



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

RAFAEL DE OLIVEIRA PEDRO

Síntese de Novos Derivados de Quitosana para Aplicação
Como Biofungicida Contra os Fungos *Aspergillus flavus* e
Aspergillus parasiticus

São José do Rio Preto

2013

RAFAEL DE OLIVEIRA PEDRO

**Síntese de Novos Derivados de Quitosana para Aplicação
Como Biofungicida Contra os Fungos *Aspergillus flavus* e
*Aspergillus parasiticus***

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Química, área de Química Ambiental, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^a Dr^a Vera Aparecida de Oliveira Tiera.

São José do Rio Preto

2013

Pedro, Rafael de Oliveira.

Síntese de novos derivados de quitosana para aplicação como biofungicida contra os fungos *aspergillus flavus* e *aspergillus parasiticus*/ Rafael de Oliveira Pedro. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2012.

93 f. : 35 il. ; 30 cm.

Orientador: Vera Aparecida de Oliveira Tiera

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Quitosana. 2. Biofungicida. 3. Aspergillus. I. Tiera, Vera Aparecida de Oliveira. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 582.28

RAFAEL DE OLIVEIRA PEDRO

**Síntese de Novos Derivados de Quitosana para Aplicação
Como Biofungicida Contra os Fungos *Aspergillus flavus* e
*Aspergillus parasiticus***

Dissertação apresentada para obtenção
do título de Mestre em Química, área de
Química Ambiental junto ao Programa de
Pós-Graduação em Química do Instituto
de Biociências, Letras e Ciências Exatas
da Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Campus de São José
do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Vera Aparecida de Oliveira Tiera
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Éder Tadeu Gomes Cavalheiro
USP – São Carlos

Prof. Dr. Marcelo de Freitas Lima
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
18 de Janeiro de 2013

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Anísio e Cleide, as minhas irmãs Patrícia e Larissa, pelo incentivo constante e pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me oferecer a oportunidade de viver e evoluir a cada dia.

À minha família pela confiança, apoio e carinho oferecidos em todo momento de minha vida.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Vera Tiera, pela paciência, disponibilidade, incentivo e, acima de tudo, pelos conhecimentos compartilhados desde o estágio básico até agora nesse trabalho de mestrado.

À minha namorada, Hellen, por todo carinho, paciência, compreensão, ajuda e apoio.

À professora e co-orientadora Teresa Gorayeb por todos os momentos de sabedoria, trabalho, dedicação e, acima de tudo, envolvimento.

A todos os profissionais do Departamento de Química e Ciências Ambientais, em especial ao Claudinei e Daniela.

A todos os meus amigos, especialmente ao Wanderson Tenório, Mirelle Takaki, Juliana Gabriel, Amanda Dias e Ricchard Hallan.

Ao Prof^o Dr^o Márcio Tiera pela colaboração, incentivo, apoio, conversas e discussões engrandecedoras.

Ao Scott pela paciência e fidelidade.

Aos meus colegas de laboratório, sem os quais esse trabalho teria sido muito menos prazeroso.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a execução desse trabalho.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

Os fungos do gênero *Aspergillus*, presentes em amendoins, milho, arroz, nozes e outros grãos, são uma constante preocupação nos dias atuais devido a sua capacidade de produzir toxinas cancerígenas. Dentre as várias técnicas de controle desse microrganismo, tem se destacado o uso de produtos naturais, não agressivos ao meio ambiente e de baixo custo, como por exemplo, a quitosana. O presente trabalho apresenta a síntese e caracterização de duas séries de novos derivados de quitosana para utilização como biofungicida contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. A primeira série descreve a síntese de derivados de quitosana pela reação de quitosana desacetilada (QD) com brometo de propil (Q-Propil) pentil (Q-Pentil) trimetilamônio para obter derivados com proporções crescentes do grau de substituição (GS). A segunda série foi obtida a partir da síntese de sais bi-quaternários de amônio, com a posterior reação com quitosana desacetilada obtendo-se derivados bi-quaternários de quitosana. Todos os derivados foram caracterizados por técnicas de RMN¹H, infra-vermelho (IR) e titulação potenciométrica e as suas atividades fungicidas testadas contra o crescimento micelial dos fungos *A. flavus* e *A. parasiticus in vitro*. Os estudos foram conduzidos variando-se a acidez e a força iônica do meio. Os resultados dos ensaios microbiológicos mostram que as atividades antifúngicas aumentam com o grau de substituição e os derivados mais substituídos de ambas as series, propil e pentil, exibiram respectivamente atividades três e seis vezes maiores que as quitosanas comercial e desacetilada. As concentrações inibitórias mínimas foram avaliadas após 24, 48 e 72 horas, variando-se a concentração dos polímeros de 0,5 a 16 g L⁻¹ e os resultados mostraram que os derivados quaternários inibem o crescimento do fungo em concentrações quatro vezes menores que quitosana desacetilada. Os derivados bi-quaternários (Q-BPHD) mostraram a mesma tendência, ou seja, atividades maiores que quitosana desacetilada e ligeiramente maiores que aquelas obtidas com as séries propil e pentiltrimetilamônio.

Palavras-chave: Quitosana, derivados de quitosana, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, aflatoxina, biofungicida.

ABSTRACT

The fungi of the genus **Aspergillus**, present in peanuts, corn, rice, nuts and other grains, are a constant concern nowadays due to its ability to produce carcinogenic toxins. Among the various techniques for controlling this microorganism it has been emphasized the use of natural products not harmful to the environment and at a low cost, for example, chitosan. This paper presents the synthesis and the characterization of two series of novel derivatives of chitosan for use as biofungicide against the **Aspergillus flavus** and **Aspergillus parasiticus** fungi. The first series of derivatives was synthesized by the reaction of deacetylated chitosan (QD) propyl bromide (Q-Propil) and pentyl trimethylammonium (Q-Pentil) for obtaining derivatives with increasing degrees of substitution (GS). The second series was obtained from the synthesis of bi-quaternary salts, with subsequent reaction with deacetylated chitosan to yield bi-quaternary derivatives of chitosan (Q-BPHD). All derivatives were characterized using NMR techniques, infra-red (IR) and potentiometric titration and fungicides activities were tested against **A. flavus** and **A. parasiticus** by evaluating the mycelial growth of fungi in vitro. The studies were conducted by varying the acidity and ionic strength of the medium. The antifungal activities increase with the degree of substitution and the most substituted derivatives from both series, propyl and pentyl, respectively exhibited activities three to six times lighter than the commercial and deacetylated chitosans. The minimum inhibitory concentrations were recorded after 24, 48 and 72 hours varying the concentration of polymer from 0.5 to 16 g L⁻¹ and the results showed that the quaternary derivatives inhibit the growth of fungi in concentrations four times lower than deacetylated chitosan . The bi-quaternary derivative (Q-BPHD) showed the same trend, ie higher activities than deacetylated chitosan and slightly lighter than those obtained with the series propyl and pentyl trimethylammonium.

Lista de Figuras

Figura 1: Representação esquemática da estrutura da quitina e quitosana.....	18
Figura 2: Esquema da parede celular dos fungos <i>Aspergillus</i>	21
Figura 3: Estruturas químicas das aflatoxinas.....	24
Figura 4: Representação esquemática da estrutura reprodutiva dos fungos <i>Aspergillus</i>	25
Figura 5: Representação esquemática da enzima Na^+/K^+ -ATPase.....	27
Figura 6: a) Efeito da concorrência entre quitosana e a alta concentração de Na^+ na membrana celular. b) efeito da baixa concentração de Na^+	28
Figura 7: Esquema representativo do viscosímetro Cannon-Ubbelohde utilizado na determinação da massa molar média viscosimétrica dos polímeros.....	35
Figura 8: Procedimento para a determinação da MIC.....	39
Figura 9: Titulação potenciométrica da quitosana desacetilada.	42
Figura 10: Espectro de RMN^1H para a Quitosana desacetilada. Estrutura da quitosana e a localização dos prótons 1 e 2.	43
Figura 11: Espectros de absorção na região do infravermelho para as quitosanas comercial e desacetilada.	45
Figura 12: Reação da quitosana com os sais de brometo de alquila.	46
Figura 13: Titulação potenciométrica da quitosana substituída com 65% de pentiltrimetilamônio.	47
Figura 14: Espectros de RMN^1H para a) quitosanas substituídas com propil e b) pentil.....	49
Figura 15: Espectros de absorção na região do infravermelho para Propil, QD e QD-Propil40.	50
Figura 16: Espectros de absorção na região do infravermelho para Pretil, QD e QD-Pentil65.....	51
Figura 17: Esquema de síntese do sal bi-quaternário de amônio.	52
Figura 18: Síntese dos derivados bi-quaternários de quitosana.....	53
Figura 19: Espectros de RMN^1H para a quitosana desacetilada (QD), para o sal bi-quaternário de amônio sintetizado (BPHD) e para o derivado de quitosana (QD-BPHD).	54
Figura 20: Espectros de RMN^1H para os derivados QD-BPHD15 e QD-BPHD25. ...	55

Figura 21: Espectros de absorção na região do infravermelho para BPHD, QD e QD-BPHD15.	56
Figura 22: Curvas de η_{sp}/C versus C para obtenção da viscosidade intrínseca.	57
Figura 23: Gráfico de valores individuais dos índices de inibição dos polímeros em pH $\cong$ 5,0.....	61
Figura 24: Gráfico de valores individuais dos índices de inibição dos polímeros em pH $\cong$ 6,0.....	63
Figura 25: Gráfico de valores individuais dos índices de inibição dos polímeros em I = 250 mmol L ⁻¹	65
Figura 26: Gráfico de valores individuais dos índices de inibição dos polímeros em I = 500 mmol L ⁻¹	67
Figura 27: Variação do índice de inibição com a concentração para as diferentes condições testadas.....	70
Figura 28: Gráfico de valores individuais dos índices de inibição dos polímeros em pH $\cong$ 5,0.....	72
Figura 29: Gráfico de valores individuais dos índices de inibição dos polímeros em pH $\cong$ 6,0.....	74
Figura 30: Gráfico de valores individuais dos índices de inibição dos polímeros em I = 250 mmol L ⁻¹	76
Figura 31: Gráfico de valores individuais dos índices de inibição dos polímeros em I = 500 mmol L ⁻¹	78
Figura 32: Variação do índice de inibição com a concentração para as diferentes condições testadas.....	80
Figura 33: a) Hifa do fungo <i>A. flavus</i> saudável e b) Hifa retorcida pela ação da quitosana desacetilada.....	81
Figura 34: Comparativo entre o desenvolvimento das colônias de <i>A. parasiticus</i> em presença dos biofungicidas.	82
Figura 35: Imagem de microscopia de fluorescência para o A) <i>A. flavus</i> e B) <i>A. parasiticus</i> em presença de Q-RODAMINA.	83

Lista de Tabelas

Tabela 1: Composição química dos resíduos da indústria pesqueira.....	19
Tabela 2: Aplicações dos derivados de quitosana.....	19
Tabela 3: Reagentes utilizados no trabalho.....	30
Tabela 4: Composição dos biofungicidas.	37
Tabela 5: Estruturas e composições dos derivados quaternários de quitosana.	58
Tabela 6: Estrutura e composição dos derivados bi-quaternários de quitosana.....	59
Tabela 7: Estatísticas descritivas dos índices de inibição dos polímeros em pH $\cong$ 5,0 para o fungo <i>A. flavus</i>	60
Tabela 8: Estatísticas descritivas dos índices de inibição dos polímeros em pH $\cong$ 6,0 para o fungo <i>A. flavus</i>	62
Tabela 9: Estatísticas descritivas dos índices de inibição dos polímeros em I = 250 mmol L ⁻¹ para o fungo <i>A. flavus</i>	64
Tabela 10: Estatísticas descritivas dos índices de inibição dos polímeros em I = 500 mmol L ⁻¹ para o fungo <i>A. flavus</i>	66
Tabela 11: Determinação da MIC para o fungo <i>A. flavus</i>	68
Tabela 12: Estatísticas descritivas dos índices de inibição dos polímeros em pH $\cong$ 5,0 para o fungo <i>A. parasiticus</i>	71
Tabela 13: Estatísticas descritivas dos índices de inibição dos polímeros em pH $\cong$ 6,0 para o fungo <i>A. parasiticus</i>	73
Tabela 14: Estatísticas descritivas dos índices de inibição dos polímeros em I = 250 mmol L ⁻¹ para o fungo <i>A. parasiticus</i>	75
Tabela 15: Estatísticas descritivas dos índices de inibição dos polímeros em I = 500 mmol L ⁻¹ para o fungo <i>A. parasiticus</i>	77
Tabela 16: Determinação da MIC para o fungo <i>A. parasiticus</i>	78

Lista de Siglas e Abreviações

[η]	Viscosidade intrínseca
a	Constante de Mark-Houwink relacionada à flexibilidade do polímero
$\bar{M}_v$	Massa molar viscosimétrica média
ATR-FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier – reflectância total atenuada
BDA	Batata dextrose ágar
BPHD	<i>N</i> -(4-bromobutil)- <i>N,N,N',N',N'</i> -pentametilhexano-1,6-diamino
DETHA	6-(dimetilamino)- <i>N,N,N</i> -trimetilhexano-1-amino
FDA	<i>Food and drug administration</i>
GD	Grau de desacetilação
GS	Grau de substituição
H₁	Área do sinal de RMN ¹ H referente aos prótons anoméricos dos monômeros não substituídos
H_{1S}	Área do sinal de RMN ¹ H referente aos prótons anoméricos dos monômeros substituídos
I	Força iônica
I_{CH2}	Área do sinal de RMN ¹ H referente a CH ₂
IR	Infravermelho
IRE	Elemento interno de reflexão (<i>internal reflection element</i>)
kDa	kilodaltons
MIC	Concentração inibitória mínima
M_{NaOH}	Concentração em quantidade de matéria de NaOH,
m_{QD}	massa total de quitosana desacetilada utilizada na titulação
m_t	Massa total de quitosana utilizada na titulação

MWCO	Limite de tamanho molecular (<i>Molecular weight cut off</i>)
n_{QD}	Número de mols de unidades desacetiladas,
n_{QS}	Número de mols de unidades substituídas,
n_{VA}	Número de mols de unidades acetiladas,
n_{VD}	Número de mols de unidades desacetiladas,
Pentil	Quitosana modificada com brometo de bromopentiltrimetilamônio
Propil	Quitosana modificada com brometo de bromopropiltrimetilamônio
QD	Quitosana desacetilada
Q-RODAMINA	Quitosana marcada com sonda Rodamina
QS	Quitosana substituída
RMN¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio.
S_N2	Reação de substituição nucleofílica bimolecular
V_{NaOH}	Volume da solução de NaOH usado para neutralizar as unidades protonadas da quitosana
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Quitosana.....	17
1.2 Atividade fungicida da quitosana.....	20
1.3 Fungos do gênero <i>Aspergillus</i>	22
1.3 Efeito da força iônica na atividade fungicida	26
2. OBJETIVO GERAL	29
2.1 Objetivos específicos	29
3. METODOLOGIA.....	30
3.1 Materiais	30
3.2 Sínteses	30
3.2.1 Desacetilação da quitosana.....	30
3.2.2 Derivados quaternários de quitosana	31
3.2.3 Sais bi-quaternários de amônio	31
3.2.4 Derivados bi-quaternários de amônio e quitosana.....	32
3.3 Caracterização dos polímeros.....	32
3.3.1 Titulação potenciométrica	32
3.3.2 Espectroscopia no infravermelho.....	32
3.3.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio	34
3.4 Determinação da massa molar viscosimétrica.....	35
3.5 Preparo das soluções de quitosana com pH e força iônica controlados.....	35
3.6 Misturas de polímeros – meio de cultura (Batata dextrose ágar – BDA).....	36
3.7 Ensaios microbiológicos.....	37
3.8 Cálculo do índice de inibição do crescimento fúngico.....	38
3.9 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)	38
3.10 Tratamento estatístico.....	40
3.11 Microscopia de fluorescência confocal a laser	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 Sínteses	41
4.1.1 Desacetilação e caracterização da quitosana.....	41
4.1.2 Síntese e caracterização dos derivados quaternários de quitosana.....	45
4.1.3 Síntese e caracterização dos derivados bi-quaternários de amônio.....	51

4.1.4 Síntese e caracterização dos derivados bi-quaternários de quitosana	52
4.1.5 Determinação das massas moleculares viscosimétricas	57
4.2 Efeito biofungicida dos derivados de quitosana contra o fungo <i>Aspergillus flavus</i>	59
4.2.1 Efeito biofungicida em pH $\cong$ 5,0	60
4.2.2 Efeito biofungicida em pH $\cong$ 6,0	62
4.2.3 Efeito biofungicida em I = 250 mmol L ⁻¹ e pH $\cong$ 5,0.....	64
4.2.4 Efeito biofungicida em I = 500 mmol L ⁻¹ e pH $\cong$ 5,0.....	66
4.2.5 Concentração mínima inibitória (MIC).....	68
4.2.6 Variação do índice de inibição com a concentração para as diferentes condições testadas	69
4.3 Efeito biofungicida dos derivados de quitosana contra o fungo <i>Aspergillus parasiticus</i>	70
4.3.1 Efeito biofungicida em pH $\cong$ 5,0	71
4.3.2 Efeito biofungicida em pH $\cong$ 6,0	72
4.3.3 Efeito biofungicida em I = 250 mmol L ⁻¹ e pH $\cong$ 5,0.....	74
4.3.4 Efeito biofungicida em I = 500 mmol L ⁻¹ e pH $\cong$ 5,0	76
4.3.5 Concentração mínima inibitória (MIC).....	78
4.3.6 Variação do índice de inibição com a concentração para as diferentes condições testadas	79
4.4 Efeito da quitosana sobre o período de crescimento do fungo	80
5. CONCLUSÃO.....	84
6. DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS NO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	86
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	87
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

1. INTRODUÇÃO

1.1 Quitosana

A quitosana é um polímero obtido a partir da desacetilação da quitina, polissacarídeo de origem animal encontrado abundantemente na natureza por ser o principal constituinte do exoesqueleto de insetos e crustáceos. A quitina e a quitosana são compostas por unidades 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ em porções variáveis, na qual a quitina é composta predominantemente por grupos acetamidos enquanto que a quitosana possui predominantemente grupos amino (Figura 1) (CAMPANA e SIGNINI, 2001).

A fase cristalina da quitina é ordenada com cadeias organizadas em folhas paralelas, ocorrendo nas formas α , β e γ . Essas formas se diferenciam entre si devido à disposição relativa das extremidades redutora e não-redutora, sendo essas variações responsáveis pelas diferentes propriedades dos domínios cristalinos. Essas três estruturas polimórficas estão relacionadas a diferentes funções nos organismos. A α quitina, forma mais comum e mais estável, possui cadeias poliméricas antiparalelas, favorecendo assim as ligações hidrogênio e resultando num empacotamento denso. Devido a esse fato, a α quitina é encontrada onde é necessário maior resistência, como, por exemplo, cutículas de artrópodes (LARANJEIRA e FÁVERE, 2009).

Desse modo, o parâmetro para diferenciar a quitina da quitosana é o grau de desacetilação (GD) sendo esse determinado por meio de técnicas analíticas como a potenciometria, espectroscopia na região do infravermelho, condutímetria, ressonância magnética nuclear de hidrogênio, entre outras.

O processo de desacetilação mencionado anteriormente se baseia na hidrólise dos grupos acetamido presentes na cadeia polimérica da quitina. Essa hidrólise de amida pode ser feita tanto em meio ácido quanto básico, embora a primeira situação não seja muito usual devido à despolimerização da cadeia, decorrente do ataque ácido nas ligações glicosídicas. Desse modo, a reação de desacetilação é comumente feita por processo heterogêneo em meio alcalino. Esse procedimento de desacetilação se baseia no tratamento da quitina por soluções

concentradas de hidróxido de sódio em temperaturas altas. Muito embora esse seja um procedimento eficiente, ele também pode levar à despolimerização da cadeia. Outro fato importante a ser observado é que, nessas condições heterogêneas, os produtos finais podem apresentar variações importantes nas suas características estruturais. Assim, outros procedimentos de desacetilação têm sido propostos na literatura e se baseiam na diluição com solvente (SANNAN et al., 1976), irradiação de ultrassom e micro-ondas (CARDOSO et al., 2001), explosão de vapor (FOCHER et al., 1998) e emprego de agentes redutores (CAMPANA et al., 2002).

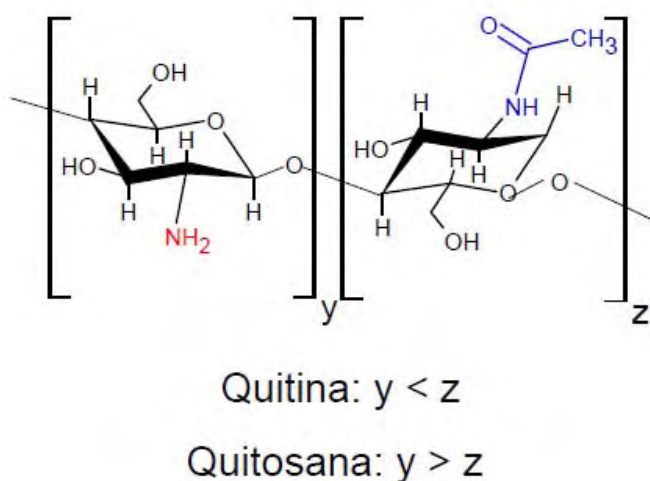


Figura 1: Representação esquemática da estrutura da quitina e quitosana.

Além de ser um polímero biodegradável e não tóxico ao meio ambiente, o emprego da quitosana está diretamente relacionado ao desenvolvimento econômico e sustentável. A quitina, precursora da quitosana, pode ser abundantemente obtida dos restos e subprodutos da indústria pesqueira, especialmente de camarões e lulas. A utilização desses subprodutos é, portanto, uma alternativa promissora, uma vez que, além de poder ser explorado economicamente, o acúmulo desses resíduos pode causar sérios problemas ao meio ambiente. A Tabela 1 mostra a porcentagem de quitina encontrada em diferentes subprodutos da indústria pesqueira.

Tabela 1: Composição química dos resíduos da indústria pesqueira, (Adaptado de Pavinatto, 2009).

Fontes	Proteínas %	Cinzas %	Lipídeos %	Quitina %
Cascas de Camarões	58,0%	24,2%	1,5%	16,4%
Carapaças de Lagostas	23,1%	33,7%	2,2%	20,2%
Resíduos de Krill	41,0%	23,0%	11,6%	24,0%
Cabeças de Camarões	42,0%	20,5%	2,4%	35,5%
Gládios de Lulas	55,3%	0,9%	0,6%	43,2%

A solubilidade da quitosana está intimamente relacionada com a força iônica, a massa molar, a concentração do biopolímero e o grau de desacetilação. Isso porque, o aumento da quantidade de grupos amino livres, passíveis de protonação ($-NH_3^+$), favorece a solubilidade do polímero em meio aquoso (VARNA et al., 2003).

Uma vez que o anel glicopiranosídeo pode sofrer um grande número de reações, os derivados resultantes podem apresentar aplicações em diferentes áreas como na quelação de íons metálicos (SUN et al., 2009), no controle do colesterol (MALHOTRA e KAUSHIK, 2009), no tratamento de efluentes (MILHOME et al., 2009), inibição de fungos (GUO et al., 2008) e bactérias (SADEGHI et al., 2008), entre outros. Outras aplicações da quitosana podem ser encontradas na Tabela 2.

Tabela 2: Aplicações dos derivados de quitosana, (Adaptado de Kumar, 2000.)

Derivados	Aplicações
N-Acil Quitosanas	Textil e membranas
N-Carboxialquil Quitosanas	Cromatografia
o-Carboxialquil Quitosanas	Peneiras moleculares, remoção de íons e cromatografia
Resinas Semissintéticas de Quitosanas	Têxtil
Derivados Quaternários de Quitosanas	Biofungicidas*

*Retirado de Oliveira Pedro et al. (2013).

Na estrutura da quitosana, dois grupos apresentam grande susceptibilidade de reagir por meio de ataques nucleofílicos: os grupos amino e/ou acetamida e os grupos hidroxila do anel. Os grupos hidroxílicos podem sofrer modificações por meio da substituição dos átomos de hidrogênio, porém sua reatividade é menor que a do grupo amino. Muitos processos, tendo como alvo os grupos hidroxílicos, empregam reações sequenciais de modo a proteger e desproteger os demais grupos visando obter derivados com estrutura bem definida (KUMAR et al., 2004). Outras reações podem também ser conduzidas com a finalidade de modificar seletivamente os

grupos amino livres, buscando alterar as propriedades da quitosana (KUMAR, 2000). Dentre essas modificações do grupo amino, tem se destacado, como mencionado anteriormente, o desenvolvimento de biofungicidas.

Trabalhos recentes na literatura demonstram que a quitosana pode ser usada para preservar ou aumentar a defesa de diferentes culturas de alimentos (ZHANG et al., 2011; JAYAKUMAR et al., 2011). É bem conhecido que os resíduos de muitos pesticidas são tóxicos para os seres humanos e animais e muitos deles não são biodegradáveis. Isso pode causar sérios problemas ambientais como a contaminação da água e do solo (SATPATHY et al., 2011). A quitosana e seus oligômeros surgiram como uma fonte promissora para muitas aplicações nessa área, uma vez que pode ser usada para produzir fungicidas biodegradáveis para regular o cultivo de plantas e para proteger as sementes (ALBURQUENQUE et al. de 2010).

1.2 Atividade fungicida da quitosana

Há muita discussão na literatura sobre o modelo mecanístico de inibição promovido pela quitosana. O principal deles se baseia na interação eletrostática do polímero, carregado positivamente, com as cargas negativas presentes na parede celular dos microrganismos (GOY et al., 2009). O segundo modelo aceito está relacionado à inibição da síntese do mRNA proveniente da ligação covalente entre a quitosana e o DNA do microrganismo (GOY et al., 2009). No entanto, a penetração do polímero pela membrana celular não tem se mostrado eficiente em fungos, dificultando desse modo à ligação com o DNA.

A parede celular dos fungos é uma organela complexa e dinâmica, responsável por proteger a célula das variações do meio, como acidez e pressão osmótica, permitir o crescimento celular, mediar a interação com o substrato, atuar com filtro de íons e proteínas e proteger o conteúdo intracelular (BOWMAN e FREE, 2006). A composição da parede celular varia de acordo com cada espécie fúngica. Nos fungos do gênero *Aspergillus* ela é constituída basicamente por glicoproteínas, β -(1,3)-glucana, β -(1,6)-glucana, galactomanana e quitina. A figura a seguir mostra a parede celular e os seus constituintes.

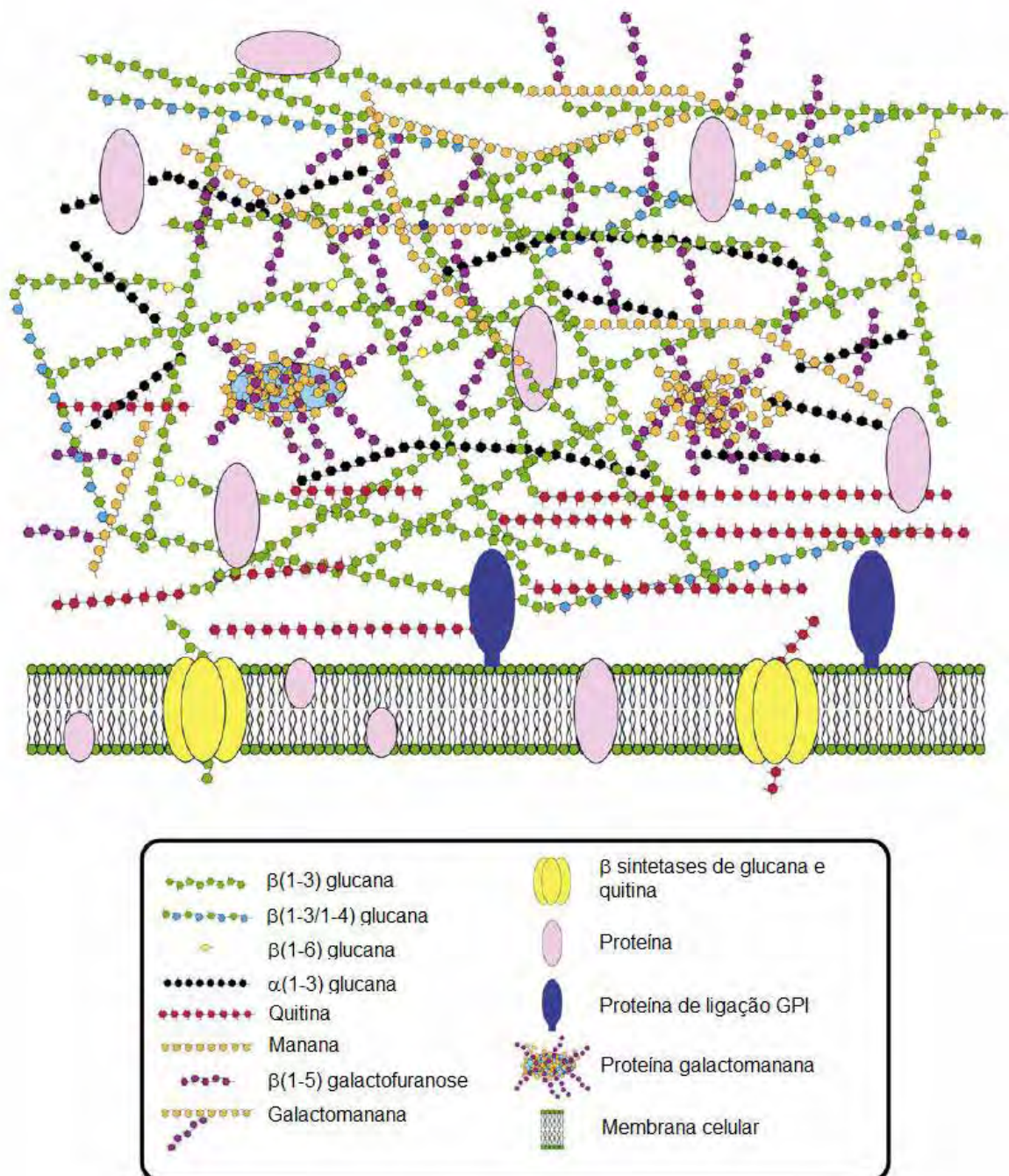


Figura 2: Esquema da parede celular dos fungos *Aspergillus*. (Adaptado de ABAD, et al., 2010)

Como é possível notar, a quitina, primeira camada sintetizada na parede celular, compõe de 10 a 20% do conteúdo externo da célula, está localizada próxima à membrana celular. A principal função desse polímero é conferir resistência mecânica a estrutura da célula. A produção de quitina se dá em dois estágios: primeiro é formada uma camada próxima à membrana e, posteriormente, uma segunda camada desse polímero é inter cruzada com açúcares da membrana

celular. A quitina pode ser degradada pela quitinase, enzima produzida por bactérias e fungos. Essa enzima é sintetizada pelo próprio *Aspergillus*, no momento da degradação da quitina, quando a célula inicia a sua reprodução e ramificação da hifa (FEOFILOVA, 2009).

Considerando que o modelo mais amplamente aceito se baseia em interações eletrostáticas, é possível presumir que quanto maior o número de cargas positivas presentes no polímero, maior será a sua atividade fungicida (GOY et al., 2009). Sendo assim, o presente trabalho visa a síntese de derivados de quitosana, com cargas positivas permanentes, para a aplicação contra fungos biológica e economicamente importantes.

1.3 Fungos do gênero *Aspergillus*

Os fungos são considerados o maior problema na produção e no consumo de grãos no mundo todo por estarem relacionados à degradação de culturas e a produção de micotoxinas. Fungos do gênero *Aspergillus* representam um grande número de fungos assexuados que podem se instalar em vários habitats (CHANG e EHRLICH, 2010). Este fungo pode ser encontrado em alimentos como leite, ovos, queijo, figo e grãos como milho, trigo, castanha, nozes, feijão, mas principalmente em amendoim contaminado (PATERSON e LIMA, 2010). Por ser um problema recorrente no amendoim, o *Aspergillus spp.* é bastante estudado nessa cultura, embora não se tenha informações objetivas e conclusivas acerca das condições que propiciam a instalação, degradação e contaminação por micotoxinas. É sabido, no entanto, que a atividade metabólica cresce com o aumento de umidade dos grãos e a partir de um determinado valor limite, denominado “umidade crítica”, esta atividade é muito acelerada, promovendo a degradação de proteínas, de carboidratos, de fosfolipídios e outros compostos, originando substâncias lipossolúveis que contaminam os grãos e o óleo, afetando a cor, o aroma e o sabor. Além disso, as enzimas lipolíticas próprias da amêndoa e dos microrganismos provocam a hidrólise dos triglicerídeos do grão degradando-os.

Durante o processo de degradação do amendoim, as espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* produzem ainda uma micotoxina denominada aflatoxina. O termo aflatoxina significa “toxina produzida pelo *A. flavus*”, uma vez que

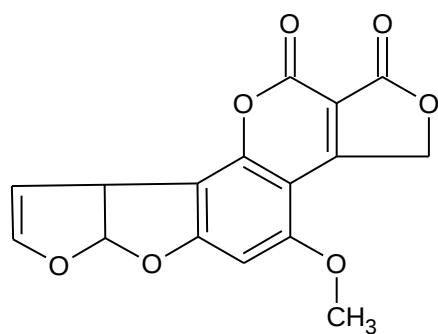
esse composto foi identificado pela primeira vez nessa espécie. Essa toxina é produzida como metabólito secundário do metabolismo desses fungos e estão entre os compostos mais cancerígenos de origem natural conhecidos. Estudos na literatura deixam claro que a ingestão de alimentos e sementes altamente contaminados com aflatoxinas pode provocar desde intoxicação aguda até a morte, dependendo da quantidade ingerida (PATERSON e LIMA, 2010).

A ocorrência das aflatoxinas é maior no amendoim devido à preferência dos fungos do gênero *Aspergillus* por esse substrato, embora essa micotoxina também seja significativamente encontrada no milho, nozes, oleaginosas, castanha-do-brasil e produtos curados contaminados por esse fungo. Essa ocorrência está diretamente relacionada com a demora na colheita, o que permite o desenvolvimento fúngico. Entretanto, sua maior incidência se dá quando o amendoim é armazenado com umidade em torno de 35% ou quando reumedece depois de ter sido seco.

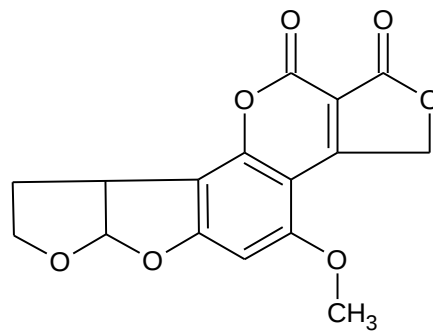
A concentração máxima de aflatoxinas considerada segura pelo *FOOD AND DRUG ADMINISTRATION* (FDA) e pelo *WORLD HEALTH ORGANIZATION* (WHO) é de 20 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$). Esses compostos são agrupados em 3 principais grupos: B, G e M, sendo que os principais tipos de aflatoxina são B_1 , B_2 , G_1 e G_2 , sendo conhecidos ainda os tipos M_1 e M_2 . A aflatoxina mais tóxica de cada grupo recebe o número 1, enquanto que a menos agressiva recebe o número 2. A aflatoxina B_1 , frequentemente encontrada em alimentos, é produzida por todas as espécies fúngicas produtoras dessas micotoxinas e é considerada a mais tóxica do grupo, apresentando o maior poder carcinogênico. A toxicidade das seis aflatoxinas segue a seguinte ordem: $B_1 > M_1 > G_1 > B_2 > M_2 = G_2$ (MICOTOXINAS, 2009). A denominação B, G e M se deve ao fato de que essas micotoxinas podem ser observadas sob luz ultravioleta (UV) fluorescendo nas colorações: B_1 e B_2 – azul, G_1 – verde, G_2 – verde-azulada, M_1 – azul-violeta e M_2 – violeta (MICOTOXINAS, 2009). As estruturas químicas das principais aflatoxinas estão dispostas na Figura 3. É possível notar que a principal diferença entre os tipos 1 e 2 de cada grupo está na presença de uma dupla ligação no anel furanóide.

O *Aspergillus flavus* pertence ao Reino Fungi, Divisão Ascomycota, classe Ascomycetes, ordem Eurotiales e família *Trichomaceae* (KIRK et al., 2008.). Esse microrganismo possui como característica o desenvolvimento de colônias esverdeadas, quando na fase inicial que se tornam acinzentadas no decorrer do

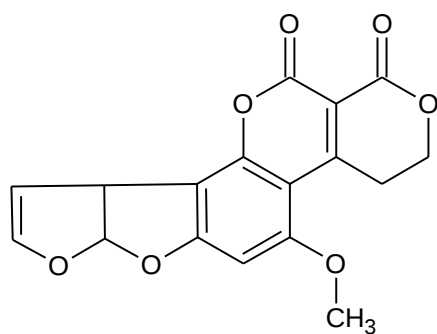
desenvolvimento da colônia (PITT e HOCKINF, 1997, apud REIS, 2009, p 9). Além disso, segundo Reis (2009), esse fungo apresenta uma maior produção de aflatoxina quando instalado em amendoim cujo crescimento se dá em solos ricos em zinco.



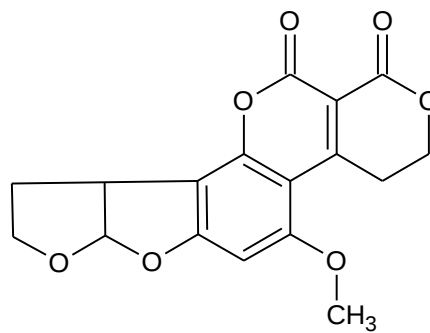
Aflatoxina - B₁



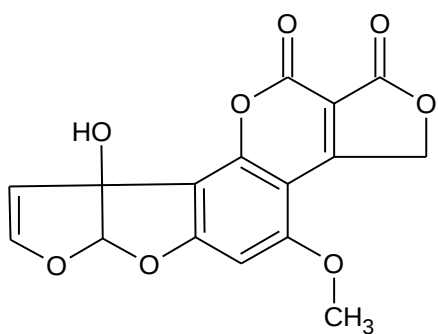
Aflatoxina - B₂



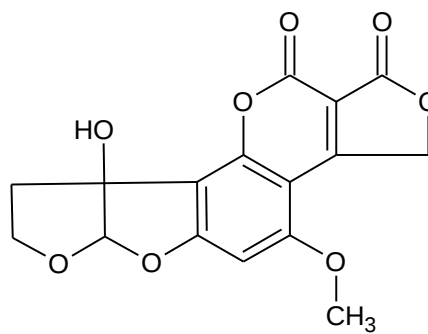
Aflatoxina - G₁



Aflatoxina - G₂



Aflatoxina - M₁



Aflatoxina - M₂

Figura 3: Estruturas químicas das aflatoxinas (MICOTOXINAS, 2009).

O *Aspergillus parasiticus* está agrupado na seção *Flavi*, assim como o *A. flavus*, além de outras variações toxicogênicas como *A. nomius*, *A. tamarii*, *A. pseudotamarii* e *A. bombycis* (KLICH e PITT 1988; CHANG et al., 2007). Além das

espécies que estão agrupadas na seção *Flavi*, outras espécies também podem produzir aflatoxinas como, por exemplo, *Aspergillus ochraceoroseus* agrupado na seção *Ochraceorosei* (CHANG et al., 2007).

Os conídios (Figura 4) são as estruturas responsáveis pela reprodução assexuada tanto em *A. flavus* quanto *A. parasiticus*, sendo originados nas extremidades dos conidióforos. As hifas, filamentos que constituem o micélio fúngico, podem produzir ramificações que dão origem aos conidióforos. As fiálides estão presentes no conidióforo e são responsáveis pela produção dos conídios.

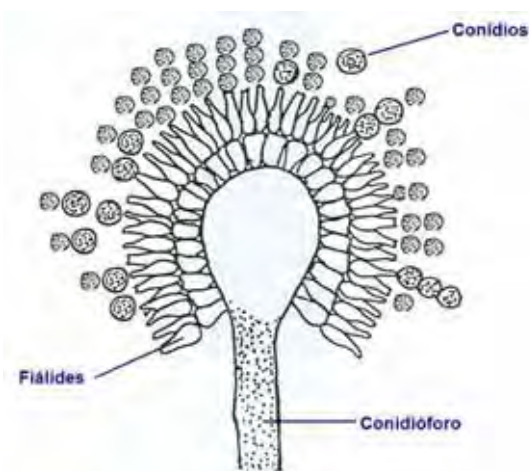


Figura 4: Representação esquemática da estrutura reprodutiva dos fungos *Aspergillus* (Adaptado de Madigan, 2009).

Estudos realizados recentemente demonstram que esses fungos estão presentes não só em alimentos, mas também em outros ambientes como hospitais. Sepahvand e colaboradores (2011) encontraram colônias de *A. flavus* no ar, em superfícies e no solo de hospitais, sendo que 45% dessas colônias produziam aflatoxinas do tipo B1. Essa é uma situação muito preocupante, porque, além de produzir compostos altamente carcinogênicos, os conídios desse fungo podem ser responsáveis ainda, segundo os pesquisadores, por reações alérgicas como rinite, asma e sinusite em pacientes debilitados.

Jabeen e colaboradores (2012) comprovaram que o fungo *A. flavus* está presente em 25% das amostras de amendoim de supermercados. Foi observado ainda que as concentrações de aflatoxinas totais variaram de 2,01 a 2,78 ppb ($\mu\text{g/kg}$) nessas amostras, abaixo, portanto, do limite estabelecido pela FDA/WHO.

Diante dessa realidade, pesquisadores cada vez mais têm buscado alternativas inovadoras de controle desses microrganismos. Produtos que não sejam agressivos ao meio ambiente e aos seres humanos, que sejam de fácil obtenção e baixo custo são altamente desejáveis. Assim como alguns extratos de plantas, a quitosana tem sido alvo de muitas pesquisas nesse campo, uma vez que ela possui propriedades de inibir a biossíntese das aflatoxinas e controlar o crescimento da colônia fúngica (PINTO et al., 2001; PAK et al., 2006; GONÇALEZ et al., 2001). Por isso, é possível vislumbrar um grande potencial de aplicação para os derivados de quitosana modificados com cargas positivas permanentes.

1.3 Efeito da força iônica (I) na atividade fungicida

A força iônica de uma solução é função da concentração de todos os íons presentes nessa solução e suas respectivas cargas, podendo ser calculada pela Equação 1:

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \quad (1)$$

onde c_i é a concentração molar do íon i (mol L^{-1}), z_i é o número de carga desse íon, sendo a soma considerada a de todos os íons na solução. Para um eletrólito 1:1 como o cloreto de sódio (NaCl), a força iônica é igual à sua concentração (SKOOG et al., 2002).

A presença de sódio tende a retirar a água das células fúngicas por osmose, diminuindo assim a disponibilidade de água para o microrganismo, o que interfere no seu desenvolvimento. Outro fator que está diretamente relacionado ao sódio é a enzima Na^+/K^+ -ATPase, também conhecida como bomba de sódio-potássio. De acordo com a Figura 5 essa enzima controla a presença de íons sódio e potássio no interior da célula.

Para que o potencial elétrico da célula seja controlado, se faz necessário uma baixa concentração de íons sódio e de uma elevada concentração de íons potássio no interior da célula. Para manter esse equilíbrio, a enzima Na^+/K^+ -ATPase bombeia

sódio para fora da célula e potássio para dentro dela por um mecanismo de Transporte Ativo (MADIGAN, 2009).

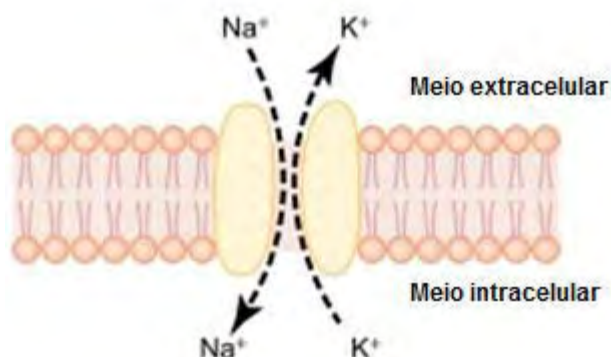


Figura 5: Representação esquemática da enzima Na⁺/K⁺-ATPase (Adaptado de Madigan, 2009).

Como mencionado anteriormente, a força iônica está diretamente relacionada com a eficiência biocida da quitosana (CHUNG et al., 2003; RAAFAT e SAHL, 2009; KONG et al., 2010). Alguns autores, como Kong et al. (2010), afirmam que os cátions, como por exemplo o íon sódio (Na⁺), em altas concentrações no meio podem diminuir o efeito fungicida da quitosana, pois íons positivos podem competir pelas cargas negativas presentes nas membranas celulares (Figura 6a). Além do efeito osmótico, outros autores afirmam que a quitosana, na presença de concentrações mais baixas de Na⁺, pode alterar as propriedades da enzima Na⁺/K⁺-ATPase, gerando um desequilíbrio na taxa de sódio e potássio no interior das células fúngicas (Figura 6b), levando assim a morte celular.

Embora os grãos de amendoim possam estar expostos à concentração de íons presentes no solo, o armazenamento também pode ser influenciado por essas condições, isso porque, uma quantidade significativa de solo pode ser transportada e armazenada juntamente com os grãos. Estudos apontam que a força iônica de solos brasileiros podem variar de 0,071 a 3000 mmol L⁻¹ (OLIVEIRA, et al., 2011), sendo a faixa de 50 a 500 mmol L⁻¹ a mais encontrada. Desse modo, no presente trabalho, foram escolhidas as forças iônicas de 250 e 500 mmol L⁻¹, objetivando a melhor compreensão do sistema em estudo.

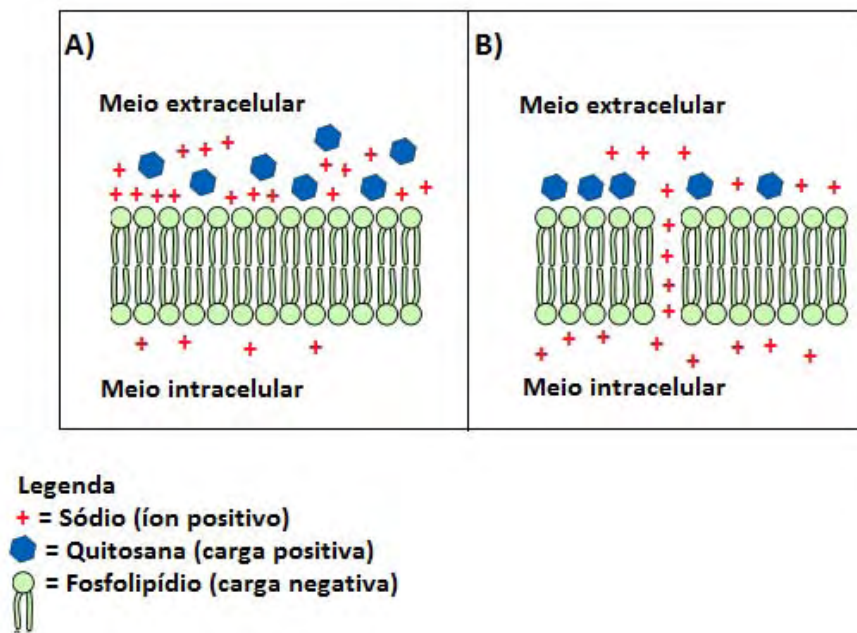


Figura 6: a) Efeito da concorrência entre quitosana e a alta concentração de Na^+ na membrana celular. b) efeito da baixa concentração de Na^+ (Adaptado de Madigan, 2009).

Uma vez que ainda existem muitas dúvidas sobre o efeito da combinação de quitosana e força iônica, esse trabalho propôs um estudo mais aprofundado do comportamento do fungo *A. flavus* e *A. parasiticus* nessas condições.

Assim, esse trabalho visa relatar um método simples e confiável para preparar derivados de quitosana, carregados com cargas positivas permanentes, com destacado potencial de inibição do crescimento dos fungos *A. flavus* e *A. parasiticus*. A síntese, caracterização e atividade antifúngica dos derivados de quitosana contra o fungo *A. flavus* são descritas, tendo sido baseadas nos pressupostos da química verde.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho foi a preparação de derivados quaternários e bi-quaternários de quitosana, solúveis em água, visando a sua aplicação como biofungicidas contra os fungos *A. flavus* e *A. parasiticus*.

2.1 Objetivos específicos

- ✓ Estudar o efeito da composição dos derivados de quitosana na eficiência como biofungicida contra *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*;
- ✓ Estudar o efeito da concentração dos polímeros na inibição do crescimento fúngico;
- ✓ Estudar o efeito da variação da acidez no crescimento fúngico;
- ✓ Estudar o efeito da variação da força iônica, por adição de cloreto de sódio no crescimento fúngico;

3. METODOLOGIA

3.1 Materiais

Os reagentes empregados no trabalho, bem como a sua forma molecular e procedência estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3: Reagentes utilizados no trabalho.

Nome	Grau de Pureza	Procedência
Ácido acético	98,0%	Synth
Batata dextrose agar – BDA	99,2%	Acumedia Manuf., Inc. Lansing
Brometo de pentiltrimetilamônio	99,5%	Aldrich Chemical Co
Brometo de propiltrimetilamônio	99,5%	Aldrich Chemical Co
Cloreto de deutério	99,8%	Aldrich Chemical Co
Cloreto de sódio	99,1%	Synth
Hidróxido de sódio	98,7%	Dinâmica
Iodeto de metila	99,3%	Dinâmica
Metanol	99,0%	Synth
Quitosana	98,6%	Polymar Ind. Com. Exp. Ltda
Tween® 80	99,4%	Synth

A água utilizada na preparação dos experimentos foi deionizada em um sistema purificador de água da Gehaka modelo DG.

3.2 Sínteses

3.2.1 Desacetilação da quitosana

Para a desacetilação da quitosana comercial, 8 g do polímero foram dispersos em 500 mL de água. Em seguida, foram adicionados 10 mL de ácido acético, sendo a solução mantida em agitação durante 12 horas para a solubilização completa da quitosana. Posteriormente foram adicionados lentamente 200 mL de solução de NaOH 50% para se obter uma suspensão finamente dividida. A nova suspensão foi aquecida à temperatura de 100 a 105 °C por 90 minutos sob atmosfera de nitrogênio em refluxo. Decorrido o tempo, a suspensão foi transferida para um béquer contendo 4 litros de água deionizada a 80 °C sob agitação. O precipitado obtido foi decantado,

lavado por 10 vezes com água deionizada e isolado por filtração a vácuo. Após a última filtragem, a quitosana foi lavada com acetona e seca em estufa a temperatura 40°C por 72h.

3.2.2 Derivados quaternários de quitosana

Os derivados quaternários de quitosana foram sintetizados e caracterizados em trabalho prévio (PEDRO et al., 2013). Para tanto, uma massa de aproximadamente 1,5 g de quitosana previamente desacetilada foi dispersa em 20 mL de água. O pH desta dispersão foi então ajustado para 8, sendo a dispersão mantida sob agitação por 2 horas. Após este tempo, diferentes massas de brometo de bromo-propiltrimetilamônio (Propil) ou brometo de bromo-pentiltrimetilamônio (Pentil) foram adicionados à solução e o pH foi mantido na faixa de 7,5 - 8,0. A mistura foi então agitada por 72 horas a 55 °C. O pH da solução foi monitorado constantemente a fim de mantê-lo próximo de 8,0. Ao término da reação a solução foi dialisada utilizando-se membrana de diálise (MWCO 6-8 kDA), contra água deionizada por 5 dias. O produto foi então recuperado por liofilização e caracterizado por RMN¹H e titulação potenciométrica.

3.2.3 Sais bi-quaternários de amônio

A primeira etapa da síntese para obtenção dos sais bi-quaternários de amônio foi realizada pela reação de *N,N,N',N'*-tetrametil-1,6-hexanodiamina em excesso com iodeto de metila, visando a quaternização de somente uma das extremidades da diamina. Para tanto, um volume de 20 mL de metanol foi adicionado num balão de fundo redondo, sendo posteriormente adicionado 10 mL de *N,N,N',N'*-tetrametil-1,6-hexanodiamina e 2 mL de iodeto de metila. Essa mistura ficou em agitação por 4 horas a 50°C sob refluxo. O precipitado obtido foi separado da fase líquida e seco em estufa a 35°C.

Na segunda etapa da reação, três gramas do sal 6-(dimetilamino)-*N,N,N'*-trimetilhexano-1-amino (DETHA), obtido na etapa precedente, foram dispersos em 20 mL de metanol e 2,9 mL de 1,6-dibromohexano num balão de fundo redondo. Essa mistura ficou em agitação, a 50°C por 48 horas. Decorrido esse período, 5 mL

de água foram adicionados à mistura visando a migração do sal sintetizado para a fase aquosa, a qual foi recuperada por centrifugação. Após o procedimento de rotaevaporação para a eliminação do metanol, a solução aquosa foi congelada e o sal *N*-(4-bromobutil)-*N,N,N',N',N'*-pentametilhexano-1,6-diamino (BPHD) recuperado por liofilização.

3.2.4 Derivados bi-quaternários de amônio e quitosana

Uma massa de aproximadamente 1,5 g de quitosana desacetilada foi dispersa em 20 mL de água e o pH desta dispersão foi então ajustado para 8,5. Após 2 horas em agitação, diferentes massas do sal bi-quaternário de amônio foram adicionados a solução e o pH mantido em 8,5. A mistura foi então agitada por 72 horas a 55 °C. O pH da solução foi monitorado constantemente a fim de manter próximo de 8,5. Ao término da reação a solução foi dialisada utilizando-se membrana de diálise (MWCO 6-8 kDA), contra água deionizada por 5 dias. O produto foi então recuperado por liofilização e caracterizado por RMN¹H.

3.3 Caracterização dos polímeros

3.3.1 Titulação potenciométrica

A determinação do grau de desacetilação utilizando-se potenciometria foi feita segundo o método de Tolaimate (2000). Nesse método, uma massa 40 mg de quitosana foi previamente seca na estufa a 50°C até atingir valor constante, sendo posteriormente dissolvida em 10 mL de ácido clorídrico padronizado. A solução resultante foi titulada com solução de hidróxido de sódio padronizado. O pH foi monitorado utilizando-se um pHmetro Analion modelo PM 608 e um eletrodo combinado de vidro.

3.3.2 Espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia, cujo principal objetivo é o estudo dos níveis de energia de átomos ou moléculas, estuda a interação da radiação eletromagnética com a

Matéria. As transições eletrônicas são situadas na região do ultravioleta ou visível, enquanto que as transições vibracionais estão na região do infravermelho e as rotacionais na região de microondas.

A absorção da radiação infravermelha ocorre quando há variação do momento de dipolo elétrico da molécula (magnitude da diferença de carga e a distância entre dois centros de cargas) em consequência de seu movimento vibracional ou rotacional. Nessa situação, o campo elétrico alternante da radiação incidente interage com a molécula, originando os espectros.

A região do espectro no infravermelho mais comumente utilizada para a análise de estruturas químicas está compreendida entre 2,5 e 25 μm (4000 a 400 cm^{-1}), conhecida como região fundamental ou infravermelho médio.

A espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é uma das técnicas mais utilizadas para análise de moléculas químicas, uma vez que espectrofotômetros FTIR são mais baratos e simples de operar do que aqueles constituídos por monocromadores. Nessa técnica, ao invés de se coletar os dados variando-se a frequência de uma luz infravermelha monocromática, a luz infravermelha é guiada através de um interferômetro, passando pela amostra, sendo obtido um sinal dito interferograma. Apesar de o interferograma conter toda a informação fornecida pelo espectrômetro sob um dado conjunto de condições, a forma com que essa informação se apresenta não é muito útil para a análise. Sendo assim, essa informação é convertida em espectro, relacionando-se as intensidades com as respectivas frequências, através da transformada de Fourier. Além da melhor precisão e exatidão em termos de comprimento de onda, o FTIR apresenta ainda como vantagem o fato de que todo o espectro é obtido de uma só vez, economizando tempo.

A espectroscopia de Reflexão Interna ou Refletância Total Atenuada (ATR) é uma técnica muito utilizada para se obter espectros no infravermelho de amostras sólidas. Nessa técnica um feixe de radiação passa de um meio mais denso (cristal de ATR) para um meio menos denso (amostra), ocorrendo reflexão. A radiação que penetra a amostra é dita onda evanescente. Quando a amostra absorve um determinado comprimento de onda evanescente, há uma atenuação do feixe a comprimentos de onda correspondentes às bandas de absorção no infravermelho, originando desse modo o espectro.

Nesse estudo, amostras sólidas dos polímeros e dos derivados de quitosana foram caracterizadas por ATR-FTIR com diamante como elemento interno de reflexão (IRE). Para eliminação total da umidade aproximadamente 2,5 mg dos polímeros foram secos em estufa a 60° C por 24 horas. Decorrido esse período, os espectros de infravermelho (IR) foram obtidos num espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum 100, no Laboratório de Sucroquímica e Química Analítica do Departamento de Química e Ciências Ambientais desta Instituição (Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da UNESP/ São José do Rio Preto – SP).

3.3.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio é uma técnica analítica que possibilita a obtenção de informações estruturais sobre a matéria, baseando-se na detecção das propriedades magnéticas dos núcleos de determinados átomos. Os núcleos atômicos se comportam como peões com carga, uma vez que rodopiam em torno do seu próprio eixo, gerando um campo magnético. Por isso, quando se incide ondas de rádio-frequência sobre uma amostra que contem isótopos com spin nuclear maior que zero (por exemplo ¹H) na presença de um campo magnético, obtém-se a ressonância magnética.

A maior parte dos núcleos atômicos se comportam como magnetos, ou seja, produtores de campo eletromagnético. Normalmente esses núcleos estão dispostos de forma aleatória, mas se colocados sob a influência de um campo magnético externo adequado, alinham-se em orientações específicas, as quais se caracterizam por terem diferentes níveis energéticos. Quando a amostra é exposta à radiação na frequência de rádio, os núcleos atômicos recebem energia suficiente para mudar de orientação. Quando retornam a orientação original, tais núcleos liberam radiação característica. Uma vez que esse fenômeno é designado por ressonância magnética nuclear, nomeia-se assim a técnica (ABRAHAM, FISHER, e LOFTUS, 1999).

Aproximadamente 20 mg das amostras de quitosana foram adicionadas a 1 µL de água deuterada contendo 10 µL de cloreto de deutério. As dispersões foram agitadas até a solubilização completa. Os espectros de RMN¹H foram obtidos na

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP utilizando-se um espectrômetro Bruker de 500 MHz a temperatura de 70° C.

3.4 Determinação da massa molar viscosimétrica

As medidas de viscosidade foram realizadas em um viscosímetro calibrado modelo Cannon-Ubbelohde 9722M-50 (Cannon Instr. Co.) imerso em banho de água termostatizado. Os polímeros foram solubilizados em tampão ácido acético (0,3 mol L⁻¹)/acetato de sódio (0,2 mol L⁻¹), pH 4,5 e temperatura de 25 °C. Antes da realização das medidas, as amostras ficaram 10 minutos no banho para o equilíbrio da temperatura. Posteriormente, foram medidos os tempos de escoamento entre os meniscos C e D da Figura 7. As medidas foram feitas em triplicata e as viscosidades intrínsecas $[\eta]$ calculadas pela equação de Mark-Houwink (Equação 2)

$$[\eta] = K_m M_v^a \quad (2)$$

Onde $a = 0,796$ e $K_m = 0,079 \text{ mL g}^{-1}$ (ROBERTS e WANG, 1996).

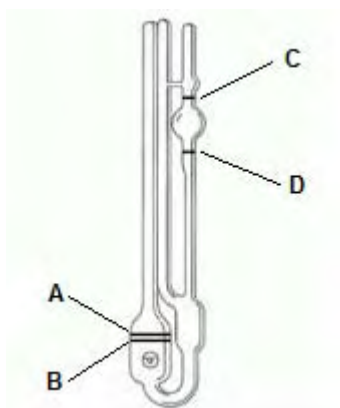


Figura 7: Esquema representativo do viscosímetro Cannon-Ubbelohde utilizado na determinação da massa molar média viscosimétrica dos polímeros (AKCELRUD, 2007).

3.5 Preparo das soluções de quitosana com pH e força iônica (NaCl) controlados

Soluções estoque de quitosana foram preparadas pela solubilização de 0,4 g de quitosana em 200 mL de solução de ácido acético 1% (v/v), sendo, portanto, obtido uma solução final com concentração de 2 g L⁻¹. A solução foi mantida refrigerada a 4°C. Para os ensaios microbiológicos, alíquotas da solução estoque

foram diluídas para concentrações desejadas, sendo o pH ajustado com adições de solução de hidróxido de sódio a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e a força iônica foi corrigida com adições de cloreto de sódio (NaCl). Os pHs utilizados nos experimentos foram de aproximadamente 5,0 e aproximadamente 6,0, enquanto que as forças iônicas foram de 250 mmol L^{-1} e 500 mmol L^{-1} .

Muitos trabalhos encontrados na literatura demonstram que esses valores de pH e força iônica empregados são os que mais se aproximam das condições naturais de crescimento fúngico (STÖSSEL e LEUBA, 1984; EL GHAOUTH et al, 1992). Objetivando a confirmação das faixas ideais de pH a serem estudadas, foi realizado um experimento na qual foram testados os pHs 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 e 7,0 na presença de quitosana comercial $0,5 \text{ g L}^{-1}$. Esses resultados apontaram que o desenvolvimento fúngico é bastante prejudicado em pHs abaixo de 4,5 e acima de 6,0, confirmando assim os dados da literatura. É importante salientar que esses são valores aproximados de pH.

A força iônica foi testada em termos de cloreto de sódio por dois motivos distintos. Primeiramente porque os íons sódio estão diretamente envolvidos no metabolismo celular, mais especificamente, no funcionamento da enzima Na^+/K^+ -ATPase, sendo, portanto, fundamental a análise da influência da concentração desses cátions na inibição fúngica, quando na presença de biofungicidas. Além disso, tanto os íons sódio, quanto íons cloreto, estão presentes em quantidades apreciáveis nos solos brasileiros (OLIVEIRA, et al., 2011), sendo esse estudo fundamental para futuras aplicações *in situ*.

3.6 Misturas de polímeros – meio de cultura (Batata dextrose ágar – BDA)

As soluções do meio de cultura (BDA) foram preparadas em erlenmeyers por meio da adição de 3,9 g de BDA em 50 mL de água deionizada. Em seguida, as soluções de quitosana previamente preparadas de acordo com o item 3.5, foram incorporadas ao BDA para a obtenção da concentração final de $0,1$ e $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de quitosana. Todos os erlenmeyers foram esterilizados em autoclave à 121°C por 20 minutos. As composições das misturas estão dispostas na Tabela 4.

Tabela 4: Composição dos biofungicidas.

Biofungicida	Polímero	Grau de substituição	Concentração (g L ⁻¹)
QC-0,1	Quitosana Comercial	-	0,1
QC-0,5	Quitosana Comercial	-	0,5
QD-0,1	Quitosana Desacetilada	-	0,1
QD-0,5	Quitosana Desacetilada	-	0,5
Q-Propil15-0,1	Quitosana Modificada com Propil	15%	0,1
Q-Propil15-0,5	Quitosana Modificada com Propil	15%	0,5
Q-Propil40-0,1	Quitosana Modificada com Propil	40%	0,1
Q-Propil40-0,5	Quitosana Modificada com Propil	40%	0,5
Q-Pentil30-0,1	Quitosana Modificada com Pentil	30%	0,1
Q-Pentil30-0,5	Quitosana Modificada com Pentil	30%	0,5
Q-Pentil65-0,1	Quitosana Modificada com Pentil	65%	0,1
Q-Pentil65-0,5	Quitosana Modificada com Pentil	65%	0,5
Q-BPHD15-0,1	Quitosana Modificada com BPHD	15%	0,1
Q-BPHD15-0,5	Quitosana Modificada com BPHD	15%	0,5
Q-BPHD25-0,1	Quitosana Modificada com BPHD	25%	0,1
Q-BPHD25-0,5	Quitosana Modificada com BPHD	25%	0,5

3.7 Ensaios microbiológicos

As cepas de *Aspergillus flavus* CBMAI 0190 e *Aspergillus parasiticus* CBMAI 0551 foram obtidas da Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria – CBMAI/UNICAMP, em Campinas – SP. Uma alçada de esporos foi transferida, da cepa original, para tubos de ensaio com o meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) solidificado e inclinado, sendo esses tubos em seguida incubados por sete dias à 25 ± 1 °C. Essa cultura é utilizada como inóculo para os experimentos com os derivados de quitosana. Decorrido o período, os experimentos com os biofungicidas foram iniciados. Para tanto, uma alçada de esporos foi retirada dos tubos de ensaio e dispersa em 1,5 mL de Tween 80 a 0,1%, estéril. Com a ajuda de uma pipeta automática, foram pipetados 2µL dessa solução de esporos no centro de cada placa, resultando numa colônia fúngica de aproximadamente 1 mm de diâmetro. O aumento do crescimento radial dessa colônia central foi acompanhado em cada placa com auxílio de paquímetro, sendo os resultados obtidos no sétimo dia (fim do primeiro ciclo de crescimento do microrganismo) utilizados para comparação. Para o controle (testemunha) foram preparadas quatro placas contendo apenas o meio de cultura BDA, sendo o mesmo número de placas

utilizado para os ensaios contendo as combinações fungicidas. O experimento foi completamente aleatorizado.

3.8 Cálculo do índice de inibição do crescimento fúngico

A inibição do crescimento do fungo pelas diferentes quitosanas foi determinada por meio da relação entre o tamanho radial das colônias nas placas de Petri contendo apenas o meio BDA e as placas contendo as combinações fungicidas. Para a análise da eficiência da quitosana o índice de inibição foi calculado de acordo com o proposto por Guo et al. (2008):

$$\text{Índice de Inibição (\%)} = \left(1 - \left[\frac{D_a}{D_b}\right]\right) \times 100\% \quad (3)$$

onde: D_a é o diâmetro da colônia das placas contendo BDA + quitosana e, D_b é o diâmetro das placas contendo apenas BDA (controle).

3.9 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

Para determinação da concentração inibitória mínima (MIC) foi utilizada a técnica de microdiluição em ágar de acordo com o método padrão de referência para fungos filamentosos (CLSI, 2008). Os derivados de quitosana foram solubilizados em ácido acético 1% (v/v) para a obtenção de soluções estoque de concentração 16 g L^{-1} . Essas soluções foram seriadamente diluídas em água (8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125 e $0,015625 \text{ g L}^{-1}$) e transferidas para os dez primeiros poços (Figura 8), sendo os dois últimos utilizados como controles negativos (apenas o meio de cultura, sem inóculo) e positivos (apenas meio de cultura e inóculo) (KUMAR, 2012). Feito isso, todos os 96 poços foram preenchidos com $100 \mu\text{L}$ de BDA e $2 \mu\text{L}$ de uma solução de suspensão fúngica (10^6 conídios mL^{-1}) foi inoculada, utilizando-se micropipeta. Os testes foram feitos em duplicata e a MIC foi adotada como a menor concentração na qual não ocorreu crescimento visível do microrganismo em 24, 48 e 72 horas.

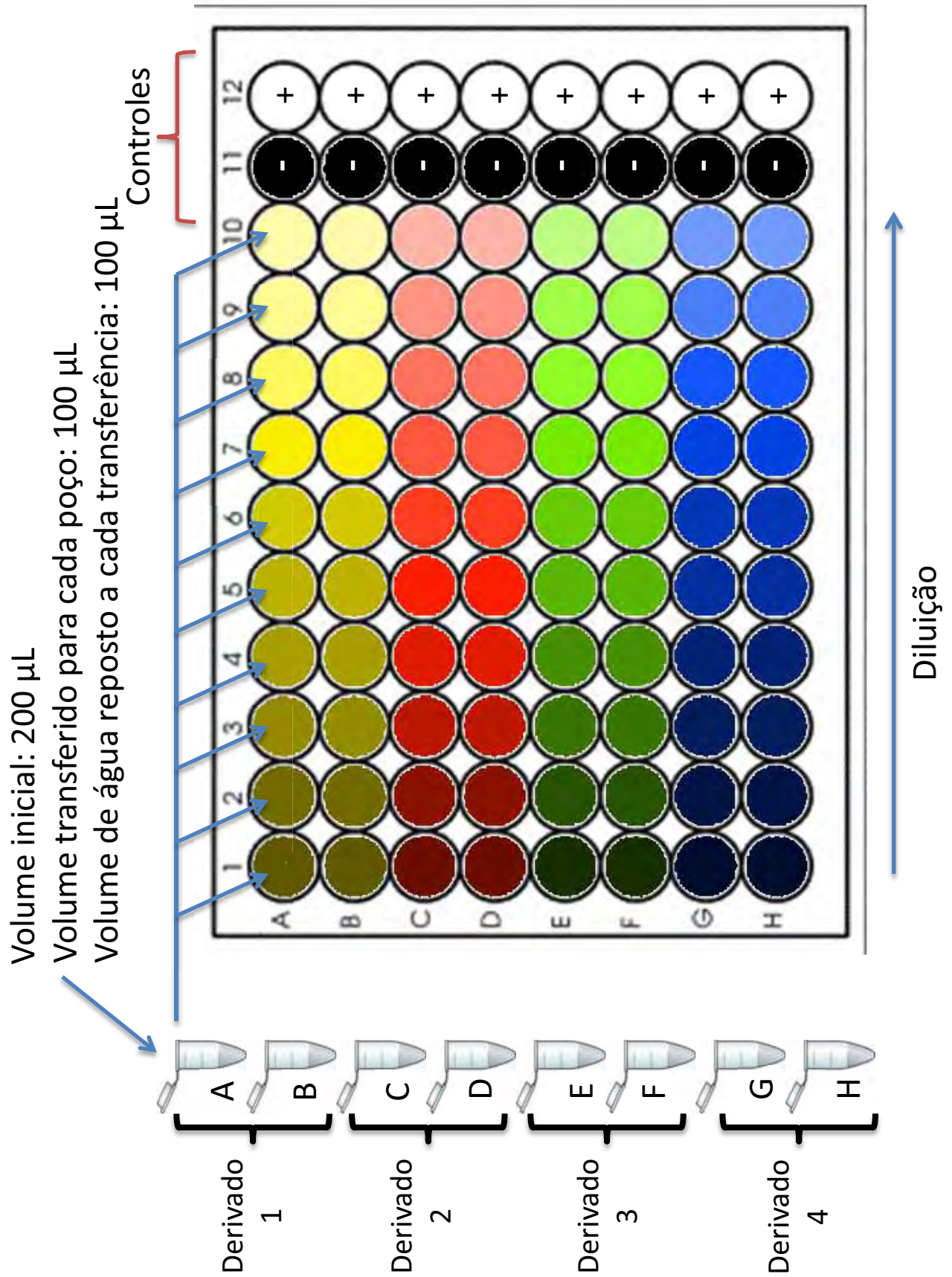


Figura 8: Procedimento para a determinação da MIC.

3.10 Tratamento estatístico

Para avaliar estatisticamente a atividade fungicida das quitosanas foram utilizadas estatísticas descritivas com cálculo de média, desvio padrão, mediana e valores de mínimo e máximo para os índices de inibição. Devido ao pequeno número de unidades experimentais ($n = 4$), característico desse tipo de experimento, as medianas dos índices de inibição foram comparadas utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. As diferenças entre grupos foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Os cálculos estatísticos foram realizados por meio dos programas MINITAB® 16.0 e Prism® 5.04.

O teste de análise de variância por postos de Kruskal-Wallis (homenagem a William Kruskal e Allen Wallis) é um método não paramétrico para testar se as amostras pequenas são provenientes de uma mesma distribuição. Ele é utilizado quando se deseja comparar mais de duas amostras independentes. A estatística de teste é dada por:

$$K = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{j=1}^k \frac{(R_j)^2}{n_j} - 3(N+1) \quad (4)$$

Onde

N = número total de observações,

k = número de amostras,

n_j = número de observações na j -ésima amostra,

R_j = soma dos postos da j -ésima amostra.

Quando o teste de Kruskal-Wallis conduz a resultados significativos, então pelo menos uma das amostras é diferente das outras amostras. Esse teste informa se há ou não diferença significativa nas amostras, mas não pode informar quais amostras são diferentes. Nesse caso, utiliza-se o pós-teste de Dunn para se verificar qual das amostras apresenta diferença significativa para as outras.

3.11 Microscopia de fluorescência confocal a laser

Para avaliar a interação da quitosana com o fungo, a nível microscópio, foram realizadas microscopias de fluorescência confocal a laser. Para tanto, ambos os fungos foram inoculados na presença de quitosana desacetilada previamente marcada com rodamina (Q-RODAMINA) (PICOLA, 2009). As imagens foram feitas num microscópio confocal a laser, modelo ZEISS LSM 710 no laboratório de Microscopia e Microanálise do Departamento de Biologia desta Instituição (Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da UNESP/São José do Rio Preto – SP). As imagens foram obtidas com aumento de 63x, utilizando-se, no laser, duas linhas de excitação (543 nm e 633 nm), com filtro MBS (488/543/633).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sínteses

Ambas as sínteses se basearam no princípio da química verde e da economia de átomos. Segundo Anastas (2000) e Silva (2005), a ideia central da química verde é o desenvolvimento de processos que visam minimizar a produção de resíduos poluentes. As reações de modificação da quitosana foram feitas utilizando água como solvente, ao contrário dos procedimentos tradicionais relatados na literatura, os quais utilizam como solventes, metanol, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, hexano e outros.

4.1.1 Desacetilação e caracterização da quitosana

Inicialmente o grau de desacetilação (GD) foi determinado para a quitosana por meio da titulação potenciométrica como descrito no item 3.3.1. Para o procedimento de titulação a quitosana foi inicialmente dissolvida em um excesso conhecido de uma solução aquosa de HCl previamente preparada e padronizada. Dessa forma assegura-se que todos os grupos amino ligados no anel glicopiranosídico estejam protonados (NH_3^+). A partir da titulação desta solução com hidróxido de sódio padronizado, uma curva com dois pontos de inflexão foi obtida

(vide Figura 9). O primeiro ponto indica o final da neutralização dos prótons em excesso provenientes da solução de HCl e o início da neutralização dos grupos amino protonados, enquanto que o segundo indica o término da desprotonação dos grupos amino. A diferença entre esses dois pontos corresponde ao volume de NaOH necessário para a desprotonação dos grupos amino, o que permite calcular o número de mols de unidades desacetiladas.

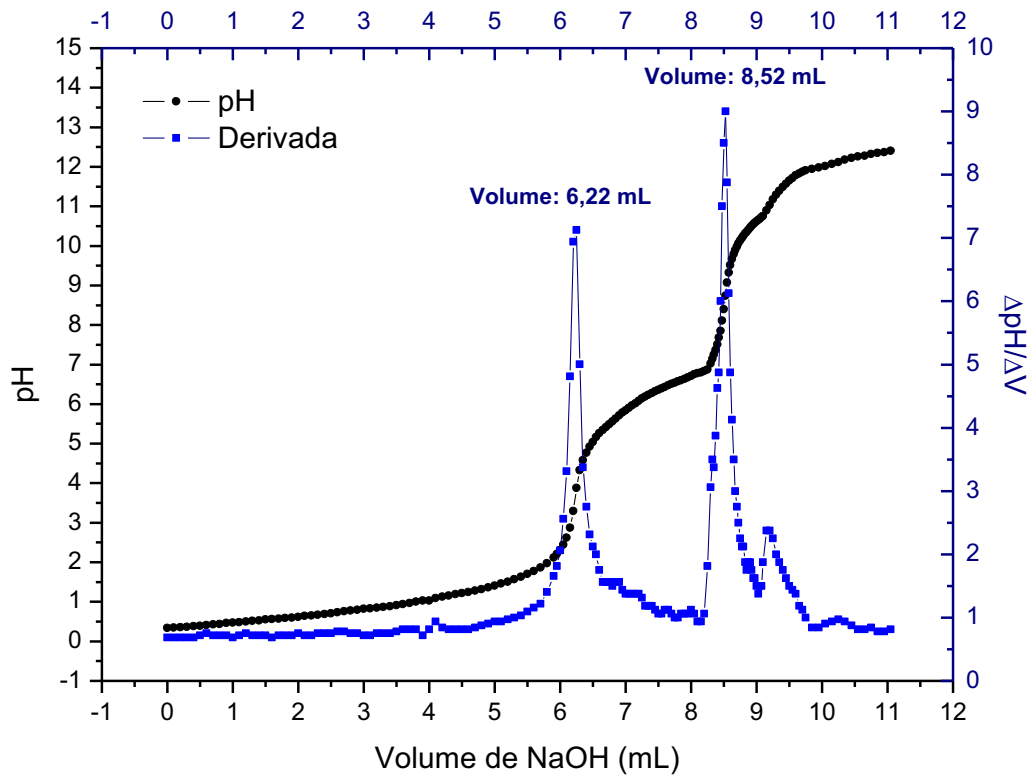


Figura 9: Titulação potenciométrica da quitosana desacetilada.

Para o calculo do GD foi utilizada a Equação 5:

$$\%GD = \frac{n_{VD}}{n_{VD} + n_{VA}} \cdot 100 = \left(\frac{M_{NaOH} \cdot V_{NaOH}}{M_{NaOH} \cdot V_{NaOH} + \left(\frac{m_t - [M_{NaOH} \cdot V_{NaOH} \cdot 161,22]}{203,4} \right)} \right) \cdot 100\% \quad (5)$$

Onde:

n_{VD} é o número de mols de unidades desacetiladas,

n_{VA} é o número de mols de unidades acetiladas,

M_{NaOH} é a concentração em quantidade de matéria de NaOH,

V_{NaOH} (L) o volume da solução de NaOH usado para neutralizar as unidades protonadas da quitosana, e

m_t é a massa total de quitosana utilizada na titulação.

Utilizando-se a Equação 5 e os parâmetros acima descritos o grau de desacetilação obtido foi de 98,7%. O grau de desacetilação foi também determinado utilizando-se a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio. A Figura 10 mostra o espectro de RMN¹H para a quitosana desacetilada.

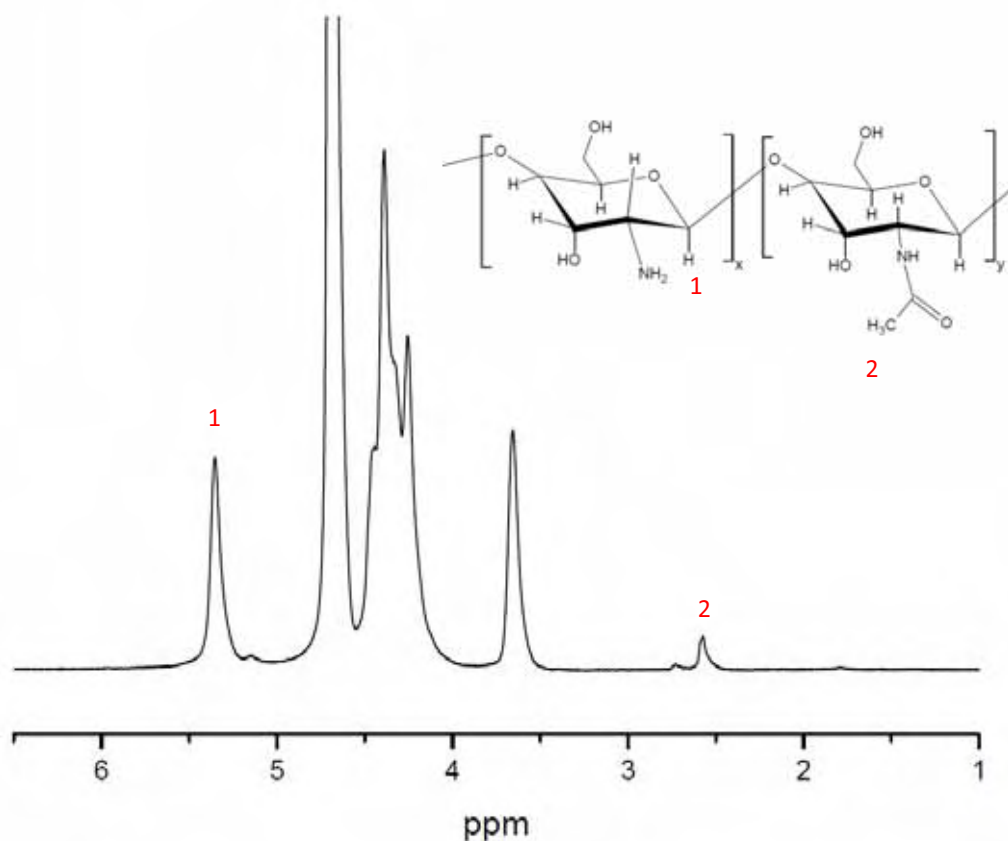


Figura 10: Espectro de RMN¹H para a Quitosana desacetilada. Estrutura da quitosana e a localização dos prótons 1 e 2.

O grau de desacetilação foi calculado com a área de integração dos picos destacados em vermelho utilizando-se a Equação 6:

$$GD = \left[1 - \left(\frac{A_2}{A_1 + A_2} \right) \right] \cdot 100\% \quad (6)$$

onde A_1 se refere ao pico localizado em 5,40 ppm e A_2 se refere ao pico em 2,61 ppm. Os resultados obtidos pelas técnicas de titulação potenciométrica (98,7%) e de ressonância magnética nuclear (98,2%) mostram uma boa concordância entre si, o que confirma a eficiência do processo de desacetilação.

Os espectros de IR obtidos para as quitosanas comercial e desacetilada estão dispostos na Figura 11. É possível notar que ambas quitosanas apresentam uma banda característica na região de 3400 cm^{-1} , devido às vibrações de estiramento axial dos grupos hidroxilas presentes nos polímeros, estando sobrepostas ao estiramento das ligações nitrogênio-hidrogênio.

Vários trabalhos (DOMSZY e ROBERTS, 1985; BAXTER et al., 1992; BRUGNEROTTO et al., 2001; DOS SANTOS et al., 2003) citam a banda de vibração do grupamento amida para diferenciar a quitosana comercial (com maior teor de grupos acetamidos) da quitosana desacetilada. Segundo esses trabalhos, a banda do grupo amida presente no substituinte acetamido apresenta um pico característico e intenso em 1650 cm^{-1} e um segundo pico discreto em 1625 cm^{-1} . Desse modo, a quitosana comercial apresenta esses dois picos bastante visíveis, enquanto que, na quitosana desacetilada, esses sinais são quase imperceptíveis. Isso pode ser comprovado na Figura 11, na qual é possível perceber no espectro da quitosana comercial os dois picos característicos do grupo amida na região de 1620 a 1660 cm^{-1} e a ausência dos mesmos no espectro da quitosana desacetilada.

A região compreendida entre 1450 a 1300 cm^{-1} também é utilizada na literatura (DOS SANTOS et al., 2003) para diferenciar a quitosana comercial da desacetilada. Por volta da região de 1308 a 1385 cm^{-1} ocorre a deformação axial da ligação carbono-nitrogênio do grupo amida, enquanto a deformação da ligação carbono-nitrogênio presente no grupo amino ocorre por volta de 1425 cm^{-1} . Essa diferença está bastante evidente na Figura 11, caracterizando assim a eficiência no processo de desacetilação.

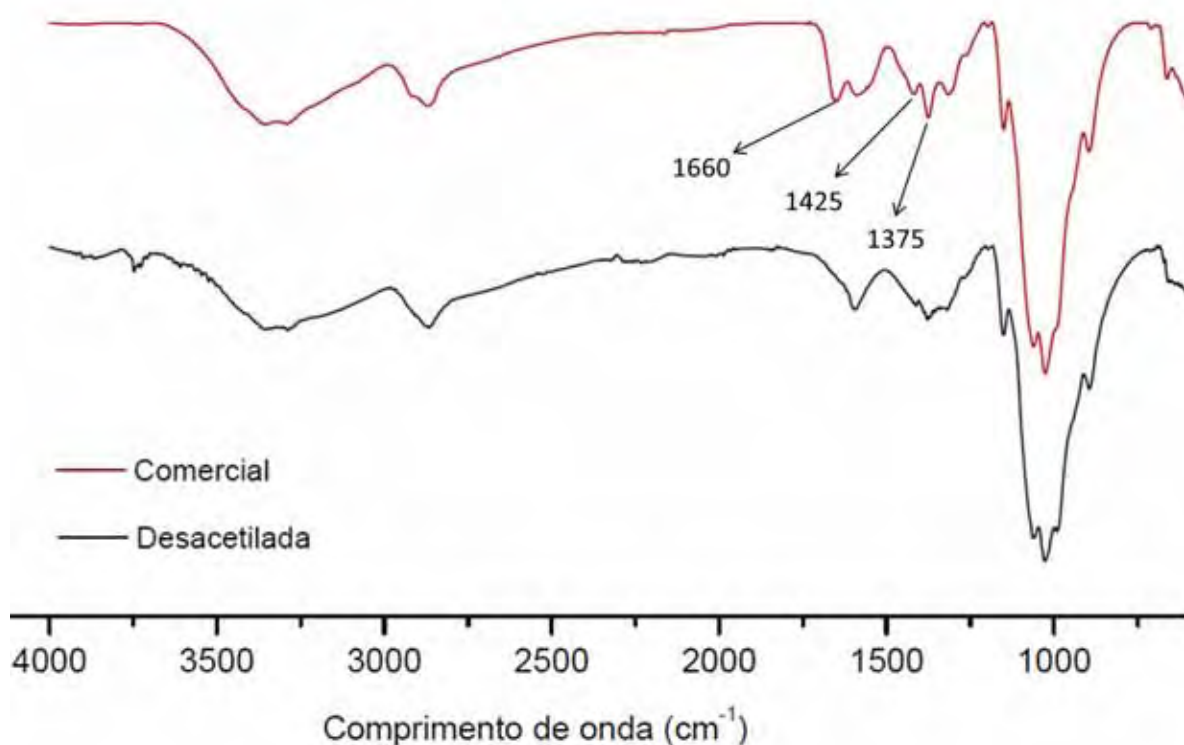


Figura 11: Espectros de absorção na região do infravermelho para as quitosanas comercial e desacetilada.

4.1.2 Síntese e caracterização dos derivados quaternários de quitosana

A síntese dos derivados quaternários de quitosana foi realizada utilizando-se proporções crescentes dos brometos de propil e pentiltrimetilamônio, em presença de quitosana desacetilada para a formação de um sal quaternário de acordo com esquema mostrado na Figura 12. Essa síntese foi previamente descrita por Pedro et al. (2013).

A titulação potenciométrica dos derivados quaternários de quitosana foi realizada de acordo com o item 3.3.1. Assim como na titulação potenciométrica para a quitosana desacetilada, os derivados foram solubilizados em excesso de solução de HCl padronizado para completa protonação dos grupos amino da quitosana, sendo titulados com hidróxido de sódio padronizado.

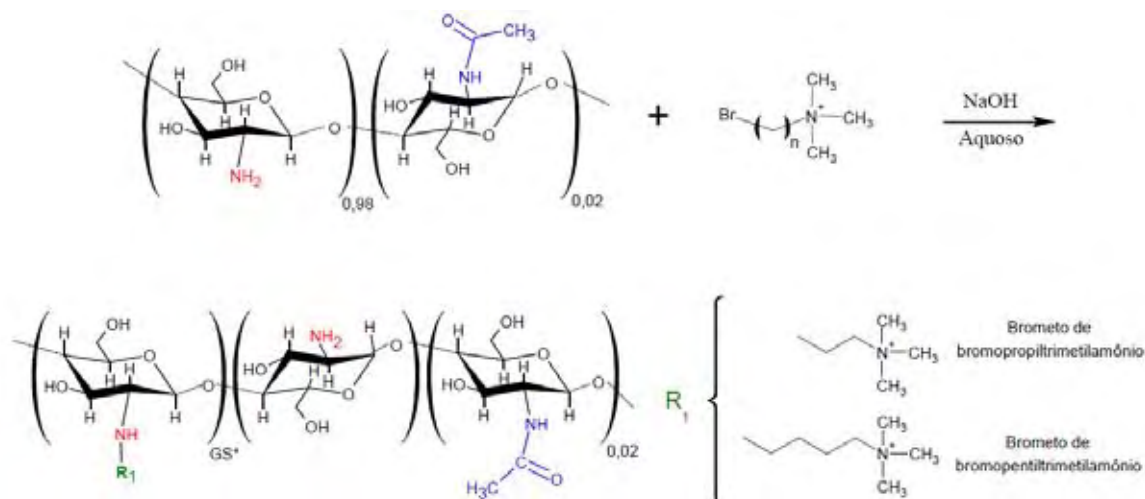


Figura 12: Reação da quitosana com os sais de brometo de alquila.

O primeiro ponto de inflexão indica o final da neutralização dos prótons em excesso provenientes da solução de HCl e o início da neutralização dos grupos amino protonados, enquanto que o segundo indica o término da desprotonação dos grupos amino. A diferença entre esses dois pontos corresponde ao volume de NaOH necessário para a desprotonação dos grupos amino, o que permite calcular o número de mols de unidades desacetiladas. A Equação 7 foi utilizada para calcular o grau de substituição do derivado. A Figura 13 mostra o gráfico de titulação para um derivado quaternário de quitosana substituído com 65% de pentil trimetilamonio.

$$\%GS = \left(\frac{n_{QS}}{n_{QD}} \right) \cdot 100\% = \left[\frac{\left(\frac{m_t - m_{QD}}{208,9} \right)}{(M_{NaOH} \cdot V_{NaOH})} \right] \cdot 100\% \quad (7)$$

Onde:

n_{QS} é o numero de mols de unidades substituídas,

n_{QD} é o numero de mols de unidades desacetiladas,

m_t é a massa total de quitosana utilizada na titulação

m_{QD} é a massa total de quitosana desacetilada utilizada na titulação, calculada por

$m_{QD} = (M_{NaOH} \cdot V_{NaOH}) \times 161,22$,

M_{NaOH} é a concentração em quantidade de matéria de NaOH,

V_{NaOH} (L) o volume da solução de NaOH utilizado para neutralizar as unidades

protonadas da quitosana.

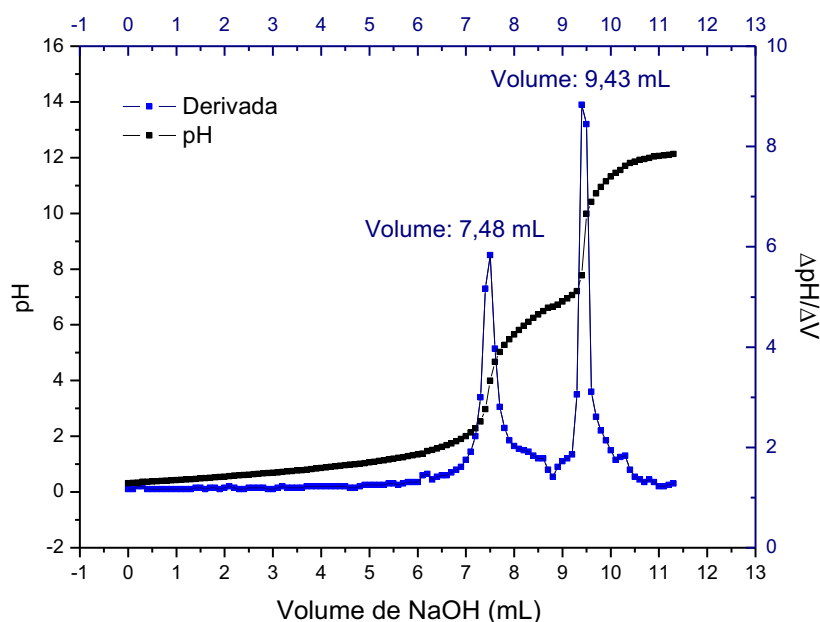


Figura 13: Titulação potenciométrica da quitosana substituída com 65% de pentiltrimetilamônio.

Dos dados da titulação potenciométrica, o grau de substituição estimado para o derivado acima foi de 65,0%.

Os espectros de RMN¹H dos derivados quaternários confirmaram o sucesso da síntese. Na Figura 14 são mostrados os espectros da quitosana desacetilada e os derivados obtidos com os grupos propil e pentiltrimetilamônio. Para simplificar a análise dos espectros de RMN¹H, foi considerada a estrutura da quitosana dividida em duas partes, sendo que a unidade substituída está representada pelo subíndice **S**.

Além dos sinais característicos da quitosana, podem ser observados claramente os picos correspondentes dos grupos trimetil amônio e o desdobramento do próton anomérico (5,4 e 5,6 ppm) devido à substituição. Em 1,9 ppm aparece o sinal referente aos prótons do grupo metileno equidistante do grupo pentil (indicado em vermelho). A porcentagem de bromopentiltrimetilamônio ligado à cadeia de quitosana foi calculada comparando-se a integração do sinal do grupo metileno

intermediário do grupo pentil, com a integração correspondente às integrações dos prótons anoméricos H_1 e H_{1S} do anel. A relação utilizada foi a equação 8.

$$GS = \left(\frac{\frac{I_{CH_2}}{2}}{H_1 + H_{1S}} \right) \cdot 100\% \quad (8)$$

Onde I_{CH_2} é a área integrada do pico em 1,9 ppm e $(I_{H_1} + I_{H_{1S}})$ corresponde a área integrada do pico referente ao hidrogênio anomérico. Os resultados com as propriedades das quitosanas desacetilada e substituídas são apresentados na Tabela 5.

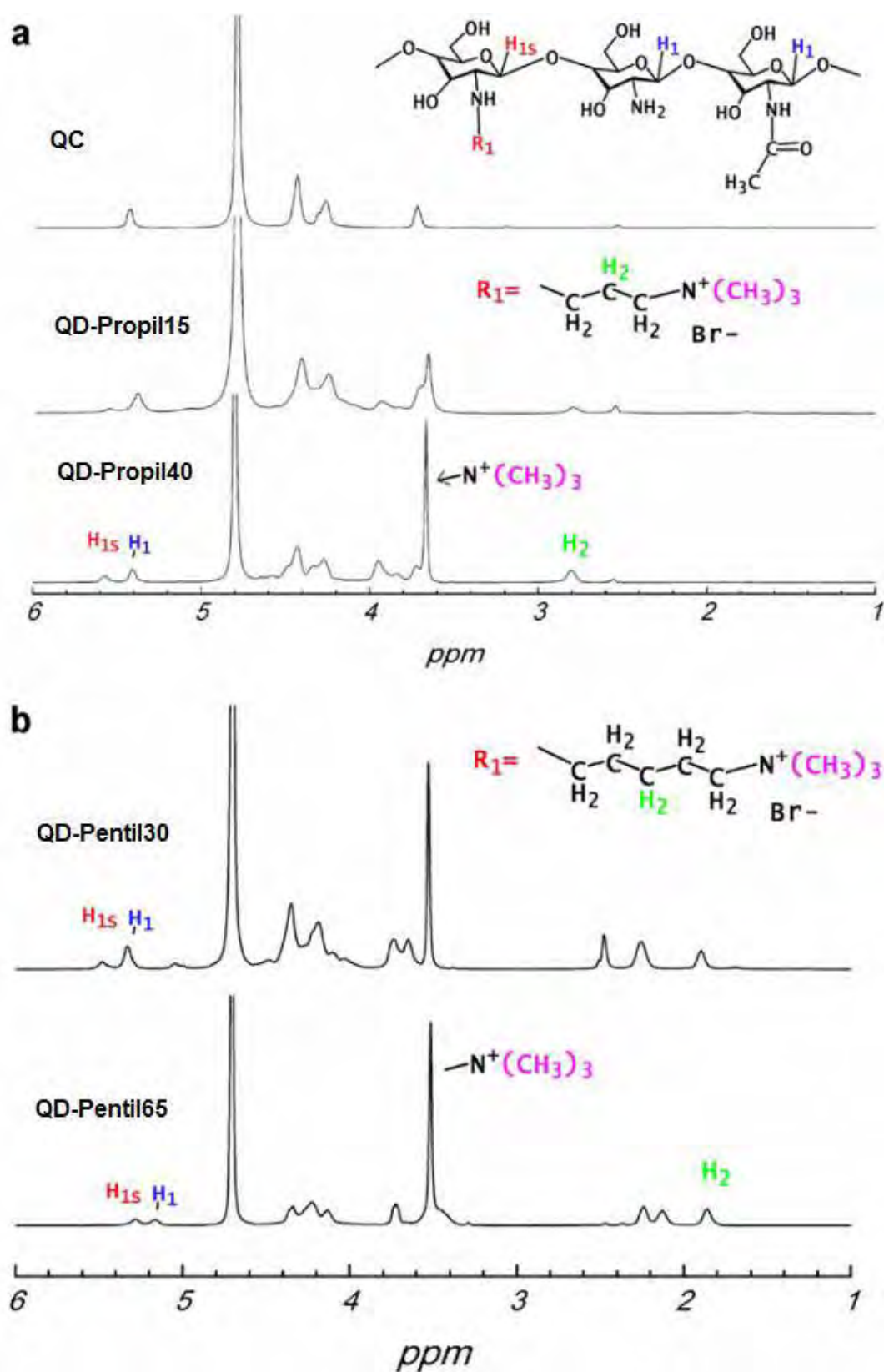


Figura 14: Espectros de RMN¹H para a) quitosanas substituídas com propil e b) pentil.

Os derivados foram ainda analisados utilizando-se a espectroscopia no infravermelho. A figura a seguir mostra os espectros dos derivados modificados com o sal brometo de bromopropiltrimetilamônio.

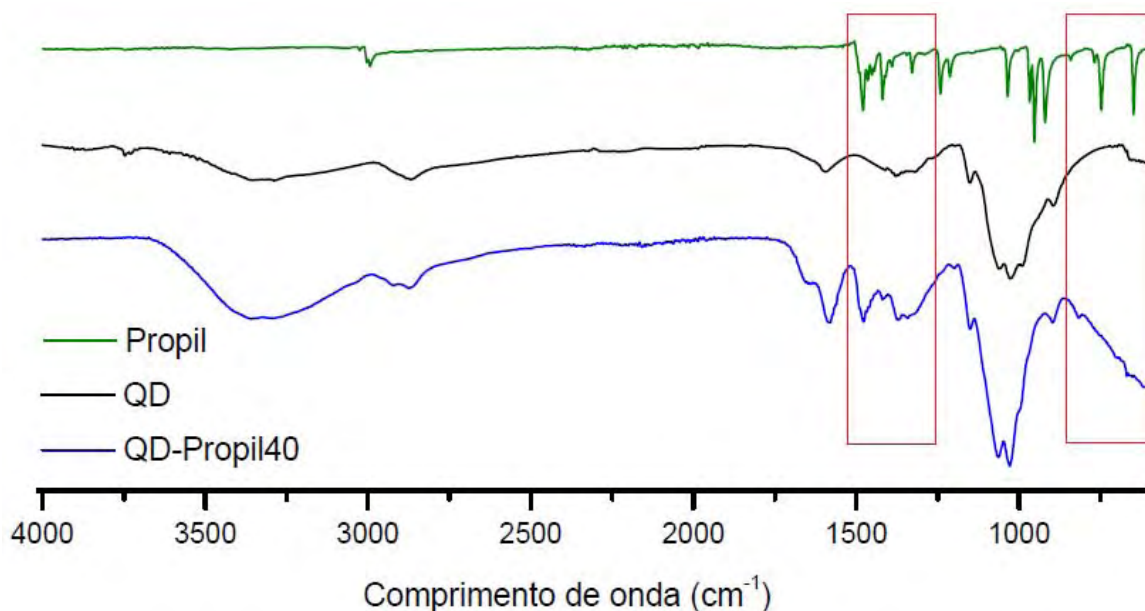


Figura 15: Espectros de absorção na região do infravermelho para Propil, QD e QD-Propil40.

É possível notar, nas regiões demarcadas em vermelho, a diferença entre os espectros dos derivados QD e QD-Propil40. Isso se deve a incorporação dos grupos presentes no sal de amônio utilizado para a síntese junto à quitosana. A região presente na faixa de 1480 a 1250 cm^{-1} pode ser atribuída à deformação da ligação nitrogênio-hidrogênio presente nos monômeros substituídos, enquanto que a região de 800 a 600 cm^{-1} está associada a deformação das ligações hidrocarbônicas presentes no grupo Propil.

Observações semelhantes podem ser encontradas na Figura 16, na qual são exibidos os espectros do sal Pentil, QD e QD-Pentil65. Fica evidente que a quitosana, após a modificação, possui na sua estrutura grupos característicos do sal quaternário utilizado na síntese. As regiões destacadas em vermelho indicam a modificação do espectro da quitosana, sendo possível perceber que o espectro do derivado possui boa concordância com o espectro do sal de amônio.

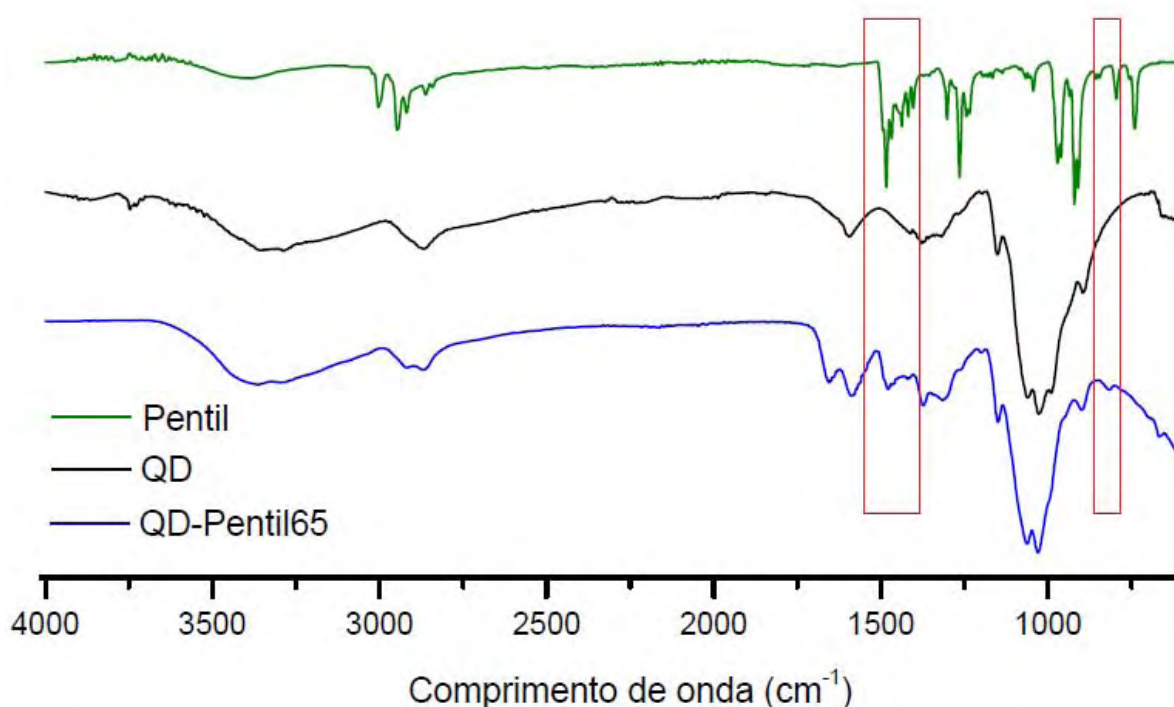


Figura 16: Espectros de absorção na região do infravermelho para Pentil, QD e QD-Pentil65.

4.1.3 Síntese e caracterização dos derivados bi-quaternários de amônio

Os derivados bi-quaternários de amônio foram preparados pela reação da quitosana desacetilada com os sais bi-quaternários de amônio. Esses sais foram sintetizados no laboratório e envolveram duas etapas.

O esquema ilustrado na Figura 17 mostra as etapas de reação para a obtenção do sal.

Na etapa 1 ocorre uma reação de substituição nucleofílica bimolecular dita reação S_N2 . Nessa reação, o par de elétrons livres presente em um dos grupos amino da molécula de *N,N,N',N'*-tetrametil-1,6-hexanodiamina ataca o carbono do reagente iodeto de metila, deslocando o iodo, deixando assim o nitrogênio quaternizado. Para impedir a quaternização dos dois nitrogênios presentes na molécula, o iodeto de metila foi adicionado como reagente limitante nessa reação. Na segunda etapa ocorre outra reação do tipo S_N2 com o ataque do nitrogênio em um dos carbonos presente no dibromohexano, obtendo-se a quaternização do grupo

amino. Após as duas etapas de reação, o sal *N*-(4-bromobutil)-*N,N,N',N',N'*-pentametilhexano-1,6-diamino (BPHD) foi obtido por secagem em estufa.

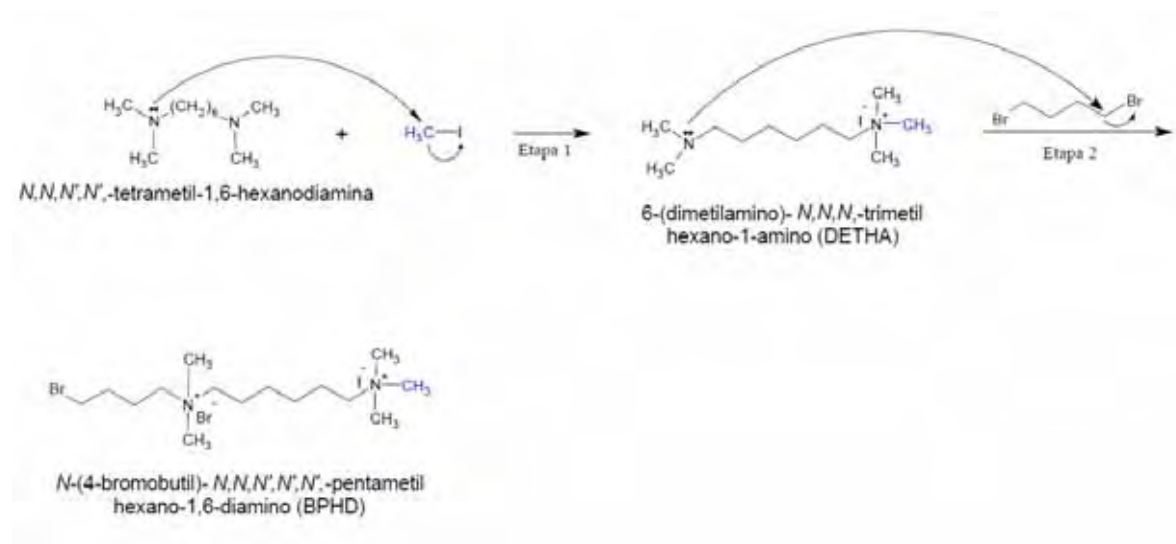


Figura 17: Esquema de síntese do sal bi-quaternário de amônio.

4.1.4 Síntese e caracterização dos derivados bi-quaternários de quitosana

Os derivados bi-quaternários de quitosana foram obtidos pela reação do polissacarídeo com o sal BPHD previamente sintetizado. Para a síntese, baseada em trabalho previamente descrito (PEDRO et al., 2013), uma massa de quitosana foi posta a reagir em meio aquoso com o sal BPHD, de acordo com o esquema exibido na Figura 18.

Essa é a uma reação do tipo S_N2 na qual o par de elétrons localizado no grupo amino (NH_2) do anel glicopiranosídico da quitosana ataca o carbono ligado ao bromo (Br) presente no sal BPHD. Uma vez que o brometo é um bom grupo de saída para as reações do tipo S_N2 , a quitosana se liga a sal BPHD, como observado na Figura 18, com rendimento final bastante significativo.

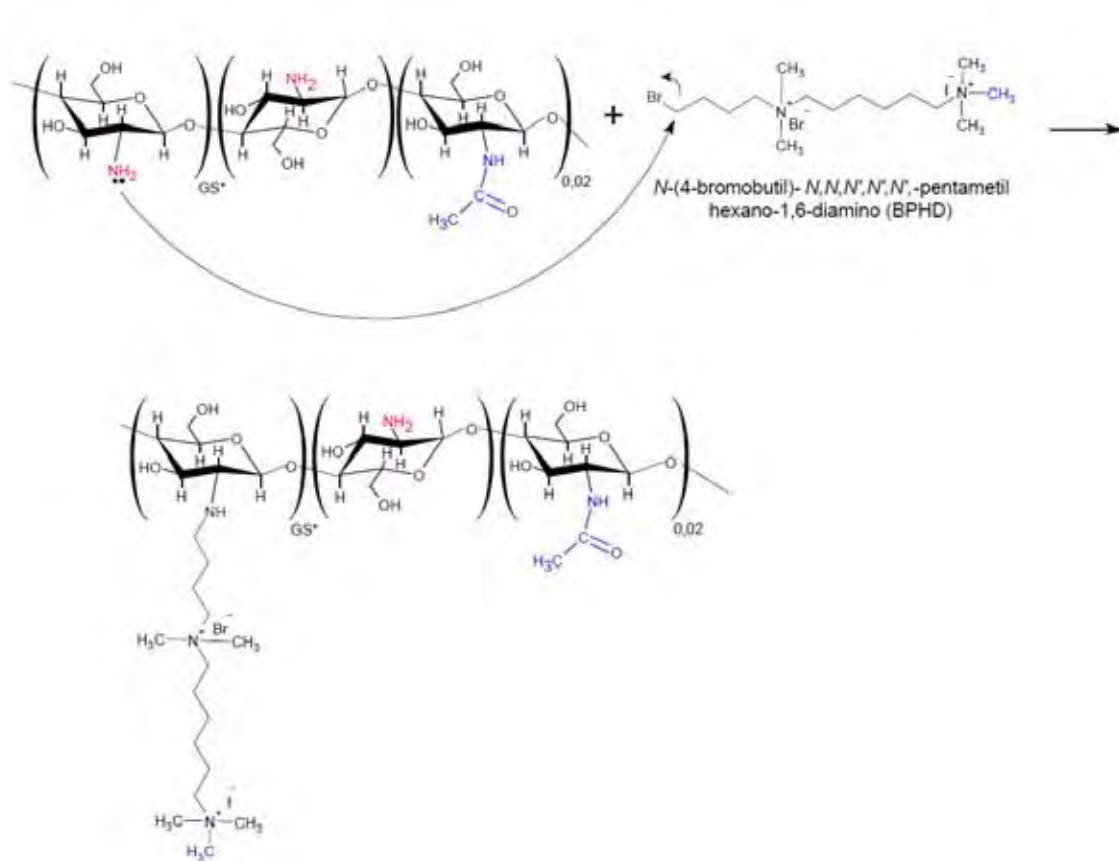


Figura 18: Síntese dos derivados bi-quaternários de quitosana (*GS = grau de substituição).

A Figura 19 mostra os espectros de RMN^1H para a quitosana desacetilada, o sal BPHD e o derivado de quitosana substituído QD-BPHD. É possível notar nos deslocamentos de 3.1 a 3.4 ppm o aparecimento dos picos referentes a ressonância dos hidrogênios dos grupos metila ligados nos nitrogênios. Além disso, no deslocamento 2,245 ppm aparece o sinal referente aos hidrogênios do segundo grupo metileno do sal, indicados na figura pelo número 1. Estes e os demais deslocamentos concordam razoavelmente bem com o observado pela predição do RMN^1H realizada no programa ChemDraw Ultra 11.0.

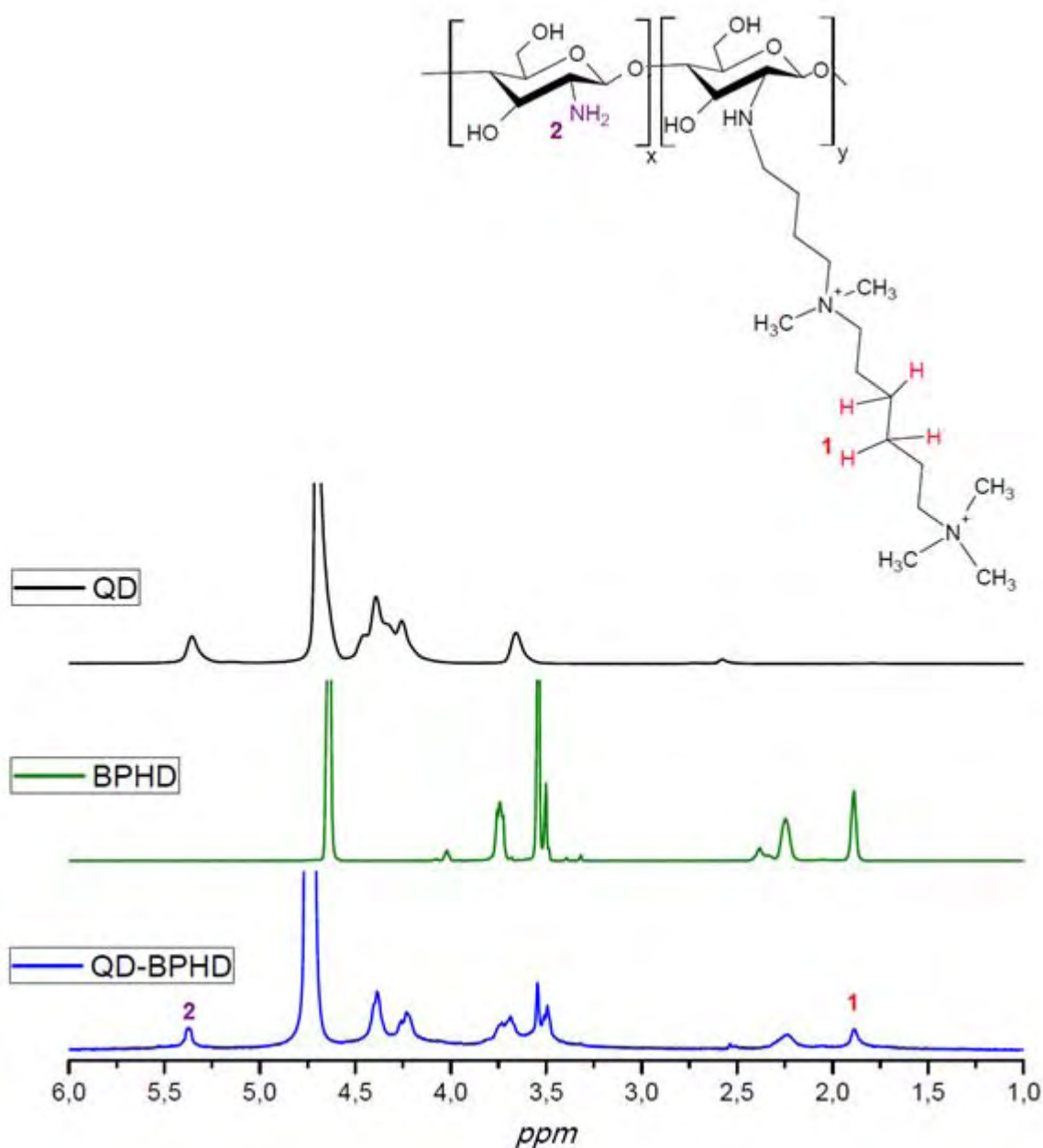


Figura 19: Espectros de RMN^1H para a quitosana desacetilada (QD), para o sal bi-quaternário de amônio sintetizado (BPHD) e para o derivado de quitosana (QD-BPHD).

Na Figura 20 é possível notar ainda que o espectro da quitosana substituída (QD-BPHD) apresenta os mesmos picos do sal BPHD nas regiões de 1,5 a 2,5 ppm e 3,2 a 4,3 ppm. Esses picos não aparecem no espectro da quitosana, o que evidencia a presença do BPHD no polissacarídeo.

Para a determinação do GS do derivado de quitosana foi utilizada a Equação 6:

$$GS = \left(\frac{\frac{A_1}{4}}{A_2} \right) \cdot 100\% \quad (6)$$

Onde A_1 se refere ao pico localizado em 1,88 ppm e A_2 se refere ao pico 5,35 ppm. A figura a seguir exibe os espectros de RMN¹H para os derivados QD-BPHD15 e QD-BPHD25, sendo possível observar que ambos derivados sintetizado possuem espectros semelhantes.

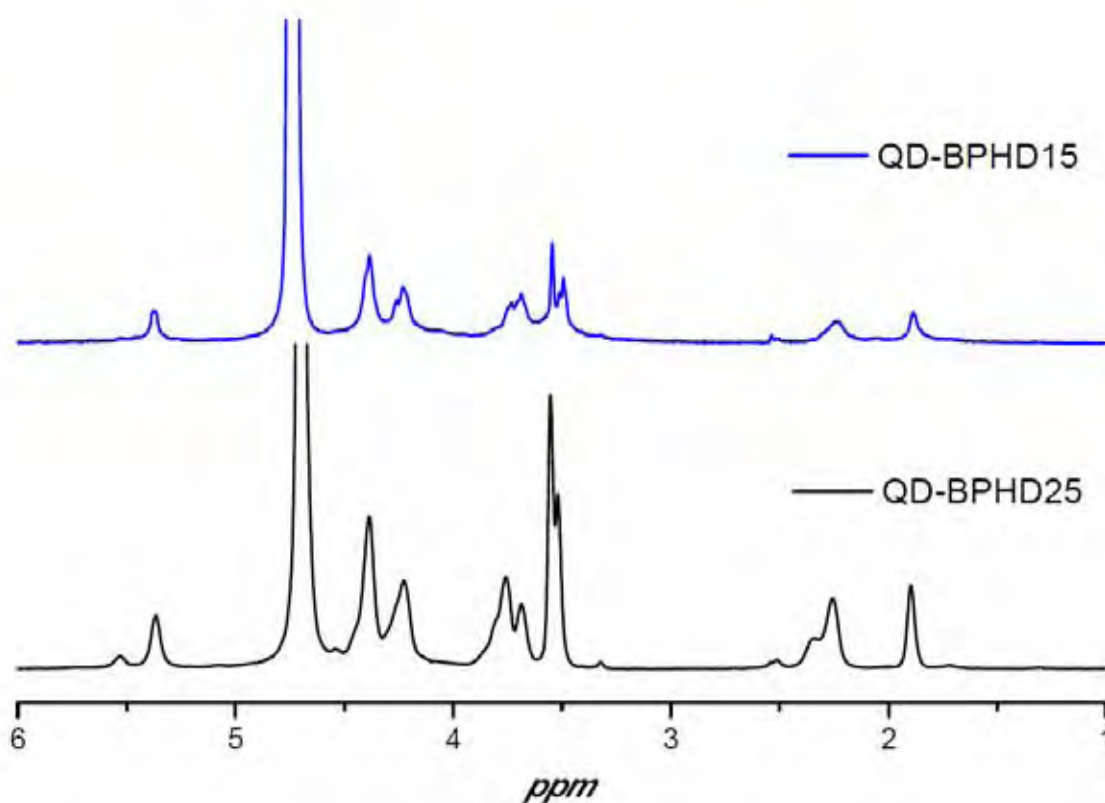


Figura 20: Espectros de RMN¹H para os derivados QD-BPHD15 e QD-BPHD25.

Esses resultados mostram que as etapas da síntese do sal bi-quaternário BPHD foram eficientes, sendo o produto obtido por um processo relativamente simples e rápido. Além disso, o BPHD foi obtido com um grau de pureza satisfatório. Esse derivado será posteriormente aplicado como biofungicida contra os fungos do gênero *Aspergillus*.

A Tabela 6 mostra os graus de substituição bem como a massa molar viscosimétrica para os derivados bi-quaternários de quitosana.

A Figura 21 mostra o espectro de IR para o sal BPHD, para a quitosana desacetilada (QD) e para a quitosana modificada com o sal (QD-BPHD).

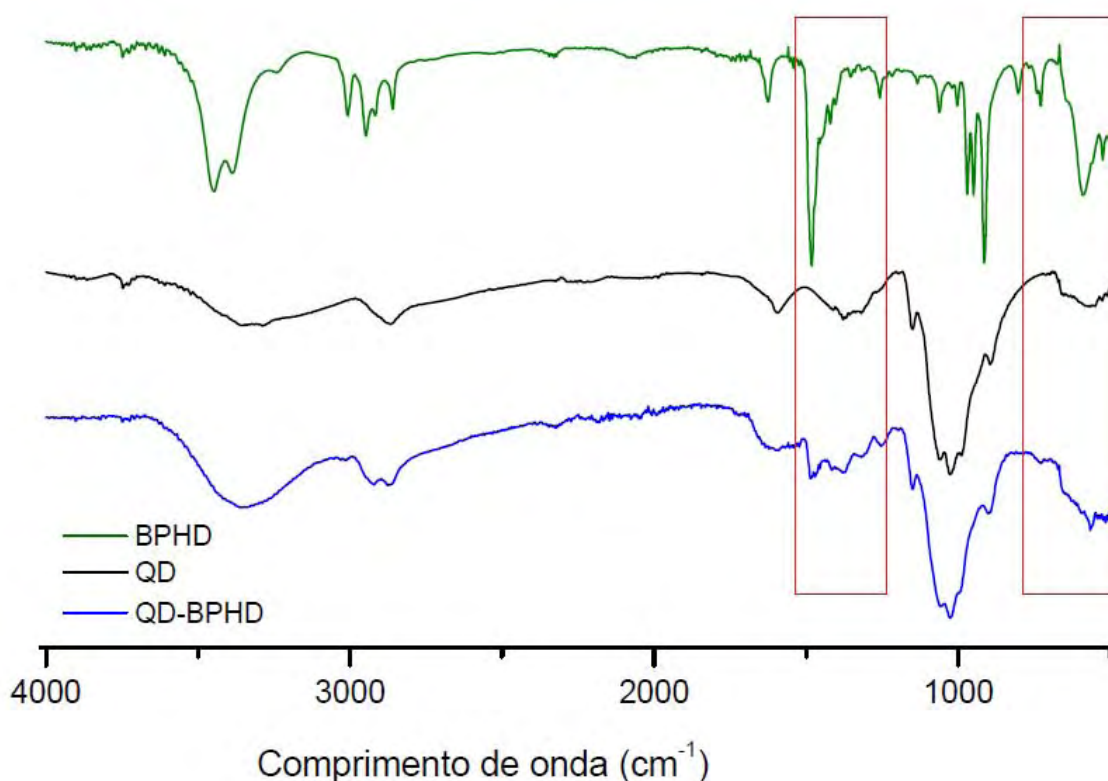


Figura 21: Espectros de absorção na região do infravermelho (IR) para BPHD, QD e QD-BPHD15.

É possível observar claramente no espectro do sal BPHD um pico intenso em 1495 cm^{-1} , característico à deformação das ligações C-H presentes nos grupos metilas ligados ao nitrogênio quaternário. Esse pico não aparece no espectro da quitosana QD, mas aparece no derivado QD-BPHD15, além disso, é possível perceber o desaparecimento do pico em 1425 cm^{-1} , relativo à deformação da ligação carbono-nitrogênio presente no grupo amino, o que comprova assim o sucesso da reação de síntese. O mesmo resultado foi obtido por Sun et al. (2006) na síntese de quitosana quaternárias carboximetiladas.

4.1.5 Determinação das massas moleculares viscosimétricas

As massas molares médias foram determinadas de acordo com o item 3.4. Os valores de massa molar viscosimétrica média ($\bar{M}_v$) dos derivados de quitosana foram obtidos pela equação de Mark-Houwink-Sakurada (equação 2), utilizando as constantes $K_m = 0,079$ e $a = 0,796$, para quitosanas com grau de desacetilação próximos de 99% (ROBERTS e WANG, 1996). A partir da equação $\eta_{sp} = \frac{\bar{t} - \bar{t}_0}{\bar{t}_0}$, onde $\bar{t}$ é o tempo médio de escoamento da solução e $\bar{t}_0$ é o tempo médio de escoamento do solvente puro, a viscosidade específica pode ser calculada. As viscosidades intrínsecas dos polímeros foram obtidas por meio da extrapolação para a concentração zero da curva do gráfico de η_{sp}/C versus C . A figura a seguir exhibe os gráficos utilizados para a obtenção da viscosidade intrínseca.

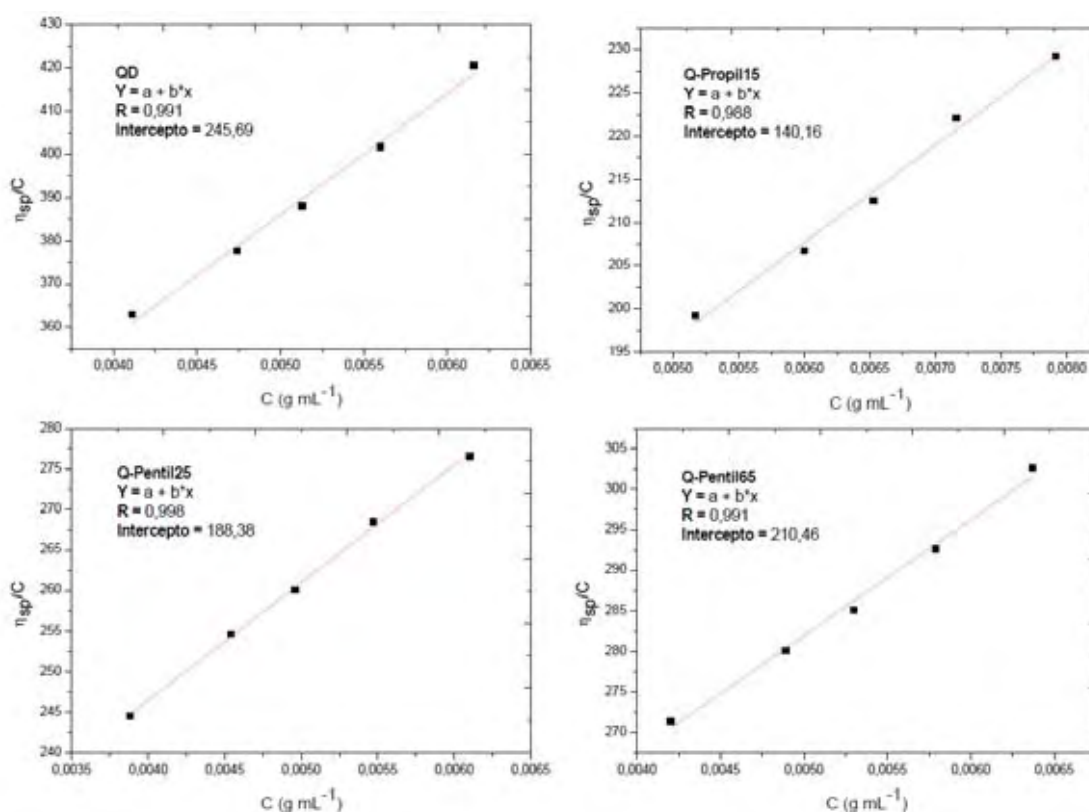
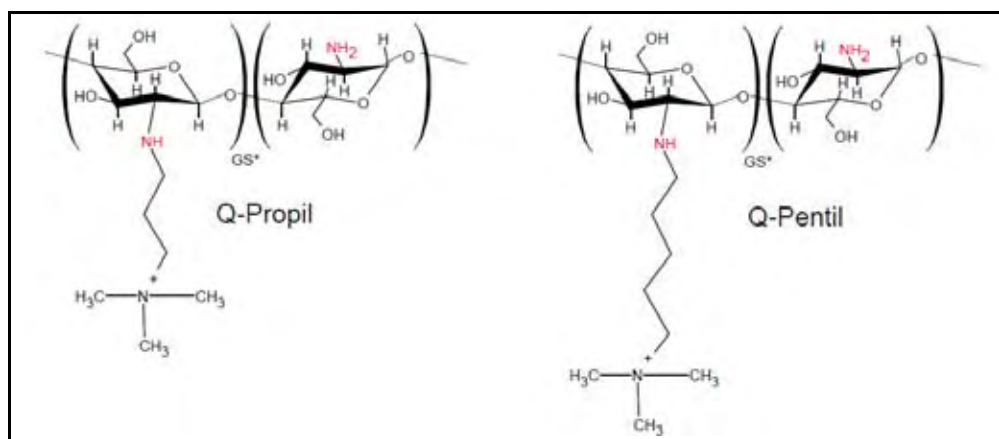


Figura 22: Curvas de η_{sp}/C versus C para obtenção da viscosidade intrínseca.

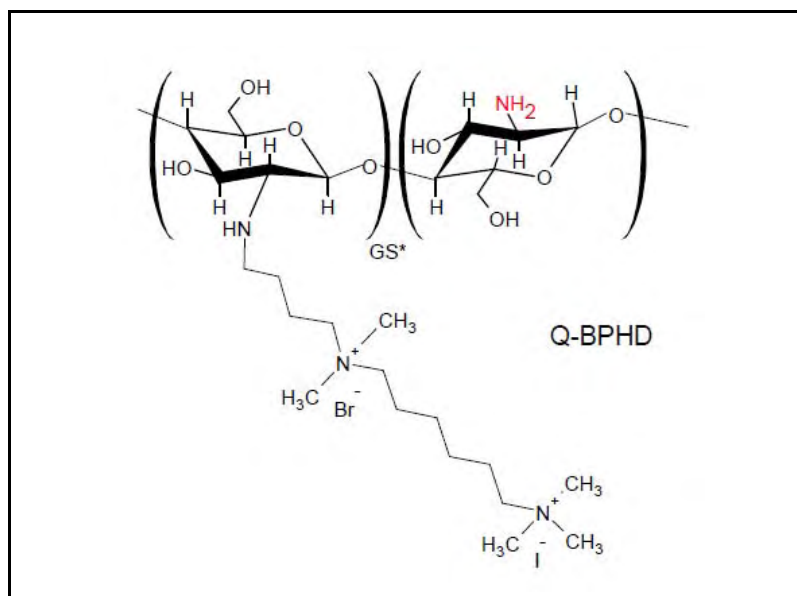
Nas Tabela 5 e Tabela 6 são apresentadas as propriedades de todos derivados sintetizados. É possível observar que os derivados apresentam massas molares médias menores do que as quitosanas comercial e desacetilada. Essa degradação pode ser associada a temperatura e pH as quais os polímeros são submetidos durante os etapas de sínteses.

Tabela 5: Estruturas e composições dos derivados quaternários de quitosana.



	Razão Molar $n_{\text{sal}}/n_{\text{quitosana}}$	GS (RMN ¹ H) %	Mv(Da)
QC	-	85,90*	32.800
QD	-	98,70*	24.400
Q-Propil15	1,5	14,70	11.900
Q-Propil40	3,8	38,40	-
Q-Pentil30	1,5	30,00	17.400
Q-Pentil65	8	64,90	20.100

*Grau de desacetilação

Tabela 6: Estrutura e composição dos derivados bi-quaternários de quitosana.

	Razão Molar $n_{\text{sal}}/n_{\text{quitosana}}$	GS (RMN ¹ H)%	Mv(kDa)
QC	-	85,90*	32.800
QD	-	98,70*	24.400
Q-BPHD15	1,7	14,98	25.100
Q-BPHD25	2,9	26,10	-

De acordo com os resultados obtidos por meio das técnicas de caracterização é possível concluir que as rotas de síntese propostas foram eficientes, sendo os rendimentos das reações de substituição bastante satisfatórios. Além disso, a síntese pode ser considerada um procedimento ambientalmente limpo, uma vez que foi realizada em solução aquosa.

4.2 Efeito biofúngica dos derivados de quitosana contra o fungo *Aspergillus flavus*

Nessa etapa do trabalho foram realizados estudos de inibição do crescimento de *A. flavus* e determinação da concentração inibitória mínima (MIC) envolvendo a aplicação das quitosanas comercial, desacetilada e dos derivados, em diferentes pHs e forças iônicas, de acordo com o proposto no item 3.7. Os resultados obtidos

foram estatisticamente analisados pelo teste de análise de variância por postos de Kruskal-Wallis.

4.2.1 Efeito biofungicida em pH $\cong$ 5,0

Os resultados apresentados na Tabela 7 e na Figura 23 demonstram que houve diferença estatisticamente significativa entre os índices de inibição para os biofungicidas em pH $\cong$ 5,0 ($p < 0,05$). A partir da Tabela 7 é possível observar que existem evidências estatísticas de que os biofungicidas da série bi-quaternária são significativamente mais eficientes na inibição do fungo *Aspergillus flavus* em pH $\cong$ 5,0, isso porque tanto os valores da mediana, quanto mínimo e máximo foram superiores aos encontrados para os demais polímeros. É possível observar também que não há diferença na inibição entre as diferentes concentrações de cada polímero.

Tabela 7: Estatísticas descritivas dos índices de inibição dos polímeros em pH $\cong$ 5,0 para o fungo *A. flavus*.

Polímero	N	$\bar{x} \pm s$	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor P
QC-0,1	4	5,02 $\pm$ 1,20	5,01 ^E	3,37	6,67	<0,001
QC-0,5	4	4,95 $\pm$ 0,92	5,00 ^E	3,60	6,20	
QD-0,1	4	6,25 $\pm$ 0,83	6,30 ^E	5,10	7,30	
QD-0,5	4	7,53 $\pm$ 1,08	7,70 ^{DE}	5,90	8,80	
Q-Propil15-0,1	4	10,30 $\pm$ 1,14	9,90 ^D	9,20	12,20	
Q-Propil15-0,5	4	9,68 $\pm$ 1,01	9,85 ^D	8,10	10,90	
Q-Propil40-0,1	4	12,43 $\pm$ 1,08	12,45 ^{CD}	10,90	13,90	
Q-Propil40-0,5	4	15,3 $\pm$ 0,58	15,20 ^C	14,60	16,20	
Q-Pentil30-0,1	4	23,5 $\pm$ 0,87	23,71 ^B	22,10	24,50	
Q-Pentil30-0,5	4	23,8 $\pm$ 0,98	23,95 ^B	22,50	24,80	
Q-Pentil65-0,1	4	28,47 $\pm$ 2,29	29,25 ^B	24,70	30,65	
Q-Pentil65-0,5	4	28,23 $\pm$ 1,53	28,46 ^B	25,87	30,12	
Q-BPHD15-0,1	4	32,84 $\pm$ 3,42	32,12 ^{AB}	29,43	37,72	
Q-BPHD15-0,5	4	29,64 $\pm$ 2,83	28,44 ^{AB}	27,23	34,44	
Q-BPHD25-0,1	4	35,63 $\pm$ 3,00	35,71 ^{AB}	31,67	39,45	
Q-BPHD25-0,5	4	41,03 $\pm$ 4,66	40,82 ^A	34,98	47,50	

*Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre as combinações biofungicidas a 0,05.

O pós teste de Dunn revela ainda que o derivado Q-Propil40-0,5 foi o que mais se destacou na série propil. A Figura 23 demonstra os valores individuais dos índices de inibição, comprovando que o biofungicida Q-BPHD25-0,5 foi o mais eficiente na inibição do fungo.

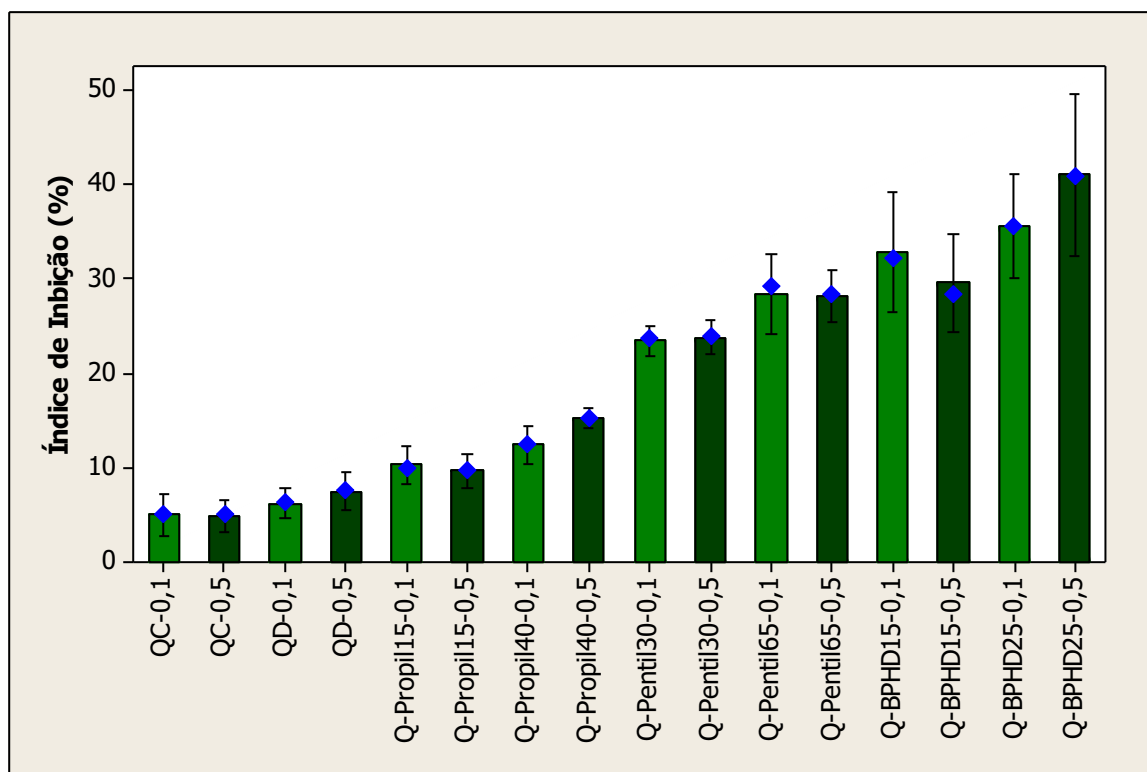


Figura 23: Gráfico de valores individuais dos índices de inibição dos polímeros em $\text{pH} \cong 5,0$. ($\blacklozenge$ = mediana)

A Figura 23 mostra a localização de cada valor dos índices de inibição. É possível visualizar que os maiores índices de inibição são provenientes dos derivados da série pentil, chegando a 40% de inibição. O símbolo ($\blacklozenge$) presente na Figura 23 representa a mediana, importante parâmetro para a compressão da distribuição dos valores de inibição nas repetições, isso porque ela permite inferir se os dados amostrais estão mais próximos aos valores de mínimo ou de máximo encontrados para os testes.

Os resultados obtidos mostram que a inibição dos fungos não foi alterada pela variação da concentração utilizada nos polímeros utilizados. Esses resultados estão de acordo com o estudo realizado por Rappussi-da-Silva (2006), envolvendo o efeito

de quitosana sobre o crescimento de *Guignardia citricarpa* em laranja pós-colheita, no qual a concentração das quitosanas não interfere diretamente na inibição do crescimento do fungo, em condições de $\text{pH} \cong 5,0$. Esses resultados estão de acordo ainda com o observado por Li e colaboradores (2011) no trabalho envolvendo a atividade fungicida de derivados de quitosana com diferentes massas moleculares sobre o microrganismo *Fulvia fulva*.

4.2.2 Efeito biofungicida em $\text{pH} \cong 6,0$

Os resultados dos ensaios microbiológicos em $\text{pH} \cong 6,0$ estão dispostos na Tabela 8 e Figura 24.

Tabela 8: Estatísticas descritivas dos índices de inibição dos polímeros em $\text{pH} \cong 6,0$ para o fungo *A. flavus*.

Polímero	N	$\bar{x} \pm s$	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor P
QC-0,1	4	$2,22 \pm 0,68$	$2,42^E$	1,15	2,87	<0,001
QC-0,5	4	$2,77 \pm 0,47$	$2,80^E$	2,11	3,39	
QD-0,1	4	$3,80 \pm 1,48$	$3,23^{DE}$	2,49	6,24	
QD-0,5	4	$2,17 \pm 1,18$	$2,65^E$	1,15	4,36	
Q-Propil15-0,1	4	$4,84 \pm 1,27$	$4,59^{BDE}$	1,98	5,28	
Q-Propil15-0,5	4	$4,58 \pm 1,43$	$4,03^{BDE}$	3,28	6,98	
Q-Propil40-0,1	4	$5,42 \pm 1,29$	$5,6^{BDE}$	3,45	7,01	
Q-Propil40-0,5	4	$5,85 \pm 1,20$	$6,4^{BDE}$	4,03	6,98	
Q-Pentil30-0,1	4	$7,62 \pm 1,18$	$7,37^{CD}$	6,34	9,38	
Q-Pentil30-0,5	4	$10,84 \pm 0,79$	$11,13^{BCD}$	9,54	11,56	
Q-Pentil65-0,1	4	$11,48 \pm 2,38$	$12,31^{CD}$	7,56	13,72	
Q-Pentil65-0,5	4	$7,25 \pm 1,31$	$7,12^{CD}$	5,54	9,23	
Q-BPHD15-0,1	4	$17,57 \pm 1,62$	$17,09^A$	15,89	20,22	
Q-BPHD15-0,5	4	$9,70 \pm 2,13$	$10,6B^{CD}$	5,79	11,81	
Q-BPHD25-0,1	4	$11,36 \pm 1,12$	$11,12^{BC}$	10,23	12,98	
Q-BPHD25-0,5	4	$9,33 \pm 0,81$	$9,19^{CD}$	8,35	10,59	

* Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre as combinações biofungicidas a 0,05.

Está evidente que nesse pH o fungo *A. flavus* se mostrou menos susceptível a ação fungicida da quitosana do que em $\text{pH} \cong 5,0$, isso porque, como é possível observar na Tabela 8, as medianas dos índices de inibição para os derivados de

quitosana não passam de 17%, embora exista diferença estatisticamente significativa entre os ensaios ($p < 0,05$).

A Figura 24 exibe os valores individuais dos índices de inibição, sendo possível observar que o derivado Q-BPHD15-0,1, foi destacadamente o mais eficiente na inibição. Os derivados da série pentil e os demais da série bi-quaternária se mostraram, no mínimo, três vezes mais eficientes do que a quitosana comercial e desacetilada.

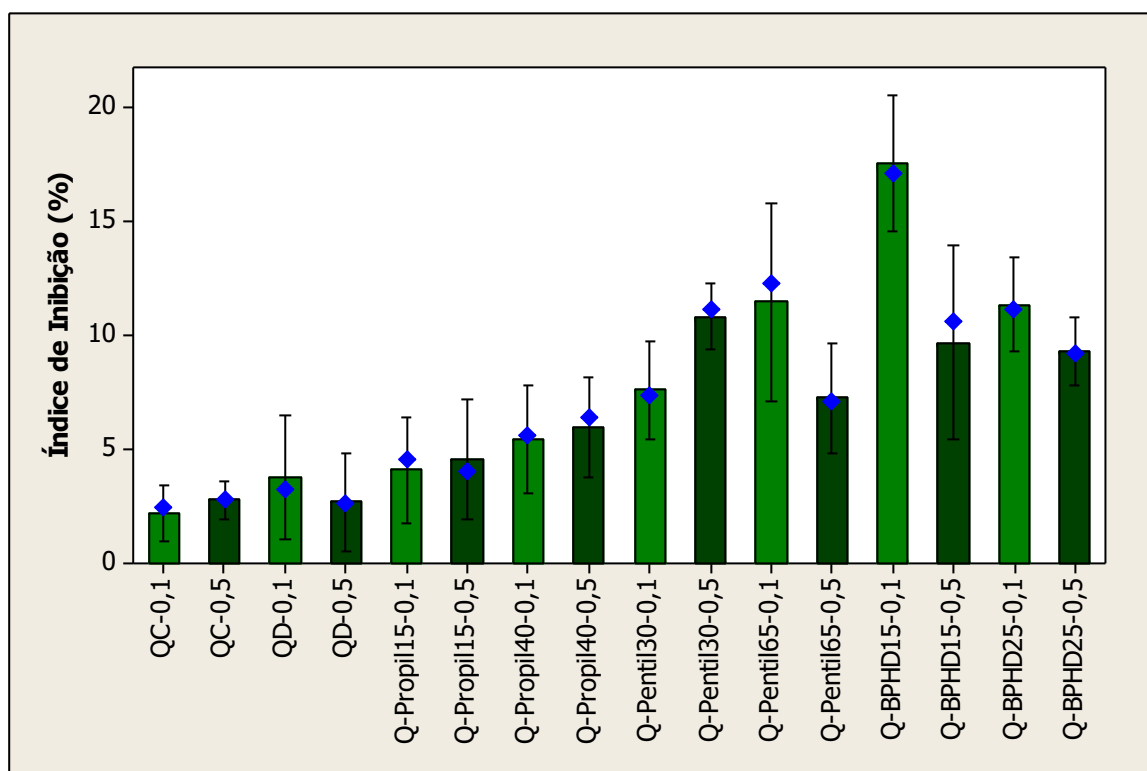


Figura 24: Gráfico de valores individuais dos índices de inibição dos polímeros em $\text{pH} \approx 6,0$. ($\blacklozenge$ = mediana)

Quando comparados com os resultados obtidos em $\text{pH} \approx 5,0$, esses índices de inibição indicam de que o fungo apresenta grande susceptibilidade à influência do pH. Esse resultado é esperado, uma vez que o desenvolvimento dos microrganismos é significativamente influenciado pela variação das condições físicas externas (MADIGAN, 2010). Além disso, é válido ressaltar que, as unidades monoméricas da quitosana que possuem grupamentos amino livres, estão menos

protonadas nesse pH, diminuindo assim a presença de cargas positivas, com consequente diminuição do efeito fungicida dos polímeros.

4.2.3 Efeito biofungicida em $I = 250 \text{ mmol L}^{-1}$ e $\text{pH} \approx 5,0$

Os resultados dos ensaios microbiológicos em $I = 250 \text{ mmol L}^{-1}$ estão dispostos na Tabela 9 e Figura 25. É possível observar que as quitosanas comercial e desacetilada não apresentaram diferença entre si na inibição fúngica. Todavia, os polímeros modificados foram significativamente eficientes no controle do fungo, como é possível notar na Figura 25. Entretanto é preciso atentar para o fato de que os derivados apresentam um padrão de inibição bastante irregular, impedindo assim correlacionar os efeitos do tipo e do grau substituição com o crescimento do microrganismo.

Tabela 9: Estatísticas descritivas dos índices de inibição dos polímeros em $I = 250 \text{ mmol L}^{-1}$ para o fungo *A. flavus*.

Polímero	N	$\bar{x} \pm s$	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor P
QC-0,1	4	$10,90 \pm 1,04$	11,30 ^D	9,2	11,8	<0,001
QC-0,5	4	$11,57 \pm 1,01$	11,97 ^D	9,87	12,48	
QD-0,1	4	$13,08 \pm 2,52$	14,32 ^D	8,76	14,92	
QD-0,5	4	$14,19 \pm 1,25$	14,06 ^D	12,65	15,98	
Q-Propil15-0,1	4	$25,53 \pm 2,88$	26,17 ^{BC}	21,22	28,53	
Q-Propil15-0,5	4	$17,73 \pm 1,49$	18,18 ^{DC}	15,29	19,27	
Q-Propil40-0,1	4	$31,08 \pm 1,17$	30,85 ^{AB}	29,87	32,76	
Q-Propil40-0,5	4	$32,64 \pm 1,35$	33,18 ^{AB}	30,4	33,8	
Q-Pentil30-0,1	4	$28,45 \pm 3,27$	29,29 ^{ABC}	23,26	31,97	
Q-Pentil30-0,5	4	$21,07 \pm 1,09$	21,14 ^C	19,63	22,36	
Q-Pentil65-0,1	4	$33,10 \pm 1,21$	32,86 ^A	31,82	34,87	
Q-Pentil65-0,5	4	$28,64 \pm 0,94$	28,45 ^B	27,54	30,12	
Q-BPHD15-0,1	4	$17,67 \pm 1,70$	18,07 ^{DC}	15,16	19,39	
Q-BPHD15-0,5	4	$23,42 \pm 6,17$	22,88 ^{ABCD}	15,27	32,63	
Q-BPHD25-0,1	4	$19,38 \pm 2,72$	18,34 ^C	16,87	23,98	
Q-BPHD25-0,5	4	$25,67 \pm 2,33$	25,17 ^{BC}	22,98	29,34	

*Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre as combinações biofungicidas a 0,05.

É possível notar ainda que, para a maioria dos derivados, o aumento da concentração de 0,1 para 0,5 g L^{-1} não alterou significativamente os índices de inibição.

Como mencionado anteriormente, a irregularidade dos resultados em presença de alta concentração de íons, está de acordo com o esperado, uma vez que o desenvolvimento dos fungos é influenciado pela variação das condições físicas externas. Ou seja, nessas condições adversas, o microrganismo sofre efetivamente a influência da força iônica, diminuindo assim o efeito fungicida dos derivados de quitosana.

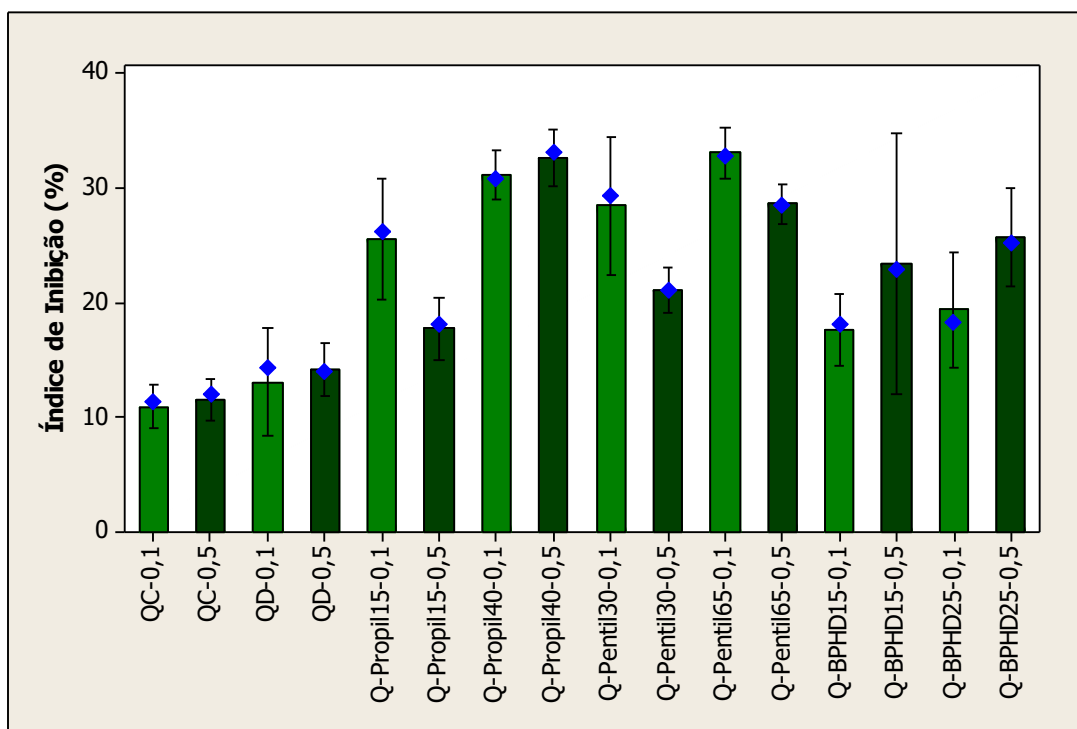


Figura 25: Gráfico de valores individuais dos índices de inibição dos polímeros em $I = 250 \text{ mmol L}^{-1}$. (♦ = mediana)

A Figura 25 exibe os valores individuais da mediana para os índices de inibição do fungo *A. flavus* em $I = 250 \text{ mmol L}^{-1}$, evidenciando o efeito da força iônica sobre os resultados de inibição. É possível observar também que o derivado Q-BPHD15-0,1 apresentou uma barra de erro grande, impedindo assim se obter qualquer conclusão a respeito desse polímero.

Esse resultado pode ser explicado, além da dinâmica de adaptação celular, pelo fato que os íons sódio em altas concentrações no meio podem diminuir o efeito fungicida da quitosana pela competição dos íons positivos com as cargas negativas das paredes e membranas celulares, impedindo assim a otimização da interação

quitosana-alvo (KONG et al., 2010). Por isso, é fato presumir que o efeito fungicida da quitosana é mais importante do que o efeito da concentração de sódio em força iônica mais baixa.

4.2.4 Efeito biofungicida em $I = 500 \text{ mmol L}^{-1}$ e $\text{pH} \cong 5,0$

Os resultados dos ensaios microbiológicos em $I = 500 \text{ mmol L}^{-1}$ estão dispostos na Tabela 10 e Figura 26.

Tabela 10: Estatísticas descritivas dos índices de inibição dos polímeros em $I = 500 \text{ mmol L}^{-1}$ para o fungo *A. flavus*.

Polímero	N	$\bar{x} \pm s$	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor P
QC-0,1	4	$2,78 \pm 0,77$	2,74 ^D	1,76	3,87	<0,001
QC-0,5	4	$3,28 \pm 1,92$	3,33 ^D	1,02	5,45	
QD-0,1	4	$4,17 \pm 1,19$	4,05 ^D	2,86	5,72	
QD-0,5	4	$4,85 \pm 1,08$	5,01 ^D	3,38	6,02	
Q-Propil15-0,1	4	$16,22 \pm 2,73$	15,76 ^B	13,07	20,3	
Q-Propil15-0,5	4	$17,07 \pm 1,42$	16,56 ^B	15,73	19,45	
Q-Propil40-0,1	4	$9,27 \pm 0,35$	9,28 ^C	8,76	9,76	
Q-Propil40-0,5	4	$8,11 \pm 0,53$	8,17 ^C	7,34	8,76	
Q-Pentil30-0,1	4	$21,73 \pm 1,49$	22,01 ^B	19,43	23,49	
Q-Pentil30-0,5	4	$17,75 \pm 1,16$	17,71 ^B	16,23	19,34	
Q-Pentil65-0,1	4	$21,53 \pm 2,07$	22,01 ^B	18,24	23,87	
Q-Pentil65-0,5	4	$18,73 \pm 1,83$	17,89 ^B	17,29	21,83	
Q-BPHD15-0,1	4	$14,18 \pm 6,97$	12,91 ^{BCD}	5,86	25,06	
Q-BPHD15-0,5	4	$19,75 \pm 3,21$	19,68 ^B	15,31	24,33	
Q-BPHD25-0,1	4	$30,98 \pm 2,47$	31,11 ^A	27,83	33,87	
Q-BPHD25-0,5	4	$34,80 \pm 0,77$	34,88 ^A	33,64	35,81	

*Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre as combinações biofungicidas a 0,05.

Os derivados, excetuando-se Q-Propil40-0,1, Q-Propil40-0,5 e Q-BPHD15-0,1, são significativamente mais eficientes na inibição fúngica do que as quitosanas comercial e desacetilada. Além disso, é possível notar ainda uma tênue tendência da concentração 0,1 g L⁻¹ em apresentar maior inibição para os derivados quitosana.

A Figura 26 exibe os valores individuais dos índices de inibição, comprovando a eficiência dos derivados frente às quitosanas comercial e desacetilada.

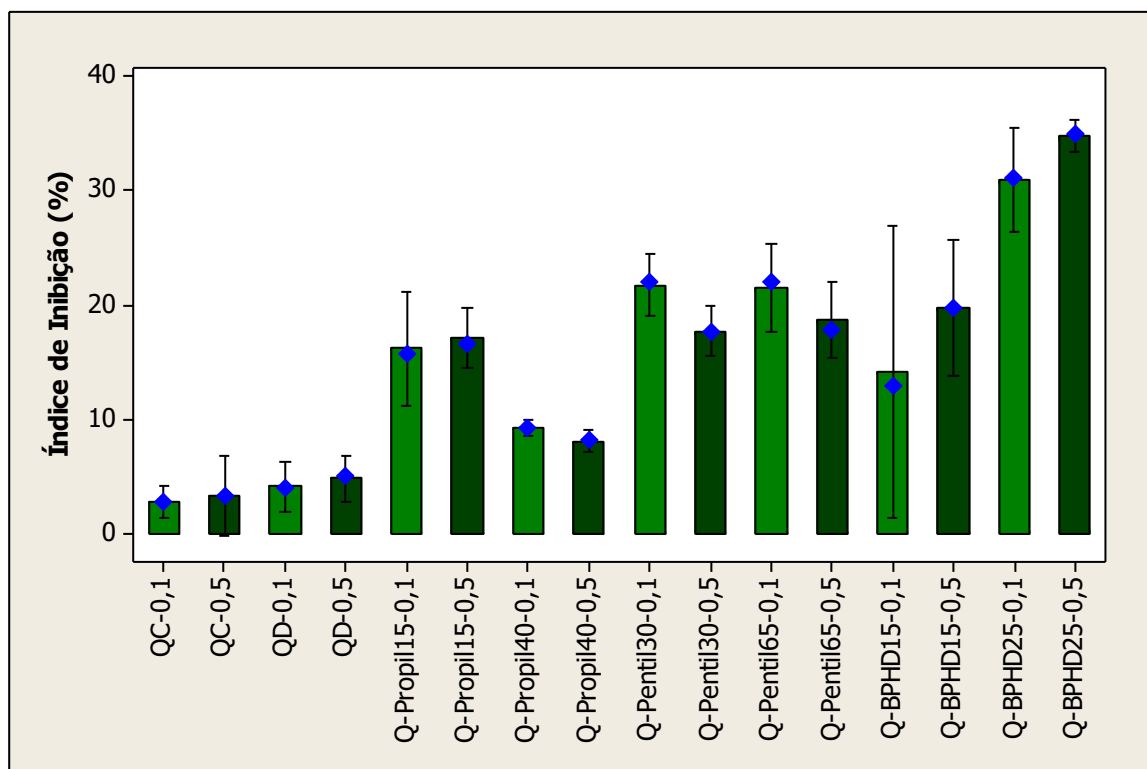


Figura 26: Gráfico de valores individuais dos índices de inibição dos polímeros em $I = 500 \text{ mmol L}^{-1}$. (♦ = mediana)

Fica evidente que os derivados da série bi-quaternária, substituídos com 25% de BPHD, se mostraram mais eficientes na inibição fúngica, sendo o derivado Q-BPHD25-0,5 até 17 vezes mais eficiente do que a quitosana comercial.

Era de se esperar que, em condições de força iônica maiores, o efeito sinérgico do fungicida associado com a presença de excesso de íons aumentasse a inibição. Isso porque, os íons em excesso podem desestabilizar o mecanismo celular de manutenção da pressão osmótica. No entanto, como mencionado anteriormente, em condições externas adversas, os microrganismos tendem a alterar o seu metabolismo celular a fim de se adaptarem (MADIGAN, 2010). Além disso, a parede celular de cada tipo de microrganismo possui funções específicas que visam à adaptação celular as condições do meio externo (MADIGAN, 2010). Sendo assim, a dinâmica celular de crescimento é característica de cada microrganismo.

4.2.5 Concentração mínima inibitória (MIC)

Como mencionado anteriormente a MIC pode ser definida como a menor concentração em que não há o crescimento do microrganismo. A MIC encontrada para os biofungicidas variou entre 0,5 e 4 g L⁻¹ (Tabela 11). No período de crescimento de 48 horas, mais comumente encontrado na literatura (MASOKO et al., 2005; TYAGI e MALIK, 2011; KUMAR, 2012; RAJ, et al., 2012), a série de derivados pentil e o derivado Q-Propil40 apresentaram as menores concentrações inibitórias (1 g L⁻¹). Para o período de 72 horas a menor MIC encontrada foi para o derivado Q-Pentil65 (1 g L⁻¹).

Tabela 11: Determinação da MIC para o fungo *A. flavus*.

	MIC (g/L)		
	24 horas	48 horas	72 horas
QC	4,0	4,0	4,0
QD	4,0	4,0	4,0
Q-Propil15	0,5	2,0	4,0
Q-Propil40	0,5	1,0	2,0
Q-Pentil30	0,5	1,0	2,0
Q-Pentil65	0,5	1,0	1,0
Q-BPHD15	2,0	2,0	2,0
Q-BPHD25	1,0	1,0	2,0

Os resultados da MIC para o fungo *A. flavus* confirmam que os derivados quaternários de quitosana sintetizados apresentaram eficiência crescente na inibição do fungo de acordo com o grau de quaternização do polímero (DE OLIVEIRA PEDRO, et al., 2013). Como pode ser visto na Tabela 11, nas primeiras 48 horas, os derivados Q-Propil40, Q-Pentil30 e Q-Pentil65 inibiram completamente o crescimento do fungo na concentração de 1,0 g L⁻¹, sendo essa concentração 4 vezes menor do que a necessária para a quitosana comercial e desacetilada. Após 72 horas, o derivado Q-Pentil65 apresentou a MIC de 1,0 g L⁻¹ enquanto que a MIC para as quitosanas comercial e desacetilada foi de 4,0 g L⁻¹, sendo esse valor compatível à literatura, cuja faixa pode ser de 0,01 a 5,0 g L⁻¹, variando de acordo com a massa molecular da quitosana, do grau de acetilação e do tipo de fungo

(SAJOMSANG et al., 2012). Os derivados da série bi-quaternária apresentaram MIC duas vezes menor que a quitosana desacetilada.

As MICs para os derivados quaternários diminuíram com o grau de substituição, o que pode ser explicado com base nas interações desses grupos com a superfície da parede celular carregada negativamente. O aumento do grau de substituição promove um aumento nas interações polímero-parede celular, promovendo assim rompimento celular ou impedimento de entrada de nutrientes (GUO et al., 2008; YANG et al., 2005).

4.2.6 Variação do índice de inibição com a concentração para as diferentes condições testadas

A Figura 27 mostra a variação do índice de inibição com a concentração para todas as diferentes condições testadas contra o fungo *A. flavus*. Fica evidente o aumento da inibição com o aumento da densidade de cargas positivas para os derivados nos diferentes pHs. É possível observar também que os resultados para a força iônica exibem padrão irregular no índice de inibição.

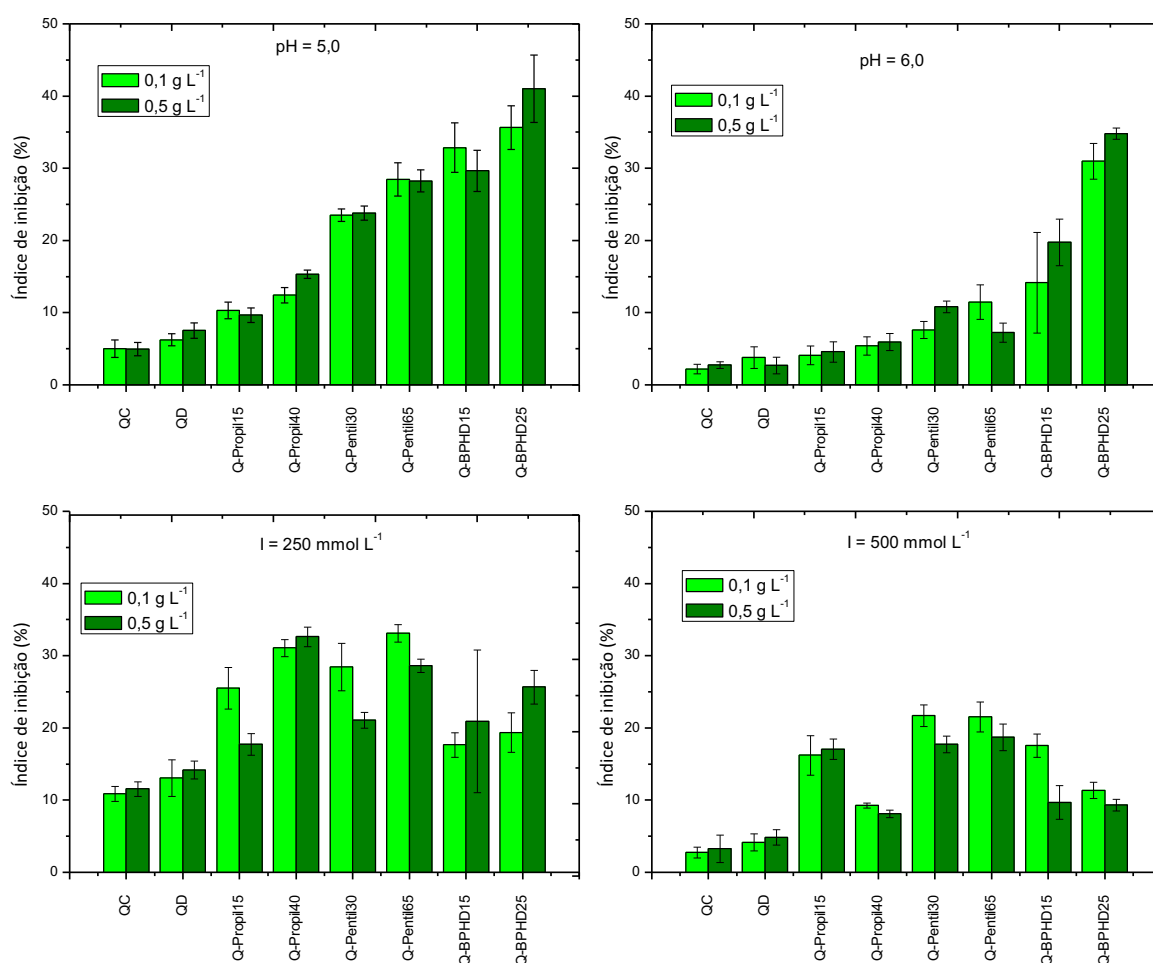


Figura 27: Variação do índice de inibição com a concentração para as diferentes condições testadas.

4.3 Efeito biofungicida dos derivados de quitosana contra o fungo *Aspergillus parasiticus*

Nessa etapa do trabalho foram realizados estudos de inibição do crescimento e determinação da concentração inibitória mínima (MIC) para *A. parasiticus*, envolvendo a aplicação das quitosanas comercial, desacetilada e dos derivados, em diferentes pHs e forças iônicas, de acordo com o proposto no item 3.7. Os resultados obtidos foram estatisticamente analisados pelo teste de análise de variância por postos de Kruskal-Wallis.

4.3.1 Efeito biofungicida em pH $\cong$ 5,0

Os resultados de inibição do fungo *A. parasiticus* em pH $\cong$ 5,0 estão dispostos na Tabela 12 e na Figura 28, os quais mostram claramente que houve diferença estatisticamente significativa entre os biofungicidas ($p < 0,05$). Existe um padrão evidente na inibição dos derivados de quitosana em relação à concentração, isso porque em concentrações de 0,5 g L⁻¹ todos os derivados foram mais eficientes na inibição.

Tabela 12: Estatísticas descritivas dos índices de inibição dos polímeros em pH $\cong$ 5,0 para o fungo *A. parasiticus*.

Polímero	n	$\bar{x} \pm s$	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor P
QC-0,1	4	5,23 $\pm$ 0,40	5,18 ^E	4,8	5,76	<0,001
QC-0,5	4	5,66 $\pm$ 0,68	5,49 ^E	4,72	6,92	
QD-0,1	4	6,53 $\pm$ 0,38	6,56 ^E	6,12	6,87	
QD-0,5	4	8,58 $\pm$ 1,96	8,71 ^E	6,11	10,81	
Q-Propil15-0,1	4	19,11 $\pm$ 2,93	19,71 ^D	15,09	21,91	
Q-Propil15-0,5	4	27,10 $\pm$ 2,64	27,45 ^D	23,58	29,95	
Q-Propil40-0,1	4	20,06 $\pm$ 2,51	20,21 ^D	16,9	22,92	
Q-Propil40-0,5	4	34,99 $\pm$ 3,93	33,66 ^C	31,92	40,71	
Q-Pentil30-0,1	4	26,84 $\pm$ 2,60	26,54 ^D	24,03	30,25	
Q-Pentil30-0,5	4	38,55 $\pm$ 2,27	38,13 ^C	36,62	41,32	
Q-Pentil65-0,1	4	20,8 $\pm$ 2,13	20,77 ^D	18,42	23,58	
Q-Pentil65-0,5	4	25,36 $\pm$ 3,19	24,94 ^D	22,06	29,49	
Q-BPHD15-0,1	4	41,76 $\pm$ 1,80	41,20 ^C	39,5	44,01	
Q-BPHD15-0,5	4	48,66 $\pm$ 2,44	48,66 ^B	45,51	51,82	
Q-BPHD25-0,1	4	51,35 $\pm$ 1,96	51,59 ^B	48,65	53,54	
Q-BPHD25-0,5	4	58,71 $\pm$ 3,03	58,41 ^A	55,56	62,46	

*Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre as combinações biofungicidas a 0,05.

É possível notar a partir da Figura 28 que os derivados da série bi-quaternária foram os mais eficientes na inibição do fungo em pH $\cong$ 5,0, sobretudo o derivado Q-BPHD25-0,5. Esta observação está em acordo com a proposição de que o aumento da densidade de cargas positivas favorece a inibição do fungo, uma vez que esse derivado possui duas cargas positivas permanentes na sua estrutura.

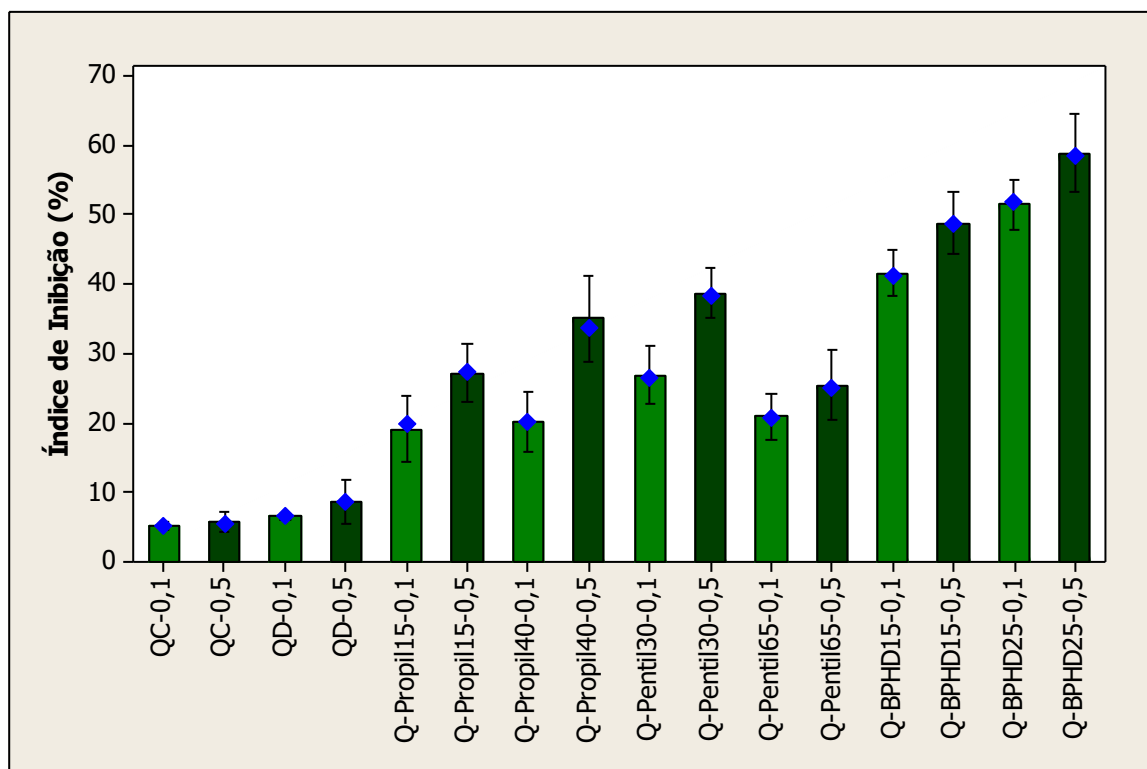


Figura 28: Gráfico de valores individuais dos índices de inibição dos polímeros em $\text{pH} \approx 5,0$. ($\blacklozenge$ = mediana)

4.3.2 Efeito biofungicida em $\text{pH} \approx 6,0$

A Tabela 13 mostra que o efeito do $\text{pH} \approx 6,0$ sobre a inibição é muito pronunciado, haja vista que, excetuando-se os derivados da série bi-quaternária, todos os biofungicidas são estatisticamente semelhantes (todos, exceto a série bi-quaternária, apresentam a letra “A” na tabela). Isso indica que a variação do pH é mais importante no desenvolvimento desse microrganismo do que a presença dos biofungicidas.

A Figura 29 exibe os valores individuais para as medianas em $\text{pH} \approx 6,0$. Os resultados observados para a série bi-quaternária fogem ao padrão dos demais biofungicidas, sendo os valores do índice de inibição negativos. Isso indica que, como mencionado anteriormente, para tais polímeros, a condição de $\text{pH} \approx 6,0$ se mostra mais importante. Por outro lado, os resultados para os demais derivados estão de acordo com o trabalho de Tsai e colaboradores (2002) envolvendo

quitosanas de massa molecular diferentes, no qual foi observado que em $\text{pH} \cong 6,0$ não há diferença na inibição do *A. parasiticus*.

Tabela 13: Estatísticas descritivas dos índices de inibição dos polímeros em $\text{pH} \cong 6,0$ para o fungo *A. parasiticus*.

Polímero	N	$\bar{x} \pm s$	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor P
QC-0,1	4	$11,53 \pm 4,09$	$11,56^{\text{AB}}$	6,78	16,2	0,024
QC-0,5	4	$11,11 \pm 1,43$	$10,57^{\text{B}}$	9,88	13,39	
QD-0,1	4	$13,88 \pm 2,52$	$13,25^{\text{AB}}$	11,42	17,61	
QD-0,5	4	$15,94 \pm 3,68$	$15,64^{\text{AB}}$	9,31	19,58	
Q-Propil15-0,1	4	$13,94 \pm 3,52$	$12,61^{\text{AB}}$	9,17	17,75	
Q-Propil15-0,5	4	$15,63 \pm 1,87$	$16,20^{\text{AB}}$	12,6	17,5	
Q-Propil40-0,1	4	$15,99 \pm 1,08$	$16,26^{\text{A}}$	14,28	17,19	
Q-Propil40-0,5	4	$16,18 \pm 1,09$	$15,85^{\text{A}}$	15,1	17,9	
Q-Pentil30-0,1	4	$15,92 \pm 2,83$	$15,92^{\text{AB}}$	11,99	19,86	
Q-Pentil30-0,5	4	$17,15 \pm 2,47$	$18,35^{\text{AB}}$	12,92	19,01	
Q-Pentil65-0,1	4	$19,64 \pm 3,86$	$20,21^{\text{AB}}$	13,95	24,36	
Q-Pentil65-0,5	4	$20,98 \pm 2,45$	$21,80^{\text{A}}$	16,89	23,42	
Q-BPHD15-0,1	4	$-18,58 \pm 2,07$	$-19,06^{\text{D}}$	-20,86	-15,36	
Q-BPHD15-0,5	4	$-5,51 \pm 4,32$	$-7,38^{\text{C}}$	-9,02	1,73	
Q-BPHD25-0,1	4	$-21,78 \pm 1,95$	$-21,38^{\text{D}}$	-24,75	-19,53	
Q-BPHD25-0,5	4	$-12,5 \pm 1,84$	$-11,95^{\text{D}}$	-15,48	-10,61	

* Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre as combinações biofungicidas a 0,05.

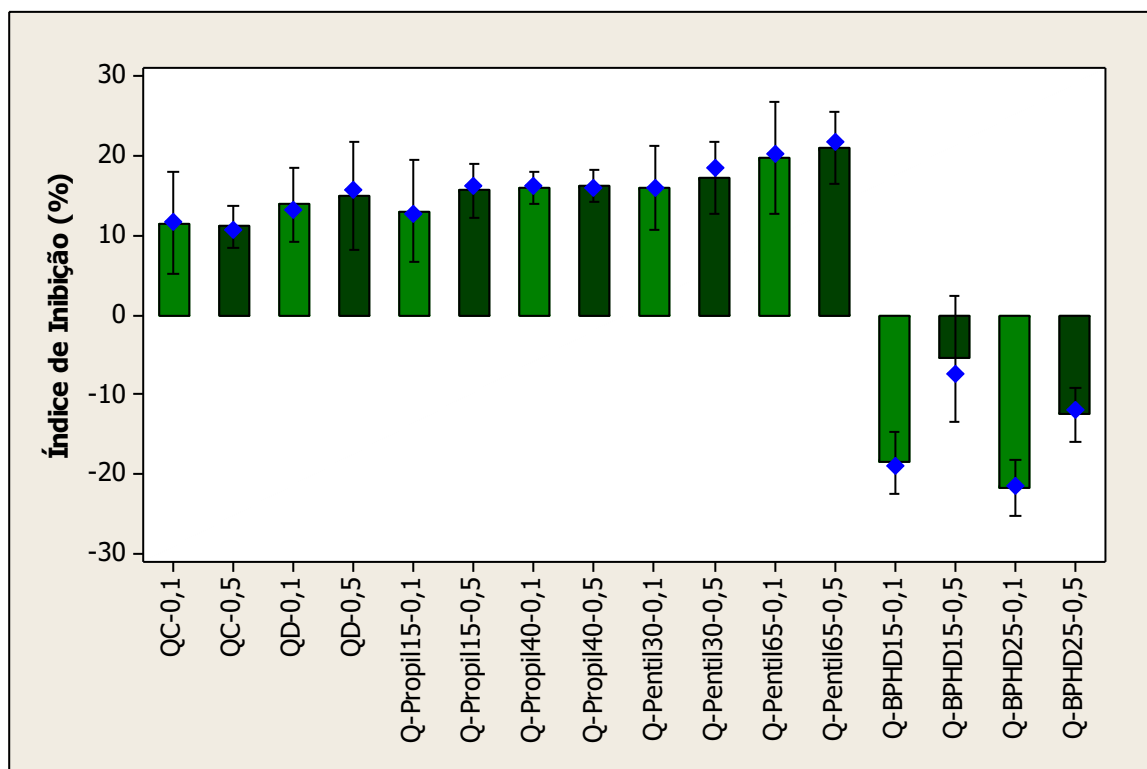


Figura 29: Gráfico de valores individuais dos índices de inibição dos polímeros em $\text{pH} \approx 6,0$. ($\blacklozenge$ = mediana)

4.3.3 Efeito biofúngica em $I = 250 \text{ mmol L}^{-1}$ e $\text{pH} \approx 5,0$

Embora não exista um padrão evidente na relação entre as diferentes concentrações dos polímeros, os resultados de inibição em meio com força iônica de 250 mmol L^{-1} mostram que os derivados de quitosana são mais eficientes na inibição do fungo do que as quitosanas comercial e desacetilada, como é possível notar na Tabela 14 e Figura 30, destacando-se, sobretudo, a série bi-quaternária.

Tabela 14: Estatísticas descritivas dos índices de inibição dos polímeros em $I = 250 \text{ mmol L}^{-1}$ para o fungo *A. parasiticus*.

Polímero	N	$\bar{x} \pm s$	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor P
QC-0,1	4	$6,94 \pm 1,02$	$6,69^E$	5,93	8,44	<0,001
QC-0,5	4	$6,85 \pm 1,16$	$6,94^E$	5,29	8,22	
QD-0,1	4	$7,10 \pm 1,74$	$7,96^E$	4,13	8,35	
QD-0,5	4	$8,75 \pm 0,69$	$8,98^E$	7,65	9,38	
Q-Propil15-0,1	4	$20,64 \pm 2,44$	$20,87^{BC}$	17,74	23,09	
Q-Propil15-0,5	4	$18,13 \pm 1,26$	$18,27^C$	16,26	19,72	
Q-Propil40-0,1	4	$18,43 \pm 3,38$	$17,05^{BC}$	16,21	23,39	
Q-Propil40-0,5	4	$18,78 \pm 0,66$	$18,99^C$	17,75	19,38	
Q-Pentil30-0,1	4	$20,23 \pm 3,07$	$19,80^{BC}$	16,67	24,66	
Q-Pentil30-0,5	4	$23,63 \pm 1,44$	$24,18^B$	21,26	24,9	
Q-Pentil65-0,1	4	$12,60 \pm 2,50$	$13,70^{DE}$	8,35	14,65	
Q-Pentil65-0,5	4	$13,77 \pm 1,24$	$14,18^D$	11,76	14,93	
Q-BPHD15-0,1	4	$21,36 \pm 3,05$	$20,57^{BC}$	18,20	26,10	
Q-BPHD15-0,5	4	$39,53 \pm 1,94$	$39,71^A$	36,78	41,92	
Q-BPHD25-0,1	4	$44,82 \pm 2,01$	$45,20^A$	41,75	47,14	
Q-BPHD25-0,5	4	$45,32 \pm 2,51$	$44,45^A$	43,09	49,33	

* Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre as combinações biofungicidas a 0,05.

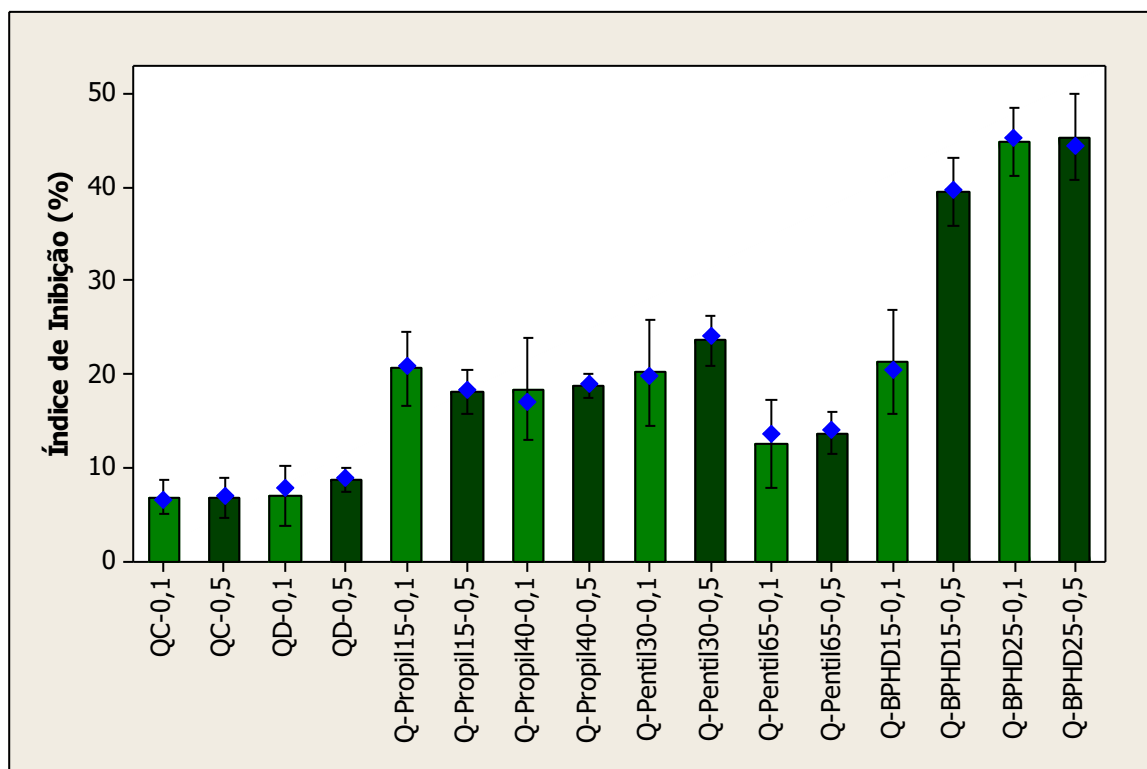


Figura 30: Gráfico de valores individuais dos índices de inibição dos polímeros em $I = 250 \text{ mmol L}^{-1}$. (♦ = mediana)

4.3.4 Efeito biofungicida em $I = 500 \text{ mmol L}^{-1}$ e $\text{pH} \cong 5,0$

Os resultados de inibição para o fungo *A. parasiticus* em força iônica 500 mmol L^{-1} estão dispostos na Tabela 15 e Figura 31. É possível notar claramente que o derivado Q-BPHD25-0,5 foi o mais eficiente. Os derivados Q-Propil15-0,1 e Q-Propil15-0,5 possuem índices de inibição semelhantes à quitosana comercial e desacetilada. Nota-se ainda que, excetuando-se a série bi-quaternária, não existe relação estatisticamente significativa entre as concentrações, ou seja, elas não influenciam diretamente a inibição nessa condição de força iônica.

Tabela 15: Estatísticas descritivas dos índices de inibição dos polímeros em $I = 500 \text{ mmol L}^{-1}$ para o fungo *A. parasiticus*.

Polímero	N	$\bar{x} \pm s$	Mediana	Mínimo	Máximo	Valor P
QC-0,1	4	$11,64 \pm 2,69$	11,96 ^E	8,33	14,29	<0,001
QC-0,5	4	$11,36 \pm 0,68$	11,50 ^E	10,28	12,14	
QD-0,1	4	$16,39 \pm 1,38$	16,20 ^D	14,98	18,2	
QD-0,5	4	$13,78 \pm 2,69$	14,23 ^{DE}	10,02	16,67	
Q-Propil15-0,1	4	$9,40 \pm 3,01$	9,40 ^E	5,81	13	
Q-Propil15-0,5	4	$15,09 \pm 2,04$	15,47 ^{DE}	12,14	17,28	
Q-Propil40-0,1	4	$36,98 \pm 3,19$	37,84 ^B	32,02	40,21	
Q-Propil40-0,5	4	$27,69 \pm 1,45$	27,67 ^C	25,68	29,75	
Q-Pentil30-0,1	4	$27,18 \pm 4,66$	26,60 ^{BCD}	22,17	33,33	
Q-Pentil30-0,5	4	$28,75 \pm 2,33$	27,93 ^{BC}	26,47	32,65	
Q-Pentil65-0,1	4	$16,06 \pm 2,59$	16,82 ^{DE}	12,04	18,56	
Q-Pentil65-0,5	4	$19,49 \pm 2,24$	19,05 ^D	16,82	23,02	
Q-BPHD15-0,1	4	$30,23 \pm 2,10$	30,27 ^{BC}	27,33	33,06	
Q-BPHD15-0,5	4	$44,36 \pm 1,54$	43,78 ^A	42,93	46,93	
Q-BPHD25-0,1	4	$35,57 \pm 2,39$	35,61 ^B	32,16	38,89	
Q-BPHD25-0,5	4	$51,01 \pm 2,92$	51,77 ^A	46,46	54,04	

* Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa entre as combinações biofungicidas a 0,05.

A Figura 31 exibe os valores individuais para as medianas em $I = 500 \text{ mmol L}^{-1}$, sendo possível observar que a série bi-quaternária se destaca entre as demais. É válido ressaltar que o fungo não apresenta padrão regular crescimento em relação a variação do biofungicidas. Esse fato está relacionado com a presença de altas concentrações de sais, uma vez que, nessas condições de estresse físico, há uma tentativa de adaptação do microrganismo as condições externas, o que promove alterações no seu metabolismo, com consequente alteração do seu desenvolvimento.

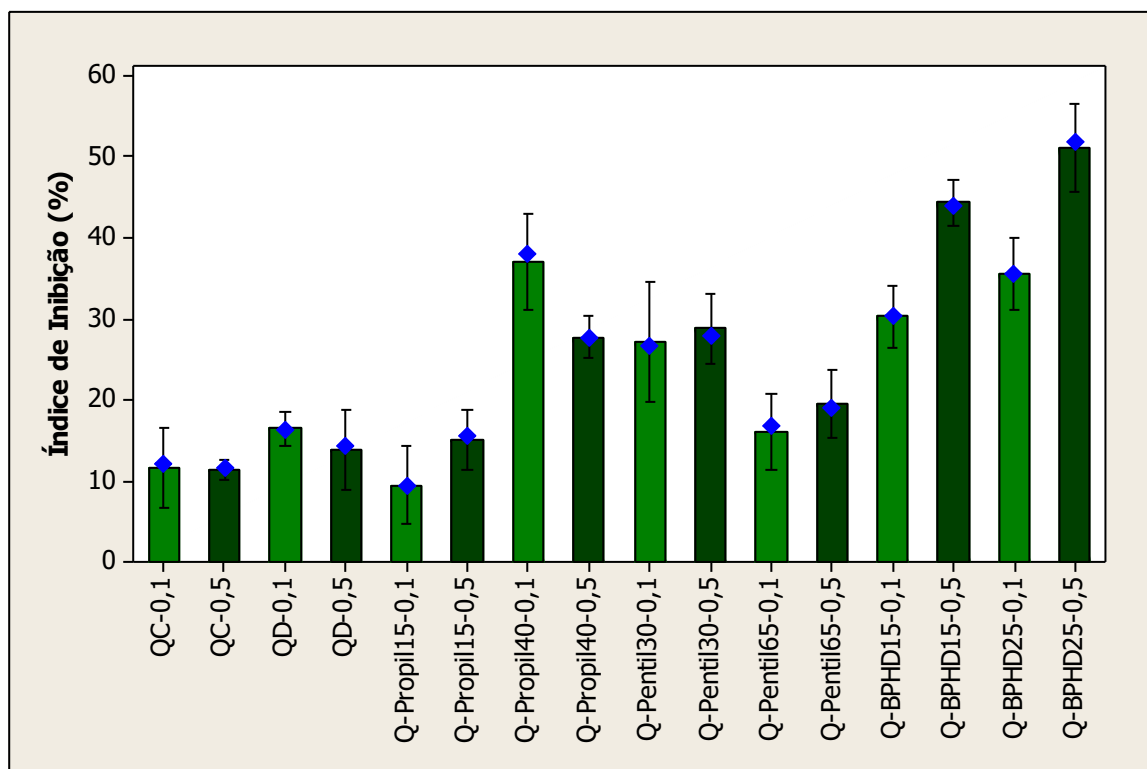


Figura 31: Gráfico de valores individuais dos índices de inibição dos polímeros em $I = 500 \text{ mmol L}^{-1}$. (♦ = mediana)

4.3.5 Concentração mínima inibitória (MIC)

A MIC pode ser definida como a menor concentração em que não há o crescimento do microrganismo. Para o fungo *A. parasiticus* a MIC encontrada para os biofungicidas variou entre 2,0 e 4 g L⁻¹ (Tabela 16).

Tabela 16: Determinação da MIC para o fungo *A. parasiticus*.

	MIC (g/L)		
	24 horas	48 horas	72 horas
QC	>4,0	>4,0	>4,0
QD	4,0	4,0	>4,0
Q-Propil15	2,0	2,0	>4,0
Q-Propil40	2,0	2,0	4,0
Q-Pentil30	2,0	4,0	4,0
Q-Pentil65	2,0	2,0	2,0
Q-BPHD15	2,0	2,0	2,0
Q-BPHD25	2,0	2,0	2,0

Os resultados da MIC para o fungo *A. flavus* confirmam que os derivados quaternários e bi-quaternários de quitosana sintetizados apresentaram eficiência na inibição do fungo. Como pode ser visto na tabela anterior, a MIC para os derivados de quitosana é no mínimo duas vezes menor do que aquela encontrada para as quitosanas comercial e desacetilada. Esses resultados estão de acordo com o observado na literatura (SAJOMSANG et al., 2012).

4.3.6 Variação do índice de inibição com a concentração para as diferentes condições testadas

É possível observar na Figura 32 que os índices de inibição apresentam destacado potencial fungicida em pH = 5,0. Enquanto que o padrão de inibição para as diferentes forças iônicas se repetem. Fica evidente também que, exceto em pH = 6,0, o derivado Q-BPHD25 é o mais eficiente na inibição para todas as condições testadas.

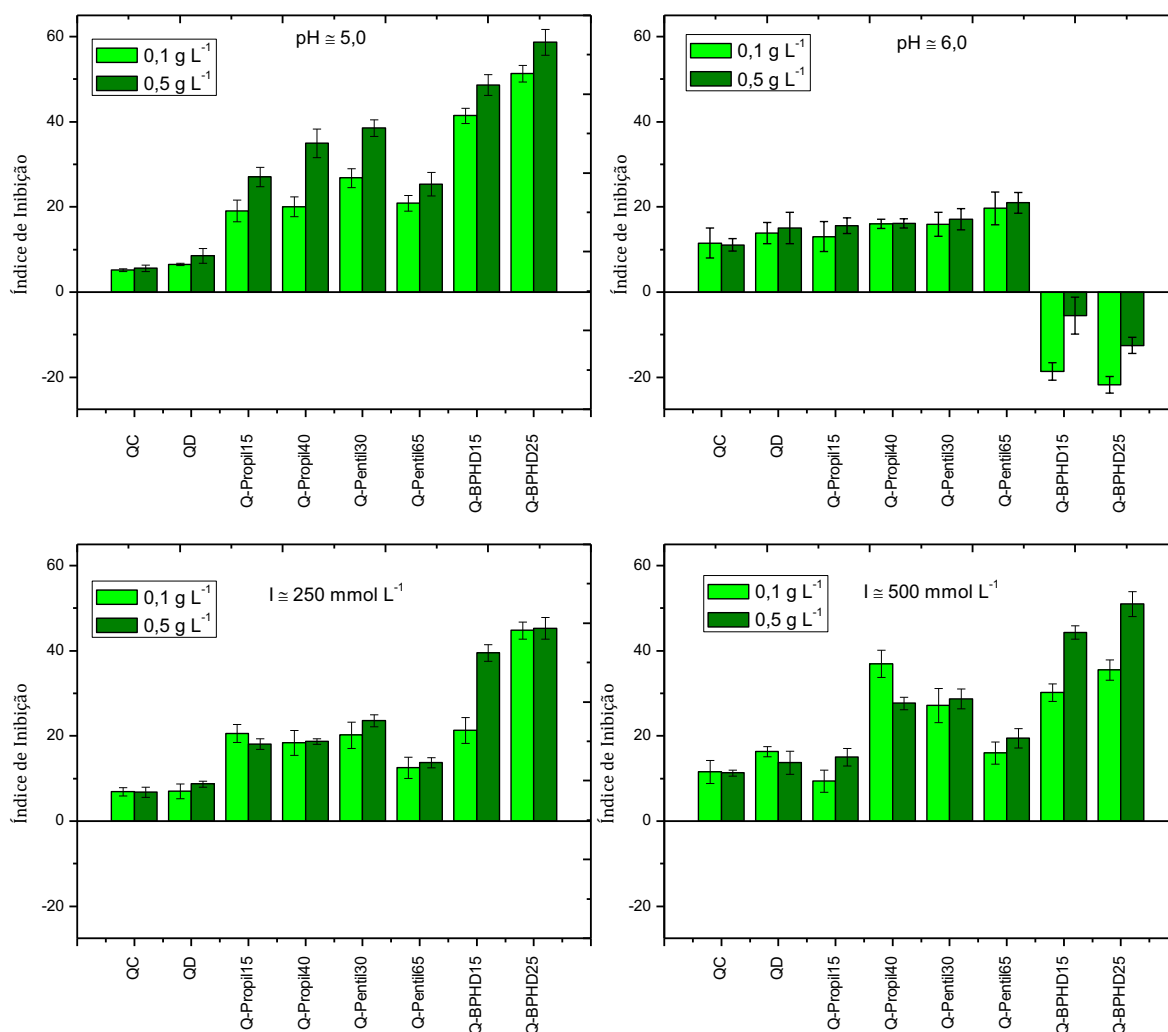


Figura 32: Variação do índice de inibição com a concentração para as diferentes condições testadas.

4.4 Efeito da quitosana sobre o período de crescimento do fungo

Como mencionado anteriormente, o mecanismo mais aceito para a ação da quitosana como biofungicida é o rompimento das membranas do microrganismo pelas interações eletrostáticas entre quitosana e essas organelas. Para entender o mecanismo de ação da quitosana, o comportamento do fungo a nível microscópico foi observado. As hifas de fungos saudáveis e de fungos que cresceram na presença de quitosana desacetilada foram fotografadas no microscópio óptico com aumento de 40x e comparadas. As fotografias são apresentadas na Figura 33.

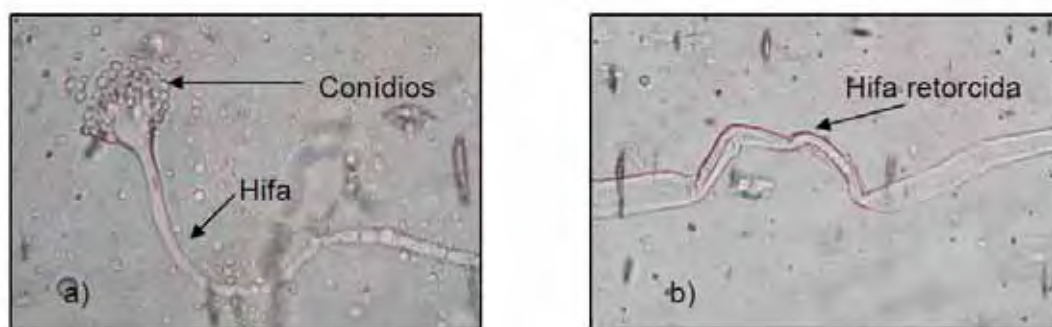


Figura 33: a) Hifa do fungo *A. flavus* saudável e b) Hifa retorcida pela ação da quitosana desacetilada.

De acordo com a Figura 33, existem indícios de que a quitosana atuou sobre a parede celular da hifa fúngica desestruturando-a, o que, por sua vez, reduz a atividade metabólica do microrganismo podendo levá-lo à morte. Nesse experimento não houve a alteração da força iônica, sendo a retorção observada na hifa originária exclusivamente da ação da quitosana.

A Figura 34 demonstra o desenvolvimento das colônias de *A. parasiticus* após cinco dias de crescimento na presença dos derivados de quitosana. É possível perceber que a série pentil apresenta os menores tamanhos de colônia. Outro fato que deve ser observado é a aparência dos fungos. Além da diferente coloração, as cepas de *A. parasiticus* que se desenvolveram nos derivados de quitosana apresentaram um crescimento vertical menos acentuado do que a testemunha. Isso permite inferir que os biofungicidas atuam também sobre o micélio fúngico, alterando a morfologia do microrganismo.

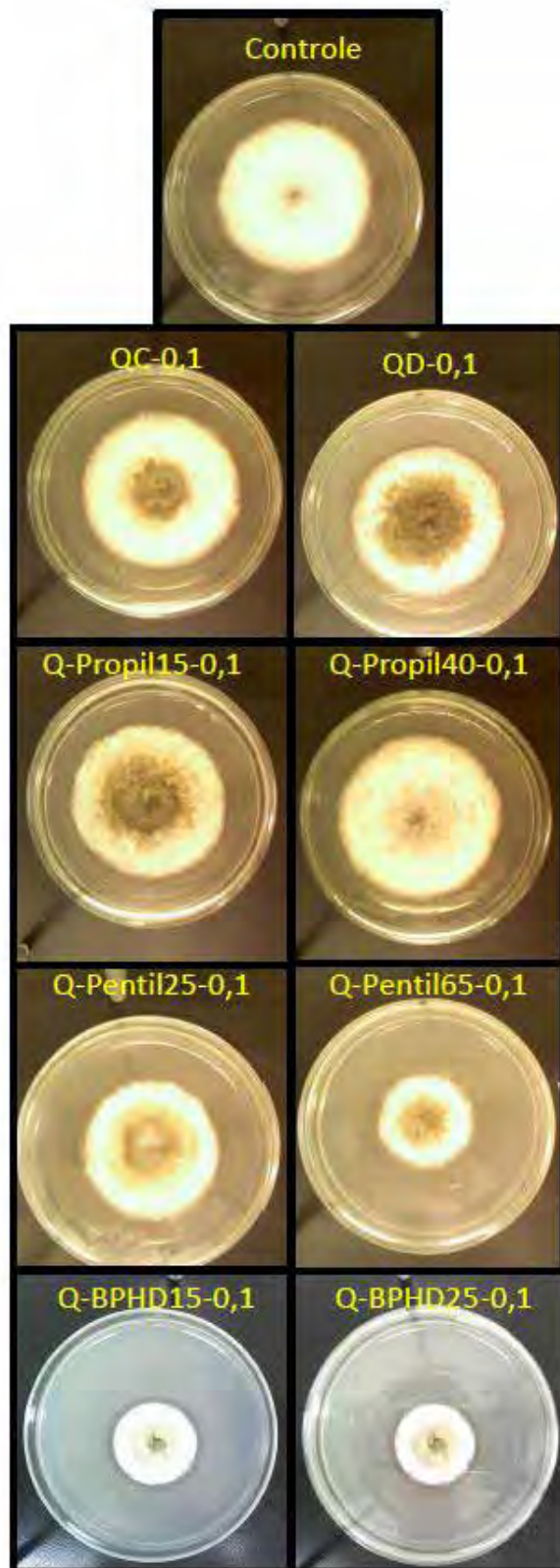


Figura 34: Comparativo entre o desenvolvimento das colônias de *A. parasiticus* em presença dos biofungicidas.

A microscopia de fluorescência revela que a Q-RODAMINA interage efetivamente com ambos os fungos, o que comprova que esse polímero tem a capacidade de interagir com membranas celulares, como pode ser observado nas imagens a seguir.

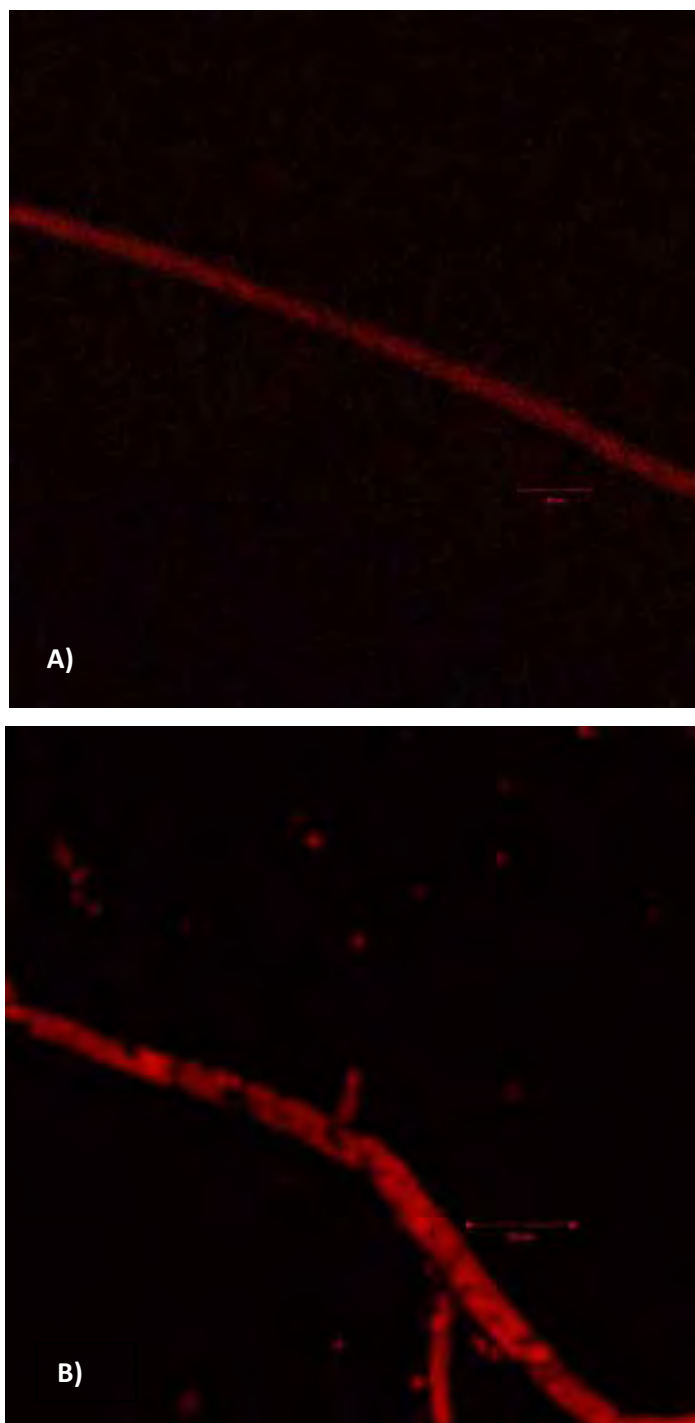


Figura 35: Imagem de microscopia de fluorescência para o A) *A. flavus* e B) *A. parasiticus* em presença de Q-RODAMINA.

5. CONCLUSÃO

Derivados quaternários de quitosana podem ser sintetizados e caracterizados para aplicação como biofungicidas contra os fungos *A. flavus* e *A. parasiticus*. As rotas de síntese empregadas permitiram a obtenção de polissacarídeos anfifílicos a partir de reações de substituição nucleofílica nos grupos amino da quitosana. Nessa etapa, o monitoramento do pH é um parâmetro importante para o controle do rendimento da reação. Os resultados de espectroscopia no infravermelho e de ressonância magnética nuclear de hidrogênio mostraram que os derivados propostos foram sintetizados com sucesso. Os graus de substituição podem ser controlados variando-se a relação entre o número de mols dos sais e da quitosana, permitindo assim o controle da composição do derivado.

O pH do meio tem um papel importante na inibição dos fungos, tendo sido observado que a condição de pH $\cong 5,0$ foi a mais eficiente na inibição de ambas as espécies. Isso pode ser atribuído à maior densidade de cargas nos derivados, que resulta da protonação dos grupos amino (substituídos ou não). Para o fungo *A. flavus*, o aumento da força iônica diminui a capacidade de inibição, o que se deve, provavelmente, à blindagem das cargas e, conseqüentemente, a um decréscimo na interação dos derivados com a parede celular do microrganismo. Além disso, a série bi-quaternária se mostrou mais eficiente na inibição em ambos os pHs testados, enquanto que a série pentil foi a quem mais se destacou entre as forças iônicas diferentes.

Os resultados obtidos pela técnica de concentração inibitória mínima (MIC) mostraram que, para os fungos *A. flavus* e *A. parasiticus*, os derivados de quitosana sintetizados apresentaram eficiência crescente na inibição do fungo de acordo com o grau de quaternização do polímero. Os derivados da série pentil inibiram completamente o crescimento do fungo em concentrações 4 vezes menor do que a quitosana comercial e desacetilada, comprovando assim a eficiência desses derivados.

Em suma, é possível observar que, na maioria dos testes, o aumento do grau de substituição de todas as séries dos derivados proporciona um aumento no índice de inibição. É possível observar ainda que a série bi-quaternária se mostrou a mais

eficiente na inibição de ambas espécies na maioria das condições testadas, estando esse fato relacionado com a presença de duas cargas positivas permanentes nesses derivados. É válido ressaltar que o derivado Q-BPHD25-0,5, na condição de $\text{pH} \cong 5,0$, apresenta os maiores índices de inibição para ambos fungos, sendo esse derivado o mais importante do ponto de vista microbiológico. Além disso, as diferenças observadas entre os diferentes índices de inibição para os fungos deixam claro que o efeito da quitosana depende do microrganismo alvo.

6. DESTINAÇÃO DOS RESÍDUOS GERADOS NO DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Os resíduos gerados no decorrer do projeto foram devidamente tratados antes de serem descartados, de acordo com o previsto na legislação vigente. Aqueles resíduos cujo tratamento não pode ser realizado foram devidamente armazenados e encaminhados ao entreposto de resíduos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da UNESP/São José do Rio Preto – SP. Todo material biológico utilizado no trabalho foi descartado após a correta esterilização em autoclave, a 121 °C por 20 minutos.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Muitos estudos ainda precisam ser feitos no sentido de se sugerir um método de aplicação dos biofungicidas aqui apresentados. Entre eles é possível citar os estudos de aplicação *in situ*, durabilidade, otimização das condições de aplicação e, principalmente, toxicidade a seres vivos e ao meio ambiente. Além disso, os derivados obtidos nesse trabalho podem ser eficientes na inibição de outras espécies de fungo e bactérias.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, A., FERNÁNDEZ-MOLINA, J. V., BIKANDI, J., RAMÍREZ, A., MARGARETO, J., SENDINO, J., HERNANDO, F. L., PONTÓN, J., GARAIZAR, J., REMENTERIA, A., What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis, *Revista Iberoamericana de Micología*, 27, 4, 155-182, **2010**.

ABRAHAM, R., FISHER, J., LOFTUS, P., Introduction to NMR Spectroscopy. In: CLARIDGE, T. D. W., *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, Wiley, Chichester, 13-43, **1999**.

ALBURQUENQUE, C., BUCAREY, S. A., NEIRA-CARRILLO, A., URZÚA, B., HERMOSILLA, G., TAPIA, C. V., Antifungal activity of low molecular weight chitosan against clinical isolates of *Candida* spp., *Medical Mycology*, 48(8), 1018–23, **2010**.

ANASTAS, P. T., WARNER, J. C., Green Chemistry: Theory and Practice, *Oxford University Press*: Great Britain, **2000**.

BAXTER, A., DILLON, M., TAYLOR, K. D. A., ROBERTS, G. A. F., Improved method for i.r. determination of the degree of N-acetylation of chitosan, *International Journal of Biological Macromolecules*, 14: 166-169, **1992**.

BOWMAN, M., FREE, S. J., The structure and synthesis of the fungal cell wall, *Bioessays*, 28, 799-808, **2006**.

BRUGNEROTTO, J., LIZARDI, J., GOYCOOLEA, F.M., ARGUÈELLES-MONAL, W., DESBRIÉÁRES, J., RINAUDO, M., An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization, *Polymer*, 42, 3569-3580, **2001**.

CAMPANA, S. P. F., SIGNINI, R., Efeitos de aditivos na desacetilação da quitina. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 11, 4, 169-173, **2001**.

CAMPANA, S. P. F., SIGNINI, R., Effects of additives and inert gas bubbling on the deacetylation of chitosan, *International Journal of Polymeric Materials*, 51, 8, 701-709, **2002**.

CARDOSO, M. B., SIGNINI, R., CAMPANA, S. P. F., On the sonications of chitin: effects on its structure and morphology and influence on its deacetylation, *Polymer Bulletin*, 47, 2, 183-190, **2001**.

CHANG, P. K., MATSUSHIMA, K., TAKAHASHI, T., YU, J., ABE, K., BHATNAGAR, D., YUAN, G. F., KOYAMA, Y., CLEVELAND, T. E., Understanding nonaflatoxicity of *Aspergillus sojae*: a windfall of aflatoxin biosynthesis research, *Applied Microbiology Biotechnology*, 76:977– 984, **2007**.

CHANG, P. K., EHRLICH, K. C., Review: What does genetic diversity of *Aspergillus flavus* tell us about *Aspergillus oryzae*?, *International Journal of Food Microbiology*, 138, 189–199, **2010**.

CHUNG, Y. C., WANG, H. L., CHEN, Y. M., LI, S. L., Effect of abiotic factor on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens, *Bioresource Technology*, 88, 179-184, **2003**.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), Reference method for Broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, *Approved standard second edition*, CLSI document M38-A2 (ISBN 1-56238-668-9), USA, **2008**.

DOMSZY, J.G., ROBERTS, G.A.F., Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analyzing chitosan, *Die Makromolekulare Chemie*, 186:1671-1677, **1985**.

DOS SANTOS, J. E., SOARES, J. P., DOCKAL, E. R., CAMPANA, S. P. F., CAVALHEIRO, E. T. G., Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 13, 4, 242-249, **2003**.

EL GHAOUTH, A., ARUL, J., GRENIER, J., ASSELIN, A., Antifungal activity of Chitosan on Two Postharvest Pathogens of Strawberry Fruits, *Phytopathology*, 82, 398-402, **1992**.

FOCHER, B., BELTRAMA, P. L., NAGGI, A., TORRI, G., Alkaline N-deacetylation of chitin enhanced by flash treatments – reaction-kinetics and structure modifications, *Carbohydrate Polymers*, 12, 4, 405-418, **1990**.

GONÇALEZ, E.; FELICIO, J., D.; PINTO, M., M.; Biflavonoids inhibit the production of aflatoxin by *Aspergillus flavus*., *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 34, 1453-1456, **2001**.

GOY, R., C., BRITTO, D., ASSIS, O., B., G., A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 19, 3, 241-247, **2009**.

GUO, Z., XING, R., LIU, S., ZHONG, Z., JI, X., WANG, L., LI, P., The influence of molecular weight of quaternized chitosan on antifungal activity, *Carbohydrate Polymers*, 71, 694-697, **2008**.

JABEEN, Z., RIAZ, A., SULTANA, K., IKRAM, A., ANSAR, M., AHMAD, T. H. I., Incidence of *Aspergillus flavus* and extent of aflatoxin contamination in peanut samples of Pothwar region of Pakistan, *African Journal of Microbiology Research*, 6(9), 1942-1946, **2012**.

JAYAKUMAR, R., PRABAHARAN, M., KUMAR, P. T. S., NAIR, S. V., Tamura, H., Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications, *Biotechnology Advances*, 29(3), 322–37, **2011**.

KARUNAI RAJ, M., BALACHANDRAN, C., DURAI PANDIYAN, V., AGASTIAN, P., IGNACIMUTHU, S., Antimicrobial activity of Ulopterol isolated from *Toddalia asiatica* (L.) Lam.: A traditional medicinal plant, *Journal of Ethnopharmacology* 140, 161–165, **2012**.

KIM, C. H., CHUN, H. J., A Synthesis of O-diethylaminoethyl chitosan and its binding ability of cholate and deoxycholate anion in vitro, *Polymer Bulletin*, 42, 25-32, **1999**.

KIRK, P. M., CANNON, P. F., MINTER, D. W., STALPES, J. A., Dictionary of Fungi, 10 ed. *United Kingdom: Cabi Europe*, 771, **2008**.

KLICH, M. A., PITT, J. I., A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs, *CSIRO Division of Food Processing*, North Ryde, NSW, **1988**.

KONG, M., CHEN, X. G., XING, K., PARK, H. J., Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review, *International Journal of Food Microbiology*, 144 51–63, **2010**.

KUMAR, M. N. V. R., A review of chitin and chitosan applications, *Reactive and Functional Polymers*, 46, 1–27, **2000**.

KUMAR, R., SAHA, A., SAHA, D., A new antifungal coumarin from *Clausena excavata*, *Fitoterapia* 83, 230–233, 2012.

LARANJEIRA, M. C. M., FÁVERE, V. T., Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico, *Química Nova*, 32, 3, **2009**.

LI, M., CHEN, X., LIU, J.,ZHANG, W.,TANG, X., Molecular Weight-Dependent Antifungal Activity and Action Mode of Chitosan Against *Fulvia fulva* (Cooke) Ciffrri, *Journal of Applied Polymer Science*, 119(6), 3127-3135, **2011**.

MADIGAN, M. T., Microbiologia de Brock, Porto Alegre: *Artmed*, **2010**.

MALHOTRA, B. D., KAUSHIK, A., Metal oxide–chitosan based nanocomposite for cholesterol biosensor, *Thin Solid Films*, 518, 614–620, **2009**.

MASOKO, P., PICARD, J., ELOFF, J. N., Antifungal activities of six South African *Terminalia* species (Combretaceae), *Journal of Ethnopharmacology* 99, 301-308, **2012**.

MICOTOXINAS. *Food Ingredients Brasil*, 7, 32-40, 2009. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/90.pdf>>. Acesso em: 18 de out. 2012.

MILHOME, M. A. L., KEUKELEIRE, D., RIBEIRO, J. P., NASCIMENTO, R. F., CARVALHO, T. V., QUEIROZ, D. C., Removal Of Phenol And Conventional Pollutants From Aqueous Effluent By Chitosan And Chitin, *Química Nova*, 32, 8, 2122-2127, **2009**.

OLIVEIRA, M. I. L., BECQUER, T., GOEDERT, W. J., VILELA, L.,DELEPORTE, P., Concentração de íons na solução de um Latossolo vermelho sob diferentes sistemas de manejo, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46, 10, 1291 -1300, **2011**.

PAK, A., GONÇALEZ, E., FELICIO, J. D., PINTO, M. M., ROSSI, M. H., SIMONI, I. C., LOPES, M. N., Inhibitory activity of compounds isolated from *Polymnia*

Sonchifolia on aflatoxin production by *Aspergillus flavus*, *Brazilian Journal of Microbiology*, nº.37, p. 199-203, **2006**.

PATERSON, R. R. M., LIMA, N., How will climate change affect mycotoxins in food?, *Food Research International*, 43, 1902–1914, **2010**.

PAVINATTO, A., Efeito de características estruturais da quitosana sobre a sua interação com filmes de Langmuir como modelo de membrana. Dissertação de mestrado (Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais), Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, **2009**.

PEDRO, R. O., TAKAKI, M., GORAYEB, T. C. C., DEL BIANCHI, V. L., THOMEIO, J. C., TIERA, M. J., TIERA, V. A. O., Synthesis, characterization and antifungal activity of quaternary derivatives of chitosan on *Aspergillus flavus*, *Microbiological Research*, 168, 50-55, **2013**.

PICOLA, I. P. D., Estudo físico-químico de nanopartículas de DNA com derivados de quitosana contendo grupos fosforilcolina, 119 f. Dissertação de mestrado (Mestre em Biofísica Molecular), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, **2009**.

PINTO, M. M., GONÇALEZ, E., ROSSI, M. H., FELICIO, J. D., MEDINA, C. S., FERNANDES, M. J. B., SIMONI, I. C., Activity of the aqueous extract from *Polynia Sochifolia* leaves on growth and production of aflatoxina B1 by *Aspergillus flavus*., *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 127-129, **2001**.

PITT, J. I., HOCKING, A. D., *Aspergillus* and related teleomorphs, In: PITT, J. I., *Fungi and food spoilage*, London: Chapman & Hall, 339-416, **1997**.

RAAFAT, D., SAHL H. G., Chitosan and its antimicrobial potential – a critical literature survey, *Microbial Biotechnology*, 2, 186-201, **2009**.

RAPPUSSI-DA-SILVA, M. C. C., Efeitos da quitosana e da radiação UV-C no controle de *Guignardia citricarpa* em laranja pós-colheita. 2006. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, **2006**.

ROBERTS, G. A., WANG, W., Evaluation of Mark-Houwink viscosimetric constants for chitosan. In: Domard, Jeuniaux, Muzzarelli, Roberts, *Advances in chitin science*, Jacques Andre, Lyon, 279-284, **1996**.

SADEGHI, A. M., DORKOOSH, F. A., AVADI, M. R., SAADAT, P., RAFIEE-TEHRANI, M., JUNGINGER, H. E., Preparation, characterization and antibacterial activities of chitosan, N-trimethyl chitosan (TMC) and N-diethylmethyl chitosan (DEMC) nanoparticles loaded with insulin using both the ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation methods, *International Journal of Pharmaceutics*, 355, 299–306, **2008**.

SAJOMSANG, W., GONIL, P., SAESOO, S., OVATLARNPORN, C., Antifungal property of quaternized chitosan and its derivatives, *International Journal of Biological Macromolecules* 50, 263– 269, **2012**.

SANNAN, T., KURITA, K., IWAKURA, Y., Studies on chitin – effect of deacetylation on solubility, *Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics*, 177, 12, 3589-3600, **1976**.

SATPATHY, G., TYAGI, Y. K., GUPTA, R. K., A novel optimised and validated method for analysis of multi-residues of pesticides in fruits and vegetables by microwave- assisted extraction (MAE)–dispersive solid-phase extraction (d-SPE)–retention time locked (RTL)–gas chromatography–mass spectrometry with deconvolution reporting software (DRS), *Food Chemistry*, 127(3), 1300–8, **2011**.

SEPAHVAND. A., SHAMS-GHAHFAROKHI, M., ALLAMEH, A., JAHANSHIRI, Z., JAMALI, M., RAZZAGHI-ABYANEH, M., A survey on distribution and toxigenicity of *Aspergillus flavus* from indoor and outdoor hospital environments, *Folia Microbiologica*, 56, 527–534, **2011**.

SILVA, F. M., LACERDA, P. S. B., JUNIOR, J. J., Desenvolvimento Sustentável e Química Verde, *Quim. Nova*, 28, 1, 103-110, **2005**.

SKOOG, D. A., HOLLER, J. F., NIEMAN, T. A., Princípios de análise instrumental, *Bookman*, 2002.

STÖSSEL, O., LEUBA, J. L., Effect if chitosan, chitin and some aminosugars on growth of various soilborne phytopathogenic fungi, *Journal of Phytopathology*, 111, p.82-90 **1984**.

SUN, L., DU, Y.,FAN, L.,CHEN, X.,YANG J., Preparation, characterization and antimicrobial activity of quaternizedcarboxymethyl chitosan and application as pulp-cap, *Polymer*, 47, 1796–1804, **2006**.

SUN, X., PENG, B.,JI, Y.,CHEN, J.,LI, D., CHITOSAN (Chitin)/Cellulose Composite Biosorbents Prepared Using Ionic Liquid for Heavy Metal Ions Adsorption, *Aiche Journal* , 55, 8, 2062-2069, **2009**.

TOLAIMATE, A., DESBRIERES, J., RHAZI, M., ALAGUI, A., VINCENDON, M., VOTTERO, P., On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin, *Polymer*, 41, 2463–2469, **2000**.

TYAGI, A. K., MALIK, A., Antimicrobial potential and chemical composition of Mentha piperita oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms, *Food Control*, 22, 1707-1714, **2011**.

VARNA, A. J., DESHPANDE, S. V., KENNEDY, J. F., Metal complexation by chitosan and its derivates: a review, *Carbohydrates Polymers*, 55, **2003**.

YANG, T. C., CHOU, C. C., LI, C. F., Antibacterial activity of N-alkylated disaccharide chitosan derivatives, *International Journal of Food Microbiology*, 97, 237-245, **2005**.

ZHANG, H. Y., LI, R. P., LIU, W. M., Effects of chitin and its derivative chitosan on postharvest decay of fruits: a review. *International Journal of Molecular Science*, 12(2), 917–34, **2011**.