

DESENVOLVIMENTO DE BIOMATERIAL À BASE DE ALGINATO DE SÓDIO/QUITOSANA: UM SISTEMA PARA LIBERAÇÃO GRADATIVA DO GLIFOSATO

Rafael F. P. da Rocha¹, Marcia P. M. da Costa¹ e Ivana L. M. Ferreira^{1*}

1- Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier, 524, PHLC, sala 310, Maracanã, Rio de Janeiro, RJ, 20550-900

* ivanalmellof@gmail.com ; ivanamello@uerj.br

RESUMO

Foi preparado um biomaterial constituído por dois polissacarídeos: alginato de sódio (ALG) e quitosana (QUI) com o herbicida glifosato encapsulado, para uso como sistema de liberação gradativa. O biomaterial preparado em pH 6 apresentou características elevadas quanto ao grau de intumescimento (>1000%) e resistência à compressão. Foram realizados estudos cinéticos de adsorção e liberação de glifosato sendo possível verificar que o biomaterial foi capaz de controlar a liberação do herbicida. A cinética de liberação atingiu o estado de equilíbrio após 30 dias. Os resultados das propriedades morfológicas, analisadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM) e microscopia confocal de varredura a laser (CLSM), mostraram a interação preferencial do glifosato com moléculas de QUI. O estudo mostrou que o complexo produzido pode ser classificado como um material superabsorvente e de alto desempenho para utilização em sistemas liberação de agroquímicos. Portanto, este trabalho apresenta uma nova perspectiva para materiais à base de polissacarídeos, possibilitando novas aplicações agrícolas.

Palavras-chaves: alginato de sódio; quitosana; glifosato; microscopia confocal; liberação controlada e adsorção.

INTRODUÇÃO

Com o crescimento da população mundial, a preocupação com o aumento da produção de alimentos é um objetivo primordial da maioria dos países⁽¹⁻³⁾. Portanto, a preocupação com o meio ambiente devido ao uso excessivo de herbicidas (glifosato) levou à necessidade de desenvolver tecnologias que diminuíssem os efeitos indesejáveis dos agroquímicos^(4,5). Nesse contexto, os materiais poliméricos, especialmente os polímeros naturais, têm sido empregados como veículos para liberação de agrotóxicos devido à capacidade de retenção de água do solo além de serem biodegradáveis e atóxicos^(6,7). Os biomateriais têm a característica especial de absorver quantidades significativas de água sem dissolver ou perder sua integridade estrutural⁽⁸⁾. A alta hidrofiliabilidade se deve particularmente à presença de porções hidrofílicas⁽⁹⁾.

O objetivo deste trabalho é produzir, caracterizar e aplicar *in vitro* biomateriais formados a partir da complexação de dois polissacarídeos (alginato de sódio e quitosana), com e sem a presença do herbicida glifosato (GLI), visando a formação de um sistema de liberação gradativa (ALG/QUI/GLI). Serão avaliadas as propriedades mecânicas e

morfológicas, antes e após a incorporação do glifosato, bem como realizados estudos cinéticos de adsorção e liberação gradativa do herbicida.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram preparadas solução aquosa de alginato de sódio (ALG) (Sigma-aldrich) e solução ácida de quitosana (QUI) (2 % m/v de ácido acético) (Sigma-aldrich) em concentrações de 3,0 % e 1,5 %, respectivamente ⁽¹⁰⁾. As soluções foram misturadas de forma a se obter uma composição de razão em volume dos polissacarídeos (ALG/QUI = 1/1) a 50°C. Após o tempo de 24h em repouso, as amostras foram lavadas com água deionizada, congeladas e liofilizadas durante 48 horas. Em seguida, as amostras secas foram divididas em dois grupos, um com o herbicida glifosato e outro grupo sem o herbicida. Para isso, as amostras foram imersas em solução de glifosato a 52 mg/L durante 48 h. Após esse período, os hidrogéis foram congelados a -4°C e liofilizados por 48 h.

Caracterização morfológica

A morfologia do biomaterial foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (SEM), em equipamento JEOL/JSM 7100F com voltagem de operação de 5Kv. Para análise no microscópio confocal a laser (CLSM), foi empregado o equipamento Zeiss LSM 510 META, usando uma objetiva EC Plan-Neofluar 10x/0.30 M27. Duas substâncias fluorescentes foram utilizadas para rotular cada polissacarídeo. Dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) rotula o alginato de sódio, absorvendo luz numa faixa de 350 – 400 nm e emitindo a coloração azul numa faixa de 420 – 461 nm e isotiocianato de rodamina B (RdB) rotula a quitosana absorvendo luz numa faixa de 495 – 570 nm e emitindo a coloração vermelha numa faixa de 525 – 590 nm.

Propriedade mecânica (resistência à compressão)

A resistência mecânica dos biomateriais foi avaliada através de medidas de compressão em máquina universal de ensaio Emic, DL2000, com célula de carga de 500 N e velocidade das placas de 12 mm/min (de acordo com a norma ASTM D 1621-00 adaptada). Os corpos de prova medindo cerca de 20 mm de comprimento x 20 mm de diâmetro. Equação (A).

$$\sigma = f / S_o \quad (A)$$

Onde: f é o valor da força exercida e S_o é a área do corpo de prova.

Avaliação da adsorção do glifosato pelo biomaterial

O estudo de adsorção foi realizado com a concentração de glifosato (52 mg/L). A quantidade de glifosato no biomaterial foi calculada pela diferença entre “ C_0 ” e a concentração na solução após o tempo “ t ” (C_t). A quantidade de herbicida adsorvida foi determinada por meio da Equação (B).

$$q_t = [(C_0 - C_t) \times V / m] \quad (B)$$

Onde: q_t é a quantidade de herbicida adsorvida pelo biomaterial por grama de biomaterial seco (mg.g^{-1});

C_0 e C_t (mg.L^{-1}) são as concentrações de herbicida na solução inicial e solução aquosa após o processo de absorção no tempo “t”, respectivamente;

V é o volume da fase aquosa;

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

Estudo da liberação gradativa do herbicida glifosato *in vitro*

O biomaterial, após ter permanecido durante 48 h na solução aquosa de glifosato ($C_0 = 52 \text{ mg/L}$), foi congelado e liofilizado por um período 48 horas. Após a sua liofilização, o biomaterial foi colocado em um bécher, contendo 50 mL de água. De tempos em tempos, durante um período de 60 dias, alíquotas de 2 mL foram retiradas e quantificadas pelo método colorimétrico utilizando curva de calibração previamente construída (comprimento de onda de absorção máxima, $\lambda = 570 \text{ nm}$). Esse teste foi realizado em triplicata. A cinética de liberação foi avaliada em termos de porcentagem de liberação em função do tempo, baseando-se na Equação (C).

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

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 mostra as imagens obtidas pelas análises de SEM e CLSM. Foi possível observar os espaços vazios (poros) na amostra (ALG/QUI), evidenciando assim, a porosidade do material e corroborando com o elevado grau de intumescimento. A microscopia de fluorescência foi aplicada com o objetivo de investigar possíveis interações estruturais na mistura ^(12,13).

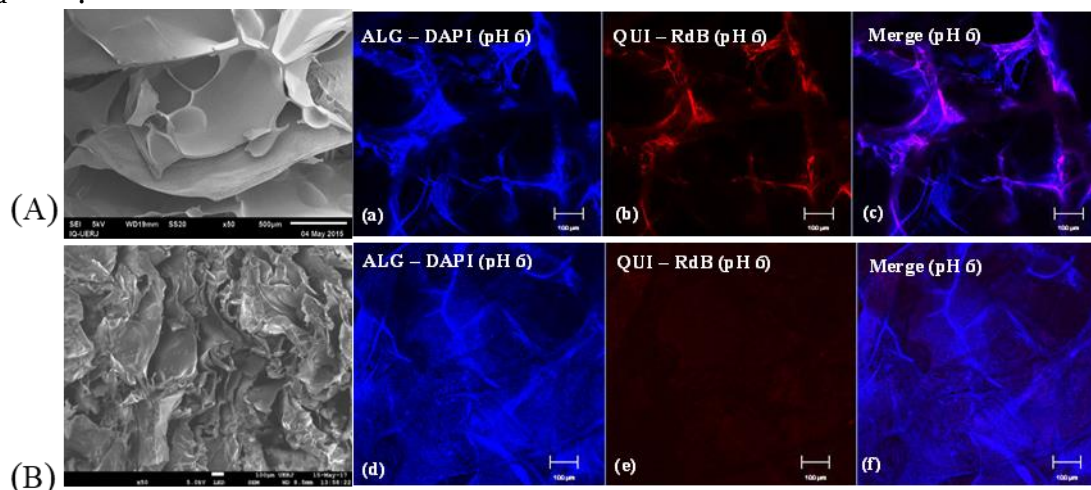


Figura 1: Imagens obtidas por SEM e CLSM do biomaterial obtido: (A) amostra antes da incorporação do herbicida; (B) amostra após a incorporação do herbicida. (Legenda: ALG–DAPI = apenas cadeias de alginato marcadas por DAPI; QUI–RdB = apenas cadeias de quitosana marcadas por RdB, para a detecção fluorescente).

As micrografias da microscopia confocal à laser revelaram a distribuição de cada componente (ALG e QUI), que formam o biomaterial. Similarmente à microscopia eletrônica de varredura (SEM), a superfície porosa foi observada na superfície da amostra. Ambos os polissacarídeos (ALG - coloração azul e QUI - coloração vermelha) ficaram evidentes após o tingimento com DAPI, para alginato e RdB, para quitosana. Após o glifosato ter sido incorporado na amostra, as imagens de CLSM revelaram, da mesma forma que no SEM uma superfície com ausência de poros. A presença da quitosana parece ter ficado encoberta mediante a presença do glifosato, ou seja, a molécula de glifosato, carregado negativamente, interagiu com a molécula de quitosana ⁽¹⁰⁾.

O ensaio de resistência mecânica (compressão) foi realizado em amostras secas e intumescidas, em solução de glifosato, em temperatura ambiente. Foi observada uma curva de força-deformação com certa linearidade entre as propriedades, evidenciando, um comportamento elástico do biomaterial, provavelmente, relacionado com o elevado teor de blocos MM (blocos manurônicos) do alginato ⁽¹⁴⁾ (Figura 2).

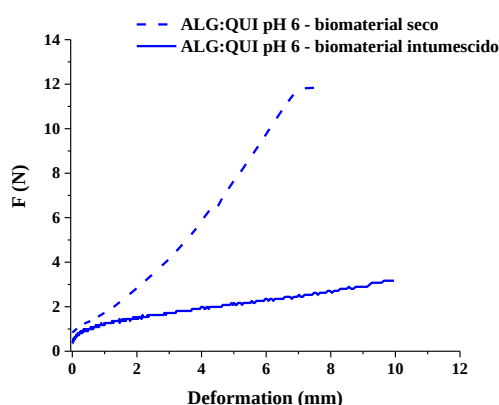
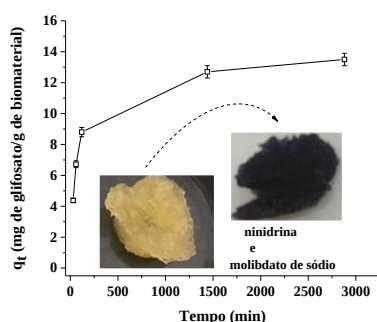
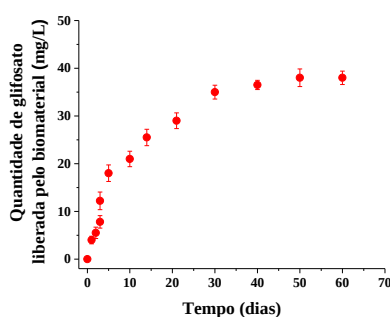


Figura 2: Força (N) versus deformação (mm) do biomaterial seco e intumescido.

A Figura 3(A) mostra a curva do perfil de adsorção e a quantidade de glifosato (q_t) em mg/g de glifosato retido pelo biomaterial, em função do tempo. Após 2880 min (48 h), a amostra adsorveu 13,5 mg/g (43,8 ml de solução de glifosato/g). A cinética de liberação de glifosato em água é apresentada na Figura 3(B).



(A)



(B)

Figura 3: Capacidade de adsorção (q_t) do glifosato pelo biomaterial (A) e quantidade de glifosato liberada *versus* tempo para o biomaterial a $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$ (B). Dado: As barras de erro representam os desvios padrão para as três medições (média $\pm$ SD, $n = 3$).

De uma forma geral, a taxa inicial de liberação de glifosato foi rápida e depois diminuiu. Este fato indica que o herbicida, no biomaterial, foi difundido rapidamente. O biomaterial produzido foi capaz de promover gradativamente a liberação de glifosato: 58 % do herbicida foi liberado em 14 dias, após esse tempo, a liberação continuou mais lentamente até atingir um platô de 87 % após 30 dias.

CONCLUSÃO

Foram preparados, com sucesso, biomateriais superabsorventes à base de alginato de sódio e quitosana, com e sem glifosato. A microscopia de fluorescência mostrou a afinidade entre glifosato e quitosana, preferencialmente. Os biomateriais produzidos apresentaram resistência mecânica elevada, com valores de $\sigma_{\text{max}} = 19,6 \text{ KPa} \pm 1,45$ (amostra seca) e $\sigma_{\text{max}} = 7,8 \text{ KPa} \pm 0,92$ (amostra intumescida). O biomaterial adsorveu 13,5 mg de glifosato por grama de biomaterial, após 48 h. A liberação gradativa do glifosato pelo biomaterial preparado atingiu 87 % após 30 dias.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro. Ao Laboratório de Ultraestrutura e Biologia Tecidual (IBRAG/UERJ) pelas análises de CLSM. Este estudo foi financiado em parte da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–Brasil (CAPES)–Código de Finanças 001.

REFERÊNCIAS

1. Saravi S. S. S., Shokrzadeh M., in *Pesticides in the Modern World–Risks and Benefits* (Ed: M. Stoytcheva), IntechOpen Limited, London, UK 2011, Ch. 1.
2. Gill H. K., Garg H. H., in *Pesticides - Toxic Aspects* (Eds: M. L. Larramendy, S. Soloneski), IntechOpen, London, United Kingdom 2014, Ch. 8.
3. Popp J., Pető K., Nagy J. *Pesticide productivity and food security. A review. Agronomy for Sustainable Development*, v.33 (1), p. 243 – 255, 2013.
4. Rosell G., Quero C., Coll-Toledano J., Guerrero A. *Biorational insecticides in pest management. Journal of Pesticide Science*, v. 33(2), p. 103 – 121, 2008.
5. Silva M. S., Cocenza D. S., Rosa A. H., Fraceto L. F. *Efeito da associação do herbicida clomazone a nanoesferas de alginato/quitosana na sorção em solos. Química Nova*, v. 35(1), p. 102 – 107, 2012.
6. Singh B., Sharma D. K., Dhiman A., Gupta A. *Synthesis and characterization of agar-starch based hydrogels for slow herbicide delivery applications. International Journal of Plastics Technology*, v. 19, p. 263 – 274, 2015.
7. Agostini de Moraes M., Cocenza D. S., Cruz Vasconcellos F., Fraceto L. F., Beppu M. M. *Chitosan and alginate biopolymer membranes for remediation of contaminated water with herbicides. Journal of Environmental Management*, v. 131, p. 222 – 227, 2013.
8. O. Okay, in *Hydrogel Sensors and Actuators. Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors (Methods and Applications)* (Eds: G. Gerlach, K. F. Arndt), Springer, Berlin, Heidelberg, p. 6, 2009.

9. El-Sherbiny I. M., Yacoub M. H. *Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. Global Cardiol. Sci. Pract.*, v. 2013 (3), p. 316 – 342, 2013.
10. Costa M. P. M., Prates L. M., Baptista L., Ferreira I. L. M., Cruz M. T. M. *Interaction of polyelectrolyte complex between sodium alginate and chitosan dimers with a single glyphosate molecule: A DFT and NBO study. Carbohydrate Polymer*, v. 198, p. 51 – 60, 2018.
11. Costa M. P. M., Rabelo K., Ferreira I. L. M., Cruz M. T. M. *Sodium alginate/chitosan/glyphosate superabsorbent bio-foam as a release system for herbicide. Journal of Applied and Polymer Science*, v. 139(11):51776, 2022.
12. Lee Y.-H., Chang J.-J., Lai W.-F., Yang M.-C., Chien C.-T. *Layered hydrogel of poly(γ -glutamic acid), sodium alginate, and chitosan: fluorescence observation of structure and cytocompatibility. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 86(2), p. 409 – 413, 2011.
13. Yu C.-C., Chang J.-J., Lee Y.-H., Lin Y.-C., Wu M.-H., Yang M.-C., Chieng C.-T. *Electrospun scaffolds composing of alginate, chitosan, collagen and hydroxyapatite for applying in bone tissue engineering. Materials Letters*, v. 93, p. 133 – 136, 2013.
14. Costa M. P. M., Delpech M. C., Ferreira I. L. M., Cruz M. T. M., Castanharo J. A., Cruz M. D. *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.

SODIUM ALGINATE/CHITOSAN BASED BIOMATERIAL DEVELOPMENT: A GLYPHOSATE GRADUAL RELEASE SYSTEM

ABSTRACT

A biomaterial consisting of two polysaccharides: sodium alginate (SA) and chitosan (CHI) – was prepared with the herbicide glyphosate encapsulated, for used as a gradual release system. The biomaterial prepared at pH 6, showed good characteristics in terms of swelling degree (>1000%) and compressive strength. Kinetic studies of adsorption and release of glyphosate were carried out and it was possible to verify that the biomaterial was able to control the release of the herbicide. Release kinetics reached steady state after 30 days. The morphological properties results, performed by scanning electron microscopy (SEM) and confocal laser scanning microscopy (CLSM), showed the preferential interaction of glyphosate with CHI molecules. The study showed that the complex can be classified as a superabsorbent and high-performance material for used in agrochemicals release systems. Therefore, this work presents a new perspective to polysaccharide based materials, making new agricultural applications possible.

Keywords: Sodium alginate; chitosan; glyphosate; confocal microscopy; gradual release and adsorption.