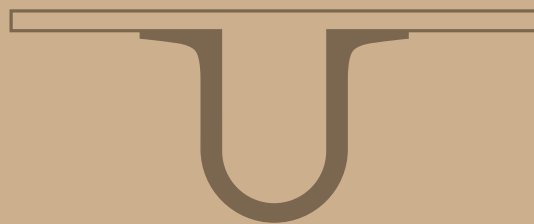




UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



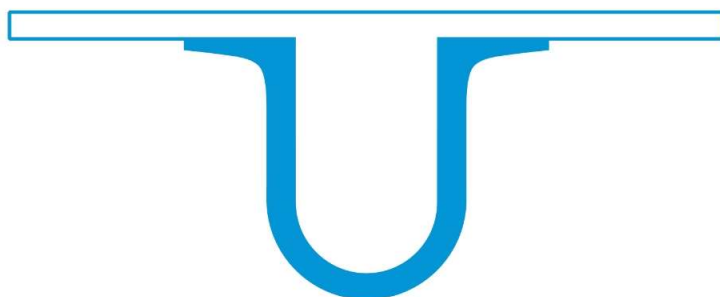
Gianluca Utzeri

DESENVOLVIMENTO DE BIOGÉIS DE  
PECTINA E QUITOSANO PARA A SORÇÃO DE  
CYMOXANIL

Dissertação no âmbito do mestrado em Química, Controlo de  
Qualidade e Ambiente, na área de hidrogéis, orientado pelo  
Professor Doutor Artur José Monteiro Valente e apresentada ao  
Departamento de Química, da faculdade de Ciências e Tecnologia  
da Universidade de Coimbra

Setembro de 2018

FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE  
COIMBRA



**Gianluca Utzeri**

**Desenvolvimento de biogéis de pectina e  
quitosano para a sorção de Cymoxanil**

**Dissertação no âmbito do mestrado em Química, ramo de Controlo de Qualidade e Ambiente, na área de Química Macromolecular, orientado pelo Professor Doutor Artur José Monteiro Valente e apresentada ao Departamento de Química, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.**

Setembro de 2018

# Agradecimentos

Quero agradecer primeiramente ao supervisor desta tese, o Professor Doutor Artur José Monteiro Valente, pela sua disponibilidade e confiança demonstrada, não só durante o período de tese, mas desde o primeiro que entrei no seu laboratório como Erasmus.

Agradeço à minha família por me ter dado a possibilidade de estudar, aconselhado e ter estado sempre presente, apoiando-me nas minhas escolhas académicas e pessoais e encorajando-me a querer e a envolver-me sempre mais.

Um agradecimento especial à minha “nova” família, à minha companheira Ana que me tem apoiado e suportado em todos os meus momentos de “loucura”, nas noites de estudo doido e ter demonstrado uma grande paciência e força. Agradeço ao meu pequeno campeão, Noah, por me ter infundido em mim uma força desconhecida e presentear um sorriso todos os dias ao entrar da porta de casa.

Agradeço a todas as pessoas do departamento de química que incomodei, que me ajudaram e se mostraram disponíveis nos diferentes passos ao longo da tese, como o grupo de Filipe Antunes, em particular ao Luís Alves. Agradeço ao Luís Veríssimo, por ter-se mostrado sempre disponível até para ler a minha tese (peço desculpa por esse sofrimento), pela simpatia e pelas muito boas conversas. Agradeço ao Professor Doutor Sérgio Seixas de Melo pela disponibilidade, Catarina Pinto e Sílvia Gramacho pela grande ajuda e terem-me salvo de grandes sustos e pânicos durante as análises HPLC e também à Daniela Pinheiro pela grande disponibilidade.

Este trabalho foi financiado por Fundos Nacionais através da FCT - Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projeto WaterJPI/0006/2016.

# Índice

	Pág.
<b>Índice</b> _____	<b>i</b>
<b>Abreviaturas</b> _____	<b>iii</b>
<b>Resumo</b> _____	<b>vii</b>
<b>Abstract</b> _____	<b>ix</b>
<b>Capítulo 1: Introdução</b> _____	<b>1</b>
<b>1.1. Pesticidas</b> _____	<b>3</b>
1.1.1. Organoclorados _____	3
1.1.2. Organofosfatos _____	4
1.1.3. Carbamatos _____	4
1.1.4. Piretrópicos _____	4
<b>1.2. Sistema legislativo europeu</b> _____	<b>5</b>
1.2.1. Aprovação e comercialização _____	5
1.2.2. Uso sustentável de fitofármacos _____	6
1.2.3. Limite máximo residual _____	6
1.2.4. Proteção das águas _____	7
1.2.5. Embalagem, rotulagem e classificação dos pesticidas _____	7
1.2.6. Legislação Internacional _____	8
<b>1.3. Comportamento no ambiente</b> _____	<b>9</b>
<b>1.4. Pesticida em estudo</b> _____	<b>10</b>
1.4.1. Cymoxanil _____	10
<b>1.5. Métodos de remoção de pesticidas</b> _____	<b>12</b>
1.5.1. Hidrogéis _____	12
1.5.1.1. Hidrogéis naturais _____	13
1.5.2. Métodos físicos de reticulação _____	15
1.5.2.1. Tratamento térmico _____	15
1.5.2.2. Interação iónica _____	15
1.5.2.3. Coacervação complexa _____	15
1.5.2.4. Ligação de hidrogénio _____	15
1.5.2.5. Congelamento/descongelamento _____	16
1.5.2.6. Emulsão _____	16
<b>1.6. Quitosano</b> _____	<b>16</b>
<b>1.7. Pectina</b> _____	<b>17</b>
<b>1.8. Objetivo do projeto</b> _____	<b>18</b>
<b>Capítulo 2: Experimental</b> _____	<b>19</b>
<b>2.1. Materiais e métodos</b> _____	<b>19</b>
<b>2.2. Método de quantificação do Cymoxanil</b> _____	<b>19</b>
<b>2.3. Síntese e caracterização dos hidrogéis</b> _____	<b>20</b>
2.3.1. Modificação da pectina _____	20

2.3.2.	Síntese dos hidrogéis _____	22
2.3.2.1.	Caraterização da pectina funcionalizada e dos hidrogéis _____	22
2.3.2.2.	Estudo de interação pesticida/hidrogel _____	23
<b>2.4.</b>	<b>Teste de degradação do Cymoxanil _____</b>	<b>23</b>
<b>2.5.</b>	<b>Estudo das isotérmicas de sorção _____</b>	<b>24</b>
2.5.1.	Isotérmica de Langmuir _____	25
2.5.2.	Isotérmica de Freundlich _____	25
2.5.3.	Isotérmica de Brunauer-Emmett-Teller _____	25
<b>Capítulo 3:</b>	<b>Resultados e Discussão _____</b>	<b>26</b>
<b>3.1.</b>	<b>Caraterização do complexo <math>\beta</math>-PT _____</b>	<b>26</b>
<b>3.2.</b>	<b>Caraterização dos hidrogéis QT-PT e QT-<math>\beta</math>-PT _____</b>	<b>28</b>
3.2.1.	Caraterização reológica _____	28
3.2.2.	Análise dos espetros IR-ATR _____	30
3.2.3.	Caraterização morfológica _____	33
3.2.4.	Análise termogravimétrica _____	36
<b>3.3.</b>	<b>Calibração e determinação da gama analítica _____</b>	<b>37</b>
<b>3.4.</b>	<b>Teste de degradação _____</b>	<b>38</b>
<b>3.5.</b>	<b>Isotérmicas de sorção _____</b>	<b>40</b>
<b>Capítulo 4:</b>	<b>Conclusão _____</b>	<b>43</b>
<b>Capítulo 5:</b>	<b>Perspectivas futuras _____</b>	<b>43</b>
<b>Referências</b>	<b>_____</b>	<b>45</b>

# Abreviaturas

%ER	Eficiência de remoção
%RE	Erro relativo percentual
<sup>1</sup> H-RMN	Ressonância magnética nuclear protónica
ACN	Acetonitrilo
BET	Brunauer-Emmett-Teller (Teoria de adsorção multimolecular)
BPA	Boas práticas agrícolas
<i>ca.</i>	<i>circa</i>
CAS	Chemical Abstracts Service
CBO	Carência biológica de oxigénio
CD	β-ciclodextrina
CE	Comunidade Europeia
CED	Calorimetria exploratória diferencial
CEE	Comunidade Económica Europeia
CIP	Controlo integrado de pragas
CMR	Carcinogénico, mutagénico e/ou reprotóxico
CPG	Cromatografia de permeação em gel
CQO	Carência química de oxigénio
CYM	Cymoxanil
D.L.	Decreto-Lei
D <sub>2</sub> O	Água deuterada
DAD	Diode Array Detector
DARf	Dose aguda de referência
DDT	1,1'-(2,2,2-Tricloroetano-1,1-diil)bis(4-clorobenzeno)
DMF	Dimetilformamida
DTG	Análise termogravimétrica diferencial
ECHA	European Chemical Agency

EFSA	European Food Security Authority
<i>f</i>	Frequência
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
<i>G'</i>	Componente elástica
<i>G''</i>	Componente viscosa
GA	Grau de acetilação
GD	Grau de deacetilação
HPLC	High performance liquid chromatography
IDA	Ingestão diária aceitável
IPM	Integrated Pest Management
IR	Espetroscopia de infravermelho
IR-ATR	Espetroscopia de infravermelho por reflexão total atenuada
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
<i>K<sub>a</sub></i>	Constante de dissociação ácida
<i>K<sub>oc</sub></i>	Coefficiente de partição em teor de carbono orgânico no solo
LMR	Limite máximo residual
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
<i>M</i>	Massa molecular
$\bar{M}$	Massa molecular media
mPmB	Muito persistente e muito bio-acumulativo
O/A	Emulsão em sistema óleo-água
OLS	Ordinary least squares
PAN	Plano de ação nacional
PBT	Persistente, bio-acumulativo e tóxico
<i>pK<sub>a</sub></i>	Forma logarítmica da constante de dissociação
POA	Processo de oxidação avançado
POC	Pesticida organoclorado
POF	Pesticida organofosfatado

POP	Poluente orgânico persistente
PPP	Produto para proteção das plantas
PT	Pectina
$q_e$	Quantidade de pesticida sorvido num determinado tempo
QT	Quitossano
QT-PT	Complexo quitossano-pectina
QT- $\beta$ -PT	Complexo quitossano-pectina funcionalizada com $\beta$ -ciclodextrina
Reg.	Regulamento
RMS	Rapporteur member states
rpm	Rotações por minuto
SE	<i>Standard error</i>
SEM	Microscopia eletrónica de varrimento
SO/A	Emulsão em sistema solvente orgânico-água
$T_{50}$	Tempo de semi-vida de degradação
TGA	Análise termogravimétrica
$t_R$	Tempo de retenção
TSP	Sal de sódio do ácido 3-(trimetilsilil) propiónico-2,2,3,3-d <sub>4</sub>
UE	União Europeia
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization
WTO	World Trade Organization
$\beta$ -PT	Pectina funcionalizada com $\beta$ -ciclodextrina
$\eta$	Viscosidade
$\lambda_{\max}$	Comprimento de onda de absorbância máxima
$\tau$	Pressão





## Resumo

O termo pesticida compreende uma ampla gama de produtos para a proteção das plantas (PPPs) e biocidas que podem apresentar diferentes níveis de persistência e toxicidade, afetando o ambiente e os seres vivos, dependendo de muitos fatores e da forma de contato. Conseqüentemente, a sua remoção do ambiente e das águas superficiais e subterrâneas tem grande importância e desde 1970 novos materiais e tecnologias foram desenvolvidos para este objetivo. Neste estudo, foram sintetizados hidrogéis à base de quitosano (QT) com pectina (PT) e pectina funcionalizada com  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -PT), por coacervação complexa em sistema de emulsão óleo/água. A funcionalização da pectina obteve-se por reação de transesterificação em ambiente ácido e o produto foi caracterizado usando técnicas como a ressonância magnética nuclear protônica ( $^1\text{H}$ -RMN) e a espectroscopia infravermelho por reflexão total atenuada (IR-ATR). Os hidrogéis, além da caracterização por IR-ATR, foram avaliados por análise termogravimétrica (TGA) e microscopia eletrônica de varrimento (SEM). As três técnicas foram efetuadas antes e após contato com o Cymoxanil (CYM) em solução aquosa por 24 h. As características mecânicas dos dois complexos foram determinadas por análise reológica. A interação entre os hidrogéis e o Cymoxanil foi avaliada através estudo das isotérmicas de sorção a 12 e 24 horas. A quantificação da concentração de Cymoxanil em solução aquosa determinou-se por análise HPLC-DAD. Dos valores de eficiência de remoção é evidente um aumento da capacidade de remoção em presença de  $\beta$ -ciclodextrina (CD), todavia, para ambos os complexos, observa-se uma forte dependência da massa de hidrogel seco utilizado.

Palavras chave: Cymoxanil, pectina, quitosano,  $\beta$ -ciclodextrina, pesticida



## Abstract

The term pesticide comprises a wide range of plant protection products (PPPs) and biocides. It may present different levels of persistence and toxicity with environment pollution and affecting human and animal life by direct or indirect contact. Consequently, their removal from environment and from surface and groundwater is of great importance since 1970 and new materials and technologies have been developed for this purpose. In this study, chitosan-based (QT) hydrogels with pectin (PT) and  $\beta$ -Cyclodextrin functionalised pectin ( $\beta$ -PT) were synthesized by complex coacervation in oil/water emulsion system. The functionalization of pectin was obtained by transesterification in acidic environment and the product was characterized using techniques such as nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H-NMR}$ ) and by attenuated total reflection infrared spectroscopy (IR-ATR). The hydrogels characterization, besides IR-ATR analysis, was evaluated by thermogravimetric analysis (TGA) and scanning electron microscopy (SEM). The three techniques were performed before and after interaction with Cymoxanil (CYM) aqueous solution for 24 h. The mechanical properties of the two complexes were determined by rheological analysis. The interaction between the hydrogels and Cymoxanil was evaluated through determination of sorption isotherms at 12 and 24 hours. Quantification of the concentration of Cymoxanil in aqueous solution was determined by HPLC-DAD analysis. From the removal efficiency values an increase in the removal capacity in presence of  $\beta$ -Cyclodextrin (CD) is evident, for both complexes, a strong dependence on the dry hydrogels used mass is observed.

Key words: Cymoxanil, pectin, chitosan,  $\beta$ -cyclodextrin, pesticide

# Capítulo 1: Introdução

A produção industrial de pesticidas começou em 1940, marcando a transição do uso de fertilizantes orgânicos para produtos sintéticos. O início de produção e uso de pesticidas sintéticos permitiu que a produção agrícola triplicasse nos cinquenta anos subsequentes, atendendo assim ao aumento da procura.<sup>1</sup>

Na Europa, o termo pesticidas inclui duas classes de substâncias: i) produtos para a proteção das plantas (PPPs), principalmente aplicados nos campos agrícolas cuja entrada no mercado é legislada pelo Reg. 1107/2009/CE, com o objetivo de salvaguardar a saúde humana, dos animais e do ambiente, e; ii) biocidas, legislados pelo Reg. 528/2012/UE, relativo à disponibilização no mercado e manipulação dos mesmos.

Em geral, a formulação de pesticidas utilizados em campo agrícola, constam de dois tipos de substâncias: i) um ou mais ingredientes ativos (aprovados pela Comissão Europeia, e cuja classificação e rotulagem é regida pelo Reg. 1272/2008/CE) usados para eliminar espécies animais e vegetais indesejadas ou, controlar os processos vitais das plantas e preservar os produtos ao longo da produção, armazenamento e transporte (*crop protection*), e; ii) ingredientes inertes para favorecer a permeação e difusão do pesticida na superfície das folhas das plantas e no solo, estabilizar o produto e aumentar o tempo de vida e a solubilidade na água, entre outros. Estas substâncias não são todas necessariamente descritas na rotulagem.<sup>2, 3, 4</sup> Embora o uso de pesticidas tenha efeitos positivos em termos de proteção das plantas e maximização do processo de produção, com a finalidade de compensar o contínuo crescimento da população mundial (ver figura 1.1), os ingredientes ativos e ingredientes inertes podem apresentar efeitos negativos a nível ambiental, assim como para a saúde humana e dos animais.<sup>5</sup>

Estes efeitos estão relacionados com as principais características químico-físicas dos pesticidas, entre as quais podemos citar a bioacumulação, a persistência e a toxicidade, que variam significativamente com as condições do sistema envolvido (temperatura, pH, sistemas aquosos e solo).

Os pesticidas podem atuar por via direta, por exemplo durante a aplicação, ou indireta por entrada na cadeia alimentar e nos cursos de água superficiais e subterrâneos.

Além disso, a persistência destes provoca o aparecimento de espécies resistentes que conduz ao uso de maiores quantidades de pesticidas, ou de outros produtos, novos ou mais tóxicos. Um estudo demonstrou que só 0.3% dos pesticidas usados atua diretamente sobre o alvo enquanto 99.7% é perdido, afetando o ambiente, a biodiversidade e a saúde humana.<sup>6, 7</sup>

Com o propósito de minimizar o uso e os efeitos prejudiciais dos pesticidas bem como dos seus subprodutos, proteger o ambiente e a saúde humana, organizações como a FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) e a WHO (*World Health Organization*), entre outras, regulamentam e estabelecem os níveis máximos residuais, para um uso correto e seguro dos PPPs encorajando o desenvolvimento de políticas e protocolos como o IPM (*Integrated Pest Management*) e a constante melhoria destes, com o objetivo de reduzir quanto mais possível o uso de fitofármacos (Fig. 1.2)<sup>8, 9, 10, 11</sup>.

O objetivo deste estudo, dentro do projeto “*How to protect water, soil and plants production all together- ProWspers-WaterJPI/0006/2016*”, foca-se no estudo da eficiência de remoção de pesticidas em sistemas aquosos, através hidrogéis naturais. O pesticida estudado foi o Cymoxanil da família das cianoacetamidas (comercializado com o nome *Milraz*).

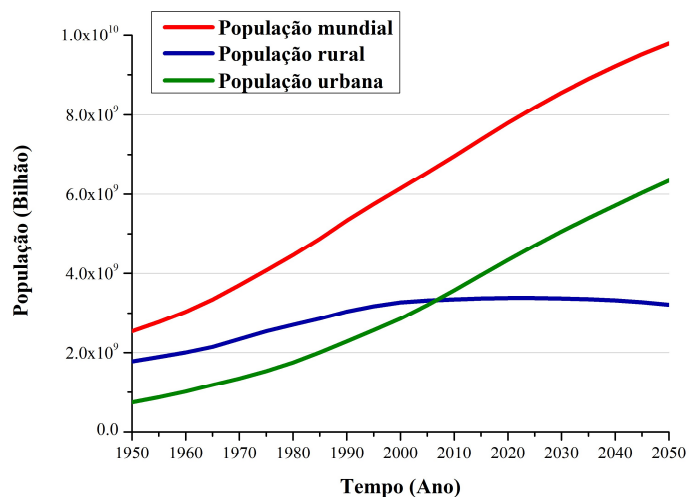


Fig. 1.1. Representação do crescimento da população mundial. Fonte: FAOstat.<sup>5</sup>

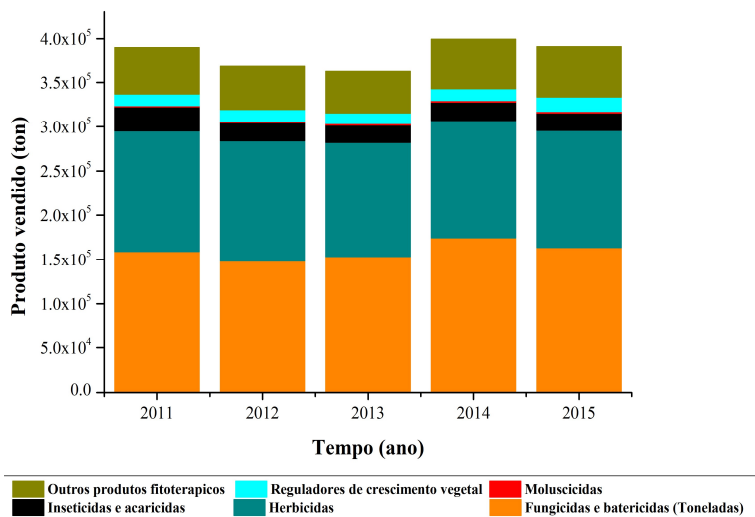


Fig. 1.2. Representação da evolução das vendas de fitofármacos entre 2011 e 2015. Fonte: Eurostat.<sup>10</sup>

## 1.1. Pesticidas

Cronologicamente, podem dividir-se os fitofármacos como substâncias de primeira e segunda geração. Os de primeira geração, usados antes de 1940, distinguem-se em pesticidas orgânicos cuja substância ativa obtém-se das plantas (por exemplo, a nicotina) e por isso chamados botânicos, e pesticidas inorgânicos que incluíam sais de arsénico ou enxofre.<sup>7, 12</sup> Após 1940, passa-se ao uso de fitoterapêuticos sintéticos considerados de segunda geração, assim definidos porque os ingredientes ativos resultam da modificação de substâncias naturais. Estas modificações permitem obter substâncias ativas com uma maior especificidade de alvo; todavia, podem também apresentar uma maior toxicidade, persistência no ambiente e menor biodegradabilidade em comparação com os compostos naturais de base.

Os pesticidas apresentam diferente especificidade e, portanto, são classificados como pesticida de largo ou estreito espectro atuando através de diversos mecanismos.<sup>13</sup>

Numerosos estudos relacionam o uso dos pesticidas com a diminuição da biodiversidade de espécies animais e vegetais, assim como com o aumento de certas doenças humanas devidas à sua exposição direta ou indireta.<sup>14, 15</sup>

Os maiores grupos de pesticidas sintéticos fazem parte das famílias químicas dos organoclorados (POCs), dos organofosfatos (POFs), dos carbamatos e piretrópicos.<sup>16</sup>

Outras distinções dos PPPs podem ser feitas em função: i) do organismo alvo (herbicida, inseticida, reguladores de crescimento de insetos, nematicida<sup>a</sup>, termiticida, moluscicida, piscicida, avicida, rodenticida, predadora, bactericida, repelente de insetos ou animais, antimicrobiano (desinfestante), fungicida e saneantes; ii) da origem da estrutura química (natural, sintético ou biológico); e iii) do estado físico (líquido, sólido ou gasoso).<sup>2</sup>

### 1.1.1. Organoclorados

Os pesticidas organoclorados foram amplamente utilizados a nível industrial e na agricultura entre 1950 e 1970. Sucessivos estudos demonstraram que os organoclorados apresentam elevada toxicidade e persistência no ambiente, levando à proibição do seu uso na União Europeia e a classificação destes como produtos orgânicos persistentes (POPs) e bioacumuláveis segundo a Convenção de Estocolmo (ver 1.2.6).<sup>12, 17</sup>

Ulteriores estudos demonstram que os organoclorados possuem, para a saúde humana, efeitos neurotóxicos, carcinogénicos e mutagénicos, efeitos hepatotóxicos e de redução da reprodutividade, afetando também os níveis hormonais do corpo humano (desreguladores endócrinos).<sup>18</sup>

As características químico-físicas gerais dos organoclorados são a baixa polaridade, a baixa solubilidade em água e elevada solubilidade em lípidos, a elevada volatilidade e estabilidade.<sup>19</sup> Estas características resultam similares para os diferentes ingredientes ativos devido às semelhantes estruturas químicas, alifática ou aromática, com um ou mais grupos cloretos substituídos.

Esta família de ingredientes ativos eram, geralmente, usados como inseticidas com amplo espectro de ação.

---

<sup>a</sup> Que age contra os nematóides (phylum Nematode), organismos com simetria bilateral, não metaméricos, de formas cilíndricas, filiformes ou fusiformes.

O uso difuso de organoclorados devia-se principalmente ao baixo custo, eficácia e fácil aplicação. Exemplos são o DDT, o alacloro, a atrazina e o lindano, cujo tempo de vida médio no solo é de cerca 15, 2.5, 2.0 e 1.0 anos, respetivamente, e, por esta razão, o seu uso na União Europeia foi proibido.<sup>19, 20</sup>

### 1.1.2. Organofosfatos

Os pesticidas organofosfatados são derivados estéreos do ácido fosfórico, geralmente usados como inseticidas, em substituição dos pesticidas organoclorados.<sup>12</sup>

O amplo uso destes compostos deve-se a menor toxicidade e persistência no ambiente em comparação com os organoclorados, sofrendo rápida degradação por hidrólise, e exposição à luz, ao ar e ao solo.<sup>7</sup>

Todavia, quantidades residuais podem ser detetadas nos alimentos e na água potável com efeitos negativos para a saúde humana e dos animais, enquanto inibe de forma irreversível a síntese da enzima acetilcolinesterase<sup>b</sup> e afeta as funções cerebrais.<sup>12, 16, 17</sup>

Exemplos de pesticidas organofosfatos aprovados na Europa, pelo Reg. 540/2011/EU, (implementação do Reg. 1107/2009/CE), são o glifosato, o dimetoato e o malatião (uso exclusivo como inseticida).<sup>20</sup>

### 1.1.3. Carbamatos

Os carbamatos são derivados do ácido carbâmico.<sup>17</sup> Esta família de pesticidas é usada como inseticidas, fungicidas, nematicidas e herbicidas devido à menor toxicidade relativamente aos organofosfatos, e em geral sofrem uma mais rápida degradação no solo, com um tempo de vida médio inferior a um ano.

Estes compostos atuam de modo similar aos organofosfatos, através da inativação reversível da enzima acetilcolinesterase, representando um perigo para a saúde humana e dos insetos em função do seu nível de toxicidade.<sup>12, 16, 21</sup>

Exemplos de ingredientes ativos da família dos carbamatos aprovados na União Europeia e a nível nacional encontram-se o oxamyl, o methomil e o fenoxycarb.<sup>7, 20</sup> Este último apresenta um mecanismo de ação diferente, porquanto atua como regulador de crescimento dos insetos.<sup>22</sup>

### 1.1.4. Piretrópicos

Os pesticidas piretrópicos dividem-se em duas classes: os piretróides naturais e sintéticos. Os piretróides naturais, cujo ingrediente ativo se obtém da flor de *Chrysanthemum Coccineum* e *C. Cinerariaefolium*,<sup>18</sup> dividem-se em seis compostos, piretrina I e II (CAS 121-21-1 e 121-29-9), jasmolin I e II (CAS 4466-14-2 e 1172-63-0) e cinerina I e II (CAS 25402-06-6 e 121-20-0).<sup>7</sup>

A classe sintética dos piretróides divide-se, por sua vez, em: i) primeira geração, derivados estéreos do ácido crisântemico e de álcoois que apresentam o anel de furano na estrutura molecular e uma cadeia lateral; e ii) segunda geração em que, geralmente, apresentam na

---

<sup>b</sup> Acetilcolinesterase é uma enzima fundamental para as funções nervosas nos humanos.



estrutura derivados do álcool 3-phenoxibenzílico.<sup>23</sup>

Os produtos de segunda geração apresentam uma maior atividade inseticida relativamente aos piretróides naturais, que por outro lado são mais biodegradáveis em múltiplas condições ambientais.

Devido à menor toxicidade dos pesticidas piretrópicos, relativamente aos POPs e aos carbamatos, aqueles encontram largo uso como inseticidas em ambientes doméstico, assim como no controlo de pragas de insetos em culturas agrícolas.

## 1.2. Sistema legislativo europeu

Desde 2009, na União Europeia, existe um complexo sistema de leis que controlam e limitam a entrada no mercado e o uso de pesticidas, de forma a proteger o ambiente e a saúde pública.<sup>24</sup> O sistema legislativo define o correto uso de pesticidas em função da toxicidade e impacto no ambiente e define os limites máximos residuais (LMRs) permitidos no ambiente, nos recursos hídricos e nos alimentos.<sup>10</sup> O sistema legislativo baseia-se no princípio da precaução que obriga à recolha de dados que garantam a segurança dum produto antes da sua aprovação.<sup>1, 25, 26</sup>

### 1.2.1. Aprovação e comercialização

É necessário fazer uma distinção entre os produtos para a proteção das plantas e os biocidas pois, embora as fases do processo de aprovação e entrada no mercado sejam semelhantes, as agências e as leis em causa são diferentes.

Se se consideram os produtos para a proteção das plantas, a primeira fase do processo de aprovação dum fitofármaco prevê a avaliação técnico-científica do ingrediente ativo, dos ingredientes inertes e dos metabolitos, da parte de um ou mais estados membros da União Europeia, chamados *Rapporteur Member State* (RMS). Os dados recolhidos são submetidos à Comissão Europeia e à *European Food Safety Authority* (EFSA), agência prevista pelo Reg. 178/2002/CE, que desenvolve análises de risco, independentes, para a saúde humana, ambiente e contaminação das águas superficiais e subterrâneas.<sup>27, 28</sup>

Além disso, são avaliados os riscos relativos aos resíduos de pesticidas nos alimentos para consumo humano e dos animais, ao fim de reduzir o uso de fitofármacos e estabelecer e melhorar os valores máximos residuais permitidos.

Na segunda fase, o produto comercial é avaliado e autorizado a entrar no mercado segundo o Reg. 1107/2009/CE. Este regulamento estabelece, também, as normas para o uso e o controlo dos fitofármacos, garantindo um nível elevado de proteção.<sup>29</sup>

O uso dum pesticida é, sucessivamente, aprovado por cada estado membro da União Europeia.

O processo de aprovação demora cerca de 3 anos e é válido por 10 anos, após os quais a autorização pode ser renovada por um período máximo de 15 anos.<sup>30</sup>

Para os biocidas, a avaliação técnica e científica é efetuada pela *European Chemical Agency* (ECHA)<sup>c</sup>, e o nível de segurança e a entrada no mercado é garantido pelo Reg. 528/2012/UE.<sup>30</sup>

---

<sup>c</sup> A ECHA é uma agência, fundada em 2007 segundo o Reg. 1907/2006/CE (REACH), que normaliza o registo, avaliação, autorização e restrição de todas as substâncias químicas.

Nos dois casos, o regulamento divide a Europa em três zonas geográficas: Norte, Centro e Sul, sendo que a autorização para uso dos produtos carece da aprovação de um dos estados membros dessa mesma zona.

### **1.2.2. Uso sustentável de fitofármacos**

A diretiva (CE) n.º 128/2009 apresenta um conjunto de normas para um uso sustentável de pesticidas, a fim de reduzir os riscos ambientais, de saúde humana e dos animais promovendo o controlo integrado de pragas (CIP), cujos princípios são estabelecidos, em Portugal, pelo D.L. n.º 256/2009, de 24 de setembro 2009.<sup>32</sup>

Além dos passos anteriormente referidos, os estados membros devem aprovar planos de ação nacionais (PAN), segundo a diretiva (CE) n.º 128/2009 (de acordo com o D.L. 150/2012), a fim de monitorar e reduzir quanto possível o uso de produtos perigosos.<sup>33</sup>

Segundo essa diretiva, o manuseamento e aplicação de fitofármaco requer treino e certificação dos utilizadores e das equipas de venda e prevê, sempre que for possível, o uso de métodos alternativos de controlo das espécies indesejadas.

Por fim, a diretiva regulamenta e obriga os estados membros à proteção dos recursos hídricos superficiais e subterrâneos.

### **1.2.3. Limite máximo residual**

A proteção das plantas e do processo de produção é importante para manter a eficiência de produção e a qualidade dos produtos. Para tal fim, podem aplicar-se métodos químicos, como o uso de fitofármacos e métodos não químicos (e.g., rotatividade de culturas).

A prática mais comum prevê o uso de produtos químicos para a proteção das plantas e/ou do processo de produção, transporte e armazenamento; todavia, estas substâncias podem apresentar efeitos negativos para o ambiente, a saúde humana e dos animais através da sua exposição direta ou indireta.

Estas últimas prioridades, relativamente à produção comercial, são estabelecidas no Reg. 396/2005/CE, através dos LMRs para os ingredientes ativos individuais e seus metabolitos, após consulta à EFSA.

Por definição, o termo limite máximo residual indica a mais elevada concentração residual de pesticida permitida em alimentos para consumo humano e animal.

Os princípios, requisitos e procedimentos operacionais na área da segurança alimentar são definidos pelo Reg. 178/2002/CE.

O valor padrão de LMR, segundo o regulamento, é geralmente, 0.01 mg/kg e aplica-se quando não existem especificações sobre um pesticida.<sup>34</sup>

Os LMRs são definidos tendo em consideração os dados técnico-científicos, entre os quais: i) boa prática agrícola (BPA), como as quantidades e frequências de aplicação, entre outras; ii) referências toxicológicas, baseadas na avaliação da toxicidade crónica, como a ingestão diária aceitável (IDA) e da toxicidade aguda, como dose aguda de referência (DARf), e; iii) os interesses de livre circulação dos produtos.<sup>35</sup>

#### **1.2.4. Proteção das águas**

Os recursos hídricos naturais, sejam eles superficiais ou subterrâneos, representam um bem fundamental de primeira importância e, como tal, devem ser protegidos e defendidos. A tal propósito, a diretiva 60/2000/CE estabelece as normas para a proteção e a melhoria da qualidade do ambiente e da água, reduzindo a contaminação, tendo sempre em consideração os objetivos dos acordos internacionais no campo da proteção ambiental.

A gestão das bacias hidrográficas inclui a elaboração, por parte dos Estados membros, de programas de monitoração do estado das águas, com a avaliação do estado ecológico e químico, do impacto das atividades antropogénicas e económicas.

Entre os parâmetros químico-físicos que definem a qualidade e o estado ecológico dum recurso hídrico consideram-se o pH, a temperatura, a salinidade, a concentração de oxigénio, a cor e a condutividade, entre outros.

Os compostos organoclorados, organofosfatos, hidrocarbonetos e compostos orgânicos persistentes e bioacumuláveis, metais pesados, biocidas e substâncias que alteram os níveis de carência bioquímica de oxigénio (CBO) e de carência química de oxigénio (CQO), são só alguns exemplos dos contaminantes principais das águas.

#### **1.2.5. Embalagem, rotulagem e classificação dos pesticidas**

O Reg. 1272/2008/CE estabelece as normas e os princípios relativos ao processo de rotulagem, embalagem e classificação de substâncias e misturas perigosas para o ambiente e a saúde humana, assegurando a livre e correta circulação e registo dos produtos no mercado. A identificação de uma substância ou mistura deve estar contida na rotulagem através de “identificadores do produto”, assim como na ficha de segurança em acordo com o Reg. 1907/2006/CE.

Segundo o regulamento, a classificação de uma substância, mistura ou impureza é determinada com base nas informações do produtor relativamente à eficiência, objetivo de uso e potenciais efeitos negativos para a saúde humana e/ou do ambiente. Os limites de concentração indicam o valor máximo acima do qual a presença da substância resulta perigosa.

Segundo o regulamento REACH, as substâncias perigosas podem ser classificadas em função do nível de toxicidade e efeito no ambiente ou na saúde humana (Tab. 1.1).<sup>26</sup>

Tab. 1.1. Representação da classificação das substâncias perigosas.<sup>26</sup>

Tipo de químicos		Caraterísticas/efeito nocivos
<b>Carcinogénico, mutagénico e/ou reprotóxico (CMR)<sup>d</sup></b>	Carcinogénico	Induz cancro ou aumenta a sua incidência
	Mutagénico	Aumenta a ocorrência de mutações
	Toxinas reprodutivas	Efeitos sobre a função sexual e fertilidade masculina e feminina, toxicidade para o feto e efeitos através ou via aleitamento
<b>Persistente, bio-acumulativo e tóxico (PBT)</b>	Persistente	Resistência a decomposição no ambiente (bactéria, luz, pH, temperatura entre outros)
	Bio-acumulativo	Acumulação em organismos vivos, com aumento da concentração em organismos mais altos na cadeia alimentar
	Tóxico	Efeitos negativos, por exemplo, no DNA, sistema neurológico, reprodutivo ou no sistema imunitário
<b>Muito persistente e muito bio-acumulativo (mPmB)</b>		Resistência a degradação ambiental e alto grau de acumulação nos organismos vivos
<b>Químicos cujos níveis de preocupação são equivalentes aos das substâncias CMR</b>	Desreguladores endócrinos	Alteração das funções do sistema hormonal
	Sensibilizadores respiratórios	Indução de alergias respiratórias
	Toxicidade para órgãos-alvo específicos	Toxicidade para um órgão ou sistema-alvo no corpo humano

### 1.2.6. Legislação Internacional

A União Europeia e Estados Membros, as organizações não governamentais (PANEurope, EFSA, Greenpeace) e organizações internacionais (WTO<sup>e</sup>, WHO, FAO), estabelecem acordos com o objetivo de proteger o ambiente e a saúde humana, incentivar a aplicação das boas práticas de uso de pesticidas e prevenir e controlar os efeitos negativos resultantes dos resíduos em alimentos para consumo humano e animal, assim como favorecer um livre e harmonizado comércio de fitofármacos, dos quais:

- i) Convenção Internacional de Proteção das Plantas, com o objetivo de definir ações comuns e eficazes a fim de garantir um uso correto e apropriado dos métodos químicos e não químicos para a proteção das plantas e controlo das pragas;<sup>36</sup>
- ii) Codex Alimentarius, que desenvolve e adota os padrões de referência no comércio alimentar internacional;<sup>37</sup>

<sup>d</sup> CMR, regulamentados pelo Reg. 1272/2008/EC.

<sup>e</sup> WTO, *World Trade Organization* controla o sistema de regras comerciais e atua como um fórum para negociar acordos comerciais internacionais, [https://www.wto.org/english/thewto\\_e/thewto\\_e.htm](https://www.wto.org/english/thewto_e/thewto_e.htm)

- iii) Convenção de Roterdão, promove a responsabilização e a cooperação no comércio internacional de substâncias químicas perigosas a fim de proteger a saúde humana e ambiental;<sup>38</sup>
- iv) Convenção de Estocolmo, estabelece um acordo internacional com o objetivo de proteger a saúde humana e o ambiente dos poluentes orgânicos persistentes, através da redução ou eliminação dos mesmos.<sup>39</sup>

### 1.3. Comportamento no ambiente

Os contaminantes introduzidos no ambiente, na sequência de atividades antropogênicas, dependendo das inerentes características físico-químicas, das condições do meio ambiente e das condições de aplicação, podem apresentar maiores ou menores tempos de persistência no ambiente, assim como condições diferentes para a sua degradação.

Com o termo persistente indicam-se todos os compostos orgânicos que não sofrem mutações na estrutura química ao longo do tempo, nas condições ambientais consideradas.<sup>40</sup> Os pesticidas, em função da potencial persistência e mobilidade podem ser adsorvidos e transportados dentro do meio considerado, com consequências proporcionais ao nível de toxicidade da substância em exame. O processo de transformação de um pesticida no tempo, por sua vez, leva à formação de produtos de degradação ou metabolitos com toxicidade, persistência e diferentes mecanismos de ação.

A interação de pesticidas com o solo, água superficial e subterrânea é complexa e controlada por muitos fatores químicos, físicos e biológicos.

A solubilidade em meio aquoso, a tendência para ser absorvido pelo solo e persistência são características importantes na determinação do comportamento de um pesticida no ambiente. Pesticidas com elevada solubilidade na água, persistência e baixa velocidade de absorção apresentam um elevado potencial de risco.

A velocidade de absorção dum pesticida no solo, depende fortemente das características deste último; geralmente, solos secos apresentam baixas capacidades de retenção de pesticidas, diferenciando-se dos solos com elevada concentração de matéria orgânica, argilosos ou húmidos.

Por outro lado, a afinidade do pesticida para com o solo, assim como a sua solubilidade em água, afeta a sua mobilidade, afetando os fenómenos de lixiviação e bioacumulação.

A absorção de pesticidas no solo é quantificada pelo coeficiente de partição,  $K_{oc}$ :

$$K_{oc} = \frac{\frac{\text{conc. adsorvida}}{\% \text{ carbo}}}{\frac{\text{conc. dissolvida}}{\text{orgânico no solo}}} \quad (\text{eq. 1.1})$$

Valores de  $K_{oc}$  superiores a 1000 indicam uma elevada afinidade do pesticida pelo solo, enquanto valores inferiores a 500 indicam uma elevada mobilidade.

Produtos com solubilidade inferior a 1 mg/L consideram-se de baixa mobilidade com tendência a permanecer à superfície ou mover-se por fenómenos de transporte superficiais. O transporte de pesticidas envolve diferentes processos como sorção e dessorção, lixiviação, fitosorção, degradação e volatilização.<sup>12, 41</sup>

## 1.4. Pesticida em estudo

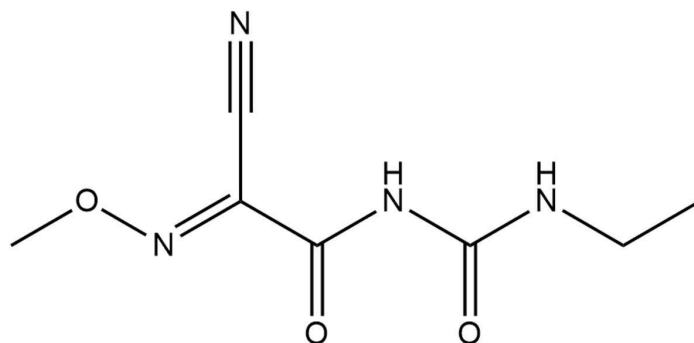
### 1.4.1. Cymoxanil

Cymoxanil (CYM), nome IUPAC 1-[(*E/Z*)-2-ciano-2-metoxiiminoacetil]-3-etilurea e CAS 57966-95-7, é um fungicida sintético aprovado na zona norte e sul da Europa, amplamente aplicado em campos agrícolas contra a *Pseudoperonospora cubensis*, em forma de suspensão aquosa. O cultivo de tomate, uva, batatas, cítricos e cereais entre outros, são exemplos de culturas tratadas com Cymoxanil. Descoberto cerca de 1970, o Cymoxanil entra no mercado após avaliação técnico-científica conduzida pela Áustria como RMS, normalizada pela Diretiva 414/91/CEE, e, sucessivamente aprovada pelo Reg. 1107/2009/CE com revisão de todos os valores LMRs de acordo com o Reg. 396/2005/CE.

Este ingrediente ativo encontra-se em formulações comerciais como o Curzate e Tanos (DuPont) e o Milraz WP62.8 (Bayer), entre outros. Quase sempre se encontra em combinação com outros ingredientes ativos como o maconzeb ou o famoxadone, dois fungicidas aprovados na União Europeia.

O Cymoxanil, pertence á classe química da cianoacetamida oxima e, como indicado da nomenclatura IUPAC existe em duas formas isoméricas *E* e *Z*, com predominância da configuração *E* devido ao menor impedimento estéreo.

A estrutura molecular e as características químico-físicas são apresentadas na figura 1.3 e tabela 1.2, respetivamente.



**Fig. 1.3.** Estrutura molecular do Cymoxanil, nome ISO 2-ciano-*N*-[(etilamino)carbonil]-2-metoxiimino)acetamida.

Os estudos apresentados em EFSA *Scientific Report* de 2008, de análises em culturas (alface, batata, alho e legumes entre outros) tratadas com Cymoxanil demonstram que, geralmente, ocorrem níveis residuais abaixo do limite LMR (0.01 mg/kg).

O Reg. 832/2018/UE (alteração dos anexos II, III e IV do Reg. 396/2005/CE) estabelece o valor limite máximo residual de Cymoxanil em 0.05 mg/kg para a maioria das culturas tratadas com este ingrediente ativo ou produtos comerciais que o incluem.

Testes de quantificação de Cymoxanil e metabolitos em águas subterrâneas demonstraram valores de Cymoxanil abaixo do limite estabelecido para a água de consumo humano (0.1 µg/L).<sup>43</sup>

Tab. 1.2. Características químico-físicas de Cymoxanil, segundo dados EFSA.<sup>43</sup>

Propriedades	Valores	Outras Informações
<b>Fórmula molecular</b>	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	
<b>Peso molecular</b>	198.2 g/mol	
<b>Estado físico</b>	Sólido cristalino branco (pureza 99.6%) Sólido cristalino, pó rosa pálido (pureza ≥ 97%)	
<b>Solubilidade em água (20 °C e pureza 99.9%)</b>	890 mg/L (pH 5) 780 mg/L (pH 7) 782 mg/L (sem tampão, pH 5.68)	
<b>Solubilidade em solvente orgânico (20 °C e pureza entre 97.4 e 99.1%)</b>	0.037 g/L 5.29 g/L 57.0 g/L 22.9 - 29.0 g/L 62.4 - 68.2 g/L	n-Hexano Tolueno Acetonitrilo Metanol Acetona
<b>Ponto de fusão (pureza 99.2 - 99.6%)</b>	161 - 162 °C	
<b>Ponto de ebulição</b>	Termicamente estável abaixo de 156 °C; Início decomposição a 180 °C	Método: Calorimetria Exploratória Diferencial (CED)
<b>Constante de dissociação (20 °C e pureza entre 99.1 - 99.9%)</b>	Entre 9.0 - 9.7	
<b>K<sub>oc</sub><sup>42</sup></b>	43.6 mL/g	
<b>Degradação hidrolítica, T<sub>50</sub></b>	pH 4: estável (20 °C) pH 5: 144 dias (25 °C) pH 7: 1 dia (25 °C), 2.1 dias (20 °C)	
<b>Degradação fotolítica, T<sub>50</sub></b>	pH 5: 1.7 dias (25 °C)	

## 1.5. Métodos de remoção de pesticidas

Os ingredientes ativos, seus metabolitos, ingredientes inertes e produtos de degradação em formulações comerciais representam uma classe de substâncias de elevado interesse a nível ambiental, para a saúde humana e dos animais, por causa dos níveis de toxicidade, persistência no solo, na água ou no ar. Com o objetivo de prevenir e controlar os níveis de contaminantes, na última década foram desenvolvidas diferentes tecnologias para remover e/ou facilitar a redução das concentrações dos poluentes do solo, da água (superficial ou subterrânea) e do ar. Os métodos atualmente mais usados para a remoção destas substâncias ativas incluem a cloração,<sup>44</sup> a ozonização<sup>45, 46, 47, 48</sup> e processos de oxidação avançados (POA); nestes últimos, encontram-se tecnologias que permitem a combinação do peróxido de hidrogénio e radiação ultravioleta que conduzem a uma mais rápida e maior formação de radicais hidroxilos, o que aumenta a eficiência de oxidação e a diminuição do tempo de reação.<sup>49, 50, 51</sup> Devido ao âmbito da presente tese, iremos abordar de forma mais detalhada a utilização de hidrogéis.

### 1.5.1. Hidrogéis

Os géis hidrofílicos, também chamados hidrogéis, são comumente definidos como polímeros reticulados com estrutura tridimensional, constituídos por homopolímeros ou copolímeros, com a capacidade de absorver grandes quantidades de água, mantendo-se insolúveis em água em consequência das interações químicas ou físicas entre cadeias poliméricas.

A hidrofiliicidade deve-se à presença de grupos hidroxilos (-OH), carboxílicos (-COOH), amida (-CONH-) e aminas (-CNH<sub>x</sub>), entre outros, ao longo da cadeia central ou lateral do polímero. O caráter hidrofóbico num hidrogel pode ser alterado através uso de polímeros com grupos hidrofóbicos.<sup>52</sup>

Devido à elevada capacidade de sorção de água e de responder aos estímulos externos (pH, temperatura ou força iónica), os hidrogéis foram objeto de numerosos estudos com aplicação em diferentes campos, por exemplo, em ótica para a produção de lentes de contato e produtos oftálmicos, no tratamento de efluentes industriais, em engenharia biomédica para reparação de cartilagem ou regeneração dos nervos, em cosmética e como sistema de sorção e libertação controlada de fármacos.<sup>53, 54</sup>

A baixa tensão superficial entre os hidrogéis e o ambiente torna estes complexos altamente biodegradáveis.

A estrutura e as propriedades dum hidrogel, após sorção da água, dependem de três parâmetros principais:

- i) fração de volume de polímero no estado entumecido, que é uma medida do grau de intumescência do hidrogel;
- ii) peso molecular efetivo da cadeia polimérica entre pontos de ligação, relacionado com o grau de reticulação;
- i) dimensões da malha de reticulação ( $\xi$ ), que indica a distância entre pontos sequenciais de reticulação.

Como previsível, a difusão de um soluto é limitada quando o tamanho da malha é comparável com aquela do soluto. A dimensão da reticulação é dependente de diversos fatores como, o grau



de reticulação do gel, a estrutura molecular dos polímeros e a capacidade de resposta aos estímulos externos (temperatura, pH ou força iônica).<sup>52, 53</sup>

Por outro lado, a dimensão da malha afeta as propriedades físicas dos hidrogéis como, a força mecânica, degradabilidade e difusividade na libertação das moléculas.

Todavia, através dum design experimental apropriado, é possível obter uma estrutura reticulada com dimensões da malha bem definidas e controlar, portanto, a mobilidade das espécies difundentes (Fig. 1.4).

Em função da fonte dos polímeros é possível classificar os hidrogéis como naturais ou sintéticos; a síntese de hidrogéis pode ser obtida através de métodos químicos (ligações covalentes intercadeia) ou através de métodos físicos (ligações a hidrogénio, hidrofóbicas ou eletrostáticas).<sup>55</sup>

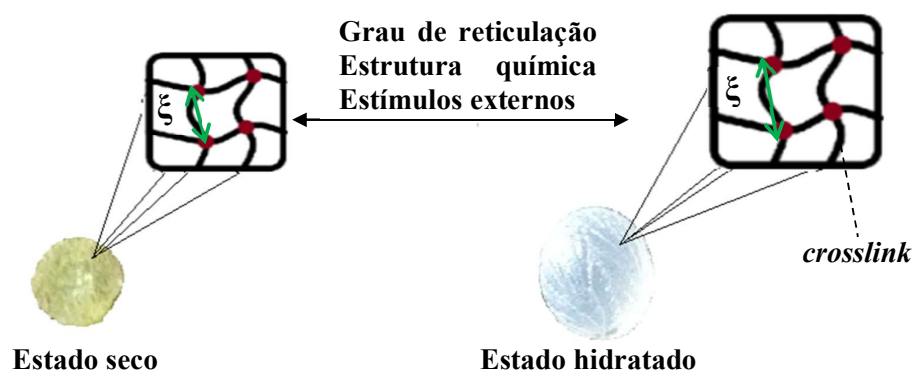


Fig. 1.4. Representação esquemática de alguns dos fatores que afetam a tamanho da malha.

### 1.5.1.1. Hidrogéis naturais

Os hidrogéis constituídos por polímeros naturais, são amplamente estudados e aplicados tanto em sistemas de tratamento ambiental quanto em engenharia biomédica e medicina regenerativa, pois para além de ser biodegradáveis, apresentam biocompatibilidade, baixa toxicidade e sofrem degradação enzimática.

Todavia, estes hidrogéis apresentam, geralmente, reduzidas propriedades mecânicas.

Os polímeros naturais comumente usados na síntese dos hidrogéis incluem proteínas ou polissacarídeos fibrosos naturais (Tab. 1.3).<sup>56</sup>

**Tab. 1.3.** Representação de polímeros aplicados na síntese de hidrogéis naturais.

<b>Polímero natural</b>	<b>Fonte</b>	<b>Métodos de sínteses</b>	<b>Aplicação</b>
<b>Colagénio</b>	Pele de ovino, ligamentos, cartilagens, pele de peixe e esponjas marinhas	Neutralização	Engenharia biomédica, transporte de fármacos
<b>Gelatina</b>	Tratamento ácido/base de colagénio	Tratamento térmico	Transporte de fármacos
<b>Fibroína de seda</b>	Artrópodes	Transição sol-gel em ambiente ácido, sonicação e liofilização	Engenharia biomédica, transporte de fármacos
<b>Alginato</b>	Algas castanhas e bactérias	Tratamento térmico, interações eletrostáticas e irradiação gama	Engenharia biomédica, transporte de fármacos e encapsulamento celular
<b>Agarose</b>	Alga vermelha	Tratamento térmico	Encapsulamento celular, engenharia biomédica
<b>Ácido hialurónico</b>	Fluido sinovial, pele; Bactéria.	Tratamento químico	Cosmética, engenharia biomédica, oftalmologia e transporte de fármacos
<b>Celulose e seus derivados</b>	Plantas	Tratamento químico, físico e polimerização radical	Transporte controlado de fármacos, cosmética, engenharia biomédica, ambiental
<b>Quitosano</b>	Derivado da quitina (concha de crustáceos e insetos)	Tratamento químico ou físico	Biomédica, transporte de fármacos e encapsulamento celular

## **1.5.2. Métodos físicos de reticulação**

Os métodos físicos de síntese dos hidrogéis são, atualmente, de grande interesse científico devido à fácil metodologia dos processos de síntese, pois não necessitam a adição de reticulantes (e.g. glutaraldeído, epícloridina) e à reversibilidade dos complexos polieletrólíticos.

Em função dos polímeros usados, das concentrações, pH e temperatura, entre outros, é possível modificar as propriedades químico-físicas do hidrogel.<sup>57</sup> Diferentes métodos físicos serão aqui apresentados.

### **1.5.2.1. Tratamento térmico**

O tratamento térmico permite a síntese de hidrogéis através de rápidas variações térmicas e resultante modificação estrutural. Este método de síntese é aplicado na síntese de hidrogéis de gelatina e carragenina, e baseia-se na variação conformacional destes polímeros, que passam duma conformação não ordenada, a elevada temperatura, para uma conformação em hélice a baixa temperatura.<sup>55</sup>

### **1.5.2.2. Interação iónica**

A reticulação polimérica por interação iónica baseia-se na atração eletrostática existente entre grupos funcionais carregados e espécies, de carga oposta (normalmente de elevada densidade de carga), adicionados à solução polimérica. Assim, este método prevê a adição de contraíões di- ou tri- valentes (e.g.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$ ) ou por interação entre polieletrólitos como, por exemplo, quitosano-polilisina ou quitosano-dextrano.<sup>58</sup>

### **1.5.2.3. Coacervação complexa**

O processo de coacervação complexa permite obter hidrogéis por interação de polímeros cationicos com polímeros aniônicos e formação de interações eletrostáticas e ligações a hidrogénio com obtenção de complexos solúveis ou insolúveis em função do pH. Exemplo deste tipo de método são os complexos obtidos com quitosano-goma xantana ou quitosano-carboximetilcelulose. No entanto, os mecanismos e cinéticas do processo de coacervação são ainda pouco conhecidos.<sup>59</sup>

### **1.5.2.4. Ligação de hidrogénio**

Como no método de coacervação complexa, o pH é um parâmetro importante pela síntese de hidrogéis por formação de ligações de hidrogénio. Como exemplo podemos citar a utilização do sal sódico de carboximetilcelulose; a valores de pH baixos, ocorrendo a protonação do grupo carboxilato, com a substituição do ião  $\text{Na}^+$ , favorecendo as interações de hidrogénio intercadeias. A obtenção de hidrogéis por reticulação por ligações de hidrogénio pode ainda ser obtida por interações entre polímeros, tais como a goma xantana e o alginato.<sup>57</sup>

### 1.5.2.5. Congelamento/descongelamento

Ciclos de congelamento permitem obter estruturas poliméricas reticuladas por ligações de hidrogénio que ocorrem em zonas de formação de microcristais. O exemplo mais comum de hidrogel formado através deste método é o poli(álcool vinílico).<sup>55</sup>

### 1.5.2.6. Emulsão

A emulsificação é uma técnica amplamente usada para preparação de micro-/nano- hidrogéis através da agitação de misturas multifásicas (e.g. óleo/água (O/A) ou solvente orgânico/água (SO/A)).

Nesta técnica o objetivo principal é formar cristais de hidrogel precursor com o meio hidrofóbico como, por exemplo, óleo ou solvente orgânico. O hidrogel precursor, em seguida, pode ser reticulado através de diferentes mecanismos (e.g., temperatura, pH e irradiação UV) para obter micro- ou nanogéis.

O método de emulsificação permite controlar a dimensão dos hidrogéis através da modificação de parâmetros experimentais tais como: i) agitação mecânica; ii) viscosidade; e iii) uso de surfactantes.

Todavia, as dimensões dos hidrogéis obtidos através de emulsificação resultam numa distribuição mais heterogénea, quando comparada com outros métodos de síntese e, geralmente, aplica-se na preparação de hidrogéis esféricos.

Este método é tipicamente usado para a preparação de hidrogéis de alginato, colagénio e gelatina, com aplicações em engenharia biomédica ou matrizes transportadoras de fármacos, entre outras.<sup>60</sup>

## 1.6. Quitosano

O quitosano é um polissacarídeo linear composto de duas unidades monoméricas, respetivamente, 2-acetamida-2-desoxi- $\beta$ -D-glucose e 2-amino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucose, ligadas por ligação  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glicosídica (Fig.1.5).<sup>61</sup>

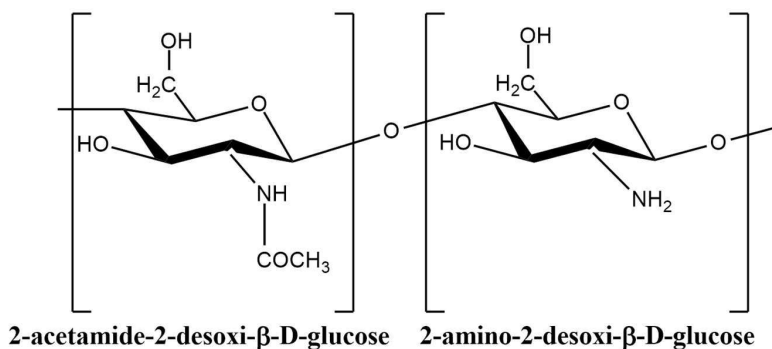


Fig. 1.5 Representação da estrutura molecular do quitosano.

O quitosano obtém-se a partir da quitina (2-acetamida-2-deoxi- $\beta$ -D-glucose), um polissacarídeo com função estrutural, largamente presente nas conchas dos crustáceos, algas e fungos, com uma produção anual entre  $10^{10}$  e  $10^{12}$  toneladas.<sup>62</sup> O processo de síntese do quitosano prevê o tratamento da quitina por reação de desacetilação, por via homogênea ou heterogênea em ambiente ácido ou alcalino; no entanto, o processo ácido é menos usado devido a conduzir a menores rendimentos e à maior degradação do polissacarídeo.

Sendo um processo reversível, é possível obter o quitosano com um grau de deacetilação (GD) controlado, entre os 40 e 100%, com valores de  $pK_a$  a variar entre 6 e 7, em função do GD e das condições experimentais. O grau de acetilação pode ser determinado por análise de infravermelho (IR), ultravioleta (UV), cromatografia de permeação em gel (CPG) e ressonância magnética nuclear protónica ( $^1H$ -RMN), entre outras.

Em função do grau de acetilação, é possível alterar a solubilidade do quitosano, que resulta solúvel em soluções aquosas ácidas ( $pH < 6$ ) – geralmente, por ácido acético 0.1 M ou ácido clorídrico 0.1 M – para quitosano com uma percentagem de acetilação  $\leq 50\%$ .<sup>63</sup>

A presença de grupos amina primários (-NH<sub>2</sub>) e grupos hidroxilos (-OH) primários e secundários faz com que o quitosano seja um composto versátil, permitindo modificações químicas ao nível dos grupos funcionais (reações de *N*-acilação, Schiff). A modificação dos grupos funcionais permite, ainda, modificar a solubilidade do polímero e, em função do pH, determinar a carga resultante do polímero. Estas propriedades químico-físicas, juntamente, com as características de biodegradabilidade, biocompatibilidade e não toxicidade, e reconhecimento pela FDA como uma substância segura, tornam o quitosano num polímero de notável interesse científico e aplicável em diferentes campos como, por exemplo, na indústria alimentar (e.g. agente de redução do colesterol e antimicrobiano), a nível ambiental (remoção de metais pesados, e outros contaminantes; agente quelante e floculante) e na área farmacêutica para o transporte e libertação controlada de fármacos, entre outros.<sup>64, 65, 66</sup>

## 1.7. Pectina

A pectina é um heteropolissacarídeo constituído essencialmente por monómeros de ácido *D*-galacturónico ligados através ligações  $\alpha$ -(1→4)-glicosídicas (Fig. 1.6).

Naturalmente presente em diferentes tecidos de uma ampla variedade de plantas e particularmente abundante em frutos (por exemplo, casca de citrinos ou polpa de maçã), a pectina é extraída a nível comercial como produto puro ou em combinação com outros biopolímeros, como celulose, hemicelulose e lignina, com larga aplicação como agente gelificante e na área alimentar, como conservante, entre outros.<sup>67</sup>

Os grupos carboxílicos existentes nos grupos galacturónico, presentes em forma parcialmente esterificada, determinam o comportamento ácido da pectina em solução aquosa, com um  $pK_a$  entre 2.5 e 3.0 e independente da concentração da pectina.

Todavia, em função do pH, e da temperatura, a pectina torna-se instável, e em ambiente ácido sofre a hidrólise das ligações glicosídicas.

A pectina é considerada um polieletrólito aniónico, devido à presença do grupo carboxílico ionizável, com capacidade de formar interações eletrostáticas com polieletrólitos ou contraíões catiónicos.<sup>61</sup>

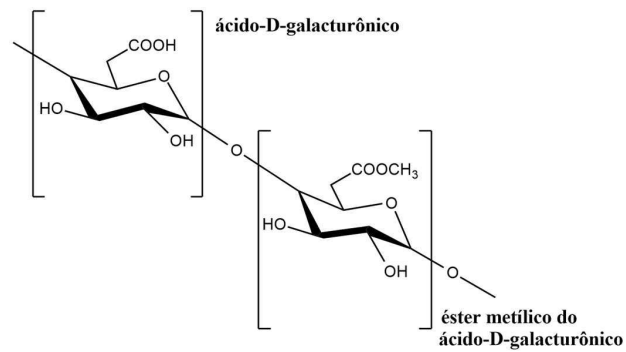


Fig. 1.6 Representação da estrutura molecular da pectina.

## 1.8. Objetivo do projeto

Com base no propósito do projeto “*How to protect water, soil and plants production all together - ProWspers-WaterJPI/0006/2016*” em campo ambiental, este estudo foca-se na síntese e determinação da eficiência de sorção de Cymoxanil em solução aquosa por hidrogéis de quitosano (QT) e pectina (PT) e quitosano-pectina funcionalizada com  $\beta$ -ciclodextrina (CD).<sup>68</sup>

O objetivo é testar as capacidades de sorção dos hidrogéis em soluções aquosas de pesticida, usadas como modelo de condição ambiental, visando possíveis aplicações em processo de tratamento de águas provenientes de campos agrícolas.

# Capítulo 2: Experimental

## 2.1. Materiais e métodos

Quitosano (poli-*D*-glucosamina) com grau de acetilação (GA) de 15% e peso molecular médio ( $\bar{M}$ ) de 87000 g/mol, foi obtido através da Golden-Shell Biochemical (China). Pectina (éster metílico do ácido poli-*D*-galacturónico), constituída por ácido *D*-galacturónico  $\geq 74\%$  (m/m) e peso molecular entre 169000 e 177000 g/mol<sup>69</sup>, foi fornecida pela Sigma-Aldrich (Dinamarca).  $\beta$ -ciclodextrina,  $M = 1134.98$  g/mol, e grau de pureza  $\geq 98\%$  foi adquirida à Acros-Organics. O Cymoxanil ( $C_7H_{10}N_4O_3$ ) com massa molecular,  $M = 198.18$  g/mol e grau de pureza 98.9% foi obtido da Sigma-Aldrich.

Todos os reagentes foram utilizados sem ulteriores tratamentos de purificação e as soluções aquosas foram preparadas em água *Millipore-Q* (resistividade elétrica 18.2 M $\Omega$ ·cm a 25 °C) obtida através o sistema de purificação de água, *Direct-Q*® 3UV-R.

Os valores de pH foram determinados através do medidor *MeterLab* PHM 240 e eléctrodo *WTW*-pH *Electrode-Sentix* 52. O eléctrodo de pH foi calibrado diariamente por soluções tampão comerciais *Panreac* (4.0, 7.0 e 10.0), antes da realização das experiências, tendo obtido valores de zero pH e sensibilidade de *ca.* 6.7 e superior a 96%, respetivamente.

## 2.2. Método de quantificação do Cymoxanil

A quantificação do pesticida Cymoxanil efetuou-se por cromatografia líquida de alta eficiência, com cromatógrafo *VWR-Hitachi LaChrom Elite HPLC*.

O sistema cromatográfico é composto por 5 módulos: i) *Organizer*: controla as funções do equipamento a nível eletrónico e as conexões com a interface; ii) *Diode Array Detector* (DAD), com lâmpada D<sub>2</sub>&W com varrimento de onda entre 220 e 750 nm; iii) *Column Oven L-2300*, com intervalo de temperatura de trabalho entre 5-70 °C e coluna analítica *Purospher*® *Star RP-18* fechada (0.25 m × 4.6 mm, 5  $\mu$ m) e equipada com pré-coluna *LiChrocart* 4-4; iv) *Autosampler L-2200*; v) *Pump L-2130*, com intervalo de fluxo de análise entre 0.5 e 8.0 mL/min com uma precisão de  $\pm 2\%$ . A aquisição e o tratamento dos dados foi efetuada através do software *EZChrom Elite* v. 3.3.2. (*Agilent*, USA).

Foi desenvolvido um modelo de calibração confiável e consistente, e foi determinada a gama analítica, com base num método previamente desenvolvido para o Cymoxanil por Balayiannis et al.<sup>70</sup>

Duma forma sintética o método consiste na preparação de soluções padrão de CYM em acetoneitrilo num intervalo de concentração entre 100 e 0.1 mg/L, por diluição duma solução-mãe obtida por solubilização de 100 mg de substância ativa padrão (98%) em 0.1 L de acetoneitrilo (ACN, 1000 mg/L).

A partir das soluções padrão, foram preparadas as amostras de análise de 1 mL em *vials* de 2 mL (*Supelco*); as soluções forma armazenadas a -20 °C.

Todas as análises foram efetuadas em triplicado.

As condições experimentais de análise são apresentadas na Tabela 2.1.

**Tab. 2.1.** Características do método de calibração e análise das amostras de Cymoxanil.

<b>Cymoxanil</b>	
<b>Fase móvel</b>	Acetonitrilo/água ultrapura (70:30 v/v) + 2% álcool isopropílico <sup>f</sup>
<b>Taxa de fluxo</b>	2 mL/min
<b>Temperatura</b>	40 °C
<b>Volume de injeção</b>	20 µL
<b>Comprimento de onda (<math>\lambda_{\max}</math>)</b>	242 nm
<b>Tempo de retenção (<math>t_R</math>)</b>	1.63 min

Todas as soluções usadas em análise de HPLC foram utilizadas após filtração com filtros de membrana de Nylon 0.45 µm (*Whatman<sup>TH</sup>*) e sonicadas por 15 minutos usando um banho de ultra-som *SELECTA®-ULTRASONS*, para desgasificar a solução.

A validade e confiança do método de calibração e a gama analítica foram determinadas por validação estatística dos valores das áreas sob a curva de absorvância de cada solução padrão.

## 2.3. Síntese e caracterização dos hidrogéis

### 2.3.1. Modificação da pectina

Uma das características interessantes no quitosano e pectina é a presença de grupos funcionais que permitem alterar as propriedades químico-físicas do polímero e dos correspondentes hidrogéis através do controlo de parâmetros como a temperatura, o pH e a força iónica, ou através da funcionalização dos polímeros.

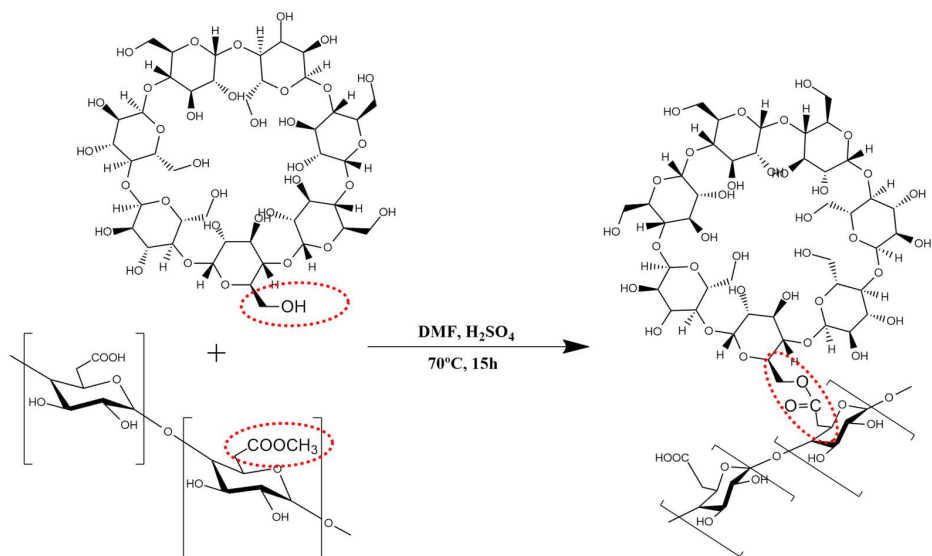
Neste estudo, analisou-se o efeito da funcionalização da pectina com  $\beta$ -ciclodextrina sobre a capacidade de sorção dos hidrogéis à base de quitosano.

A funcionalização da pectina com  $\beta$ -ciclodextrina em razão 2:1 (m/m), secos a 50 °C por 24 horas, foi efetuada através da reação de transesterificação em 40 mL de dimetilformamida anidra (DMF), com adição de 0.1 mL de ácido sulfúrico concentrado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), sob agitação a 70 °C por 15 horas (Fig.2.1).

---

<sup>f</sup> Álcool isopropílico: segundo um estudo efetuado (G. Balayiannis et al., 2014) é usado para alcançar mais rapidamente o acondicionamento da coluna cromatográfica, evitando fenómenos de colapso hidrofóbico.

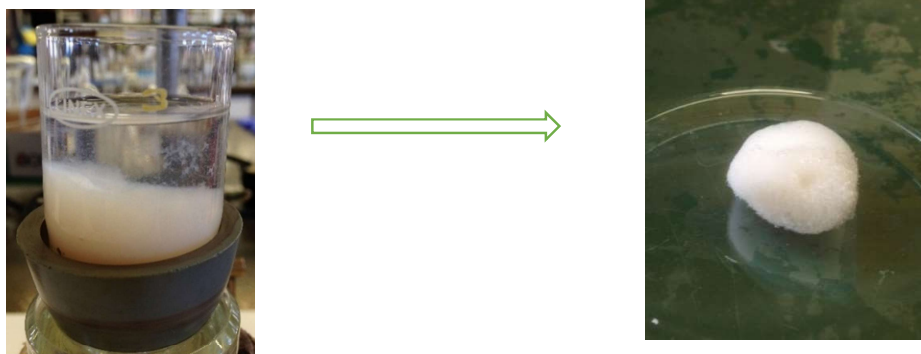




**Fig. 2.1** Representação do mecanismo de síntese do complexo pectina- $\beta$ -ciclodextrina.

O produto de reação, foi precipitado com excesso de acetona e filtrado em vácuo com um funil de Buchner com placa porosa; por fim, o produto de filtração foi solubilizado em água ultrapura e purificado através duma membrana de diálise de acetato de celulose (*Sigma-Aldrich*, *cut-off* massa molar  $\leq 12000$  g/mol), num banho de água ultrapura a 25 °C. O processo dura três dias, com renovação da água 3 vezes por dia.

Por último, a solução de pectina- $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -PT) foi congelada e, sucessivamente liofilizada por 2 dias a -56 °C e 0.085 mBar, num liofilizador *LabConco-FreeZone 4.5* (Fig. 2.2.).



**Fig. 2.2.** Fotografias da pectina funcionalizada antes e após a liofilização.

### 2.3.2. Síntese dos hidrogéis

Soluções de quitosano (1% m/v), em tampão acetato 0.1 M e pH = 3, e soluções de pectina e  $\beta$ -PT (1% m/v), em tampão fosfato 0.1 M e pH 9.2, foram preparadas à temperatura ambiente e em constante agitação.

Os hidrogéis sintetizaram-se em sistema de emulsão O/A, cuja fase hidrofóbica é constituída por 5 mL de álcool benzílico, onde são homogeneizadas as soluções de QT e PT, ou  $\beta$ -PT, numa razão de 1:1 (v/v) através de agitação a  $34 \times 10^3$  rpm por 5 minutos, obtida com um agitador *Ultraturrax MICCRA D-1*.

Os hidrogéis sintetizados, quitosano pectina (QT-PT) e quitosano-pectina funcionalizada (QT- $\beta$ -PT), são posteriormente lavados com acetona para a remoção de possíveis contaminantes e favorecer a secagem à temperatura ambiente, dentro dum excicador por 24 horas antes de ser liofilizado para a completa remoção da água reticular (Fig. 2.3).



Fig. 2.3. Fotografias do hidrogel de QT-PT antes e após a liofilização.

#### 2.3.2.1. Caracterização da pectina funcionalizada e dos hidrogéis

O produto de transesterificação da pectina com a  $\beta$ -ciclodextrina foi caracterizado através da análise de espectroscopia de infravermelho por reflexão total atenuada (IR-ATR) das amostras em estado sólido, para determinar a presença da CD ligada à pectina, com base na análise das bandas vibracionais dos grupos funcionais característicos de cada composto e/ou formação de novas bandas. Os espectros foram obtidos através do equipamento *Variam Cary 630 FTIR Spectrometer*, com varrimento de onda entre 650 e 4000  $\text{cm}^{-1}$ . A eficiência da reação de transesterificação foi avaliada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear protónica ( $^1\text{H}$ -RMN). A referência utilizada na análise do rendimento da reação foi o sal de sódio do ácido 3-(trimetilsilil) propiónico-2,2,3,3- $\text{d}_4$  (TSP, *Aldrich*), com grau de pureza  $\geq 98\%$ .

A solução para a análise foi preparada solubilizando, numa solução 2.0 mg/mL de TSP em óxido de deutério ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $M = 172.27$  g/mol, pureza  $> 99.9\%$  da *Eurisotop*), uma quantidade conhecida de  $\beta$ -PT, de forma a se obter uma concentração final de 4.0 mg/mL. A análise  $^1\text{H}$ -RMN foi efetuada através dum espectrómetro *Bruker-Avance III 400*.

A caracterização dos hidrogéis de QT-PT e QT- $\beta$ -PT obteve-se através de métodos de análise diferentes.

As propriedades viscoelásticas dos hidrogéis foram determinadas por análise reológica através do equipamento *Haake-Mars (Modular Advanced Rheometer System)* equipado com *Plate-P35 TiL* (diâmetro 35 mm). Inicialmente, foi efetuada a análise variando a frequência ( $f$ ) da força aplicada (entre 0.1 e 10 Hz) a pressão constante de 100 Pa, até obter um comportamento linear da componente elástica ( $G'$ ). Sucessivamente, efetuaram-se análises variando a pressão ( $\tau$ ) (entre 1.0 e  $10 \times 10^4$  Pa) a frequência constante de 1 Hz. Ambas as análises foram conduzidas com uma altura do prato de 0.52 mm e à temperatura de 25 °C. Para as análises foi utilizada, por cada hidrogel, uma quantidade suficiente para cobrir inteiramente o prato e o hidrogel em excesso foi eliminado. O tratamento dos dados foi feito com o software *Origin v. 8.5.1 (OriginLab Corporation, USA)*.

A caracterização dos hidrogéis foi complementada por espectroscopia de infravermelho, análise termogravimétrica e espectroscopia eletrônica de varrimento. No primeiro caso, foi utilizado um *Variam Cary 630 FTIR Spectrometer*, sendo a análise de amostras sólidas obtida por ATR. As análises termogravimétricas (TGA) foram efetuadas com o equipamento TG209-F3 (*Taurus Netzsch Instruments*). Foram utilizadas amostras entre 2.0 e 5.0 mg, num intervalo de temperatura de 25 a 800 °C, com uma velocidade de aquecimento de 10 °C/min em atmosfera inerte de azoto (taxa de fluxo de 50 mL/min). A análise termogravimétrica permitiu determinar a estabilidade térmica dos hidrogéis assim como relacionar como esta é modificada com a modificação estrutural dos mesmos.

A morfologia da superfície dos hidrogéis observou-se através de microscopia eletrônica de varrimento (SEM *Scanning Electron Microscopy*) a 4.00 kV com valores de ampliação crescentes: 100, 1000, 3000, e 10000 $\times$ , usando um equipamento *Merlin-Zeiss Gemini 2-Zeiss*. As amostras foram previamente revestidas a ouro usando um *DC-Generator-PFG 1500 DC*.

### **2.3.2.2. Estudo de interação pesticida/hidrogel**

Os efeitos de interação do CYM com os hidrogéis de QT-PT e QT- $\beta$ -PT foram determinados através de caracterização por análise IR-ATR, TGA e SEM de amostras de hidrogel colocadas em soluções aquosas de pesticida 100 ppm, a 20 °C e 450 rpm de agitação, por 24 horas.

Todas as análises de IR-ATR, termogravimétricas e SEM, foram efetuadas em amostras de hidrogel, após processo de congelamento e liofilização. Em particular, para a análise de SEM, as amostras foram congeladas em azoto líquido, antes da liofilização.

## **2.4. Teste de degradação do Cymoxanil**

Estudos prévios reportam que o CYM se degrada por via hidrolítica e fotolítica (ver Tabela 1.2). Em ambos os processos, o pH e a temperatura são os principais fatores que afetam o tempo de degradação da substância ( $T_{50}$ ), que decresce com o aumento do pH e da temperatura.<sup>71</sup>

De forma a validarmos esse estudo, procedemos a testes de degradação que consistiram na determinação da concentração de Cymoxanil em duas soluções aquosas de concentração máxima (100 ppm) e média (50 ppm) da gama analítica que se pretendia estudar num período de tempo de 24 horas. As amostras de análise, para as soluções nas duas concentrações, foram

preparadas em razão 95:5 de solução aquosa de Cymoxanil e acetonitrilo. A quantificação foi efetuada por HPLC-DAD segundo o método descrito na Secção 2.2.

## 2.5. Estudo das isotérmicas de sorção

Para obtenção das isotérmicas de sorção começou-se por preparar uma solução-mãe de Cymoxanil 250 mg/mL em água ultrapura. Com base nessa solução, foram preparados dois conjuntos de oito soluções de 40 mL, numa gama de concentração entre 10 e 120 ppm, diferenciados pela presença duma quantidade conhecida de hidrogel (cerca de 4 mg). De forma a garantir a não degradação física do hidrogel na sequência da agitação, este foi mantido no interior de um saco de chá de Nylon, com *cut-off* de 20 µm.

A solubilização do analito usado na solução mãe, assim como a homogeneização e estudo de sorção foram conduzidos mantendo as soluções em agitação constante de 450 rpm e a uma temperatura constante de 20 °C, usando para tal um agitador magnético *Variomag-Poly* e um banho termostático *GFL*, respetivamente.

De modo a minimizar a possível fotólise do Cymoxanil, os tubos *Falcon* contendo as soluções de análise foram revestidos com papel de alumínio.

Determinaram-se as concentrações das soluções de CYM entre 120 e 10 ppm, em presença e ausência de hidrogel.

As soluções foram mantidas em agitação por 24 h, intervalo de tempo considerado suficiente para o sistema atingir o equilíbrio, minimizando os fenómenos de degradação (ver Tabela 1.2). A quantificação foi efetuada por análise HPLC-DAD, segundo o método supra indicado (ver Secção 2.2), após 12 e 24 horas.

A quantidade de pesticida sorvido determinou-se com base na eq. (2.1):<sup>68, 72</sup>

$$q_e = \frac{V \cdot (C_0 - C_e)}{m_x} \quad (\text{eq. 2.1})$$

onde  $q_e$  é a quantidade de pesticida sorvido a um determinado tempo ( $t$ ) por unidade de massa de hidrogel,  $C_0$  e  $C_e$  são as concentrações iniciais e de equilíbrio (mg/L) de CYM em solução aquosa, respetivamente,  $m_x$  é a massa de hidrogel seco (g) e  $V$  é o volume das soluções de análises (L).

A eficiência de remoção (%ER) foi calculada através da seguinte equação 2.2:<sup>68</sup>

$$\%ER = \left( \frac{C_0 - C_e}{C_0} \right) \times 100 \quad (\text{eq. 2.2})$$

O estudo do equilíbrio de sorção foi conduzido através de três diferentes modelos de isotérmica de sorção, Langmuir, Freundlich e Brunauer-Emmett-Teller (BET). Neste estudo serão apresentados os resultados segundo o modelo Freundlich e BET, pois foram estes que apresentaram melhores ajustes em detrimento do modelo de Langmuir.

### 2.5.1. Isotérmica de Langmuir

O modelo empírico de Langmuir, baseia-se num modelo homogéneo de adsorção monocamada, com um número finito de pontos de ligação.<sup>73</sup>

A sua expressão matemática é representada na equação 2.3:

$$q_e = \frac{Q_L K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (\text{eq. 2.3})$$

onde  $Q_L$  representa a capacidade máxima de adsorção do hidrogel,  $K_L$  é a constante de Langmuir enquanto,  $C_e$  e  $q_e$  representam a concentração no equilíbrio e a massa de adsorvido por unidade de massa de adsorvente, respetivamente.

Este modelo é caracterizado graficamente pela presença dum *plateau*, que indica o alcance do ponto de saturação onde todos os pontos de ligação foram ocupados (com a ocorrência duma monocamada).<sup>72, 74</sup>

### 2.5.2. Isotérmica de Freundlich

O modelo de Freundlich, contrariamente ao de Langmuir, é uma equação semi-empírica sendo aplicável a sistemas heterogéneos e de sorção multicamada, permitindo descrever mecanismos de sorção não-ideais e reversíveis. Os termos heterogéneo e multicamada indicam que os locais de interação apresentam diferentes energias de adsorção, com formação de camadas sucessivas com força de ligação decrescente.

A equação de Freundlich é descrita na equação 2.4:

$$q_e = K_f C_e^{1/n} \quad (\text{eq. 2.4})$$

onde  $K_f$  e  $1/n$  são constantes de Freundlich, específicas do sistema em estudo, que indicam a capacidade de sorção do adsorvente e a intensidade de sorção, respetivamente. Valores de  $1/n$  inferiores a 1 indicam processos de adsorção favoráveis.<sup>72, 74</sup>

### 2.5.3. Isotérmica de Brunauer-Emmett-Teller

O modelo de Brunauer-Emmett-Teller (BET), é definido como uma extensão do modelo de Langmuir, pois baseia-se no conceito de adsorção homogénea e não prevê interações intermoleculares, mas considera a formação de sistemas multicamadas com igual energia de adsorção, à exceção da primeira camada.<sup>75</sup>

A equação do modelo é reportada a seguir (eq. 2.5):

$$q_e = \frac{q_s K_{BET} C_e}{(C_s - C_e)[1 + (K_{BET} - 1)(C_e/C_s)]} \quad (\text{eq. 2.5})$$

onde  $q_s$ ,  $K_{BET}$  e  $C_s$  indicam a capacidade teórica de saturação relativa da primeira monocamada, a constante de isotérmica de sorção BET e a concentração de saturação de adsorvido na monocamada.<sup>74</sup>

## Capítulo 3: Resultados e Discussão

### 3.1. Caracterização do complexo $\beta$ -PT

A funcionalização da pectina por  $\beta$ -ciclodextrina foi avaliada por espectroscopia de infravermelho (IR-ATR) e por ressonância magnética nuclear. Na figura 3.1 são apresentados os espectros de infravermelho da pectina, CD e da  $\beta$ -PT. Relativamente à pectina, na zona a elevada frequência entre 4000 e 2000  $\text{cm}^{-1}$  é possível observar duas bandas características. Uma primeira banda, a 3317  $\text{cm}^{-1}$ , relativa à elongação vibracional dos grupos hidroxilo (-OH) presentes nos grupos álcool e carboxílico. Esta banda aparece a frequências mais baixas do que a banda normal do grupo hidroxilo livre, entre 3700 e 3584  $\text{cm}^{-1}$ , por causa de ligações a hidrogénio.<sup>76</sup> Uma segunda banda, observa-se a 2928  $\text{cm}^{-1}$  e é característica da elongação vibracional assimétrica do grupo C-H dos grupos metilo (-CH<sub>3</sub>) e metilenos (-CH<sub>2</sub>-). A presença do grupo carboxílico é indicada pela banda a 1732  $\text{cm}^{-1}$  devida à elongação assimétrica do grupo C=O e por uma segunda banda a 1605  $\text{cm}^{-1}$  por efeito de ressonância com o grupo C-O-H. A banda a 1732  $\text{cm}^{-1}$  pode resultar sobreposta com a banda de elongação vibracional do grupo C=O do grupo metilo estereo (C(=O)O-CH<sub>3</sub>).<sup>77</sup> As bandas a 1142  $\text{cm}^{-1}$  e a 966  $\text{cm}^{-1}$  são características da ligação  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glicosídica e da ligação C-O-C do grupo éter.<sup>78, 79</sup> Considerando o espetro da  $\beta$ -ciclodextrina, observam-se a 3274  $\text{cm}^{-1}$  e 2923  $\text{cm}^{-1}$  duas bandas devidas a elongação vibracional do grupo -OH de álcoois primários e secundários e do grupo C-H dos grupos metilenos.<sup>80</sup> Uma segunda banda característica do grupo -OH, devida ao modo de flexão vibracional, observa-se a 1648  $\text{cm}^{-1}$ . As bandas 1152, 1077, 1020 e 856  $\text{cm}^{-1}$  devem-se ao estiramento vibracional assimétrico e simétrico do grupo C-O-C e C-O do grupo álcool e éter, incluindo a ligação  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glicosídica.<sup>81</sup>

O espetro IR do complexo pectina- $\beta$ -ciclodextrina, por sua vez, é caracterizado pela presença de duas bandas, respetivamente, a 1736 e 1228  $\text{cm}^{-1}$  devidas ao estiramento vibracional assimétrico dos grupos C=O, O-C-C e RC(=O)-O do grupo éster da pectina. Estas bandas indicam a presença de pectina ligada por ligação éster com a CD. A banda a 1629  $\text{cm}^{-1}$ , por outro lado, é característica do grupo -OH em álcoois primários e secundários da CD.<sup>68, 76</sup>

A quantificação de CD em termos de eficiência de reação em percentagem, foi determinada através análise <sup>1</sup>H-RMN de uma solução de TSP: CD 1:2 (m/m) em água deuterada (ver Secção 2.3.2.1). Na figura 3.2, a seguir, são apresentados os espetros de pectina,  $\beta$ -ciclodextrina e do complexo  $\beta$ -PT. Através da análise das bandas foi determinada, em maneira unívoca, a presença da CD no produto de síntese. A banda característica evidenciada no gráfico a 4.991 ppm, como reportado na literatura, é identificativa do H1 disposto na superfície hidrofílica externa da CD.<sup>82, 83, 84</sup> O *shift* químico da banda é provavelmente devido à interação com a pectina na formação do complexo  $\beta$ -PT. Determinada a presença da CD no complexo, determinou-se a eficiência percentual da reação pondo em razão as áreas do pico do TSP e do H1 da CD, conhecendo a massa utilizada e o número de prótons total de cada composto. Desta forma, foi possível determinar uma eficiência de reação do 52%.

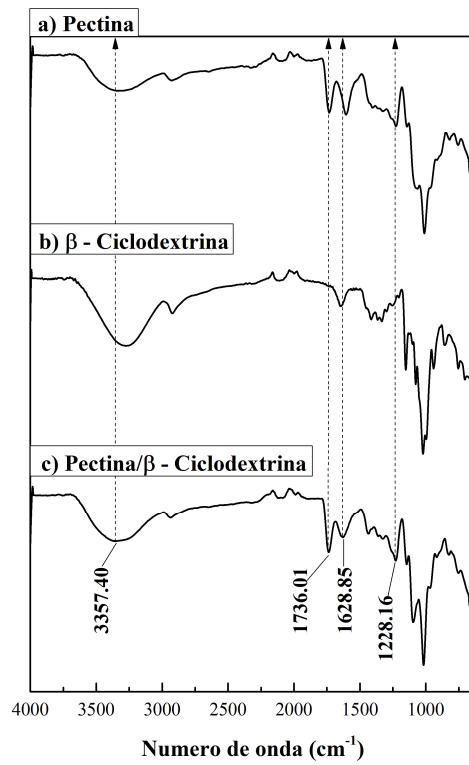


Fig. 3.1 Espectro de IR-ATR de: a) pectina; b) β-ciclodextrina e; c) pectina-β-ciclodextrina.

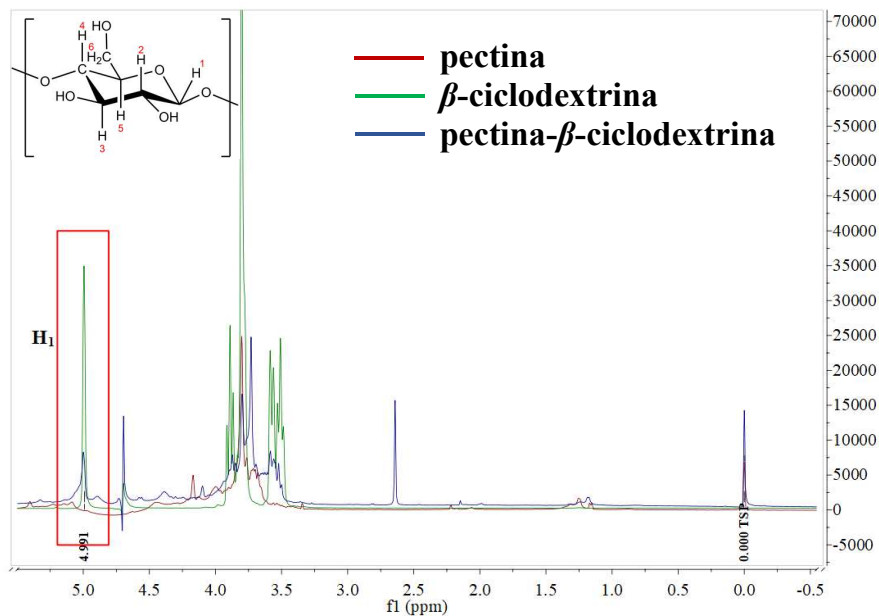


Fig. 3.2 Espectro de <sup>1</sup>H-NMR de pectina funcionalizada com β-ciclodextrina: pectina (vermelho), β-ciclodextrina (verde), complexo β-PT (azul).

## 3.2. Caracterização dos hidrogéis QT-PT e QT- $\beta$ -PT

### 3.2.1. Caracterização reológica

A caracterização reológica das amostras de QT-PT e QT- $\beta$ -PT permitiu, numa primeira análise, observar que a pressões inferiores a 100 Pa, não é possível obter uma relação linear das componentes  $G'$  e  $G''$  em função da frequência. Determinados os parâmetros de análise, estudou-se o comportamento dos dois hidrogéis (QT-PT e QT- $\beta$ -PT) através um primeiro estudo da variação da viscosidade ( $\eta$ ) em função da frequência (0.1-10 Hz).

Na figura 3.3 I) observa-se que para ambos os hidrogéis há uma diminuição da viscosidade aparente ao aumento da frequência, característica particular dos fluidos não Newtonianos, definidos como pseudoplásticos.<sup>85</sup> A diminuição da viscosidade pode ser explicada considerando que a estrutura reticulada dos dois hidrogéis se orienta progressivamente ao aumentar a frequência, com deformação ou quebra das interações entre os dois polímeros. A figura 3.3 II) mostra que em todo o intervalo de frequência a componente  $G'$  é superior a  $G''$ ; verifica-se ainda que ambas apresentam uma variação paralela e ligeiramente dependente da frequência. Mais em detalhe, a componente  $G'$  é cerca de 5 vezes superior à componente  $G''$ , entre  $10 \times 10^4$  e  $10 \times 10^5$ , quer para o QT-PT quer para o QT- $\beta$ -PT, classificando os complexos como hidrogéis fortes.<sup>86</sup>

O comportamento pseudoplástico foi posteriormente confirmado através do modelo de Ostwald-de Waele (Tab. 3.1 e Fig. 3.3 II):

$$G' = A \cdot f^{(B)} \quad (\text{eq. 3.1})$$

onde  $G'$  indica a componente elástica,  $A$  é um coeficiente de viscosidade,  $f$  representa a frequência e  $B$  é um índice adimensional que indica o comportamento do sistema.<sup>87</sup>

Os parâmetros  $A$  e  $B$  foram determinados como ordenada na origem e declive, respetivamente, através do ajuste linear de  $G'$  em função da frequência na forma logarítmica. Valores de  $B < 1$ , 0.1 para QT-PT e 0.09 para QT- $\beta$ -PT, indicam um comportamento pseudoplástico e covalente dos hidrogéis.<sup>88</sup>

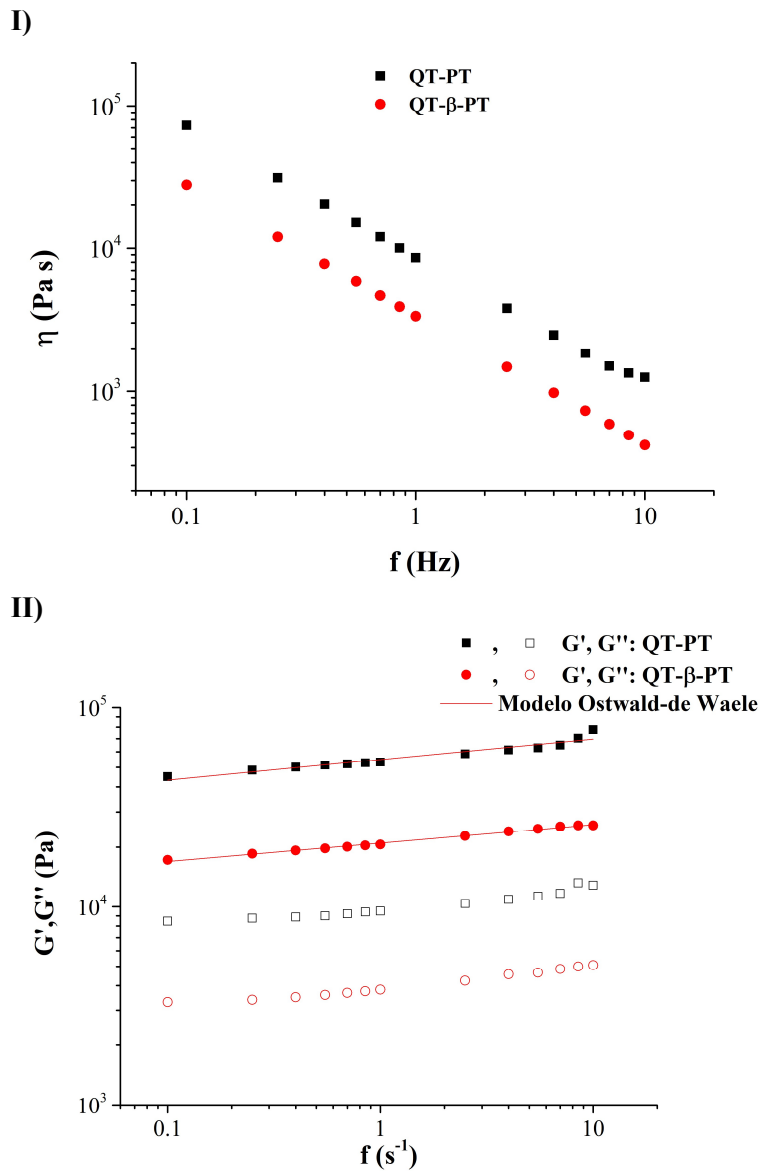
Da figura 3.4 é possível observar a variação da componente elástica e viscosa em função da pressão para os dois hidrogéis.

Em geral, os hidrogéis QT-PT e QT- $\beta$ -PT não apresentam diferenças significativas da componente  $G'$  e  $G''$ , caracterizadas por uma variação paralela em função da pressão, com a componente elástica maior do que a componente viscosa em quase todo o intervalo de pressão considerado – comportamento típico de materiais viscoelásticos. A cerca de 3000 Pa observa-se uma diminuição de  $G'$  a que corresponde, simultaneamente, um aumento da componente  $G''$  até o ponto de quebra (QT-PT  $\approx$  9500 Pa, QT- $\beta$ -PT  $\approx$  6500 Pa), que indica o ponto de transição sol-gel.

Os resultados reológicos podem ser explicados considerando o processo de preparação dos hidrogéis, no qual o quitosano foi solubilizado a pH = 3 e a pectina e a pectina funcionalizada a pH = 9.2, com o objetivo de maximizar a densidade de carga.

A elevada elasticidade e resistência a elevada pressão, provavelmente, devem-se a uma elevada reticulação do complexo com um elevado grau de interação eletrostática entre o grupo catiónico do quitosano e o grupo aniónico da pectina e ligações de hidrogénio entre os dois polímeros.



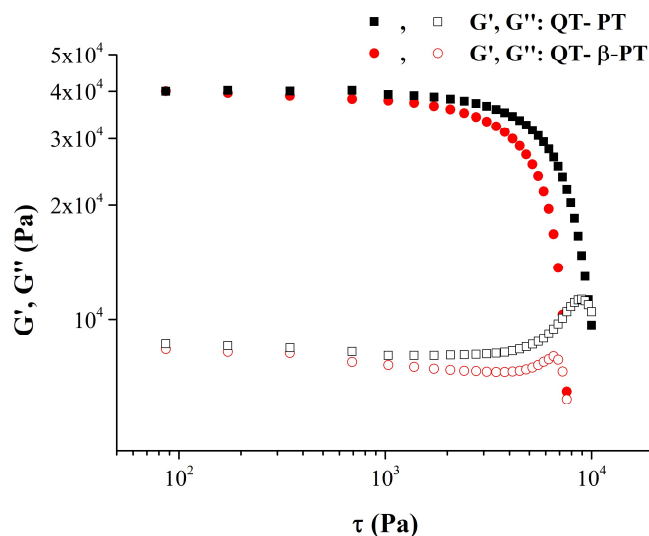


**Fig. 3.3** Representação dos resultados reológicos no intervalo de frequência 0.1-10 Hz, a 25 °C: I) variação da viscosidade dos hidrogéis; II) variação das componentes  $G'$  e  $G''$ .

**Tab. 3.1** Parâmetros do modelo Ostwald-de Waele para os dois hidrogéis, a 25 °C.

Hidrogéis	$A$ (Pa·s) <sup>B a</sup>	$B$ <sup>a</sup>	$R^2$
QT-PT	4.74	0.10	0.9644
QT- $\beta$ -PT	4.32	0.09	0.9936

<sup>a</sup> desvio padrão de  $A$  e  $B$  da ordem de  $10^{-3}$



**Fig. 3.4** Representação da variação da componente elástica  $G'$  e viscosa  $G''$  em função da pressão ( $1$  e  $10 \times 10^4$  Pa) a  $25$  °C.

### 3.2.2. Análise dos espectros IR-ATR

A figura 3.5 apresenta os espectros IR-ATR dos dois complexos polieletrólitos QT-PT e QT- $\beta$ -PT na ausência e presença de CYM.

Consideramos inicialmente a análises na ausência da substância ativa.

O espectro do quitosano, polímero de base na formação de ambos os complexos, é caracterizado na zona a alta frequência por uma banda larga devida a sobreposição da absorbância da elongação vibracional assimétrica e simétrica do grupo -OH, do grupo álcool, -NH da amina primária e amida secundária, com picos a  $3353$  e  $3286$   $\text{cm}^{-1}$ . As duas bandas entre  $2930$ - $2850$   $\text{cm}^{-1}$ , resultam da elongação vibracional assimétrica e simétrica do grupo -CH do grupo metileno.<sup>76</sup> A presença do grupo amida (RC(=O)-NH-R') é confirmada pela presença da banda a  $1644$   $\text{cm}^{-1}$  devida à elongação vibracional do grupo C=O (amida I) e pela banda a  $1586$   $\text{cm}^{-1}$  representativa do modo vibracional de flexão do grupo -NH (amida II), sobrepostas com a banda de absorbância do grupo -NH de aminas primárias geralmente presente entre  $1650$  e  $1580$   $\text{cm}^{-1}$ .<sup>89</sup> As múltiplas bandas presentes entre  $1450$  e  $1250$   $\text{cm}^{-1}$  resultam da interação da elongação vibracional do C-N e da flexão vibracional do grupo N-H da amida secundária e da amina primária (amida III).<sup>90</sup> O grupo éter produz uma primeira banda a  $1148$   $\text{cm}^{-1}$  devida à elongação vibracional assimétrica do grupo C-O-C, incluindo a ligação  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glicosídica, e uma segunda entre  $1000$  e  $810$   $\text{cm}^{-1}$  resultante da interação vibracional do grupo C-C e C-O do grupo éter.<sup>89</sup>

No espectro do complexo QT-PT, na figura 3.5 I), observa-se a formação de múltiplas bandas entre  $3100$  e  $3000$   $\text{cm}^{-1}$ , resultantes da elongação vibracional assimétrica e simétrica do grupo -NH<sub>3</sub><sup>+</sup> da amina primária do quitosano, provavelmente, devido à protonação do grupo amina no pH ácido da solução tampão. A presença do grupo amônio, no quitosano, confirma-se pela formação de duas bandas a  $2363$  e  $2334$   $\text{cm}^{-1}$  características da interação entre o grupo R-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>

do quitosano e o grupo  $\text{COO}^-$  da pectina.

A banda a  $1742\text{ cm}^{-1}$ , relativa ao grupo  $\text{C=O}$  do grupo carboxilato, resulta numa frequência e intensidade maior relativamente ao espectro da pectina; de forma semelhante, a banda a  $1551\text{ cm}^{-1}$  relativa ao modo de flexão vibracional assimétrica do grupo catiónico  $\text{R-NH}_3^+$  do quitosano ocorre a frequências mais baixas do que no quitosano devido, provavelmente, à interação dos dois grupos com carga oposta. Por último, podem-se observar as bandas a  $1602$  e a nova banda a  $1497\text{ cm}^{-1}$ , relativas à elongação assimétrica do grupo aniónico  $\text{COO}^-$  da pectina e à flexão simétrica do grupo  $\text{NH}_3^+$  no quitosano.<sup>76, 91, 92</sup>

O complexo QT- $\beta$ -PT, em figura 3.5 II), na zona de alta frequência do espectro IR, as bandas entre  $3100$  e  $3000\text{ cm}^{-1}$  relativas ao alongamento vibracional assimétrico e simétrico do grupo catiónico  $\text{NH}_3^+$ , embora menos evidentes, apresentam um perfil similar àquele obtido para o complexo QT-PT e confirmam a presença do quitosano no complexo. A banda a  $1741\text{ cm}^{-1}$  relativa ao grupo  $\text{C=O}$  do grupo carboxilato, como para o complexo QT-PT, encontra-se a maior frequência e intensidade do que no espectro da pectina e confirma a presença da pectina no complexo. A banda a  $1537\text{ cm}^{-1}$  relativa ao modo de flexão vibracional assimétrica do grupo catiónico  $\text{R-NH}_3^+$  do quitosano resulta em frequências mais baixas do que no quitosano. A variação nas frequências destas últimas duas bandas, indica a interação entre os grupos  $\text{COO}^-$  e  $\text{NH}_3^+$  de pectina e quitosano, respetivamente.<sup>68, 76, 91, 92</sup>

Considerando as análises na presença do ingrediente ativo, podemos concluir o seguinte: o espectro do Cymoxanil, é caracterizado na zona de elevada frequência pela presença de múltiplas bandas entre  $3400$  e  $3100\text{ cm}^{-1}$  devidas a elongação vibracional do grupo  $-\text{NH}$  da amida secundária e do grupo  $-\text{OH}$  do grupo carbonilo em forma enólica. A presença deste último é confirmada pela banda a  $2891\text{ cm}^{-1}$ . A banda a  $2230\text{ cm}^{-1}$  é característica do grupo nitrilo  $-\text{C}\equiv\text{N}$ , previsto no intervalo de  $2260$  e  $2240\text{ cm}^{-1}$ . A diferença pode ser devida à presença de conjugação e de um átomo aceitador de eletrões no carbono  $\alpha$ . Os dois grupos  $-\text{NH}$ , das amidas secundárias, apresentam a banda característica de flexão vibracional a  $1543\text{ cm}^{-1}$ . Esta banda geralmente está presente entre  $1650$  e  $1515\text{ cm}^{-1}$  (amida II). A presença do grupo amida é, também, confirmada pela banda a  $1689\text{ cm}^{-1}$  relativa à elongação vibracional do grupo  $\text{C=O}$  do grupo amida (amida I), geralmente presente entre  $1870$  e  $1540\text{ cm}^{-1}$ . No entanto, considerando o efeito de ressonância e conjugação, a frequência diminui entre  $1695$  e  $1650\text{ cm}^{-1}$ . Esta banda resulta sobreposta com a elongação vibracional da ligação  $\text{C=N}$ . A banda a  $1385\text{ cm}^{-1}$  juntamente com a banda a  $1350\text{ cm}^{-1}$ , são características do grupo amida III. A  $1150\text{ cm}^{-1}$  encontra-se a banda devida a elongação vibracional assimétrica do grupo  $\text{C-O-C}$  (esta banda está entre  $1500$  e  $1085\text{ cm}^{-1}$ ). O grupo  $\text{C=O}$  do grupo “anidrido” apresenta em geral uma banda cerca de  $\approx 1047\text{ cm}^{-1}$ , neste caso a banda ocorre a  $1067\text{ cm}^{-1}$ , a frequência mais alta, o que se deve, possivelmente, à presença de conjugação no carbono  $\alpha$  e a presença de átomo de azoto ligado diretamente ao carbono do grupo carbonilo. A banda a  $901\text{ cm}^{-1}$  deve-se à combinação da elongação vibracional dos grupos  $\text{C-O}$  e  $\text{C-C}$  do grupo éter.<sup>76, 93</sup>

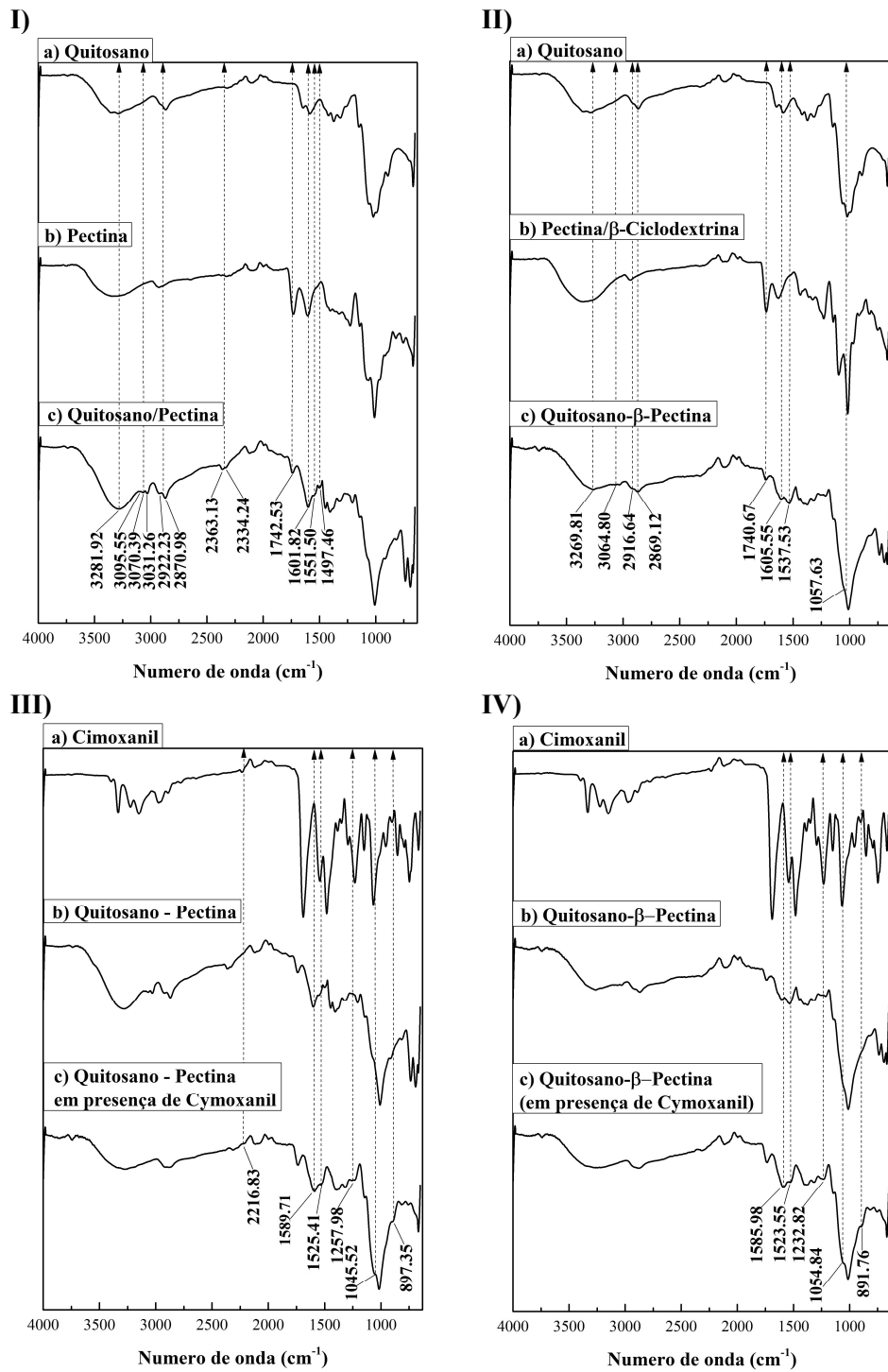


Fig. 3.5. Representação dos espectros IR-ATR dos hidrogéis de QT-PT (I e III) e QT- $\beta$ -PT (II e IV), em ausência (I e II) e presença de Cymoxanil (III e IV).

Os espectros dos complexos QT-PT e QT- $\beta$ -PT, em figura 3.5 III) e IV), apresentam um perfil muito similar e a presença do Cymoxanil, em ambos os casos, pode ser determinada por bandas com número de onda semelhantes.

As bandas entre 1600 e 1500  $\text{cm}^{-1}$  devem-se à flexão vibracional do grupo -NH em grupo amida secundária (presentes em quitosano e Cymoxanil) e ao grupo - $\text{NH}_3^+$  no quitosano. As bandas a 1258  $\text{cm}^{-1}$  (QT-PT) e 1233  $\text{cm}^{-1}$  (QT- $\beta$ -PT), são relativas à interação da elongação vibracional entre os grupos -NH e -CN do Cymoxanil (1231  $\text{cm}^{-1}$ ). No espectro do complexo QT-PT observa-se um aumento na frequência da banda.

A nova banda a cerca de 1050  $\text{cm}^{-1}$  é relativa ao grupo C=O do grupo pseudo-anidrido do Cymoxanil, geralmente prevista a 1047  $\text{cm}^{-1}$ . As bandas a 897 e 891  $\text{cm}^{-1}$ , devem-se aos grupos C-C e C-O do grupo éter do Cymoxanil.

Há ainda a salientar que no espectro do complexo QT-PT (figura 3.5, III) é possível observar uma banda pequena a 2217  $\text{cm}^{-1}$ , característica do grupo nitrilo do Cymoxanil, que confirma a sua presença.

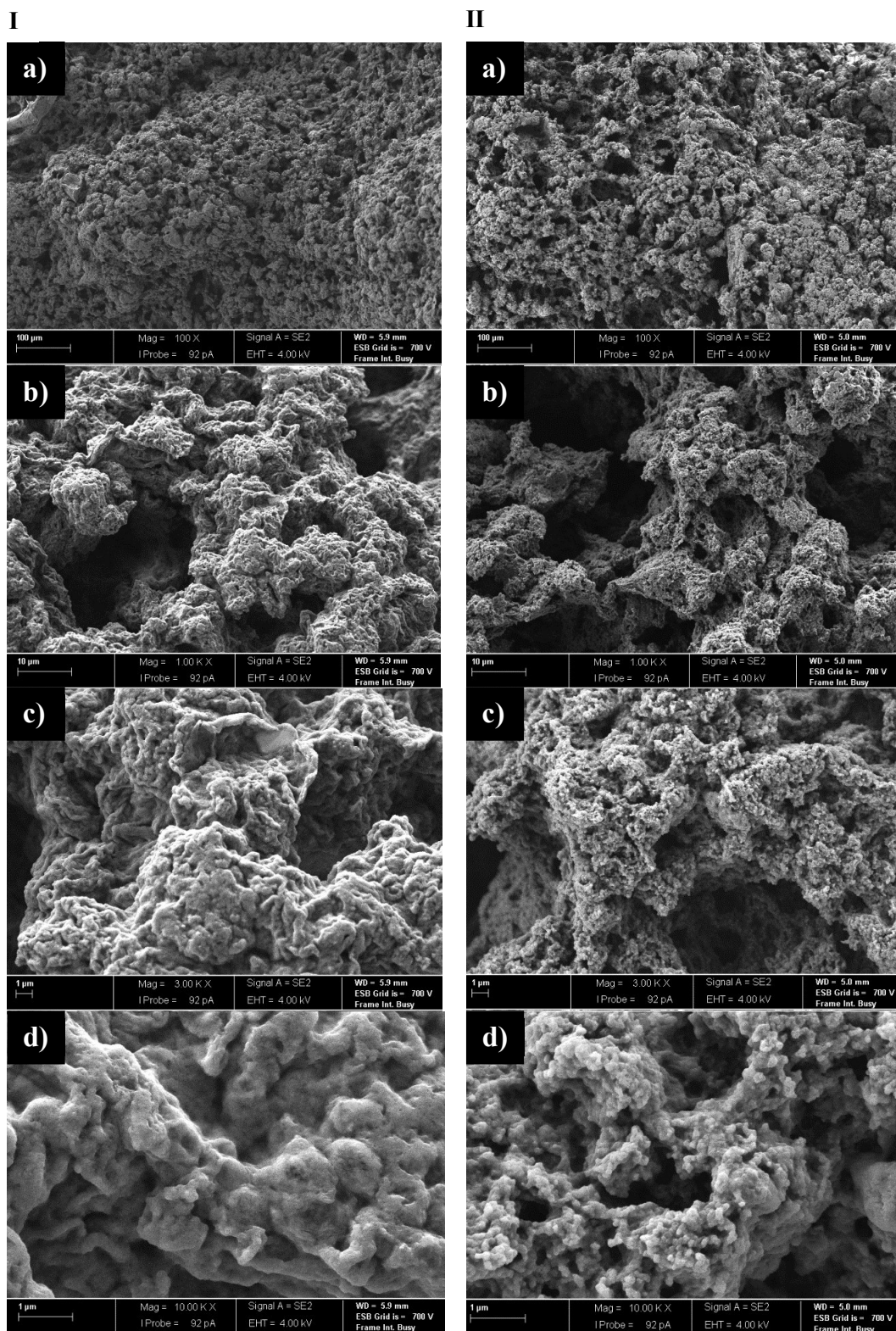
Particularmente interessante, em presença de Cymoxanil (espectros III e IV), é a ocorrência do desaparecimento de bandas características que nos espectros I e II indicam a interação dos polímeros. Em ambos os hidrogéis, observa-se o desaparecimento das múltiplas bandas entre 3100 e 3000  $\text{cm}^{-1}$  características do grupo - $\text{NH}_3^+$  do quitosano e a diminuição de intensidade das bandas a cerca de 2350  $\text{cm}^{-1}$ , observáveis no espectro do complexo QT-PT, resultantes da interação entre os grupos - $\text{NH}_3^+$  do quitosano e  $\text{COO}^-$  da pectina. A variação destas bandas pode ser indicativa de um processo de degradação que afeta as interações eletrostáticas intercadeia entre os polímeros. Esta hipótese está em acordo com os resultados obtidos por SEM.

### 3.2.3. Caracterização morfológica

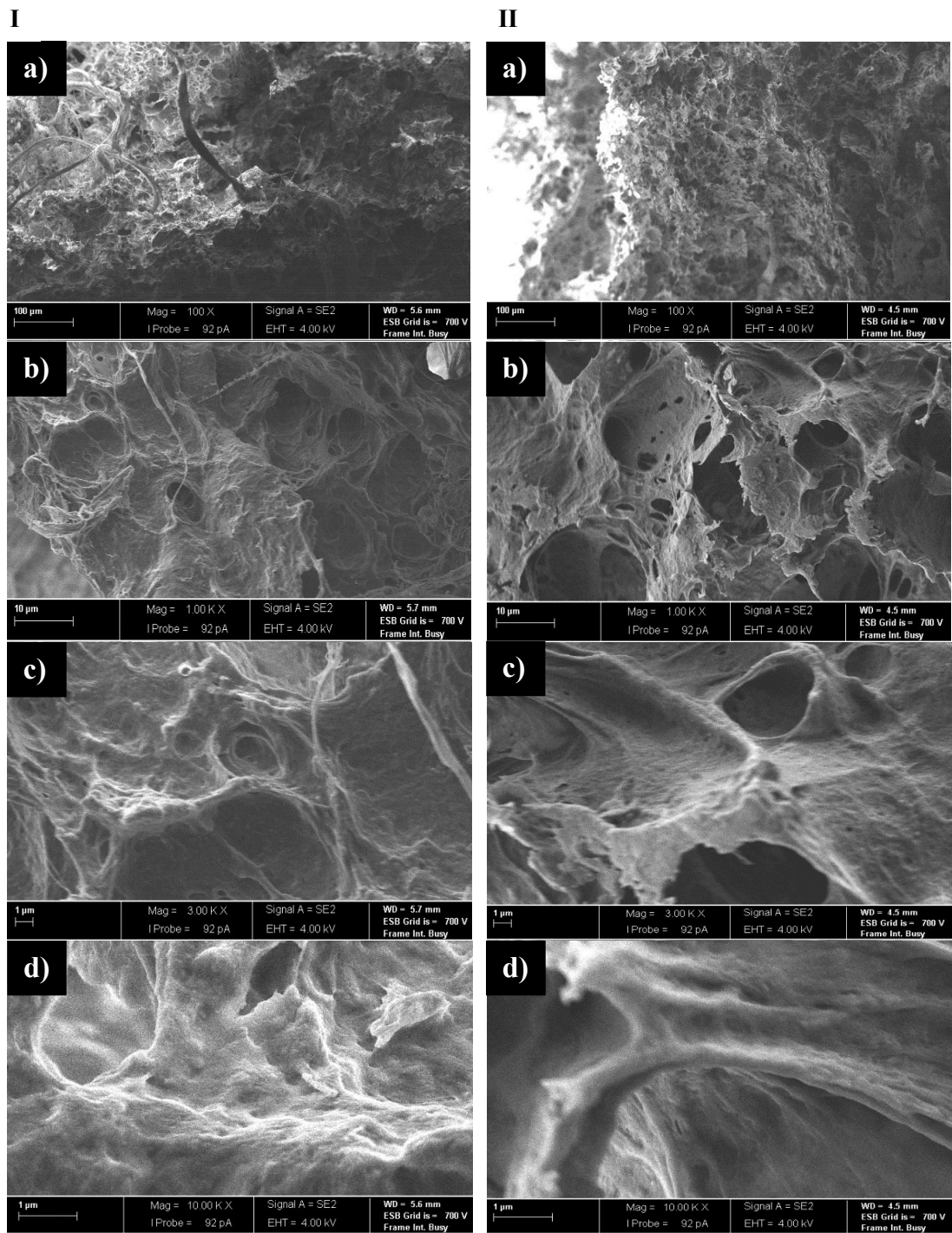
As imagens SEM para os complexos QT-PT e QT- $\beta$ -PT são reportadas na figura 3.6. Os resultados mostram, para ambos os hidrogéis, uma estrutura interligada, alveolar, nas figuras I a) e II a) (magnitude 100  $\times$ ). Aumentando a magnitude para 1000  $\times$  e 3000  $\times$  é possível confirmar a presença de poros e cavidades de tamanho considerável. Nas imagens I c) - I d) e II c) - II d), embora seja possível observar um fenómeno de *shrinking* em ambos os complexos, no caso do hidrogel quitina-pectina a superfície apresenta-se mais regular quando comparada com a superfície do hidrogel quitina-pectina funcionalizada, notavelmente mais irregular.

As imagens de SEM dos complexos QT-PT e QT- $\beta$ -PT, após contato por 24 h com uma solução de Cymoxanil 100 ppm, são apresentadas na figura 3.7. A sorção do Cymoxanil pelos hidrogéis apresenta uma alteração significativa na morfologia da superfície dos hidrogéis; nas micrografias com ampliação de 100  $\times$  e 1000  $\times$ . Os poros e os canais da estrutura tridimensional complexa, deram lugar a uma estrutura com um aspeto laminar, aparentemente mais frágil.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos no estudo dos espectros IR-ATR (ver Secção 3.2.2.). O Cymoxanil parece atuar num processo de degradação, segundo um mecanismo desconhecido, quando em contato com ambos os complexos poliméricos.



**Fig. 3.6** Representação das imagens SEM para o complexo QT-PT (I) e QT- $\beta$ -PT (II), com ampliação crescente; 100  $\times$  (a), 1000  $\times$  (b), 3000  $\times$  (c) e 10000  $\times$  (d), a 4kV.



**Fig. 3.7** Micrografia de SEM para o complexo QT-PT (I) e QT-β-PT (II) em presença de Cymoxanil, com ampliação crescente: 100 × (a), 1000 × (b), 3000 × (c) e 10000 × (d), a 4kV.

### 3.2.4. Análise termogravimétrica

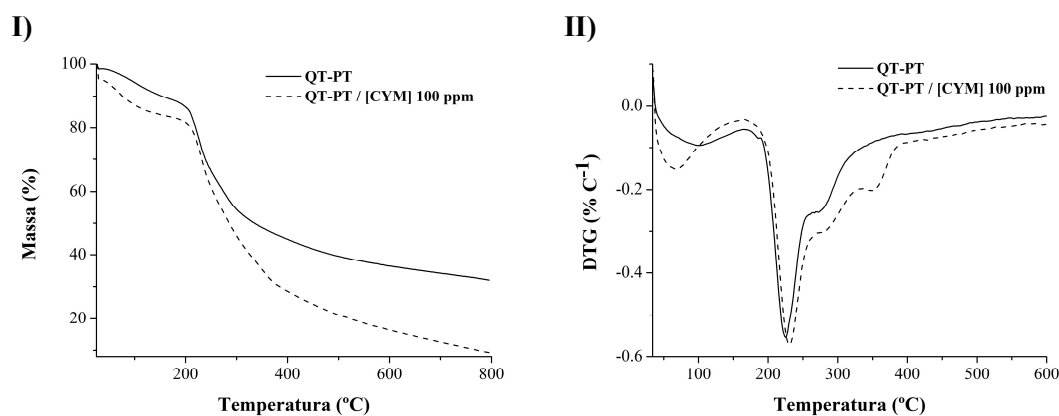
Nas figuras 3.8 I) e II) são apresentados os gráficos de TGA e respectivos DTGs do complexo QT-PT na presença e ausência de CYM.

Nas figuras 3.9 I) e II) são apresentados os gráficos de TGA e DTGs do complexo QT- $\beta$ -PT em presença e ausência de CYM.

Em ambas as imagens 3.8 e 3.9, podemos observar a ocorrência duma primeira transição térmica entre 25 e 100 °C devida à perda de água adsorvida pelos polímeros. Mais em detalhe, no caso de QT-PT existe uma diferença significativa na percentagem de água na ausência e presença de CYM, evidenciada por uma perda de massa entre 5-10% a 100 °C, e 10-20% a 66 °C, respetivamente. Por outro lado, para QT- $\beta$ -PT a perda em percentagem de massa resulta em cerca de 15% a 66 °C, aproximadamente, na presença e ausência de CYM.

Nos gráficos de DTG de ambos os hidrogéis em ausência de CYM, duas transições são visíveis num intervalo de temperatura entre 220 e 280 °C com uma perda em percentagem de massa entre 50 e 65%. No caso do QT-PT, este apresenta uma primeira degradação a 226 °C, enquanto para o QT- $\beta$ -PT essa ocorre a 242 °C. Esta primeira transição, nos dois complexos, associa-se à degradação da cadeia polimérica da pectina, de acordo com os valores reportados na literatura (235 °C).<sup>94, 95</sup> A diferença com o valor de referência deve-se, provavelmente, à reticulação entre os dois polímeros.

Nos gráficos das figuras 3.8 II) e 3.9 II), na ausência de CYM, a segunda transição térmica ocorre a 273 °C e 279 °C, para QT-PT e QT- $\beta$ -PT, respetivamente. Estes picos devem-se à degradação da cadeia polimérica do quitosano, que como descrito na literatura degrada a partir duma temperatura de 260 °C.<sup>86, 96</sup>



**Fig. 3.8** Termogramas (I) e respetivos DTGs (II) de QT-PT na ausência e presença de CYM.

O efeito da sorção de CYM pelos hidrogéis apresenta alguns efeitos no comportamento térmico destes. Assim, é possível observar um ligeiro aumento de cerca de 4 °C (de 226 °C para 230 °C), para a principal transição térmica que ocorre no QT-PT; já no caso do QT- $\beta$ -PT observa-se uma diminuição significativa da temperatura de degradação de 242 °C para 234 °C. Enquanto no primeiro caso a variação da temperatura de degradação poderá não ser conclusiva, já no caso do QT- $\beta$ -PT é possível concluir que a presença do pesticida proporciona uma estrutura de



hidrogel menos organizada, o que está em linha com o que foi discutido nas secções anteriores. Por fim, o complexo QT-PT apresenta um ulterior pico a 345 °C.<sup>88</sup>

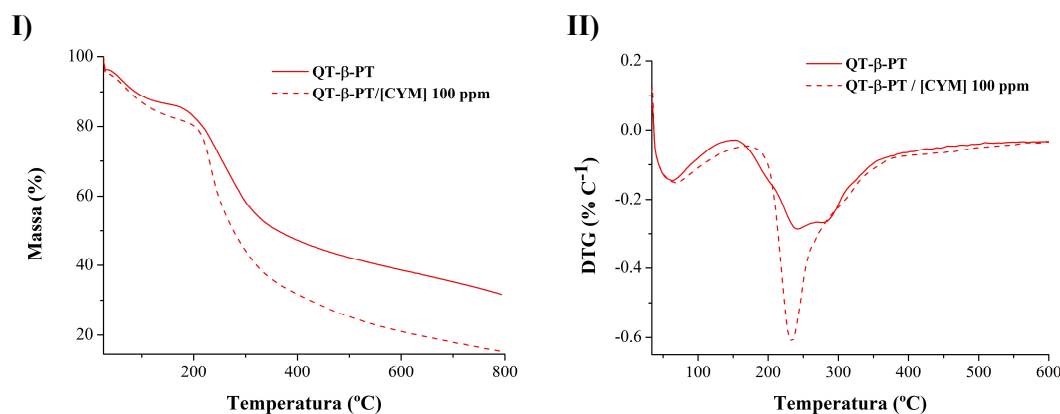


Fig. 3.9 Termogramas (I) e respetivos DTGs (II) de QT- $\beta$ -PT na ausência e presença de CYM.

### 3.3. Calibração e determinação da gama analítica

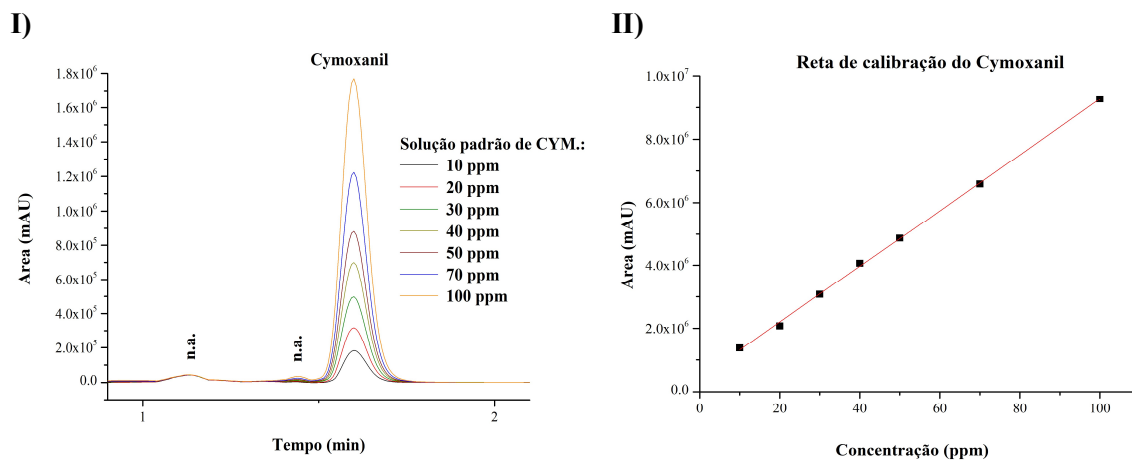
A quantificação do Cymoxanil é um passo fundamental na execução do presente projecto. Neste sentido, e duma primeira análise cromatográfica da solução padrão de 100 ppm, foi possível determinar a ocorrência duma banda bem definida cuja absorbância máxima ocorre ao comprimento de onda ( $\lambda_{\text{max}}$ ) de 242 nm, e o tempo de retenção ( $t_R$ ) de 1.63 min, otimizando o tempo de análise por cada amostra.

Os dados experimentais foram validados estatisticamente. Através do teste de Grubbs foi verificada a presença de *outliers* entre os valores experimentais; sucessivamente verificou-se a homocedasticidade das variâncias e através do tratamento dos dados por OLS (*Ordinary Least Squares*) foram determinados os parâmetros  $b_0$  e  $b_1$  e as respetivas incertezas padrão, com grau de confiança de 95% (Tabela 3.2).

Os valores de  $b_0$  e  $b_1$  foram usados para determinação de: i) limiares analíticos, limite de deteção (LOD) e limite de quantificação (LOQ); ii) gama analítica. Na figura 3.10 são apresentados os cromatogramas relativos a cada solução padrão e a reta de calibração, enquanto, a tabela 3.2 resume os valores dos parâmetros analíticos determinados.

Tab. 3.2. Parâmetros analíticos do modelo de calibração, valores de limiares analíticos e gama analítica de Cymoxanil.

Modelo polinomial	$(b_0) \pm SE$	$(b_1) \pm SE$	%RE (b0)	%RE (b1)	$R^2$	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Gama analítica (mg/L)
$y = b_0 + b_1 x$	$435199 \pm 55194$	$88388 \pm 1033.78$	12.7	1.2	0.9996	2.5 e 7.5		7.5-98.9



**Fig. 3.10.** Resultados da análise cromatográfica das soluções padrão de Cymoxanil (10, 20, 30, 40, 50, 70 e 100) ppm, a 40 °C: I) Cromatogramas,  $\lambda_{\max}$  242 nm e  $t_R$  1.63 min; II) Reta de calibração.

### 3.4. Teste de degradação

Os resultados dos testes conduzidos em amostras de 50 e 100 ppm de Cymoxanil em água ultrapura (ver Secção 2.4), são apresentados na figura 3.11.

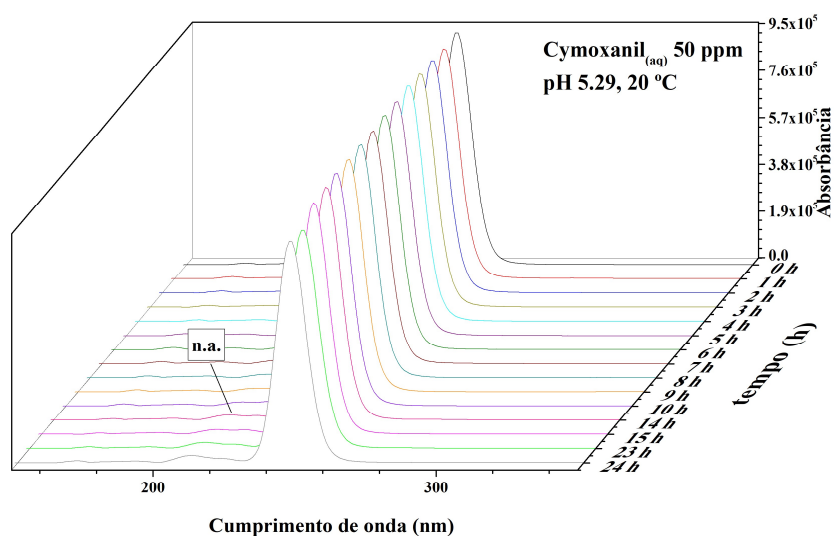
Os valores das áreas das bandas nos cromatogramas são semelhantes, sem variações anômalas ao longo das 24 h experimentais, não sendo observável a presença de picos significativos devidos a produtos de degradação ou formação de metabolitos.

Os resultados demonstram que soluções aquosas de Cymoxanil, a pH não controlado ( $\text{pH} \approx 5$ ), a 20 °C e na ausência de luz, são estáveis por um período de tempo maior do que 24 h, o que está de acordo com a literatura (Fig. 3.12 e Tab. 3.3).<sup>71</sup>

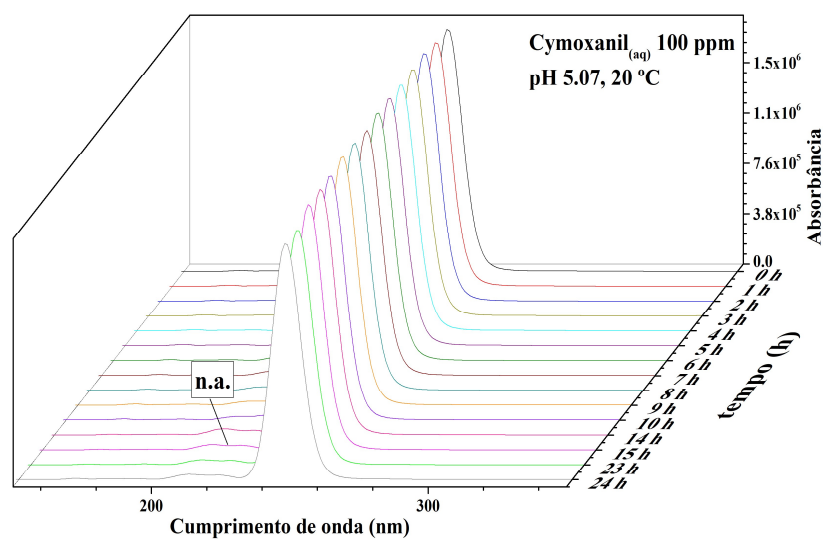
**Tab. 3.3** Valores de concentração média das soluções de Cymoxanil e erro percentual relativo, em função dos valores da reta de calibração.

Solução CYM	Conc. media $\pm$ SE (ppm)	%RE
50 ppm	49.8 $\pm$ 0.4	0.65
100 ppm	102.8 $\pm$ 0.8	3.84

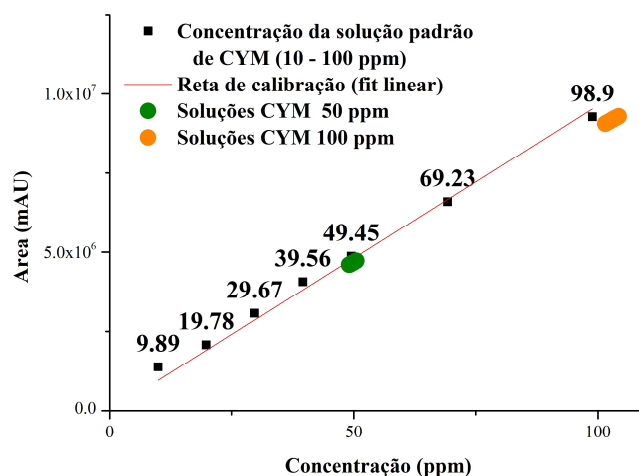
D)



II)



**Fig. 3.11** Cromatogramas de soluções de Cymoxanil em função do tempo ( $\lambda = 242 \text{ nm}$ ,  $T = 40 \text{ °C}$ ,  $t_R = 1.63 \text{ min}$ ): I) Solução de Cymoxanil em água ultrapura, 50 ppm, pH 5.29, a 20 °C; II) Solução de Cymoxanil em água ultrapura, 100 ppm, pH 5.07, a 20 °C.



**Fig. 3.12** Representação dos valores de concentração das soluções a 50 ppm (verde) e 100 ppm (laranja) na reta de calibração.

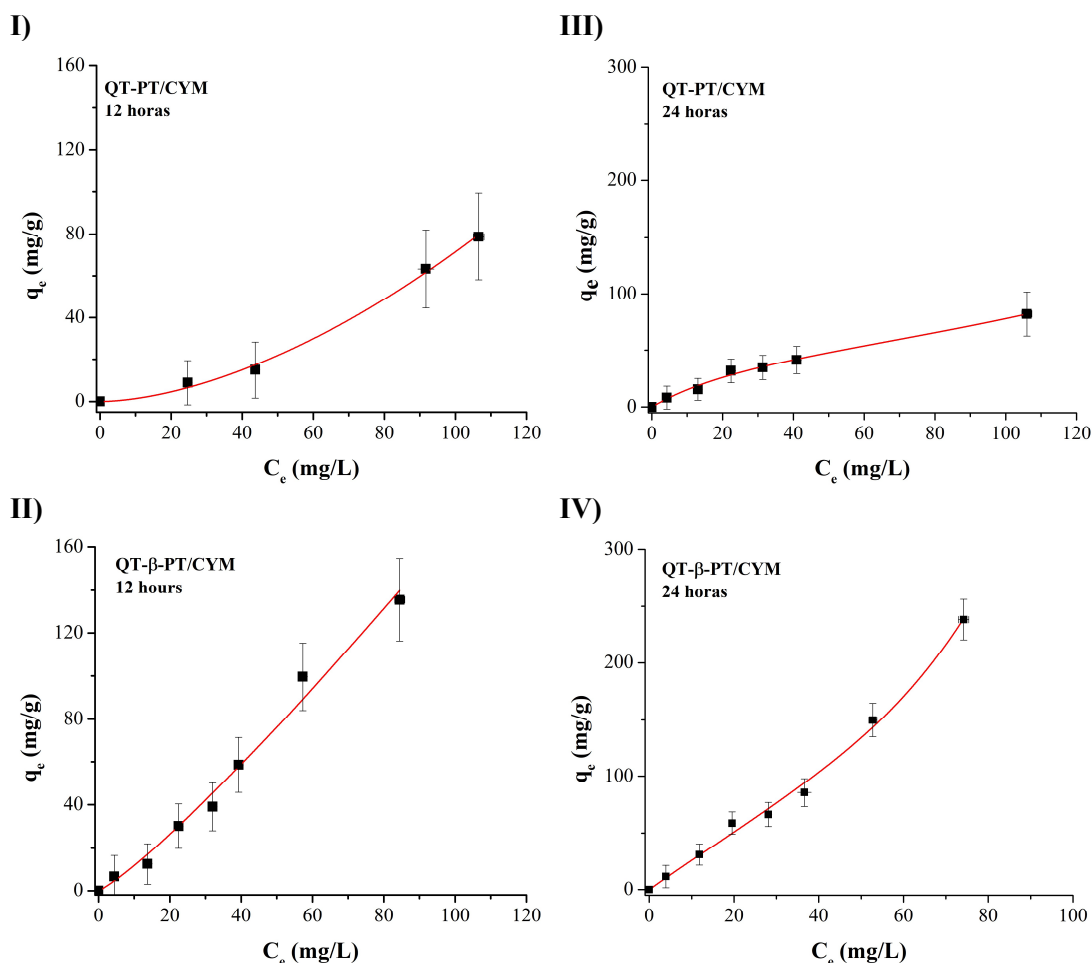
### 3.5. Isotérmicas de sorção

A figura 3.13 apresenta os gráficos das isotérmicas de sorção do Cymoxanil, pelos dois hidrogéis em estudo a 12 e 24 horas. Como mencionado na Seção 2.5, são apresentados os resultados segundo os modelos de Freundlich e BET que permitiram obter coeficientes de determinação mais elevados no ajuste aos dados experimentais. Os dois modelos consideram o processo de formação de multicamadas, o que os distingue, entre outros pontos, do modelo de Langmuir. Nas tabelas 3.4 e 3.5 são reportados os valores dos respectivos parâmetros de ajuste dos dois modelos e de eficiência de remoção a 24 horas.

Duma primeira análise é possível observar que a quantidade de CYM adsorvida por unidade de adsorvente, quer a 12 quer a 24 horas, aumenta ao aumentar a concentração de substância ativa, indicando um processo governado por gradiente de concentração.

As isotérmicas a 12 horas nas figuras 3.13 I) e II) foram melhor ajustadas através do modelo de Freundlich, com um coeficiente de determinação maior relativamente ao modelo BET que, por outro lado, apresenta um valor de coeficiente de determinação maior nas isotérmicas a 24 horas, nas figuras 3.13 III) e IV).

Mais em detalhe, considerando os gráficos a 12 horas, embora os dois hidrogéis apresentem valores de  $K_f$  e  $1/n$  inferiores a 1, sugerindo a ocorrência dum processo de quimissorção, que envolve interações não reversíveis entre adsorvido e adsorvente e baixa heterogeneidade, o complexo QT- $\beta$ -PT apresenta em toda a gama de concentrações uma maior capacidade adsorvente com maiores quantidades de adsorvido por unidade em peso de adsorvente (Tab. 3.4). Este resultado está de acordo com as evidências experimentais obtidas por análise IR-ATR e SEM, onde bandas características dos polímeros desaparecem e a morfologia dos hidrogéis resulta altamente afetada pela presença do CYM.



**Fig. 3.13** Representação das isotérmicas de sorção de QT-PT e QT-β-PT num intervalo de concentração de Cymoxanil entre 10 e 120 ppm, a 20 °C: I) e II) isotérmicas a 12 horas (modelo de Freundlich); III) e IV) isotérmicas a 24 horas (modelo BET). As linhas a vermelho apresentam o ajuste das equações dos modelos de sorção aos dados experimentais.

Considerando as isotérmicas a 24 horas, os gráficos mostram, novamente, uma notável maior capacidade de sorção para o complexo QT-β-PT. Esta conclusão é suportada pelos valores dos parâmetros  $C_s$  e  $q_s$  reportados na tabela 3.5. Tal pode dever-se à capacidade da ciclodextrina em formar complexos com o CYM e/ou no efeito que a ciclodextrina poderá ter na alteração da estrutura do hidrogel.

No hidrogel QT-PT, embora este apresente um valor de concentração de saturação da monocamada ( $C_s$ ) duas vezes maior do que o valor obtido para o QT-β-PT, o valor teórico de concentração de saturação resulta mais baixo, indicando um possível mecanismo de monocamada e sugerindo, uma vez mais, que a ciclodextrina apresenta um papel relevante no processo de adsorção.

Por outro lado, o QT- $\beta$ -PT apresenta um mais baixo valor de  $C_s$ , com um valor duas vezes maior de  $q_s$  indicando um possível processo de sorção por multicamada que permite uma maior sorção de CYM por quantidade em peso de hidrogel usado (ver Tabela 3.5).

Por fim, comparando os gráficos às 12 e 24 horas, nota-se facilmente como o processo de sorção a 12 horas não resulta ainda completo.

Os valores de eficiência de remoção do Cymoxanil a 24 horas, em tabela 3.5, aumentam desde 10 ( $\pm 2$ )% até 22 ( $\pm 2$ )% passando de QT-PT para QT- $\beta$ -PT. Os valores de eficiência de remoção, tendo em conta a elevada capacidade de sorção em peso de CYM em função da quantidade em peso de hidrogel, sobretudo para o complexo QT- $\beta$ -PT, indicam uma forte dependência da quantidade de hidrogel utilizado ( $\approx 4$  mg). A maior capacidade de sorção em presença da pectina funcionalizada deve-se a uma maior porosidade e um maior número de sítios ativos de interação com o Cymoxanil, assim como a uma maior superfície de contato resultante da complexa e irregular morfologia. Esta teoria confirma também os resultados obtidos através do modelo de Freundlich, que indica um processo de quimissorção.

**Tab. 3.4** Parâmetros de ajuste do modelo de Freundlich ao estudo das isotérmicas de sorção a 12 horas.

Freundlich, 12 horas				
Hidrogel	[CYM] <sub>0</sub> (mg/L)	$K_f$ (mg <sup>(n-1)/n</sup> L <sup>1/n</sup> g <sup>-1</sup> )	1/n	R <sup>2</sup>
QT-PT	10-120	0.03 $\pm$ 0.02	0.59 $\pm$ 0.10	0.9937
QT- $\beta$ -PT	10-120	0.80 $\pm$ 0.30	0.86 $\pm$ 0.09	0.9828

**Tab. 3.5** Parâmetros de ajuste do modelo de BET ao estudo das isotérmicas de sorção a 24 horas e eficiência de remoção (%ER).

BET, 24 horas						
Hidrogel	[CYM] <sub>0</sub> (mg/L)	$q_s$	$C_s$	$K_{BET}$	R <sup>2</sup>	%ER
QT-PT	10-120	59 $\pm$ 21	272 $\pm$ 102	8 $\pm$ 2	0.9913	10 ( $\pm 2$ )
QT- $\beta$ -PT	10-120	133 $\pm$ 54	131 $\pm$ 23	3 $\pm$ 1	0.9929	22 ( $\pm 2$ )

## Capítulo 4: Conclusão

Com base nos crescentes problemas de poluição ambiental, e nos efeitos diretos ou indiretos para a saúde humana e dos animais, este estudo tem como objetivo testar a eficiência de remoção de Cymoxanil através da utilização de bio-hidrogéis de quitosano-pectina e quitosano-pectina funcionalizada com  $\beta$ -ciclodextrina. A funcionalização da pectina obteve-se por reação de transesterificação e a sua eficiência foi determinada por análise de  $^1\text{H-RMN}$ . A síntese dos hidrogéis efetuou-se por coacervação complexa em sistemas de emulsão O/A sob elevada agitação. A formação de ligações eletrostáticas entre os dois polímeros foi verificada através análise de IR-ATR e as suas propriedades físicas foram determinadas por análise reológica, confirmando a natureza viscoelástica dos dois complexos, que apresentam uma elevada elasticidade e resistência a elevadas pressões. A análise morfológica permitiu determinar uma substancial diferença entre os dois sistemas, onde a presença de ciclodextrina comporta a formação duma superfície complexa e irregular. O estudo das isotérmicas de sorção foram conduzidas dentro dum intervalo de concentração de 10-120 ppm de substância ativa. Dos resultados, observou-se uma elevada capacidade de sorção tendo em conta a quantidade em peso de hidrogel utilizado, sobretudo com o complexo de pectina funcionalizada que, ao contrário de QT-PT, apresenta um processo de sorção multicamada. Em conclusão, embora o processo de remoção do Cymoxanil seja afetado para diferentes fatores, os resultados obtidos mostram como a partir de baixas quantidades em peso de hidrogel, especialmente em presença de pectina funcionalizada, resultem significativas quantidades em peso de substância ativa removida indicando a possibilidade de aplicação destes complexos em processos de tratamento de águas. Aplicações industriais seriam também possíveis, considerando a elevada resistência e elasticidade sob elevadas pressões.

## Capítulo 5: Perspectivas futuras

Sendo o processo de sorção fortemente afetado pela quantidade de hidrogel utilizado e pela possível instabilidade do Cymoxanil devido a diferentes fatores como temperatura, pH, luz e ambientes aquosos, ulteriores estudos deverão ser efetuados, de forma a confirmar o efeito da variação da quantidade de hidrogel utilizado, em diferentes condições de análises.

Outro fator muito importante é a interação da substância ativa com os dois hidrogéis estudados pois, como descrito anteriormente, o CYM parece afetar a estabilidade da reticulação dos hidrogéis (ver, e.g., análise por microscopia electrónica de varrimento). Posteriores estudos estão previstos para determinar o mecanismo de interação do CYM com os diferentes hidrogéis.





## Referências

1. G. Erbach. Pesticide legislation in the EU: Towards sustainable use of plant protection products. European Parliament: EP Library; 2012 Mar. [citado 2018 Fev. 18], p.6; Disponível a partir de: [http://europarl.europa.eu/thinktank/en/document.html?reference=LDM\\_BRI\(2012\)120291](http://europarl.europa.eu/thinktank/en/document.html?reference=LDM_BRI(2012)120291);
2. European Commission (UE). Disponível a partir de: [https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides\\_en](https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides_en);
3. National Pesticide Information center (US). Disponível a partir de: <http://npic.orst.edu/factsheets/inerts.html>;
4. United States Environmental Protection Agency (US). Disponível a partir de: <https://epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/basic-information-about-pesticide-ingredients>;
5. Food and Agriculture Organization of the United Nation. Feeding the world in 2050 [internet]. 2009 Out. [citado 2018 Mai. 04]; p.4; Disponível a partir de: [http://fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues\\_papers/HLEF2050\\_Global\\_Agriculture.pdf](http://fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/HLEF2050_Global_Agriculture.pdf);
6. D. Pimentel. Amounts of Pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. *J. Agr. Environ. Ethic.* 1995; 8: p.17-29;
7. R. L. Metcalf. Insect Control. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.* 2012; 19: p.264-322;
8. Food and Agriculture Organization of the United Nation. International Code and Conduct on the Distribution and Use of Pesticides. Rome; 2010; p.39;
9. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. Manual on development and use of FAO and WHO specifications for pesticides. Rome; 2016; p.306;
10. European Environment Agency (UE). Annual Indicator Report Series (AIRS) [Internet]. 2017 Nov. [citado 2018 Mai. 04]; p.13; Disponível a partir de: <https://eea.europa.eu/airs/2017/environment-and-health/pesticides-sales>;
11. C. E. Handford, C. T. Elliott, K. Campbell. A Review of the Global Pesticide Legislation and the Scale of Challenge in Reaching the Global Harmonization of Food Safety Standards. *SETAC.* 2015; 11: p.525-536;
12. A. Burgeois, E. Klinkhamer, J. Price. Pesticide Removal from water [Tesi]. Massachussets: Polytechnic Institute Worcester, Science Degree; 2012;
13. J. E. Casida, R. J. Bryant. The ABCs of pesticide toxicology: amounts, biology, and chemistry. *RSC.* 2017; 5: p.755-763;
14. European Commission (UE). Presence of persistent chemicals in the human body results of Commissioner Wallstrom's blood test. Brussel. 2003 Nov. [citado 2018 Jul. 29]; p.5; Disponível a partir de: [http://europa.eu/rapid/press-release\\_MEMO-03-219\\_en.htm?locale=en](http://europa.eu/rapid/press-release_MEMO-03-219_en.htm?locale=en)
15. W. Wibawa, Rosli Bin Mohamad, A. B. Puteh, D. Omar, A. S. Jurami, S. A. Abdullah. Residual Phytotoxicity Effects of Paraquat, Glyphosate and Glufosinate-

- Ammonium Herbicides in Soils from Field-Treated Plots. *Int. J. Agri. Biol.* 2009; 11: p.214-216;
16. F. P. Garcia, S. Y. C. Ascencio, J. C. G. Oyarzun, A. C. Hernandez, P. V. Alavarado. Pesticide: classification, uses and toxicity. Measures of exposure and genotoxic risks. *J. Res. Environ. Sci. Toxicol.* 2012; 1: p.279-293;
  17. R. Jayaraj, P. Megha, P. Sreedev. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdiscip. Toxicol.* 2016; 9: p.90-100;
  18. R. Pleština. Pesticides and herbicides. In: L. Trugo, P. M. Finglas. Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition. 2<sup>nd</sup> ed. *Academic Press*; 2003; p.4473-4483;
  19. D. W. Sparling. Organochlorine Pesticides. *Ecotoxicology Essentials. Academic Press*; 2016; ch. 4; p.69-107;
  20. European Commission (UE). Disponível a partir de: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.selection&language=EN>;
  21. F. M. Fishel. Toxicity Profile: Cabramate Pesticides. University of Florida Institute of Food and Agricultural Science [Internet]. 2005 Jun. [citado 2018 Agu. 02]; p.3; Disponível a partir de: <http://edis.ifas.ufl.edu/pi088>
  22. J. L. Krysan, J. Dunley. Insect Growth Regulators [Internet]. Wenatchee: Washington State University, Tree Fruit Research & Extension Center. 1993. Disponível a partir de: <http://jenny.tfrec.wsu.edu/opm/displaySpecies.php?pn=-60>;
  23. H. Kaneko. Pyrethroid Chemistry and Metabolism. Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology; 2010; ch. 76; p.1635-1663;
  24. European Food Safety Authority (UE). The 2009 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal.* 2011; 9; p.2430-2655;
  25. European Food Safety Authority (UE). The 2015 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal.* 2017; 15; p.4791-4925;
  26. D. Bourguignon. EU policy and legislation on chemicals. European Parliamentary Research Service (UE); 2016; p.37;
  27. European Food Safety Authority (UE). About EFSA [Internet]. EFSA. Disponível a partir de: <http://efsa.europa.eu/en/aboutefsa>;
  28. European Commission (UE). Approval of active substances. Disponível a partir de: [https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval\\_active\\_substances\\_en](https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval_active_substances_en);
  29. European Crop Protection Authority (B). Registering plant protection products in the EU. Brussels. 2013 Jan.; p.20; Disponível a partir de: [http://ecpa.eu/sites/default/files/7450\\_Registration%20brochure\\_3.pdf](http://ecpa.eu/sites/default/files/7450_Registration%20brochure_3.pdf)
  30. European Food Safety Authority (UE). How pesticides are regulated in the EU. 2018 Abr.; p.10; Disponível a partir de: <https://efsa.europa.eu/en/corporate/pub/pesticides-ebook-180424>;
  31. D. Bourguignon. The precautionary principle. European Parliamentary Research Service (UE); 2015. P.28;
  32. European Commission (UE). Integrated Pest Management. Disponível a partir de: [https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/sustainable\\_use\\_pesticides/ipm\\_en](https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/sustainable_use_pesticides/ipm_en);
  33. Pesticide Action Network International (D). PAN International List of Highly Hazardous Pesticides. Hamburg. 2016 Dez.; p.35;

34. European Commission (UE). EU legislation on MRLs. Disponible a partir de: [https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max\\_residue\\_levels/eu\\_rules\\_en](https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max_residue_levels/eu_rules_en);
35. European Commission (UE). How are EU MRLs set? Disponible a partir de: [https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max\\_residue\\_levels/application\\_en](https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max_residue_levels/application_en);
36. European Commission (UE). International Plant Protection Convention (IPPC). Disponible a partir de: [https://ec.europa.eu/food/safety/international\\_affairs/standard\\_setting\\_bodies/ippc\\_en](https://ec.europa.eu/food/safety/international_affairs/standard_setting_bodies/ippc_en);
37. European Commission (UE). Codex Alimentarius. Disponible a partir de: [https://ec.europa.eu/food/safety/international\\_affairs/standard\\_setting\\_bodies/codex\\_en](https://ec.europa.eu/food/safety/international_affairs/standard_setting_bodies/codex_en);
38. Secretariat of Rotterdam Convention. Rotterdam Convention, on the prior informed consent procedure for certain hazardous chemicals and pesticides in international trade. Rome; 2015; p. 51;
39. Secretariat of Stockholm Convention. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs). Stockholm; 2009; p. 56
40. International Union of Pure and Applied Chemistry. Definition of persistence in pesticide chemistry. (Great Britain) Pure & Appl. Chem. 1980; 52: p.2563-2566;
41. M. Gavrilescu. Fate of Pesticides in the environment and its bioremediation. *Eng. Life Sci.* 2005; 5: p.497-526. (DOI: 10.1002/clsc.200520098);
42. A. A. Álvarez-Martín, M. S. Rodríguez-Cruz, M. Soledad Andrades, M. J. Sánchez-Martín. Application of a biosorbent to soil: a potential method for controlling water pollution by pesticides. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2016; 23: p.9192-9203 (DOI 10.1007/s11356-016-6132-4);
43. EFSA Scientific Report, 2008, 167, p.1-116, doi: 10.2903/j.efsa.2008.167r;
44. I. V. Muralikrishna, V. Manickam. Principles and design of water treatment. *Environmental Management.* 2017; ch. 11, p.209-248;
45. A. Cruz-Alcalde, C. Sans, S. Esplugas. Priority pesticides abatement by advanced water technologies: The case of acetamiprid removal by ozonation. *Science of the total Environment.* 2017; 599-600: p.1454-1461;
46. S. Gligorovski, R. Strekowski, S. Barbati, D. Vione. Environmental Implications of Hydroxyl Radicals ( $\bullet\text{OH}$ ). *Chem. Rev.* 2015; 115: p.13051-13092;
47. E. C. Wert, F. L. Rosario-Ortiz, S. A. Snyder. Using Ultraviolet Absorbance and color to assess pharmaceutical oxidation during ozonation of wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 2009; 43: p.4858-4863;
48. E. Borowska, M. Bourgin, J. Hollender, C. Kienle, C. S. McArdell, U. von Gunten. Oxidation of cetirizine, fexofenadine and hydrochlorothiazide during ozonation: Kinetics and formation of transformation products. *Water Research.* 2016; 94: p.350-362;
49. D. Gerrity, S. Gamage, J. C. Holady, D. B. Mawhinney, O. Quiñones, R. A. Trenholm, S. A. Snyder. Pilot-scale evaluation of ozone and biological activated carbon for trace organic contaminant mitigation and disinfection. *Water Research.* 2011; 45: p.2155-2165;
50. E. J. Rosenfeldt, K. G. Linden, S. Canonica, U. von Gunten. Comparison of the efficiency of  $\bullet\text{OH}$  radical formation during ozonation and the advanced oxidation processes  $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$ . *Water Research.* 2006; 40: p.3695-3704;

51. M. Sillanpää, M. C. Ncibi, A. Matilainen. Advanced oxidation processes for the removal of natural organic matter from drinking water sources: A comprehensive review. *J. of Environ. Manage.* 2018; 208: p.56-76;
52. F. Ganji, S. V. Farahani, E. V. Farahani. Theoretical Description of Hydrogel Selling: A Review. *Iranian Polymer Journal.* 2010; 19: p.375-398;
53. M. Dilaver. Preparation and characterization of carboxymethylcellulose based hydrogels. Dokuz Eylul University (Thesis). 2011; p. 62;
54. E. Caló, V. Vitaliy, V. Khutoryanskiy. Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *Eur. Polym. J.* 2015; 65: p.252-267;
55. S. K. H. Gulrez, S. Al-Assaf, G. O Phillips. Hydrogels: Methods of preparation, characterisation and applications. *INTECH.* 2011; 5: p.117-150;
56. M. R. Singh, S. Patel, D. Singh. Natural polymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering. *Nanobiomaterials in soft tissue engineering.* 2016; 5: ch. 9, p.231-260;
57. M. F. Akhtar, M. Hanif, N. M. Ranjha. Methods of synthesis of hydrogels ...A review. *Saudi Pharm. J.* 2016; 24: p.554-559;
58. S. Khan, A. Ullah, K. Ullah, N. Rehman. Insight into hydrogels. *Designed monomers and polymers.* 2016; 19: p.456-478;
59. P. Dubin, R. J. Stewart. Complex coacervation. *Roy. Soc. Ch.* 2018; 14: p.329-330;
60. S. Vieira, A. S. Morais, J. S. Crréia, J. M. Oliveira, R. L. Reis. Natural-Based Hydrogels: From Processing to Applications. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology.* 2017; (<https://doi.org/10.1002/0471440264.pst652>)
61. K. M. Vårum, O. Smidsrød, Chitosans. Food Polysaccharides and their Applications. 2<sup>nd</sup> ed.; ch. 14; 2006;
62. D. Elieh-Ali-Komi, M. R. Hamblin. Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. *International Journal of Advanced Research.* 2016; 4: p.411-427;
63. M. Rinaudo. Chitin and Chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* 2006; 31: p.603-632;
64. P. K. Dutta, M. N. V. Ravikumar, J. Dutta. Chitin and Chitosan for versatile applications. *J. Macromol. Sci. C.* 2002; C42: p.307-354;
65. M.N. V. Ravikumar, R. A. A. Muzzarelli, C. Muzzarelli, H. Sashiwa, A. J. Domb. Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chem. Ver.* 2004; 104: p.6017-6048;
66. P. K. Dutta, J. Dutta, V. S. Tripathi. Chitin and Chitosan: Chemistry, properties and applications. *J. Sci. Ind. Res.* 2004; 63: p.2031;
67. T. Yoshimura, K. Sengoku, R. Fujioka. Pectin-based superabsorbent hydrogels crosslinked by some chemicals: synthesis and characterization. *Polymer Bulletin.* 2005; 55: p.123-129;
68. C. M. C. Filho, P. V. A. Bueno, A. F. Y. Matsushita, A. F. Rubira, E. C. Muniz, L. Duares, D. M. B. Murtinho, A. J. M. Valente. Synthesis, characterization and sorption studies of aromatic compounds by hydrogels of chitosan blended with  $\beta$ -cyclodextrin- and PVA- functionalized pectin. *RSC Adv.* 2018; 8: p.14609-14622;
69. M. A. Masuelli. Mark-Houwink Parameters for Aqueous-Soluble Polymers and Biopolymers at Various Temperatures. *Journal of Polymer and Biopolymer Physics Chemistry.* 2014; 2: p.37-43;

70. G. Balayiannis, H. Karasali. Rapid Determination of Famoxadone and Cymoxanil in Commercial Pesticide Formulation by High Performance Liquid Chromatography Using a C18 Monolithic Rod Column. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2014; 93: p.775-780;
71. European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of cymoxanil, EFSA Scientific Report. 2008; 167: p.1-116;
72. M. Belhachemi, F. Addoun. Comparative adsorption isotherms and modelling of methylene blue onto activated carbons. *Appl. Water Sci.* 2011; 1: p.111-117;
73. D. D. Do. Adsorption analysis: Equilibris and kinetics. *Series on Chemical Engineering.* 1998; 2: ch. 2; p.913;
74. K. Y. Foo, B. H. Hameed. Insight into the modelling of adsorption isotherm systems. *Chem. Eng. J.* 2010; 156: p.2-10;
75. A. K. Agarwal, C. Pandhurnekar, I. Methreja. Brunauer-Emmett-Teller (B.E.T.), Langmuir and Freundlich Isotherm Studies for the adsorption of Nickel ions onto Coal Fly Ash. *Asian Journal of Water, Environment and Pollution.* 2016; 13: p.49-53;
76. R. M. Silverstein, F. X. Webster, D. J. Kiemle. Spectroscopyc identification of Organic Compounds, 7<sup>th</sup> ed; 2015; ch. 2; p.72;
77. F. Bigucci, B. Luppi, T. Cerchiara, M. Sorrenti, G. Bettinetti, L. Rodriguez, V. Zecchi. Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: Selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin. *European Journal of pharmaceutical sciences.* 2008; 35: p.435-441;
78. A. Synytsya, J. Čopíková, P. Matějka, V. Machovič. Fourier transform Raman and infrared spectroscopy of pectins. *Carbohydr. Polym.* 2003; 54: p.97-106;
79. M. Szymanska-Chargot, A. Zdunck. Use of FT-IR Spectra and PCA to the Bulk Characterization of Cell Wall Residues of Fruits and Vegetables Along a Fraction Process. *Food Biophysics.* 2013; 8: p.29-42;
80. M. M. Yallapu, M. Jaggi, S. C. Chauhan.  $\beta$ -Cyclodextrin-curcumin self-assembly enhances curcumin delivery in prostate cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2010; 79: p.113-125;
81. V. S. Ghorpade, A. V. Yadav, R. J. Dias. Citric acid crosslinked  $\beta$ -Cyclodextrin/carboxymethylcellulose hydrogel films for controlled delivery of poorly soluble drugs. *Carbohydr. Polymer.* 2017; 164: p.339-348;
82. H. J. Schneider, F. Hacket, V. Rüdiger. NMR Studies of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes. *Chem. Rev.* 1998; 98: p.1755-1785;
83. R. Zhao, C. Sandström, H. Zhang, T. Tan. NMR Study on the Inclusion Complexes of  $\beta$ -Cyclodextrin with Isoflavones. *Molecules.* 2016; 21: p.372-383;
84. F. B. T. Pessine, A. Calderini, G. L. Alexandrino. Review: Cyclodextrin Inclusion Complexes Probed by NMR Techniques. *InTech;* 2012; 12: p.237-265;
85. A. Björn, P. Segura de La Monja, A. Karlsson, J. Ejlertsson, B. H. Svensson. Rheological Characterization. *InTech.* 2012; ch. 3: p.63-77;
86. C. A. R. Barragán, E. R. M. Balleza, L. G. Uriostegui, J. A. A. Ortega, G. Toríz, E. Delgado. Rheological characterization of new thermosensitive hydrogels formed by chitosan, glycerophosphat, and phosphorylated  $\beta$ -cyclodextrin. *Carbohydr. Polym.* 2018; p.26; (<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.076>)
87. F. M. Carbinatto, A. D. de Castro, B. S. F. Cury, A. Magalhães, R. C. Evangelista. Physical properties of pectin-high amylose starch mixtures cross-linked with sodium trimetaphosphate. *Int. J. Pharm.* 2012; 423: p.281-288;

88. D. Khondkar, R. F. Tester, N. Hudson, J. Karkalas, J. Morrow. Rheological behaviour of uncross-linked and cross-linked gelatinised waxy maize starch with pectin gels. *Food Hydrocolloids*. 2007; 21: p.1296-1301;
89. H. Moussout, H. Ahlafi, M. Aazza, M. Bourakhouadar. Kinetics and mechanism of the thermal degradation of biopolymers chitin and chitosan using thermogravimetric analysis. *Polymer Degradation and Stability*. 2016; 130: p.1-9;
90. L. Zhang, Y. Jin, H. Liu, Y. Du. Structure and control release of Chitosan/Carboxymethyl cellulose Microcapsules. *J. Appl. Polym. Sci.* 2001; 82: p.584-592;
91. F. Bigucci, B. Luppi, T. Cerchiara, M. Sorrenti, G. Bettinetti. L. Rodriguez, V. Zecchi. Chitosan/Pectin polyelectrolyte complexes: Selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery vancomycin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008; 35: p.435-441;
92. P. Coimbra, P. Ferreira, H. C. de Sousa, P. Batista, M. A. Rodrigues, I. J. Correia, M. H. Gil. Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2011; 48: p.112-118;
93. D. Gallart-Mateu, S. Armenta, M. de la Guardia. Implementing the contamination prevention programs in the pesticide industry by infrared spectroscopy. *Talanta*. 2014; 119: p.312-319;
94. M. U. Minhas, M. Ahmad, J. Anwar, S. Khan. Synthesis and Characterization of Biodegradable Hydrogels for Oral Delivery of 5-Fluorouracil Targeted to Colon: Screening with Preliminary In Vivo Studies. *Ad. Polym. Tech.* 2018; 37: p.1-9;
95. A. Rachini, M. Le Troedec, C. Peyratout, A. Smith. Comparison of the Thermal Degradation of Natural Alkali-Treated and Silane-Treated Hemp Fibers Under Air and an Inert Atmosphere. *J. Appl. Polym. Sci.* 2009; 112: p.226-234;
96. I. Corazzari, R. Nisticò, F. Turci, M. G. Faga, F. Franzoso, S. Tabasso, G. Magnacca. Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity. *Polym. Degrad. Stabil.* 2015; 112: p.1-9;