade de anéis para espalhar a radiação.

A banda de espalhamento situada em 480 cm^{-1} , referente à deformação angular da ligação C-O-C (ligação glicosídica) no plano, também decresce em intensidade, o que confirma os resultados obtidos por FTIR, que indicam a quebra das cadeias de polissacarídeos em cadeias menores, os oligossacarídeos.

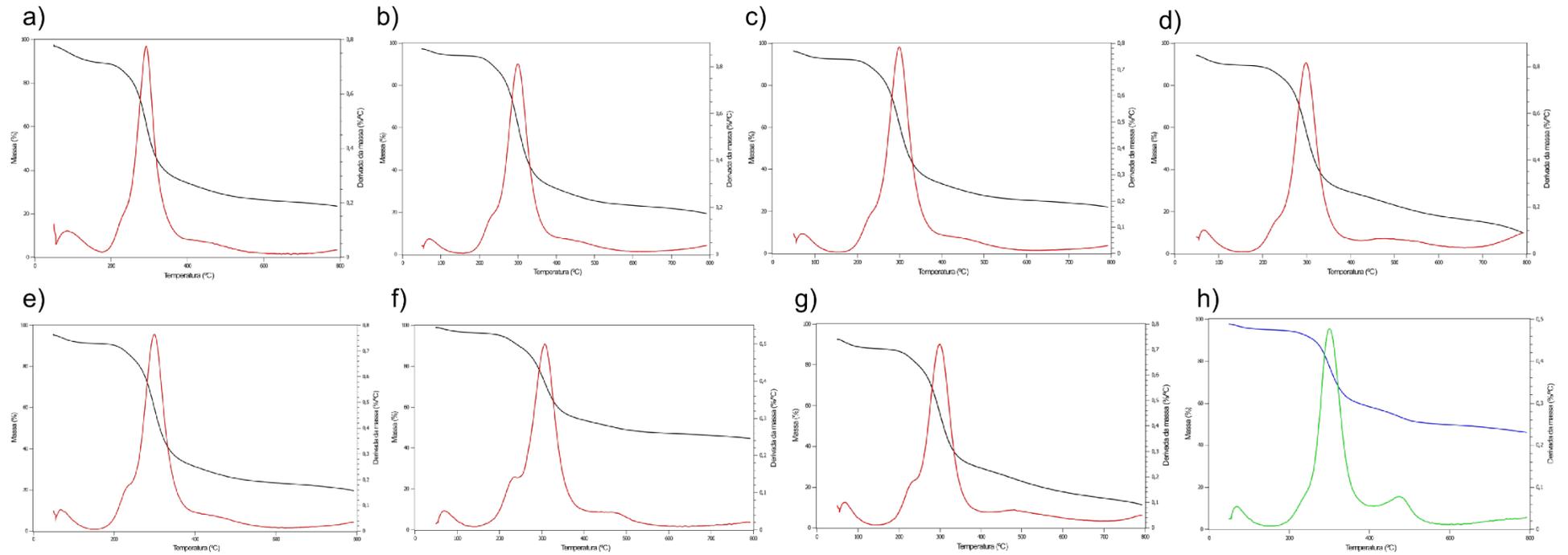
Observando, então, os espectros obtidos pelas amostras, foi possível notar a diminuição da intensidade das bandas, o que indica uma estrutura cada vez mais degradada, a ponto de o espalhamento ser cada vez mais enfraquecido.

4.4.3. Termogravimetria (TG) e termogravimetria derivada (DTG)

Através das curvas de TG e DTG, pôde-se observar alteração na resistência térmica dos hidrogéis de acordo com o tempo de biodegradação (Figura 21).

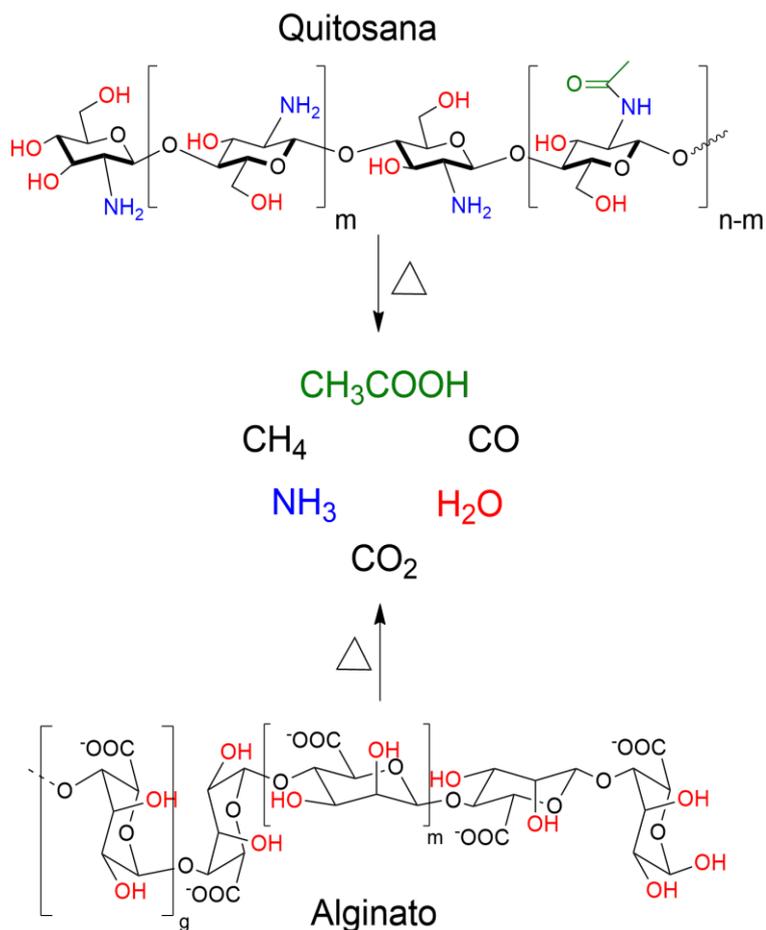
Para o hidrogel H0D (Figura 21a), entre 50 e 150 $^{\circ}\text{C}$, ocorreu a primeira etapa de perda de massa, referente à perda de água absorvida pelo hidrogel, uma vez que ambos os polissacarídeos constituintes (alginato e quitosana) apresentam grupamentos hidrofílicos (-OH, $-\text{COO}^-$, $-\text{NH}_2$) em grandes quantidades. A segunda etapa de perda de massa (200 a 400 $^{\circ}\text{C}$) é justamente a degradação térmica do hidrogel, pela clivagem das cadeias poliméricas através das ligações glicosídicas, tanto do alginato, quanto da quitosana, seguido da quebra dos anéis piranosídicos, com consequente formação de: H_2O , NH_3 , CO , CO_2 , CH_4 e CH_3COOH (para as unidades acetiladas de quitosana) (Figura 22) (MOUSSOUT *et al.*, 2016).

Figura 21 – Curvas de TG e DTG para os hidrogéis biodegradados nos tempos: 0 dia (H0D) (a), 1 dia (H1D) (b), 2 dias (H2D) (c), 3 dias (H3D) (d), 4 dias (H4D) (e), 5 dias (H5D) (f), 1 semana (H1S) (g) e 2 semanas (H2S) (h).



Fonte: O autor, 2023.

Figura 22 – Produtos de degradação térmica da quitosana e do alginato.



Fonte: O autor, 2023.

A Tabela 11 evidencia os valores da temperatura onde a degradação térmica do estágio é iniciada (T_{onset}) e a temperatura na qual a velocidade de degradação térmica é máxima ($T_{\text{máx}}$) para todas as amostras que puderam ser recuperadas e analisadas. Foi observado, através do aumento do valor de T_{onset} que a resistência térmica do material aumentou após a biodegradação.

Tabela 11 – Temperaturas dos estágios de decomposição térmica dos hidrogéis de acordo com o tempo de biodegradação.

Amostras*	Massa utilizada (mg)	T _{onset} (°C)		T _{máx.} (°C)	
		ED2**	ED3***	ED2	ED3
H0D	9,1200	258	-	292	-
H1D	3,0670	273	-	300	-
H2D	4,0430	274	-	300	-
H3D	2,9450	275	-	300	-
H4D	3,5020	275	-	300	-
H5D	3,2850	280	-	307	-
H1S	3,0810	274	-	299	-
H2S	3,5000	277	459	300	477

* H0D (0 dia de degradação), H1D (após 1 dia de degradação), H2D (após 2 dias), H3D (após 3 dias), H4D (após 4 dias), H5D (após 5 dias), H1S (após 1 semana) e H2S (após 2 semanas).

** ED2 (segundo estágio de degradação).

*** ED3 (terceiro estágio de degradação).

Fonte: O autor, 2023.

Uma possível explicação para esse resultado pode ser o fato de a biodegradação ter ocorrido preferencialmente nas cadeias de alginato, pela maior disponibilidade do mesmo no preparo do hidrogel. Com isso, as amostras após serem biodegradadas, ficariam com uma maior quantidade de quitosana em sua constituição, explicando assim o aumento do T_{onset} dessas amostras, uma vez que a quitosana apresenta uma maior resistência térmica do que o alginato (ALSAMMAN; SÁNCHEZ, 2022), podendo ser comprovada pelos valores de T_{onset} dos polissacarídeos puros (252°C para a quitosana e 215°C para o alginato) (COSTA, 2018).

Entretanto, nas curvas de TG e DTG foi observado um terceiro estágio de decomposição térmica, que foi aumentando de área de acordo com o tempo de biodegradação, como mostrado na Figura 21.

Ao estudar a influência do grau de desacetilação da quitosana na resistência térmica através das técnicas de TG e DTG, Gámiz-González *et al.* (2017) observaram que, de acordo com a diminuição do grau de desacetilação, um segundo pico de degradação térmica aparecia, referente às unidades acetiladas remanescentes da quitina, uma vez que a resistência térmica da quitina é maior que da quitosana (SOON

et al., 2018). Tal fato pode explicar o aumento da área do terceiro estágio de decomposição térmica dos hidrogéis, mostrado na Figura 21.

A quitosana utilizada nesta Dissertação contém 94 % de grau de desacetilação (COSTA; FERREIRA; CRUZ, 2016), portanto, por mais que a quitosana esteja presente em menor quantidade em relação ao alginato, existem mais unidades desacetiladas, inicialmente, do que acetiladas. Após duas semanas de biodegradação, o grau de desacetilação foi alterado naturalmente. Os resultados, obtidos através da TG nesta Dissertação, sugerem que, primeiramente, as unidades de alginato são biodegradadas, e, em seguida, as unidades desacetiladas de quitosana são o segundo alvo preferencial, restando, por último, um número maior de unidades acetiladas. Um fator que pode corroborar para este indicativo é o fato de que o grau de desacetilação da quitosana é inversamente proporcional à sua taxa de biodegradação (GUARINO *et al.*, 2015).

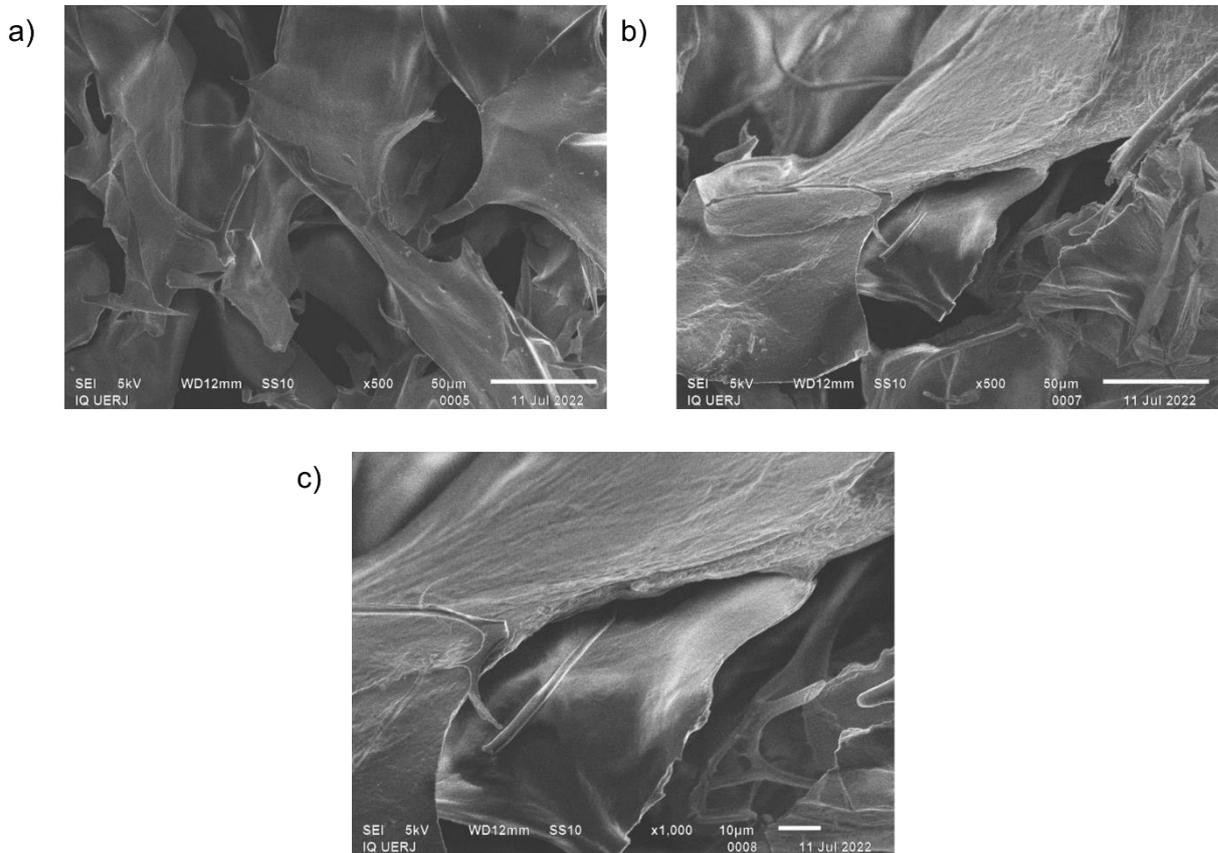
Estes resultados estão de acordo com os resultados encontrados no item 4.4.1 – *Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)*, que mostraram um aumento de intensidade da banda atribuída à vibração do grupamento acetil (NHCO) (SOON *et al.*, 2018) conforme a biodegradação ocorreu, possivelmente indicando uma maior proporção destes grupamentos no hidrogel após duas semanas de biodegradação.

4.4.4. Microscopia eletrônica de varredura (SEM)

Através das análises por SEM, foi possível observar como a morfologia dos hidrogéis à base de alginato de sódio e quitosana se alterou de acordo com a biodegradação.

Na Figura 23 (a), pode-se observar a micrografia do hidrogel H0D (antes da biodegradação), com aumento de 500 vezes, evidenciando uma estrutura foliácea com a presença de espaços vazios, responsáveis pelo alto poder de absorção de água pelo hidrogel. Na Figura 23 (b), após um dia de biodegradação (amostra H1D) foi possível observar, uma superfície com certa rugosidade, provavelmente devido à formação de colônias de microrganismos, como fungos ou bactérias.

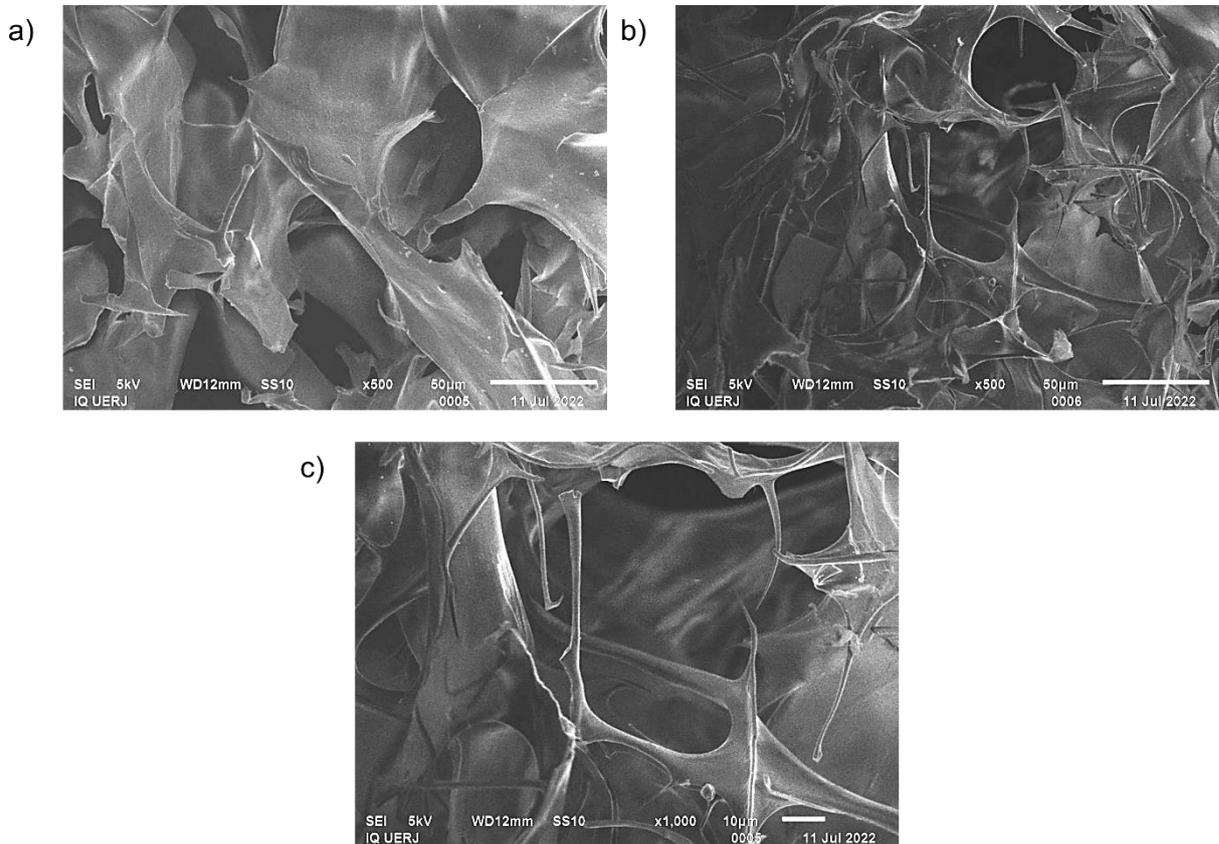
Figura 23 – Micrografias de SEM do hidrogel: H0D (antes da biodegradação) com aumento de 500 vezes (a), H1D (após um dia de biodegradação) com aumento de 500 vezes (b) e H1D com aumento de 1.000 vezes (c).



Fonte: O autor, 2023.

Após a instalação de colônias microbianas na superfície dos hidrogéis, os mesmos começam a ser biodegradados, ocasionando a diminuição de sua espessura tridimensional e posterior fragmentação, pela fragilidade da estrutura. Neste caso, pode-se observar a diferença entre a estrutura íntegra do hidrogel antes da biodegradação (H0D) (Figura 24a) e a estrutura fragmentada e fragilizada do hidrogel após cinco dias de biodegradação (H5D) (Figuras 24b e 24c). É provável que a fragmentação do material seja consequência direta da quebra da ligação glicosídica (C-O-C), discutida anteriormente no item 4.4.1.

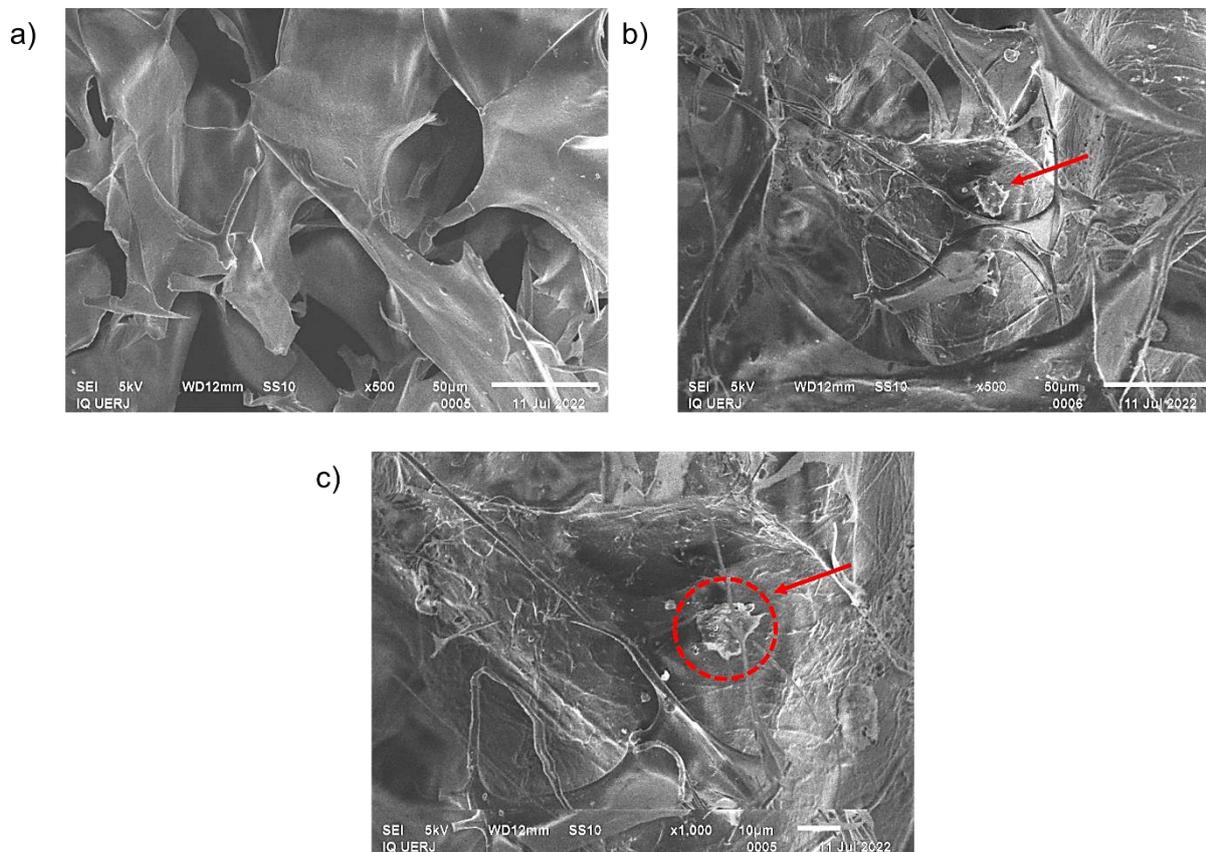
Figura 24 – Micrografias de SEM do hidrogel: H0D (antes da biodegradação) com aumento de 500 vezes (a), H5D (após cinco dias de biodegradação) com aumento de 500 vezes (b) e H5D com aumento de 1.000 vezes (c).



Fonte: O autor, 2023.

Em estágio mais avançado, com duas semanas de biodegradação (amostra H2S), é possível observar tanto a fragilização e fragmentação das cadeias, quanto a instalação de corpos estranhos na superfície da estrutura remanescente do hidrogel (Figuras 25b e 25c). Tal observação pode ser um indicativo da instalação de colônias microbianas na superfície do hidrogel.

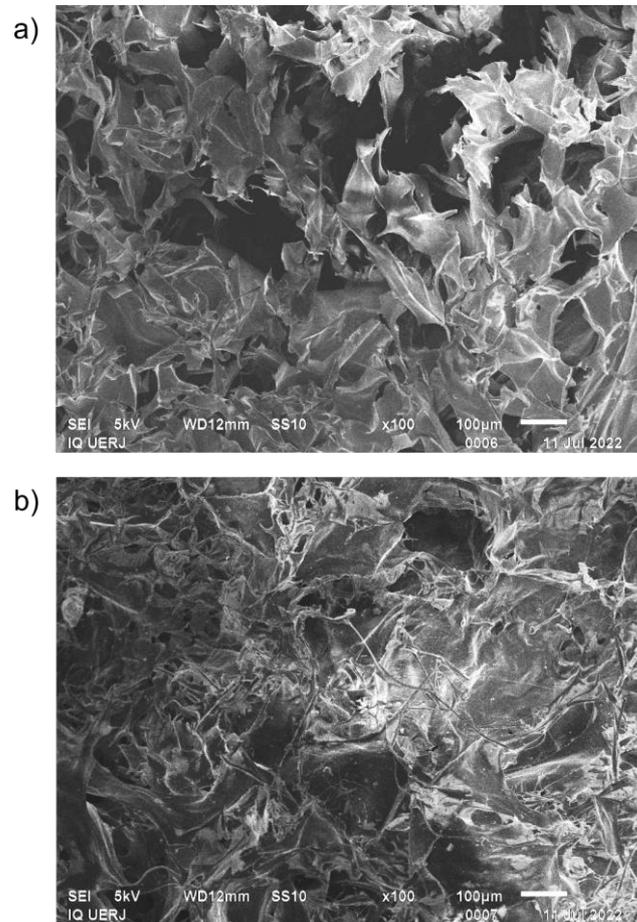
Figura 25 – Micrografias de SEM do hidrogel: H0D (antes da biodegradação) com aumento de 500 vezes (a), H2S (após duas semanas de biodegradação) com aumento de 500 vezes (b) e H2S com aumento de 1.000 vezes (c).



Fonte: O autor, 2023.

Foi possível observar nas micrografias mostradas na Figura 26 uma certa desestruturação dos espaços vazios dos hidrogéis causada pela biodegradação.

Figura 26 – Micrografias de SEM do hidrogel antes da biodegradação com aumento de 100 vezes (a) e após duas semanas de biodegradação com aumento de 100 vezes (b).



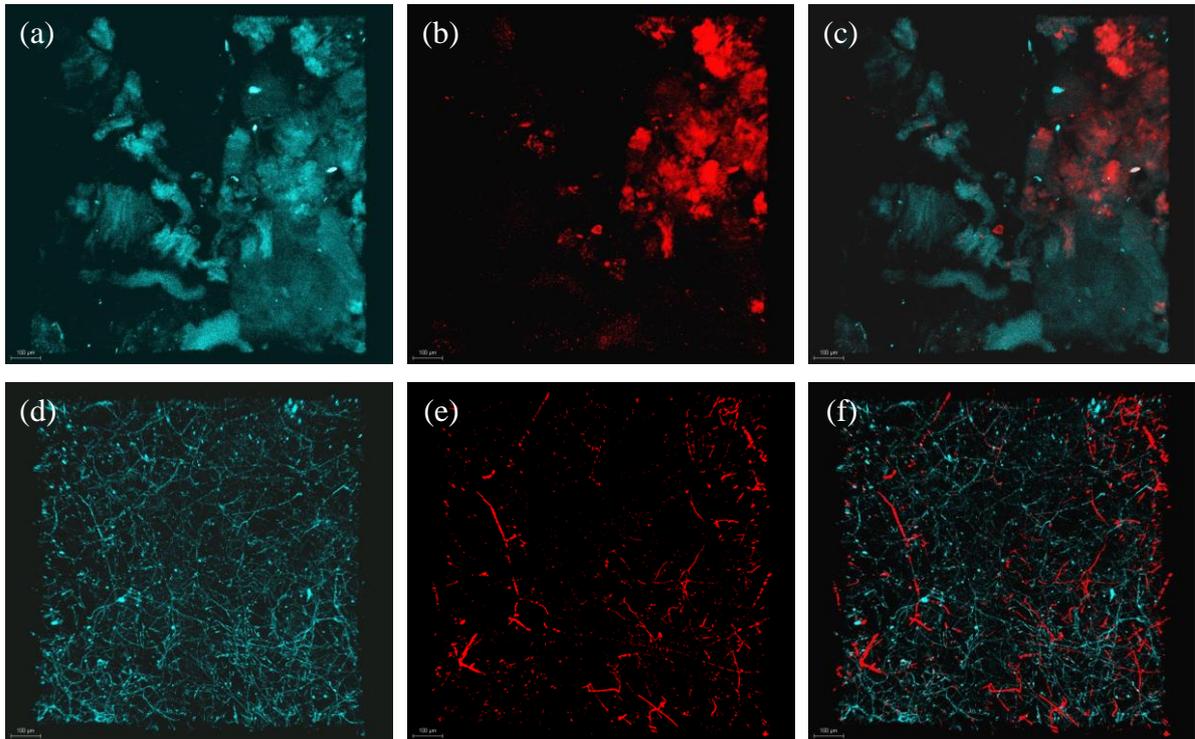
Fonte: O autor, 2023.

4.4.5. Microscopia confocal de varredura a laser (CLSM)

A análise por microscopia confocal foi realizada com a utilização do DAPI, para marcar as cadeias de alginato, emitindo fluorescência no comprimento de onda correspondente à coloração azul, e do RdB, para marcar as cadeias de quitosana, emitindo fluorescência no comprimento de onda correspondente à coloração vermelha.

Com o intuito de se observar o impacto da biodegradação na morfologia dos complexos polieletrólíticos, os materiais foram analisados antes e após duas semanas de biodegradação (Figura 27).

Figura 27 – Imagens de microscopia confocal dos materiais antes da biodegradação, (a) até (c), e após duas semanas de biodegradação, (d) até (f). Todas com aumento de 10x.



(a) = apenas DAPI marcando as cadeias de alginato; (b) = apenas RdB marcando as cadeias de quitosana; (c) = sobreposição das imagens (a) e (b). (d) = apenas DAPI marcando as cadeias de alginato; (e) = apenas RdB marcando as cadeias de quitosana; (f) = sobreposição das imagens (d) e (e).

Fonte: O autor, 2023.

Tipicamente, o DAPI é utilizado para gerar fluorescência em material genético ou biológico, porém em comprimentos de onda de excitação menores, de 360 a 380 nm (BREILAND *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2023). Entretanto, é possível observar, pela Figura 28, que os reagentes fluorescentes (DAPI e RdB) marcaram, com sucesso, as cadeias poliméricas de alginato de sódio e quitosana, respectivamente (LEE *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2022). Através das imagens obtidas, foi possível constatar a formação da fibrosidade do material após duas semanas de biodegradação, confirmando a mudança de sua morfologia.

4.5. Estudo da população fúngica e bacteriana em solo argiloso

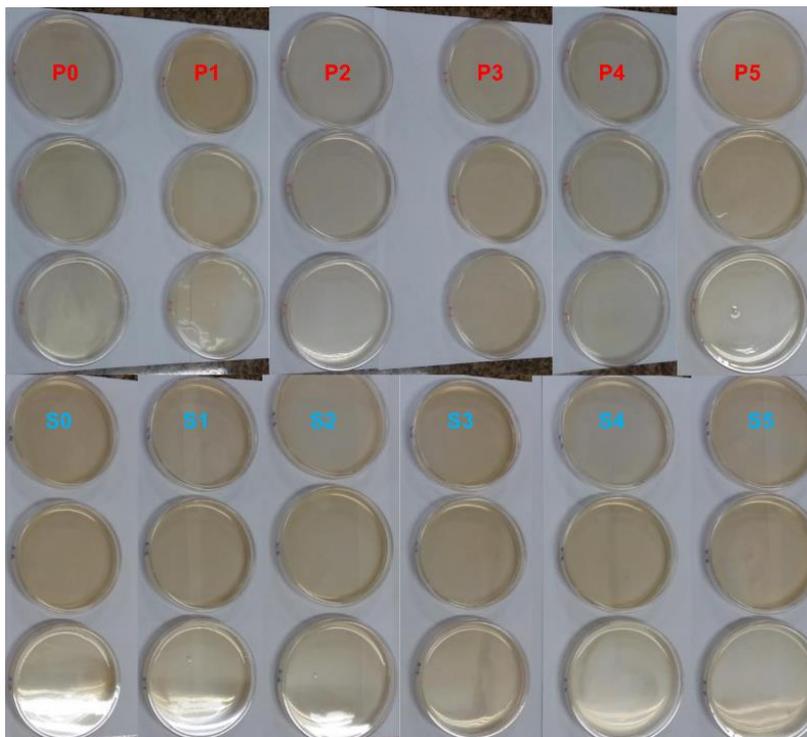
Com o objetivo de se investigar quais fungos e bactérias estavam atuando na biodegradação dos hidrogéis, foi realizado um estudo da população fúngica e bacteriana no solo argiloso usado nos experimentos desta Dissertação. Esta etapa incluiu o preparo das placas para observação de microrganismos, seguido do isolamento dos fungos, observação do crescimento fúngico em meio de cultura deficiente em nutrientes e observação morfológica dos fungos.

4.5.1. Preparo das placas para observação de fungos e bactérias

Ao se investigar a biodegradação de um material em solo, é imprescindível o conhecimento da população microbiana do solo utilizado, visto que a biodegradação nada mais é do que a degradação de um corpo pela ação de microrganismos e de seus produtos de metabolismo. Portanto, se fez necessário o estudo microbiológico do solo argiloso usado durante a pesquisa.

As placas de Petri preparadas foram identificadas de acordo com o meio utilizado, *Sabouraud* (S) (meio de cultura que favorece o crescimento fúngico) ou PCA (P) (meio de cultura que favorece o crescimento bacteriano), e com as diluições sucessivas da mistura gerada pela incorporação do solo em solução salina (0 para nenhuma diluição, até 5 para cinco diluições sucessivas, conforme mencionado no item 3.8.3 – *Diluição da mistura de solo em solução salina*). Esse procedimento de diluições sucessivas objetivou facilitar a visualização do crescimento microbiano, uma vez que é esperado que o solo dissolvido em solução salina, quando diretamente aplicado às placas de Petri, deve levar à uma proliferação descontrolada de microrganismos, dificultando a visualização e posterior isolamento. As placas preparadas podem ser observadas na Figura 28.

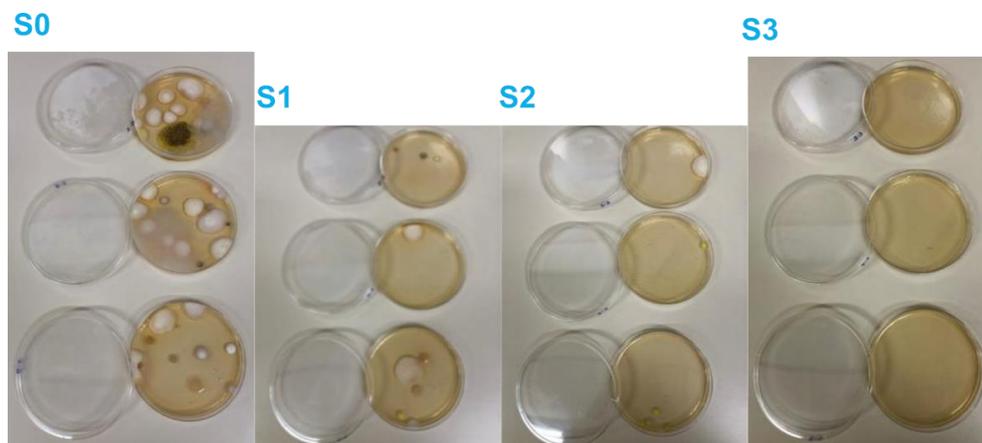
Figura 28 – Placas de Petri preparadas, em triplicata, com os meios de cultura *Sabouraud* (S) e PCA (P), de acordo com as diluições sucessivas (0 a 5).



Fonte: O autor, 2023.

Após a incubação das placas de Petri com os meios *Sabouraud* e PCA, a 23 °C por uma semana para os fungos, e a 35 °C por uma semana para as bactérias, foi possível observar o crescimento de microrganismos. Como esperado, o crescimento foi maior em placas com menor, ou nenhuma, diluição da solução salina com solo incorporado. Tal constatação pode ser visualizada na Figura 29.

Figura 29 – Crescimento fúngico em placas com meio *Sabouraud*, sem diluição (S0) até a 3ª diluição (S3).

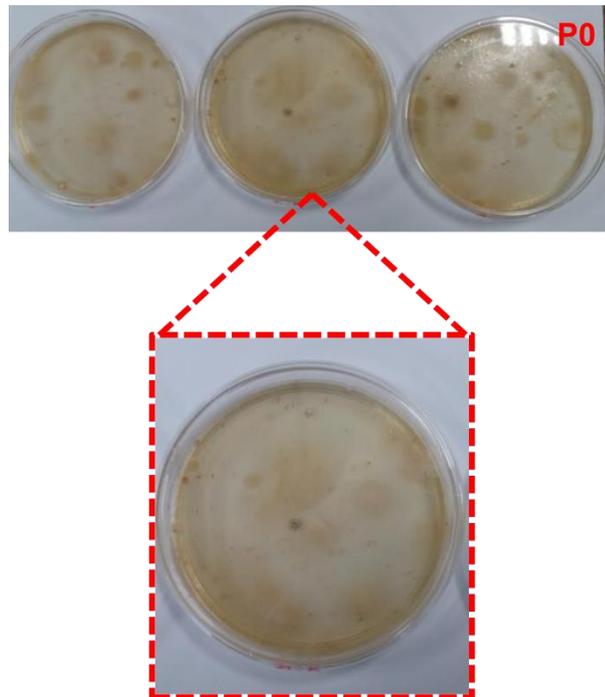


Fonte: O autor, 2023.

A partir da terceira diluição (S3), não foi observado crescimento de microrganismos nas placas com meio *Sabouraud*.

Como é sabido, os meios de cultura *Sabouraud* e PCA favorecem o crescimento de fungos e bactérias, respectivamente. Entretanto, é possível que fungos cresçam em meio PCA, ou ainda que bactérias cresçam em meio *Sabouraud*. É o que foi observado nas placas com meio PCA sem diluição (P0).

Figura 30 – Crescimento de fungos em meio PCA sem diluição (P0).

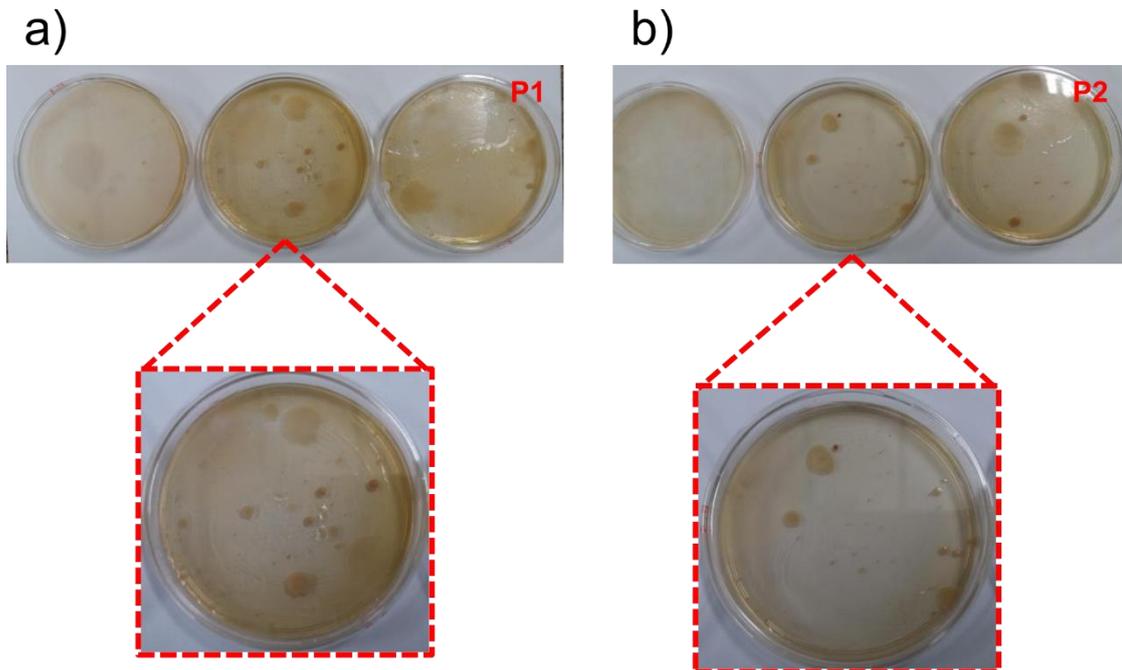


Fonte: O autor, 2023.

Pode-se observar, com o aumento da imagem, colônias microbianas largas, o que não é característica de colônias bacterianas, nem é característico do crescimento de fungos filamentosos. Portanto, pode-se concluir que se tratam de colônias fúngicas, no entanto, provavelmente são fungos unicelulares, ou seja, leveduras, já que os fungos podem ser amplamente divididos em filamentosos e unicelulares.

O mesmo foi observado para placas com meio PCA com uma (P1) e duas diluições (P2) sucessivas (Figura 31).

Figura 31 – Crescimento de fungos em meio PCA: na 1ª diluição (P1) (a) e na 2ª diluição (P2) (b).



Fonte: O autor, 2023.

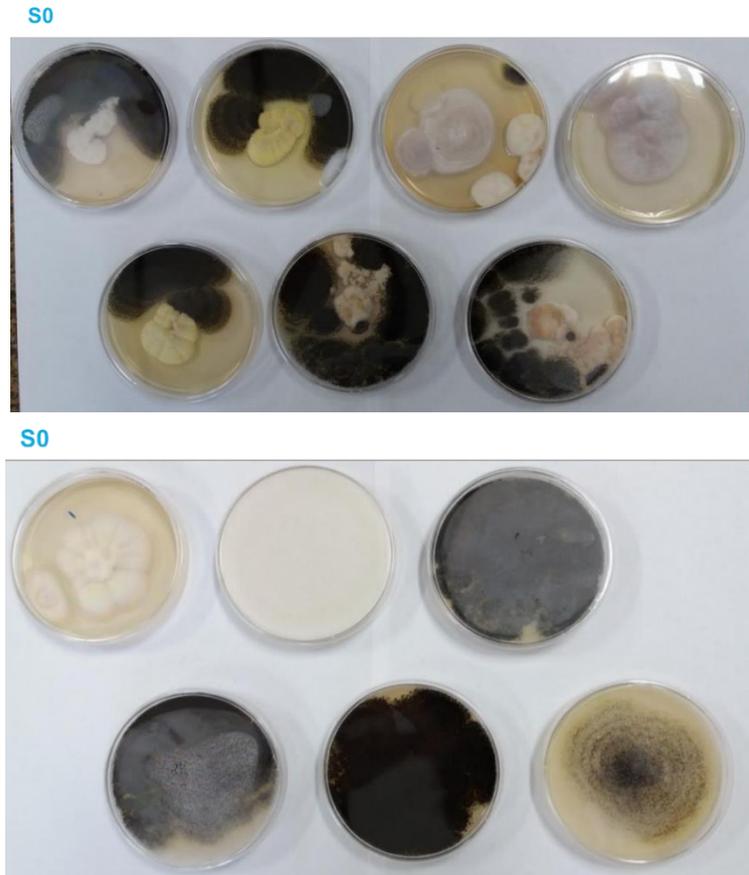
O fato de fungos terem crescido em placas favoráveis ao crescimento de bactérias não conclui que no solo argiloso utilizado não há bactérias, apenas que as mesmas não cresceram no meio e nas condições utilizados. A presença de bactérias no solo foi constatada pelos resultados obtidos no item 4.1. – *Análise físico-química e microbiológica do solo antes e após a biodegradação*.

Uma vez que foi observado o crescimento microbiológico nas placas de Petri, o procedimento foi seguido pelo isolamento de tais microrganismos em novas placas de Petri com meio *Sabouraud*, visando obter os fungos isoladamente.

4.5.2. Isolamento dos fungos

Uma vez que o crescimento fúngico foi observado de maneira exacerbada e misturada nas placas de Petri, foi feito o isolamento dos microrganismos, passando-os para novas placas de Petri e observando seus respectivos crescimentos individualizados. As placas com microrganismos isolados, obtidos das placas originais sem diluição, podem ser observadas na Figura 32.

Figura 32 – Fungos isolados das placas com meio *Sabouraud* sem diluição (S0).



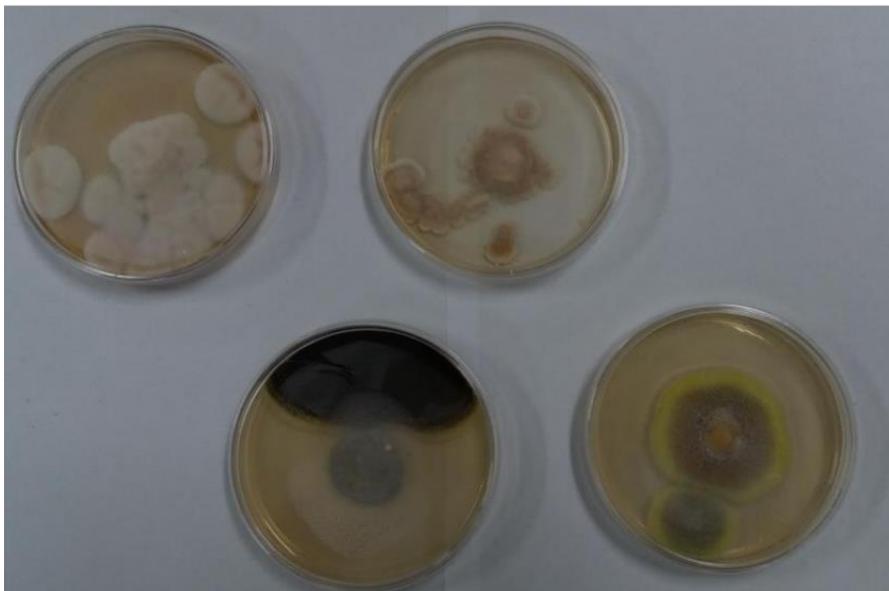
Fonte: O autor, 2023.

Nestas placas, é possível observar o crescimento de fungos filamentosos (porções de coloração escura e clara), além de outros tipos, indicando uma grande variedade de fungos presentes no solo utilizado nesta Dissertação.

Uma melhor separação, porém, em menor variedade microbiológica, pôde ser obtida ao se isolar microrganismos das placas na 1ª diluição e na 2ª diluição. Os microrganismos isolados a partir das placas com meio *Sabouraud* nas 1ª e 2ª diluições podem ser observados na Figura 33.

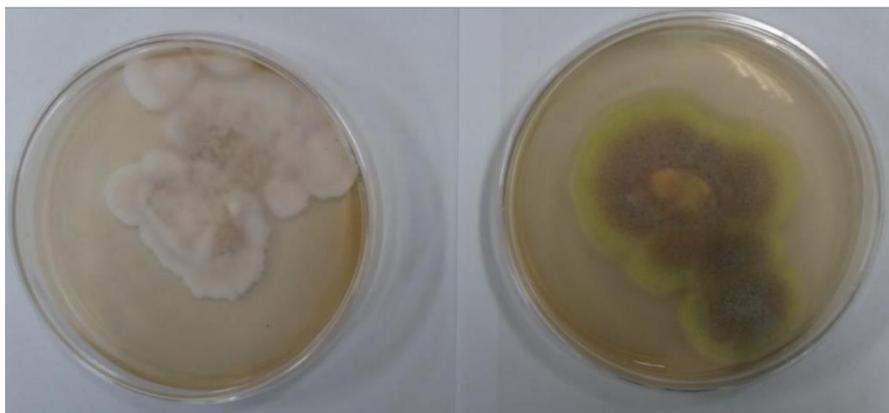
Figura 33 – Fungos isolados das placas com meio *Sabouraud* na: 1ª diluição (S1) (a) e 2ª diluição (S2) (b).

S1



(a)

S2

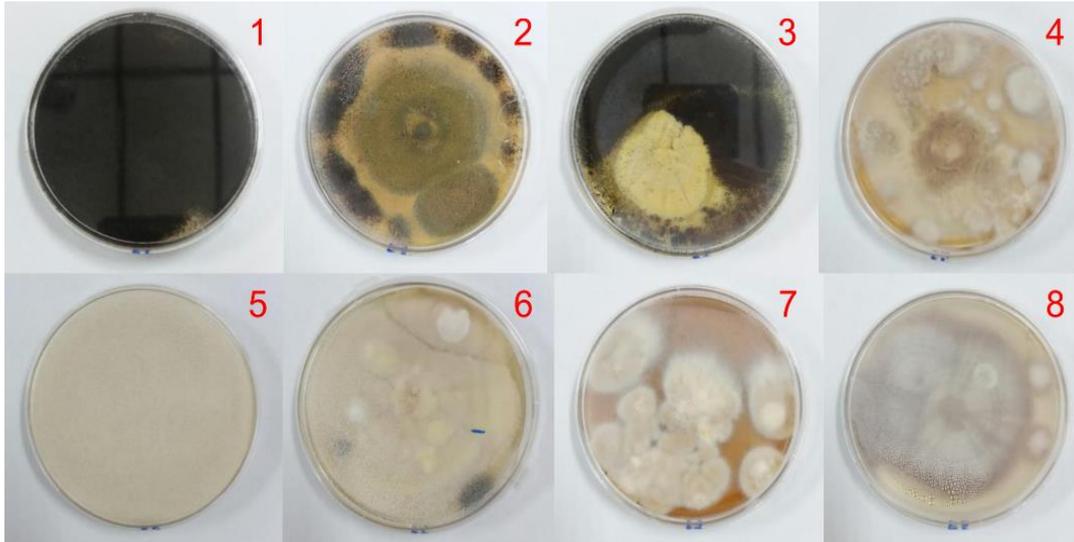


(b)

Fonte: O autor, 2023.

Nesta etapa, a partir destas placas, foi possível isolar oito fungos diferentes (Figura 34).

Figura 34 – Fungos isolados, numerados de um a oito.



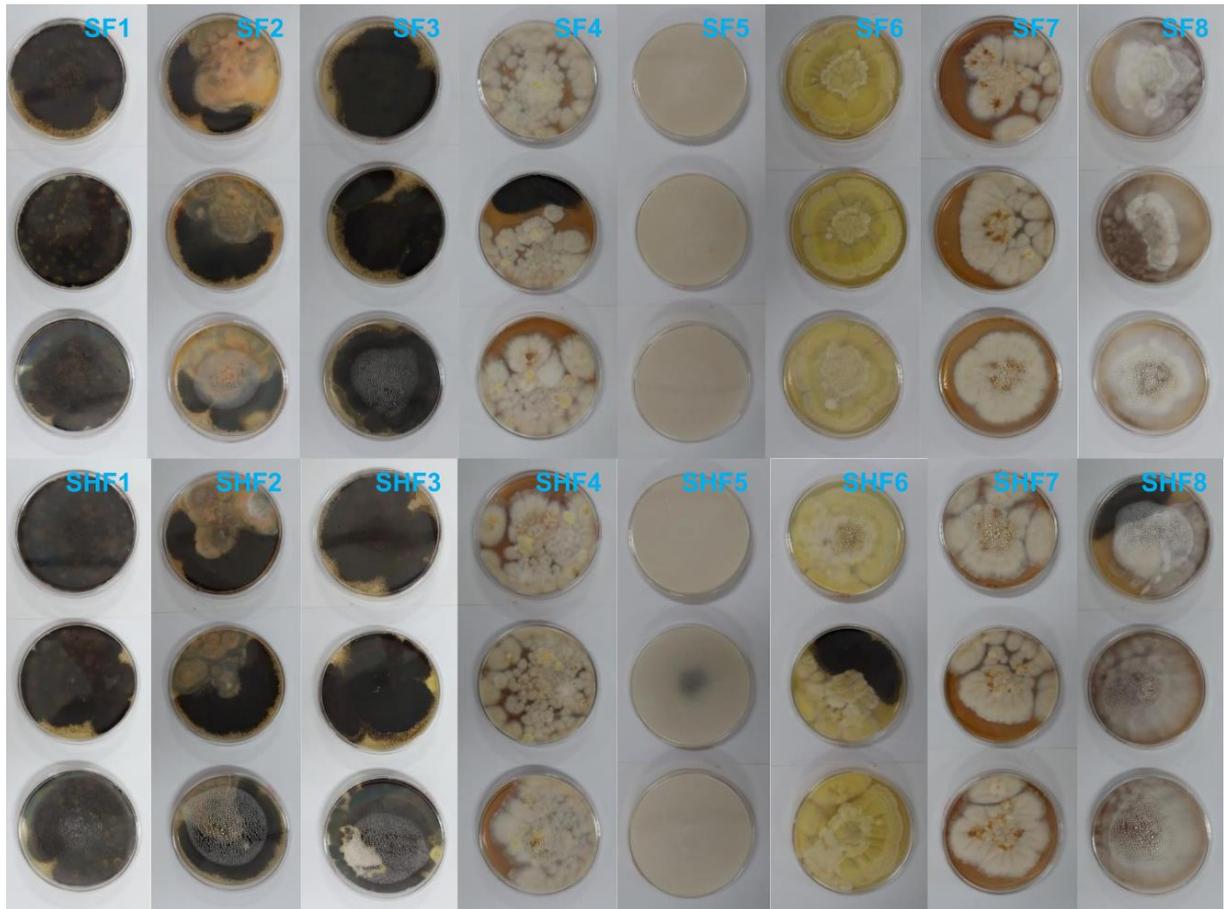
Fonte: O autor, 2023.

Estes oito fungos diferentes foram utilizados para a próxima etapa do estudo.

4.5.3. Observação do crescimento fúngico em meio de cultura deficiente em nutrientes

Após a incubação das placas de Petri a 20 °C durante 7 dias, foi possível observar a influência dos hidrogéis no crescimento fúngico. Em meio *Sabouraud*, há a disponibilidade de nutrientes, geralmente, utilizados por fungos para seu crescimento, logo, as placas de Petri com este meio foram utilizadas como controle positivo (Figura 35).

Figura 35 – Crescimento fúngico em meio *Sabouraud*: (SF1-8) sem hidrogel e (SHF1-8) com hidrogel (placas em triplicata).



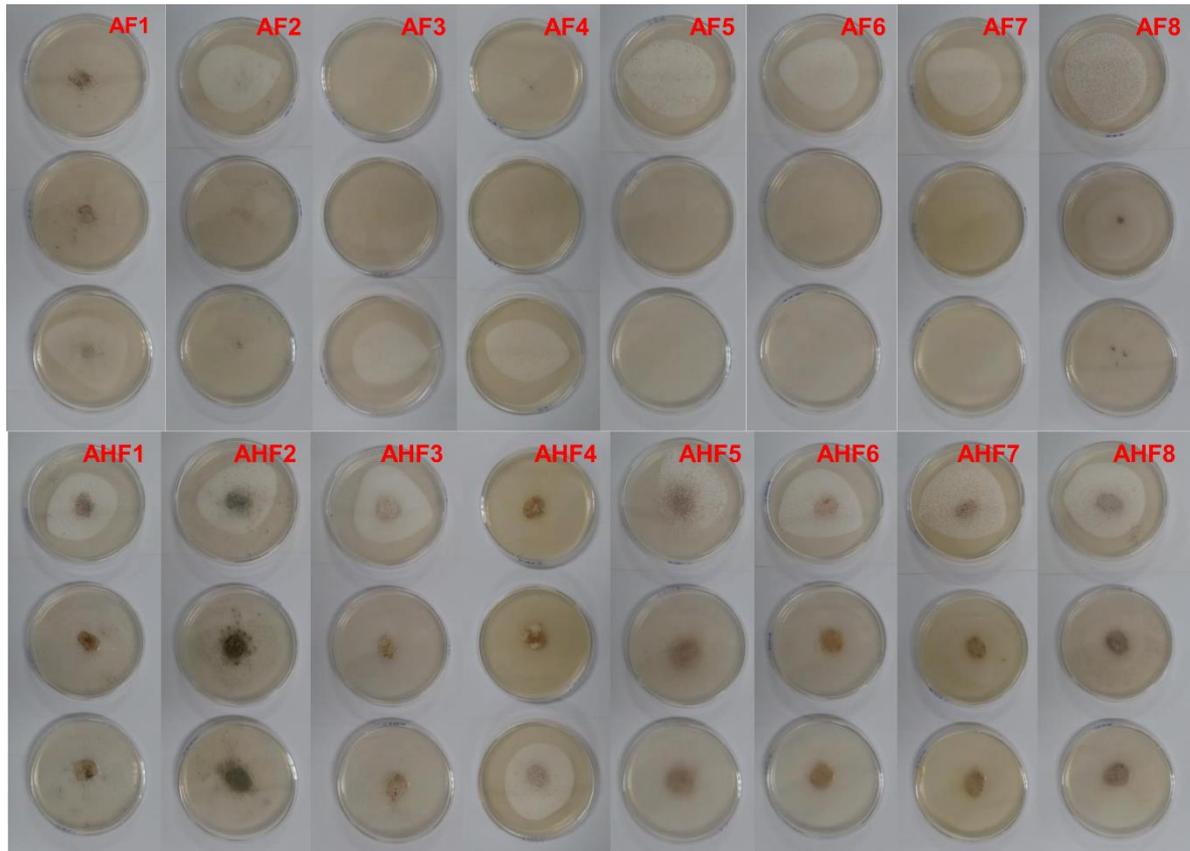
Fonte: O autor, 2023.

Na Figura 35, é possível observar o crescimento fúngico da placa SF1 até a placa SF8, como já era esperado. Nas placas identificadas como SHF1 até SHF8, ou seja, meio *Sabouraud* com hidrogel, foi possível observar que a presença dos hidrogéis não inibiu o crescimento de nenhum dos oito fungos diferentes isolados. O crescimento ocorreu com ou sem hidrogel, provavelmente por causa dos nutrientes existentes no meio *Sabouraud*.

Porém, a partir de observações macroscópicas, não foi possível afirmar que os hidrogéis estimularam o crescimento fúngico. Portanto, tal ensaio indicou apenas que o hidrogel, quando colocado no solo, não interferiu negativamente na atividade fúngica, isto é, que o material pode ser biodegradado por estes fungos.

Por outro lado, ao se utilizar um meio deficiente em nutrientes, como o ágar, foi possível se obter um controle negativo de crescimento fúngico. A Figura 36 ilustra as placas de Petri, em triplicata, contendo ágar com os fungos 1 ao 8 separadamente, com e sem hidrogel, após um período de incubação a 20 °C de 7 dias.

Figura 36 – Crescimento fúngico em ágar: (AF1-8) sem hidrogel e (AHF1-8) com hidrogel (placas em triplicata).



Fonte: O autor, 2023.

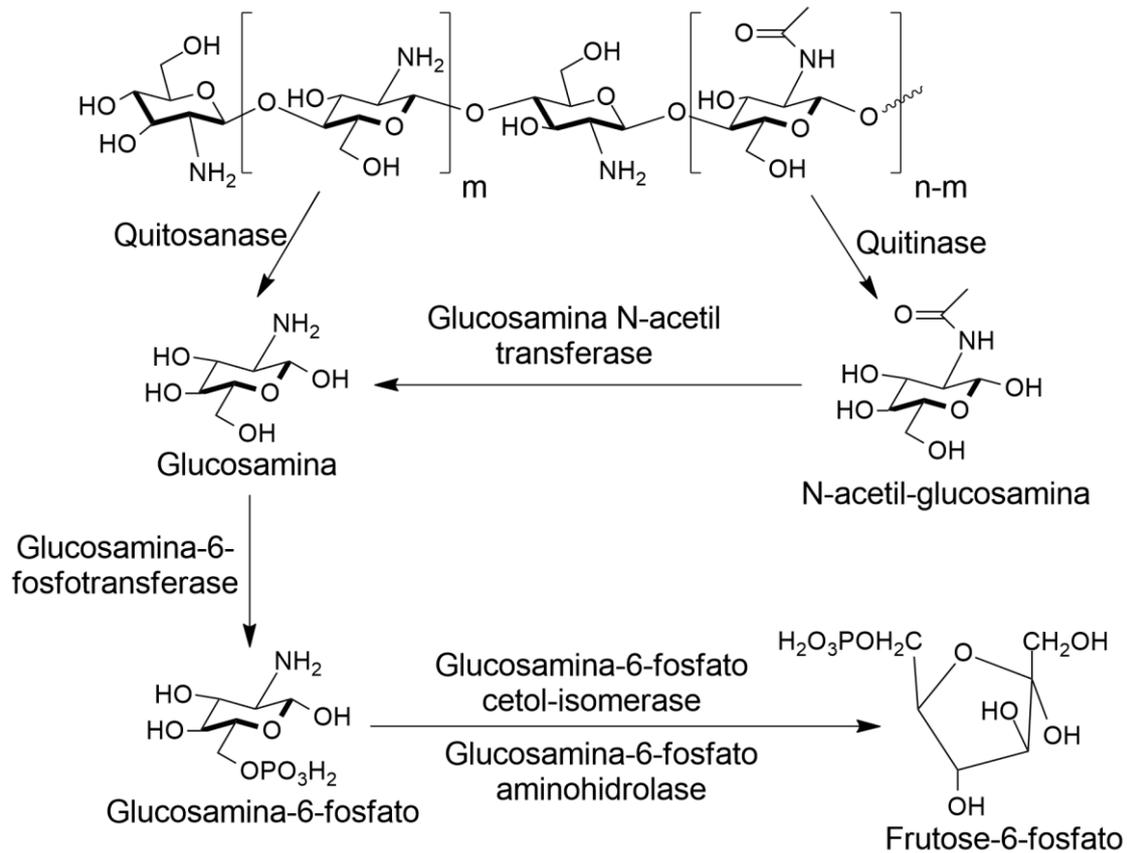
Como mencionado, pelo fato de o ágar não ser utilizado como fonte de nutrientes para o crescimento fúngico, este meio pôde ser utilizado como controle negativo. De fato, não foi possível observar crescimento nas placas contendo apenas o ágar.

Entretanto, nas placas de Petri contendo meio ágar e hidrogel, foi possível observar um pequeno crescimento ao redor do hidrogel. Tal crescimento foi mais acentuado em algumas placas, como, por exemplo, a placa AHF2 (ágar + hidrogel + fungo 2). Ao se comparar esta placa com a placa AF2 (ágar + fungo 2), é possível observar que o crescimento fúngico se deu ao redor do hidrogel, isto é, às custas do hidrogel.

Também foi possível observar este crescimento fúngico acentuado na placa AHF5 (ágar + hidrogel + fungo 5). A turbidez da placa está diretamente relacionada ao crescimento fúngico, uma vez que este fungo, especificamente, cresce de forma expandida, radicalar, ocupando toda a placa. Este crescimento não foi observado na placa AF5 (ágar + fungo 5).

Os fungos utilizaram os hidrogéis como fonte de carbono, pela estrutura que os mesmos apresentam. A Figura 37 ilustra um mecanismo para a obtenção de energia a partir da quitosana como fonte de carbono, que ocorre no interior dos microrganismos.

Figura 37 – Mecanismo de obtenção de energia pelos microrganismos através da quitosana.



Fonte: O autor, 2023 (adaptado de Yan e Fong, 2015).

Primeiramente, há a ação conjunta de quitinase, enzima responsável pela quebra da ligação glicosídica C-O-C das unidades acetiladas da quitosana (N-acetil-D-glucosamina), e de quitosanase, enzima responsável pela quebra da ligação glicosídica C-O-C das unidades desacetiladas da quitosana (β(1→4)-D-glucosamina). As unidades acetiladas são, então, convertidas em unidades desacetiladas através da enzima glucosamina N-acetil transferase.

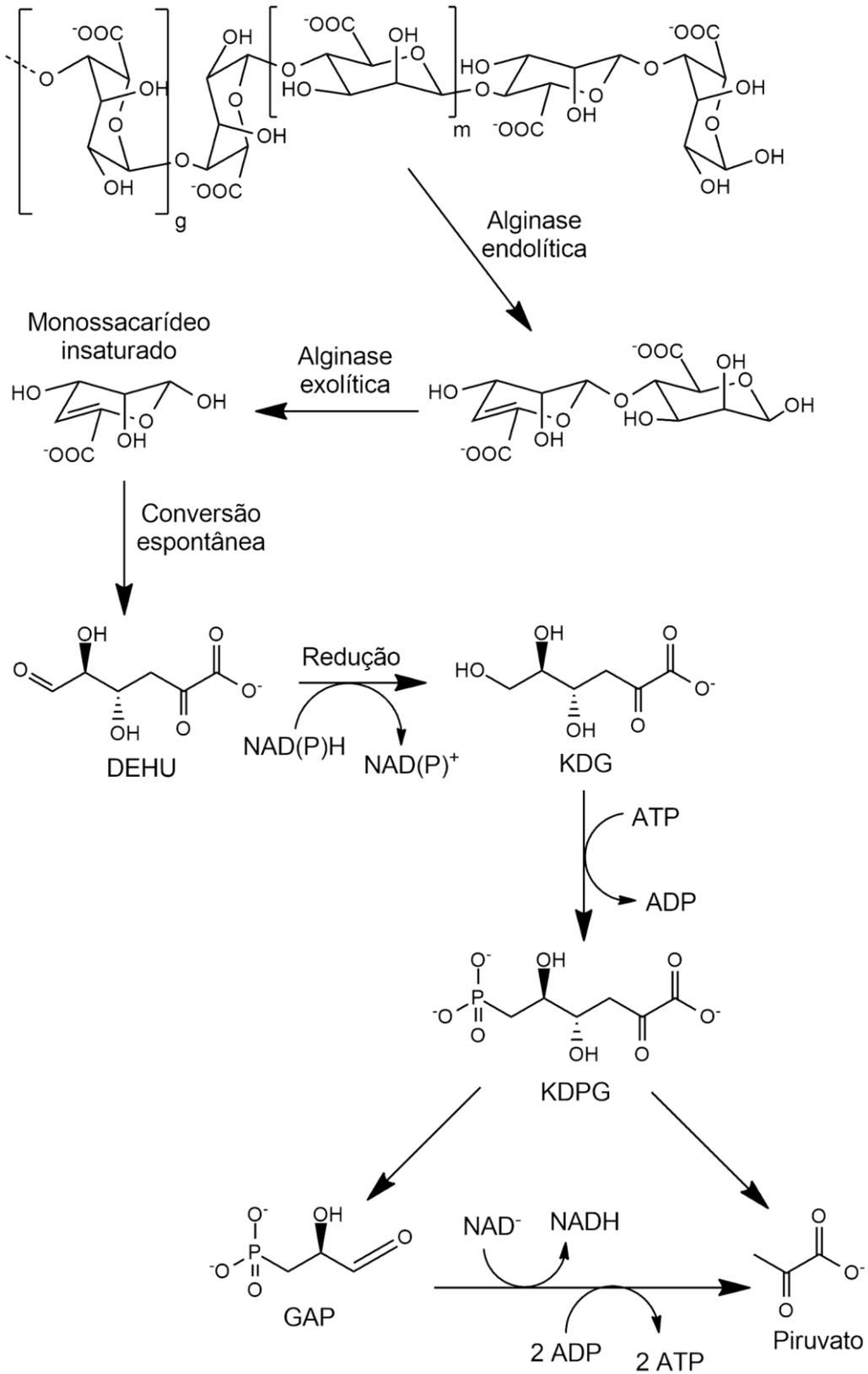
Em seguida, o grupamento fosfato (PO_3H_2^-) é introduzido no carbono 6 da glucosamina pela enzima glucosamina-6-fosfotransferase, transformando-a em glucosamina-6-fosfato.

Por último, há a ação de duas enzimas, a glucosamina-6-fosfato cetol-isomerase, responsável pela conversão do anel piranosídico para o anel furanosídico, e a glucosamina-6-fosfato aminohidrolase, responsável pela quebra e consequente retirada do grupamento amino (-NH₂).

A frutose-6-fosfato, então, é utilizada para a glicólise, processo de clivagem de ligações para obtenção de energia através da respiração ou fermentação.

A Figura 38 esquematiza um mecanismo proposto por Nishiyama *et al.* (2021) para a ação metabólica de alginato por bactérias.

Figura 38 – Mecanismo de obtenção de energia pelos microrganismos através do alginato.



Fonte: O autor, 2023 (adaptado de Nishiyama *et al.*, 2021).

Primeiramente, as enzimas alginases endolíticas clivam a estrutura do alginato em pontos aleatórios da cadeia, seguidas das enzimas alginases exolíticas, produzindo monossacarídeos insaturados. Estas unidades são convertidas espontaneamente, isto é, sem a ação de enzimas, em ácido 4-desoxi-L-erythro-5-hexulose urônico (*4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid* – DEHU).

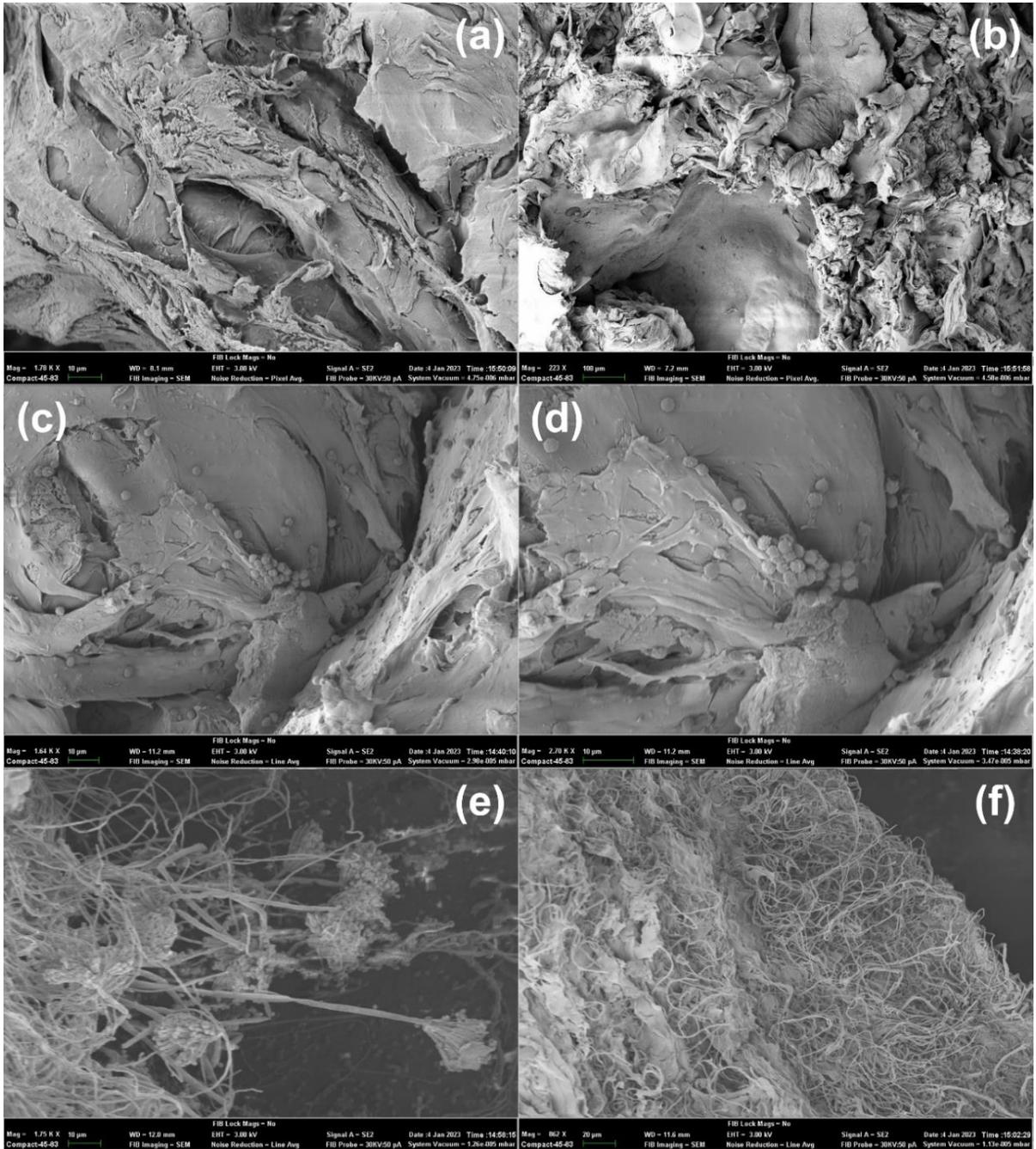
O DEHU, por sua vez, é reduzido em 2-ceto-3-desoxi-D-gluconato (*2-keto-3-deoxy-D-gluconate* – KDG), por enzimas específicas. A adição de grupamento fosfato ocorre em seguida, transformando KDG em 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato (*2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate* – KDPG). O KDPG pode ser diretamente convertido em piruvato, ou convertido em gliceraldeído-3-fosfato (GAP), que por sua vez é transformado em piruvato, gerando, então, energia (KAWAI; HASHIMOTO, 2022; NISHIYAMA *et al.*, 2021).

Os resultados encontrados corroboraram para o indicativo de que os fungos isolados do solo, usado nos experimentos de biodegradação desta Dissertação, realmente utilizaram os hidrogéis à base de alginato de sódio e quitosana como fonte de carbono. Estes resultados estão de acordo com os resultados microbiológicos encontrados no item 4.1. – *Análise físico-química e microbiológica do solo antes e após a biodegradação.*

4.5.4. Observação morfológica dos fungos

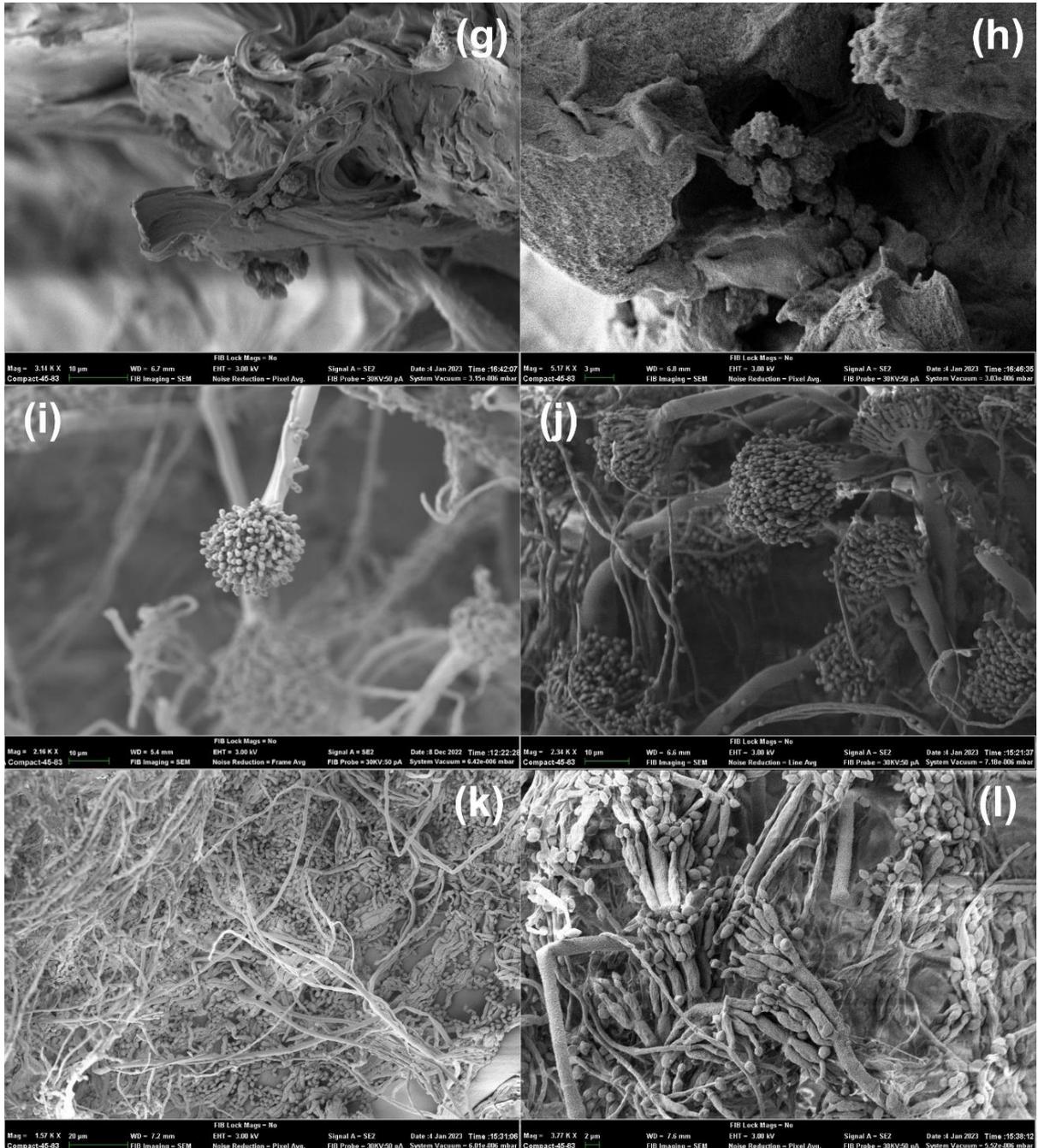
Com o objetivo de se obter mais informações acerca dos fungos (Figura 34) que estão atuando sobre a biodegradação do hidrogel utilizado, foram realizadas análises de SEM nas amostras de fungo em hidrogel, utilizando ágar como meio. Para isto, foi necessário tratar todas as amostras, com o intuito de se manter a estrutura morfológica dos fungos intacta. As micrografias podem ser observadas na Figura 39.

Figura 39 – Micrografias de SEM do controle e das amostras de fungos isolados (1 - 8) mostrados na Figura 34: controle (a) e (b); fungo 1 (c) e (d); fungo 2 (e) e (f); fungo 3 (g) e (h); fungo 4 (i) e (j); fungo 5 (k) e (l); fungo 6 (m) e (n); fungo 7 (o) e (p); fungo 8 (q) e (r).



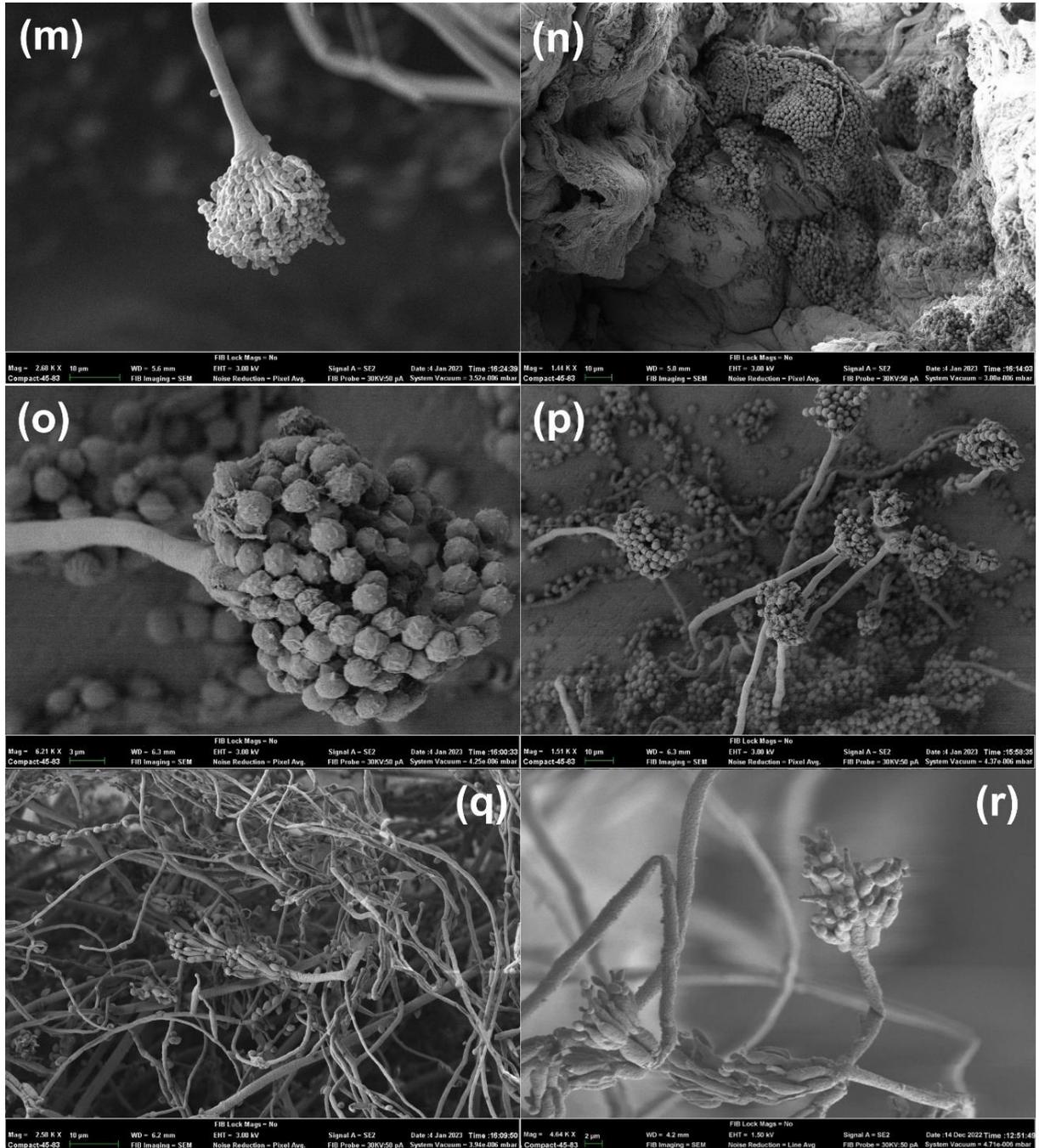
Fonte: O autor, 2023.

Figura 39 – Micrografias de SEM do controle e das amostras de fungos isolados (1 - 8) mostrados na Figura 34: controle (a) e (b); fungo 1 (c) e (d); fungo 2 (e) e (f); fungo 3 (g) e (h); fungo 4 (i) e (j); fungo 5 (k) e (l); fungo 6 (m) e (n); fungo 7 (o) e (p); fungo 8 (q) e (r) (continuação).



Fonte: O autor, 2023.

Figura 39 – Micrografias de SEM do controle e das amostras de fungos isolados (1 - 8) mostrados na Figura 34: controle (a) e (b); fungo 1 (c) e (d); fungo 2 (e) e (f); fungo 3 (g) e (h); fungo 4 (i) e (j); fungo 5 (k) e (l); fungo 6 (m) e (n); fungo 7 (o) e (p); fungo 8 (q) e (r) (continuação).



Fonte: O autor, 2023.

De acordo com Madigan *et al.* (2016), fungos utilizam polissacarídeos ou proteínas como fonte de carbono, para nutrição, através da produção de enzimas extracelulares capazes de digerir tais substâncias. Portanto, foi observado (Figura 39) que os fungos isolados utilizaram os hidrogéis à base de alginato de sódio e quitosana

como substrato, por meio da produção de enzimas que possibilitou a conversão da cadeia polimérica dos polissacarídeos utilizados em substâncias que produzissem energia, como discutido no tópico 4.5.3. – *Observação do crescimento fúngico em meio de cultura deficiente em nutrientes*. Ainda de acordo com Madigan *et al.* (2016), os fungos podem ser diferenciados pelas suas estruturas, como seus esporos e hifas.

Primeiramente, foi possível observar que, no controle (Figuras 39a e 39b), não houve crescimento de fungos. Com o intuito de obter indicativos de quais gêneros pertenceriam cada fungo observado na Figura 39 (c – r), as micrografias obtidas foram comparadas com micrografias presentes na literatura.

Pelas estruturas observadas dos fungos presentes nas Figuras 39 (c) e 39 (d) (Fungo 1), 39 (g) e 39 (h) (Fungo 3), foi possível notar um indicativo de que seriam leveduras, ou seja, fungos unicelulares (AGIZZIO *et al.*, 2006; MOLON; WOZNICKA; ZEBROWSKI, 2018; BELLUT; KROGERUS; ARENDT, 2020). Os fungos 2 (Figuras 39e e 39f) e 8 (Figuras 39q e 39r) pertenceriam ao gênero *Penicillium* (FUKUDA *et al.*, 2005; VALENTE *et al.*, 2014; BARSAINYA; CHANDRA; SINGH, 2016), os fungos 4 (Figuras 39i e 39j) e 6 (Figuras 39m e 39n) seriam do gênero *Aspergillus* (LEVETIN, 2004; KRIJGSHELD *et al.*, 2013; SAEED *et al.*, 2019), e os fungos 5 (Figuras 39k e 39l) e 7 (Figuras 39o e 39p) pertenceriam ao gênero *Cunninghamella* (NGUYEN; CHOI; LEE, 2017). Portanto, foi possível obter indicativos, com sucesso, de quais gêneros de fungos estão atuando sobre a biodegradação dos hidrogéis utilizados nesta Dissertação.

A explicação para a capacidade de crescimento dos fungos nos hidrogéis à base de alginato de sódio e quitosana se dá pela produção enzimática destes fungos em questão. De acordo com a literatura, espécies do gênero *Aspergillus* (Figuras 39i, 39j, 39m e 39n) são capazes de produzir as enzimas: quitinase (XIA *et al.*, 2001; BRZEZINSKA; JANKIEWICZ, 2012; FARAG *et al.*, 2016), capazes de hidrolisar cadeias de quitina, quitosanase (SILVA FILHO *et al.*, 2011; HIRANO *et al.*, 2012), capazes de hidrolisar cadeias de quitosana, e alginase (SINGH *et al.*, 2011), capazes de hidrolisar cadeias de alginato. Através destas hidrólises, os substratos são convertidos em energia (Figuras 37 e 38). Portanto, os fungos do gênero *Aspergillus* atuam sobre a biodegradação tanto das cadeias de alginato quanto de quitosana.

Os fungos do gênero *Penicillium* (Figuras 39e, 39f, 39q e 39r) são capazes de produzir as enzimas: quitinase (LEE *et al.*, 2009; XIE *et al.*, 2021) e quitosanase (NGUYEN *et al.*, 2014; CAO *et al.*, 2022). De acordo com Park *et al.* (2016), espécies do gênero *Penicillium* não produzem alginase. Porém, os fungos do gênero

Penicillium, apesar de não estarem atuando sobre a biodegradação do alginato, podem estar crescendo às custas da quitosana utilizada, através da produção das enzimas quitinase e quitosanase.

Em relação ao gênero *Cunninghamella*, algumas espécies podem produzir alginase (SILVA *et al.*, 2022; SILVA *et al.*, 2022), hidrolisando cadeias poliméricas de alginato.

De acordo com a literatura, algumas leveduras também conseguem produzir alginase (TAKAGI *et al.*, 2016) e quitosanase (NIDHEESH; PAL; SURESH, 2015), ou seja, também estariam atuando sobre a biodegradação.

Estes resultados indicam claramente que os hidrogéis preparados com alginato de sódio e quitosana foram usados, com sucesso, como fonte de carbono pelos fungos isolados do solo.

CONCLUSÃO

As conclusões obtidas nesta Dissertação foram:

- Através dos ensaios de biodegradabilidade dos hidrogéis à base de alginato de sódio e quitosana em solo argiloso, foi possível: (i) desenterrar e lavar os hidrogéis até 2 semanas de ensaio; (ii) entre 3 e 6 semanas, os hidrogéis puderam ser desenterrados, porém não conseguiram se manter íntegros após a lavagem; (iii) após 6 semanas, até 8 semanas enterrados, os hidrogéis não foram encontrados no solo, isto é, foram totalmente degradados;
- Não foi possível determinar a perda de massa dos hidrogéis após os ensaios de degradação. As micrografias de SEM mostraram que a morfologia dos hidrogéis sofreu alterações, desde o aumento da rugosidade da superfície até o rompimento da estrutura do material, à medida que o tempo de degradação aumentou;
- Não houve variação do pH do solo sem e com hidrogel. Entretanto, a umidade do solo com hidrogel foi superior à umidade do solo sem hidrogel a partir do 7º dia de ensaio. O hidrogel utilizado pode ser considerado como um condicionador de solo argiloso e ainda torna o ambiente propício à biodegradação;
- A análise microbiológica do solo mostrou que após o enterro do hidrogel, os níveis relativos à atividade microbiana aumentaram significativamente, indicando a ocorrência de biodegradação do hidrogel utilizado;
- A caracterização por FTIR e espectroscopia Raman evidenciou a quebra das ligações β -glicosídicas, comprovando a ocorrência da degradação do hidrogel;
- A análise termogravimétrica revelou que, de acordo com a biodegradação, os hidrogéis aumentaram sua resistência térmica, sugerindo que a biodegradação tenha ocorrido, inicialmente, de forma preferencial nas cadeias de alginato de sódio e por último nas cadeias acetiladas da quitosana;
- Os ensaios microbiológicos comprovaram a utilização dos hidrogéis à base de alginato de sódio e quitosana como fonte de carbono, com indicativos de que foram por fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cunninghamella*, além de leveduras.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (DF). *Manual de usos consuntivos da água no Brasil*. Distrito Federal: ANA, 2019. 75 p. Relatório técnico.

AGIZZIO, A. P. *et al.* The antifungal properties of a 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds involve plasma membrane permeabilization and ultrastructural alterations in yeast cells. *Plant Science*, v. 171, p. 515-522, 2006.

ALSAMMAN, M. T.; SÁNCHEZ, J. Chitosan- and alginate-based hydrogels for the adsorption of anionic and cationic dyes from water. *Polymers*, v. 14 (1498), 2022.

ARAFI, E. G. *et al.* Preparation of biodegradable sodium alginate/carboxymethylchitosan hydrogels for the slow-release of urea fertilizer and their antimicrobial activity. *Reactive and Functional Polymers*, v. 174, p. 105243, 2022.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 6457: amostras de solo: preparação para ensaios de compactação e ensaios de caracterização: método de ensaio*. Rio de Janeiro, 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 6502: rochas e solos*. Rio de Janeiro, 1995.

BARSAINYA, M.; CHANDRA, P.; SINGH, D. P. Investigation of Cr (VI) uptake in saline condition using psychrophilic and mesophilic *Penicillium* sp. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 5 (1), p. 274-288, 2016.

BARZKAR, N. *et al.* Alginate lyases from marine bacteria: an enzyme ocean for sustainable future. *Molecules*, v. 27 (11), 2022.

BAULI, C. R. *et al.* Eco-friendly carboxymethyl cellulose hydrogels filled with nanocellulose or nanoclays for agriculture applications as soil conditioning and nutrient carrier and their impact on cucumber growing. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 623, 2021.

BELLUT, K.; KROGERUS, K.; ARENDT, E. K. *Lachancea fermentati* strains isolated from kombucha: fundamental insights, and practical application in low alcohol beer brewing. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 1-21, 2020.

BREILAND, A. A. *et al.* Polyphosphate-accumulating bacteria: potential contributors to mineral dissolution in the oral cavity. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 84 (7), 2018.

BRZEZINSKA, M. S.; JANKIEWICZ, U. Production of antifungal chitinase by *Aspergillus niger* LOCK 62 and its potential role in the biological control. *Current Microbiology*, v. 65, p. 666-672, 2012.

CAO, S. *et al.* A novel chitosanase from *Penicillium oxalicum* M2 for chitooligosaccharide production: purification, identification and characterization. *Molecular Biotechnology*, v. 64, p. 947-957, 2022.

CATTELAN, A. J.; DALL'AGNOL, A. The rapid soybean growth in Brazil. *OCL – Oilseeds & fats, Crops and Lipids*, v. 25 (1), 2018.

CHATTERJEE, S.; CHI-LEUNG HUI, P. Stimuli-Responsive Hydrogels: An Interdisciplinary Overview. *In: HYDROGELS - SMART MATERIALS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS*: IntechOpen, 2019.

CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 15., 2019, Bento Gonçalves. *Avaliação da razão volumétrica na formação de complexo polieletrólítico hidrotentor à base de carboximetilcelulose e quitosana*. Bento Gonçalves, 2019.

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

COSTA, M. P. M. *et al.* 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.

COSTA, M. P. M. *et al.* Sodium alginate/chitosan/glyphosate superabsorbent bio-foam as a release system for herbicide. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 139 (11), p. 51776, 2022.

COSTA, M. P. M.; FERREIRA, I. L. M.; CRUZ, M. T. M. New polyelectrolyte complex from pectin/chitosan and montmorillonite clay. *Carbohydrate Polymers*, v. 146, p. 123-130, 2016.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (DF). *Manual de métodos de análise de solo*. Distrito Federal: EMBRAPA, 2017. 573p. Manual Técnico.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (DF). *Visão 2030: o futuro da agricultura brasileira*. Distrito Federal: EMBRAPA, 2018. 212p. Relatório técnico.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (PR). *Manejo do solo para a cultura da soja*. Londrina: EMBRAPA, 1993. 71p. Circular Técnica.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (RJ). *A produção da soja e do milho como um caminho para o desenvolvimento do agronegócio da região norte fluminense*. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 2021. 46 p. Relatório técnico.

FARAG, A. M. *et al.* Purification, characterization and antimicrobial activity of chitinase from marine-derived *Aspergillus terreus*. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, v. 42, p. 185-192, 2016.

FRACHINI, E. C. G.; PETRI, D. F. S. Magneto-responsive hydrogels: Preparation, characterization, biotechnological and environmental applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 30 (10), p. 2010–2028, 2019.

FUKUDA, T. *et al.* Citridones, new potentiators of antifungal miconazole activity, produced by *Penicillium* sp. FKI-1938. *The Journal of Antibiotics*, v. 58 (5), p. 309-314, 2005.

GÁMIZ-GONZÁLEZ, M. A. *et al.* Kinetic study of thermal degradation of chitosan as a function of deacetylation degree. *Carbohydrate Polymers*, v. 167, p. 52-58, 2017.

GUARINO, V. *et al.* Degradation properties and metabolic activity of alginate and chitosan polyelectrolytes for drug delivery and tissue engineering applications. *AIMS Materials Science*, v. 2 (4), p. 497–502, 2015.

GUILHERME, M. R. *et al.* Superabsorbent hydrogels based on polysaccharides for application in agriculture as soil conditioner and nutrient carrier: A review. *European Polymer Journal*, v. 72, p. 365–385, 2015.

HASIJA, V. *et al.* Green synthesis of agar/Gum Arabic based superabsorbent as an alternative for irrigation in agriculture. *Vacuum*, v. 157, p. 458-464, 2018.

HAY, I. D. *et al.* Bacterial biosynthesis of alginates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 85 (6), p. 752–759, 2010.

HE, M. *et al.* Biocompatible and biodegradable chitosan/sodium polyacrylate polyelectrolyte complex hydrogels with smart responsiveness. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 155, p. 1245–1251, 2020.

HEBBAR, R. S.; ISLOOR, A. M.; WAHAB MOHAMMAD, A. Specialty Application of Functional Biopolymers. *In: FUNCTIONAL BIOPOLYMERS: Springer, Cham, 2018. p. 1–48.*

HIEW, S. H. *et al.* Bioinspired short peptide hydrogel for versatile encapsulation and controlled release of growth factor therapeutics. *Acta Biomaterialia*, 2021.

HIRANO, K. *et al.* Characterization of a chitosanase from *Aspergillus fumigatus* ATCC13073. *Bioscience, Biotechnology & Biochemistry*, v. 76 (8), p. 1523-1528, 2012.

JOSEPH, S. M. *et al.* A review on source-specific chemistry, functionality, and applications of chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, v. 2, p. 100036, 2021.

KAPAREKAR, P. S.; PODDAR, N.; ANANDASADAGOPAN, S. K. Fabrication and characterization of Chrysin – A plant polyphenol loaded alginate-chitosan composite for wound healing application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 206, p. 111922, 2021.

KAUR, K.; JINDAL, R.; JINDAL, D. Controlled release of vitamin B1 and evaluation of biodegradation studies of chitosan and gelatin based hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 146, p. 987–999, 2020.

KAWAI, S.; HASHIMOTO, W. 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronate (DEH) and DEH reductase: key molecule and enzyme for the metabolism and utilization of alginate. *Molecules*, v. 27 (2), 2022.

KAYA, M.; BARAN, T. Description of a new surface morphology for chitin extracted from wings of cockroach (*Periplaneta americana*). *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 75, p. 7-12, 2015.

KHAJAVIAN, M. *et al.* Chitin and derivative chitosan-based structures — Preparation strategies aided by deep eutectic solvents: A review. *Carbohydrate Polymers*, v. 275, 2022.

KIM, H. S.; LEE, C.; LEE, E. Y. Alginate lyase: structure, property, and application. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 16, p. 843-851, 2011.

KLOSTER, G. A. *et al.* Design of super-paramagnetic bilayer films based on chitosan and sodium alginate. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, v. 2, p. 100083, 2021.

KRIJGSHELD, P. *et al.* Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, v. 74, p. 1-29, 2013.

LEE, Y. *et al.* Acceleration of wound healing in diabetic rats by layered hydrogel dressing. *Carbohydrate Polymers*, v. 88, p. 809-819, 2012.

LEE, Y. G. *et al.* Purification and properties of a chitinase from *Penicillium sp.* LYG 0704. *Protein Expression and Purification*, v. 65, p. 244-250, 2009.

LEVETIN, E. An atlas of fungal spores. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 113 (2), p. 366-368, 2004.

LI, X. *et al.* Characterization and biodegradation of chitosan-alginate polyelectrolyte complexes. *Polymer Degradation and Stability*, v. 94 (1), p. 1–6, 2009.

LIANG, C.; DAS, K. C.; McCLENDON, R. W. The influence of temperature and moisture contents regimes on the aerobic microbial activity of a biosolids composting blend. *Bioresource Technology*, v. 86, p. 131-137, 2003.

LIU, T. *et al.* Identification of coexistence of biological and non-biological aerosol particles with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) stain. *Particuology*, v. 72, p. 49-57, 2023.

LONČAREVIĆ, A.; IVANKOVIĆ, M.; ROGINA, A. Lysozyme-induced degradation of chitosan: the characterisation of degraded chitosan scaffolds. *Journal of tissue repair and regeneration*, v. 1 (1), p. 12-22, 2017.

LOPES, A. S. *Manual Internacional de Fertilidade do Solo*. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1998.

MADIGAN, M. T. *et al.* *Microbiologia de Brock*. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MICHALIK, R.; WANDZIK, I. A mini-review on chitosan-based hydrogels with potential for sustainable agricultural applications. *Polymers*, v. 12 (10), p. 1–16, 2020.

MOLON, M.; WOZNICKA, O.; ZEBROWSKI, J. Cell wall biosynthesis impairment affects the budding lifespan of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. *Biogerontology*, v. 19, p. 67-79, 2018.

MONTESANO, F. F. *et al.* Biodegradable Superabsorbent Hydrogel Increases Water Retention Properties of Growing Media and Plant Growth. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, v. 4, p. 451–458, 2015.

MOUSSOUT, H. *et al.* Kinetics and mechanism of the thermal degradation of biopolymers chitin and chitosan using thermogravimetric analysis. *Polymer Degradation and Stability*, v. 130, p. 1-9, 2016.

NAKAMURA, K.; HATAKEYAMA, T.; HATAKEYAMA, H. Thermal properties of solvolysis lignin-derived polyurethanes. *Polymers for Advanced Technology*, v. 3, p. 151-155, 1992.

NARAYAN, R. Biodegradability... *Bioplastics magazine*, v. 4, p. 28-31, 2009.

NASCIMENTO, C. D. v. *et al.* Potential of superabsorbent hydrogels to improve agriculture under abiotic stresses. *Journal of Arid Environments*, v. 189, 2021.

NIDHEESH, T.; PAL, G. K.; SURESH, P. V. Chitooligomers preparation by chitosanase produced under solid state fermentation using shrimp by-products as substrate. *Carbohydrate Polymers*, v. 121, p. 1-9, 2015.

NGUYEN, A. D. *et al.* Production and purification of a fungal chitosanase and chitooligomers from *Penicillium janthinellum* D4 and discovery of the enzyme activators. *Carbohydrate Polymers*, v. 108, p. 331-337, 2014.

NGUYEN, T. T. T.; CHOI, Y.; LEE, H. B. Isolation and characterization of three unrecorded zygomycete fungi in Korea: *Cunninghamella bertholletiae*, *Cunninghamella echinulata*, and *Cunninghamella elegans*. *Mycobiology*, v. 45, p. 318-326, 2017.

NISHIYAMA, R. *et al.* An oxidative metabolic pathway of 4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (DEHU) from alginate in an alginate-assimilating bacterium. *Communications biology*, v. 4 (1254), 2021.

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

PARK, M. S. *et al.* Diversity and enzyme activity of *Penicillium* species associated with macroalgae in Jeju Island. *Journal of Microbiology*, v. 54 (10), p. 646-654, 2016.

PHANG, Y. *et al.* Thermal and microbial degradation of alginate-based superabsorbent Polymer. *Polymer Degradation and Stability*, v. 96, p. 1653-1661, 2011.

POLMAN, E. M. N. *et al.* Comparison of the aerobic biodegradation of biopolymers and the corresponding bioplastics: A review. *Science of the Total Environment*, v. 753, 2021.

PRADO, A. G. S.; AIROLDI, C. The influence of moisture on microbial activity of soils. *Thermochimica Acta*, v. 332, p. 71-74, 1999.

RUJNIĆ-SOKELE, M.; PILIPOVIĆ, A. Challenges and opportunities of biodegradable plastics: A mini review. *Waste Management and Research*, v. 35 (2) p. 132–140, 2017.

SAEED, I. *et al.* Assessment of mold and yeast in some bakery products of Lahore, Pakistan based on LM and SEM. *Microscopy Research & Technique*, v. 82, p. 85-91, 2019.

SALA, O. *Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho*. 2. ed. São Paulo: Ed. Unesp, 2011.

SANCHEZ-BALLESTER, N. M.; BATAILLE, B.; SOULAIROL, I. Sodium alginate and alginic acid as pharmaceutical excipients for tablet formulation: Structure-function relationship. *Carbohydrate Polymers*, v. 270, 2021.

SARUCHI *et al.* Biodegradable hydrogels of tragacanth gum polysaccharide to improve water retention capacity of soil and environment-friendly controlled release of agrochemicals. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 132, p. 1252–1261, 2019.

SARUCHI *et al.* Biodegradation of Gum tragacanth acrylic acid based hydrogel and its impact on soil fertility. *Polymer Degradation and Stability*, v. 115, p. 24–31, 2015.

SCHMID, T. *et al.* Towards Chemical analysis of nanostructures in biofilms II: tip-enhanced Raman spectroscopy of alginates. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 391 (5), p. 1907-1916, 2008.

SENNA, A. M.; BOTARO, V. R. Biodegradable hydrogel derived from cellulose acetate and EDTA as a reduction substrate of leaching NPK compound fertilizer and water retention in soil. *Journal of Controlled Release*, v. 260, p. 194–201, 2017.

SILVA, C. E. F. *et al.* Application of machine learning to predict the yield of alginate lyase solid-state fermentation by *Cunninghamella echinulata*: artificial neural networks and support vector machine. *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*, v. 135, p. 3155-3171, 2022.

SILVA, M. C. S. *et al.* Alginate lyase produced by filamentous fungus through solid state fermentation using *Sargassum* from the Brazilian coast. *Waste and Biomass Valorization*, v. 13, p. 2947-2962, 2022.

SILVA FILHO, R. C. *et al.* Selection of strains producing fungal chitosanase and kinetics. *Holos*, v. 3, p. 56-63, 2011.

SINGH, R. P. *et al.* Purification and partial characterization of an extracellular alginate lyase from *Aspergillus oryzae* isolated from brown seaweed. *Journal of Applied Phycology*, v. 23 (4), p. 755-762, 2011.

SOON, C. Y. *et al.* Extraction and physicochemical characterization of chitin and chitosan from *Zophobas morio* larvae in varying sodium hydroxide concentration. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 108, p. 135-142, 2018.

TAKAGI, T. *et al.* Engineered yeast whole-cell biocatalyst for direct degradation of alginate from macroalgae and production of non-commercialized useful monosaccharide from alginate. *Biotechnological Products and Process Engineering*, v. 100, p. 1723-1732, 2016.

TORRES, E. J. L. *et al.* On the structural organization of the bacillary band of *Trichuris muris* under cryopreparation protocols and three-dimensional electron microscopy. *Journal of Structural Biology*, v. 212 (2), 2020.

VALENTE, A. M. M. P. *et al.* Quantification of mycophenolic acid and citrinin produced by *Penicillium sp.* using ^1H NMR. *Applied Magnetic Resonance*, v. 45, p. 207-215, 2014.

VLEUGELS *et al.* Determination of the 'apparent pK_a ' of selected food hydrocolloids using ortho-toluidine blue. *Food Hydrocolloids*, v. 81, p. 273-283, 2018.

WARREN, R. A. J. Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 50, p. 183-212, 1996.

WOLF, M.; TAMBOURGI, E. B.; PAULINO, A. T. Stability of β -D-galactosidase immobilized in polysaccharide-based hydrogels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 609, 2021.

XIA, G. *et al.* A novel chitinase having a unique mode of action from *Aspergillus fumigatus* YJ-407. *European Journal of Biochemistry*, v. 268, p. 4079-4085, 2001.

XIE, X. *et al.* A broad-specificity chitinase from *Penicillium oxalicum* k10 exhibits antifungal activity and biodegradation properties of chitin. *Marine Drugs*, v. 19 (7), p. 356, 2021.

YAN, Q.; FONG, S. S. Bacterial chitinase: nature and perspectives for sustainable bioproduction. *Bioresources and Bioprocessing*, v. 2 (31), 2015.

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

ZAJAĆ, A. *et al.* Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 134, p. 114-120, 2015.

APÊNDICE – Resultados da Análise de Variância (ANOVA) para os resultados de umidade do solo (item 4.3.2. – *Determinação da umidade*).

1 dia até 8 semanas					
Fonte da variação	Soma dos quadrados (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média dos quadrados (MQ)	F	Valor de p
Entre grupos	2173,051	12	181,0876	51,29055	5,63x10 ⁻¹⁵
Dentro dos grupos	91,79618	26	3,530622		
Total	2264,847	38			
3 semanas até 8 semanas					
Fonte da variação	Soma dos quadrados (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média dos quadrados (MQ)	F	Valor de p
Entre grupos	83,677	5	16,7354	3,107365	0,049931
Dentro dos grupos	64,62864	12	5,38572		
Total	148,3056	17			
4 semanas até 8 semanas					
Fonte da variação	Soma dos quadrados (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Média dos quadrados (MQ)	F	Valor de p
Entre grupos	44,83169	4	11,20792	2,743585	0,089085
Dentro dos grupos	40,85137	10	4,085137		
Total	85,68306	14			

Fonte: O autor, 2023.

Estes resultados confirmam que o *plateau* para a umidade do solo foi atingido após 4 semanas de ensaio ($p > 0,05$).