

(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES
(PCT)

(19) Organização Mundial da
Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional



(10) Número de Publicação Internacional
WO 2014/043774 A1

(43) Data de Publicação Internacional
27 de Março de 2014 (27.03.2014) **WIPO | PCT**

(51) Classificação Internacional de Patentes :
A01N 31/06 (2006.01) A01N 33/04 (2006.01)
A01N 31/14 (2006.01) A01N 33/08 (2006.01)
A01N 33/02 (2006.01)

(21) Número do Pedido Internacional :
PCT/BR2013/000356

(22) Data do Depósito Internacional :
9 de Setembro de 2013 (09.09.2013)

(25) Língua de Depósito Internacional : Português

(26) Língua de Publicação : Português

(30) Dados Relativos à Prioridade :
BR1020120238594
21 de Setembro de 2012 (21.09.2012) BR

(71) Requerente : UNIVERSIDADE ESTADUAL
PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
[BR/BR]; CNPJ:48.031.918/0001-24, Rua Quirino de
Andrade, 215, Centro, CEP:01049-010 São Paulo - SP
(BR).

(72) Inventores : TIERA, Marcio José; CPF/MF
nº048.237.808-50, Rua Cristóvão Colombo, nº 2265,
Jardim Nazareth, CEP: 15.054-000 São José do Rio Preto-
SP (BR). APARECIDA DE OLIVEIRA TIERA, Vera;
CPF/MF nº051.318.128-30, Rua Cristóvão Colombo, nº
2265, Jardim Nazareth, CEP: 15.054-000 São José do Rio
Preto-SP (BR). DOS SANTOS GABRIEL, Juliana;
CPF/MF nº380.038.718-24, Rua Cristóvão Colombo, nº
2265, Jardim Nazareth, CEP: 15.054-000 São José do Rio
Preto-SP (BR). DE OLIVEIRA PEDRO, Rafael;
CPF/MF nº364.414.128-29, Rua Cristóvão Colombo, nº

2265, Jardim Nazareth, CEP: 15.054-000 São José do Rio
Preto-SP (BR).

(74) Mandatário : DE MORAES SPIANDORELLO,
Fabiola; Rua Dr. Bento Teobaldo Ferraz, 271, Bloco 2,
Barra Funda, CEP:01140-070 São Paulo-SP (BR).

(81) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos
os tipos de proteção nacional existentes) : AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(84) Estados Designados (sem indicação contrária, para todos
os tipos de proteção regional existentes) : ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ,
RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT,
LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI,
SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

— com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))

(54) Title : BIOFUNGICIDE BASED ON CATIONIC, AMPHIPHILIC CHITOSAN DERIVATIVES AND METHOD FOR
PRODUCING SAME

(54) Título : BIOFUNGICIDA A BASE DE DERIVADOS ANFIFÍLICOS CATIÔNICOS DE QUITOSANA E MÉTODO DE
OBTENÇÃO DO MESMO

(57) Abstract : The present invention relates to biofungicides based on cationic, amphiphilic chitosan derivatives, with increasing
proportions of dodecyl groups, for use against the fungus *Aspergillus flavus*, and to the method for producing said biofungicides.

(57) Resumo : A presente invenção se refere a biofungicidas a base de derivados anfifílicos catiônicos de quitosana, com proporções
crescentes de grupamentos dodecil, para serem utilizados contra o fungo *Aspergillus flavus*, bem como o método de obtenção do
mesmo.



WO 2014/043774 A1

**BIOFUNGICIDA A BASE DE DERIVADOS ANFIFÍLICOS CATIÔNICOS DE
QUITOSANA E MÉTODO DE OBTENÇÃO DO MESMO**

Campo de aplicação:

A presente invenção se aplica no campo agrícola e se
5 refere a biofungicidas a base de derivados anfifílicos
catiônicos de quitosana, os quais apresentam proporções
crescentes de grupos alquílicos hidrofóbicos do tipo n-
dodecil, para prevenir a contaminação e a proliferação de
fungos *Aspergillus*, em particular o *Aspergillus flavus*, bem
10 como a contaminação da colheita por aflatoxinas.

Adicionalmente, a invenção se refere ao método de
obtenção do respectivo biofungicida, o qual é desenvolvido
a base de uma matéria prima natural, abundante e renovável
e apresenta biodegradabilidade e baixa toxicidade.

15 **Fundamentos da invenção:**

A quitosana é um polissacarídeo de cadeia linear, a
qual é um produto da desacetilação da quitina e compreende
unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glicose e 2-acetamido-2-
desoxi-D-glicose unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$, cuja estrutura
20 molecular está demonstrada na Figura 1A.

A quitina (cuja estrutura molecular é demonstrada na
Figura 1B) é um polímero natural, presente em exoesqueletos
de crustáceos, insetos, moluscos e fungos. Além disso, é o
segundo polissacarídeo mais abundante na natureza após a
25 celulose, sendo uma excepcional alternativa como fonte de
biomassa, por ser econômica e ecologicamente viável.

O parâmetro utilizado para diferenciar a quitina da
quitosana é o grau de desacetilação (GD) das mesmas, sendo
esse determinado por meio de técnicas analíticas, como a
30 potenciometria, espectroscopia na região do infravermelho,

condutometria, ressonância magnética nuclear de prótons (RMN-H), dentre outras.

Além disso, a quitosana, diferentemente da quitina, é solúvel em ácidos orgânicos diluídos (como o ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico e ácido fórmico) e em ácidos inorgânicos. A solubilidade da quitosana está diretamente relacionada com a quantidade de grupos amino presentes na estrutura do polímero, os quais podem ser protonados (-NH_3^+) e, assim, aumentar a solubilidade em meio aquoso, devido à repulsão eletrostática e ao aumento da solvatação das cadeias.

Assim, a solubilidade da quitosana está intimamente relacionada com o grau de desacetilação e força iônica, bem como a massa molar, concentração do biopolímero e do ácido. A estrutura da quitosana permite inúmeras modificações químicas e confere a mesma a possibilidade de produção de diversos derivados com diferentes propriedades.

Dentre as propriedades da quitosana, destaca-se sua capacidade de inibir o crescimento de micro-organismos do reino fungi, como *Fusarium*, *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Botrytis cinerea* e *Rhizoctonia solani*.

Pela inibição do crescimento dos micro-organismos, observou-se que os grupamentos amino são protonados quando em contato com o meio fisiológico. Desse modo, esses grupos podem interagir com grupos aniônicos da membrana dos micro-organismos, resultando no vazamento dos constituintes celulares e, conseqüentemente, na inibição do crescimento.

No que diz respeito a sua atividade antimicrobiana, a ação de quitosana é influenciada por fatores intrínsecos, como o tipo de quitosana, o grau de polimerização da mesma,

o hospedeiro (micro-organismo alvo), a composição química dos substratos e as condições ambientais.

A atividade antimicrobiana da quitosana ocorre para valores de pH inferiores a 6,0 e se deve, principalmente, a carga positiva do grupo amino ligado ao carbono 2 do monômero de glucosamina. O mecanismo da ação antimicrobiana da quitosana é ainda desconhecido, mas é bem aceito que a interação das cargas positivas de quitosana com as membranas celulares negativamente carregadas dos fungos e bactérias pode levar ao vazamento das proteínas e outros constituintes celulares.

A quitosana age, principalmente, na superfície externa da bactéria. Em baixas concentrações (inferiores a 0,2 mg mL⁻¹), acredita-se que a quitosana liga-se a superfície bacteriana negativamente carregada, causando aglutinação, enquanto que, em altas concentrações, o grande número de cargas positivas pode conferir uma carga positiva líquida à superfície bacteriana, mantendo-a em suspensão.

Dentre os fatores que tem influência na atividade bactericida e antifúngica da quitosana, a massa molecular é o fator mais importante. Estudos mostram que derivados quaternizados de quitosana com diferentes massas molares exibiram diferentes atividades antifúngicas, sendo esta atividade superior do que aquela observada para a quitosana pura.

Além disso, a atividade antimicrobiana da quitosana ocorre, principalmente, em meio ácido devido a sua baixa solubilidade em pHs superiores a 6,5. Portanto, derivados de quitosana solúveis em água (meio ácido e alcalino) podem ser bons candidatos como biocidas policatiônicos.

De acordo com Zhang et al. (2009), o fungo *Aspergillus flavus* é um dos mais atuantes na deterioração de grãos e frutos e está amplamente distribuído nas regiões tropicais e zonas subtropicais do mundo.

5 Este fungo, que infecta alimentos como o amendoim, o milho, o centeio, a cevada, sementes oleaginosas, nozes, e a castanha-do-brasil, dentre outros, pode ainda produzir micotoxinas, substâncias metabólicas que podem ou não ser liberadas em seus substratos de crescimento, denominadas
10 aflatoxinas.

As aflatoxinas destacam-se como umas das mais importantes micotoxinas devido a sua toxicidade ao homem e aos animais, por apresentarem atividade carcinogênica, teratogênica e mutagênica, em condições de umidade e
15 temperatura favoráveis, tais como a demora na colheita, devido ao período prolongado de chuvas, que dificulta a secagem após o arranquio.

Devido a essa problemática e a propriedade fungicida comprovada da quitosana e de seus derivados, a presente
20 invenção se refere a um biofungicida a base de derivados anfifílicos catiônicos de quitosana, com proporções crescentes de grupamentos dodecil, para ser utilizado contra o fungo *Aspergillus flavus*, bem como o método de obtenção do mesmo.

25 Os resultados dos ensaios microbiológicos demonstraram a eficiência da quitosana modificada como biofungicida, com a introdução de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos na matriz polimérica da quitosana para propiciar uma maior interação com a membrana celular, aumentando a atividade
30 antimicrobiana.

Estado da técnica:

O documento de anterioridade CN 101816678 descreve um fungicida médico hemostático de amplo espectro a base de quitosana, para tratamento de infecções de pele e membranas mucosas.

O documento de anterioridade CN 101781374 se refere a um fungicida agrícola a base de derivados de quitosana, o qual apresenta atividade antibacteriana e pode prevenir e controlar doenças de colheitas e árvores frutíferas.

O documento de anterioridade CN 1751576 descreve um fungicida agrícola contendo derivados de quitosana de alto peso molecular, o qual é utilizado para prevenir e eliminar doenças e pragas das plantações.

O documento de anterioridade JP 2004244324 relata um fungicida de baixa toxicidade, consistindo de Fe^{+2} , ácido cítrico e quitosana, para uso agrícola.

O documento de anterioridade MX PA00011813 descreve um revestimento biológico, para efeito protetor e curativo de doenças no pós-colheita. O produto contém sais de quitosana e outros componentes, como micro-organismos antagonistas e um cátion.

O documento de anterioridade US 5633025 descreve um revestimento, contendo uma matriz de quitosana modificada, para a aplicação no pós-colheita.

O documento de anterioridade PI 0114449-9 descreve uma composição aquosa de limpeza contendo quitosana, o qual apresenta uma atividade antifúngica melhorada.

Sumário da invenção:

A presente invenção se refere a biofungicidas a base de derivados anfifílicos catiônicos de quitosana, com

proporções crescentes de grupamentos dodecil, para ser utilizado contra o fungo *Aspergillus flavus*, bem como o seu método de obtenção.

Breve descrição das figuras:

5 A Figura 1A é uma representação da estrutura primária da quitosana.

 A Figura 1B é uma representação da estrutura primária da quitina.

 A Figura 2 é uma representação esquemática do possível
10 mecanismo da ação antimicrobiana de polímeros catiônicos, no qual a interação destes leva à desestabilização da membrana celular.

 A Figura 3 é um gráfico de titulação potenciométrica da quitosana desacetilada (CH).

15 A Figura 4 é o espectro de ressonância magnética nuclear de próton (RMN-H) da quitosana desacetilada (CH).

 A Figura 5 consiste nos espectros de ressonância magnética nuclear de próton (RMN-H) das quitosanas modificadas com grupos dietiletilamina DEAE.

20 A Figura 6A é uma representação das estruturas dos derivados anfifílicos de quitosana sintetizados.

 A Figura 6B é uma representação de outras possíveis estruturas dos derivados anfifílicos de quitosana.

 A Figura 7A são os espectros de ressonância magnética
25 nuclear de próton (RMN-H) dos derivados de quitosana, contendo 43% de DEAE, alquilados.

 A Figura 7B são os espectros de ressonância magnética nuclear de próton (RMN-H) dos derivados de quitosana, contendo 30% de DEAE, alquilados.

30 A Figura 8A é um gráfico comparativo entre os índices

de inibição em porcentagem para um fungicida comercialmente disponível (Thiram) e a sequência de derivados de baixa massa molecular.

A Figura 8B é um gráfico comparativo entre os índices de inibição em porcentagem para um fungicida comercialmente disponível (Thiram) e a sequência de derivados de alta massa molecular.

Descrição detalhada da invenção:

A presente invenção descreve biofungicidas a base de derivados anfifílicos catiônicos de quitosana, com proporções crescentes de grupos alquílicos hidrofóbicos do tipo n-dodecil, de baixa massa molecular, os quais apresentam solubilidade em pH neutro e alta atividade contra o fungo *Aspergillus flavus*.

- Método de obtenção dos derivados:

Para a obtenção dos biofungicidas, foram utilizados os seguintes reagentes para a síntese dos derivados:

- Quitosana comercial;
- Quitosana desacetilada (CH);
- Quitosana desacetilada e degradada (CHD);
- Cloreto de 2-cloro-N,N-dietiletilamina (DEAE);
- Dodecil aldeído (DD) 95% e
- Borociano hidreto de sódio.

A estrutura dos biofungicidas contém, além dos grupos glucosamina da quitosana, grupos dietilaminoetilamina e grupos alquílicos hidrofóbicos do tipo n-dodecil.

A tabela 1 abaixo descreve o número de mols de CH, CHD, DEAE e DD utilizados na reação de obtenção dos derivados de quitosana.

Tabela 1: Número de mols (**n**) dos reagentes CH, CHD, DEAE e

DD utilizados na obtenção dos derivados anfifílicos de quitosana.

Derivados	n _{CH}	n _{DEAE}	n _{DD}
CH30DEAE2,7DD	5,0x10 ⁻³	8,4x10 ⁻³	1,8x10 ⁻⁴
CH30DEAE10DD			5,0x10 ⁻⁴
CH30DEAE19DD			1,3x10 ⁻³
	n _{CHD}		
CHD43DEAE5DD	5,0x10 ⁻³	8,4x10 ⁻³	1,8x10 ⁻⁴
CHD43DEAE28DD			5,0x10 ⁻⁴
CHD43DEAE39DD			1,3x10 ⁻³

Os derivados descritos na presente invenção são obtidos por meio do processo que compreende as seguintes etapas:

Preparação da quitosana:

A quitosana utilizada na síntese dos derivados é obtida pela desacetilação heterogênea da quitosana, na qual a quitosana disponível comercialmente é desacetilada a fim de se obter um grau de desacetilação superior a 90%.

Para isto, a quitosana é dispersa em água deionizada, sob agitação magnética, sendo, em seguida, solubilizada pela adição de ácido acético glacial.

Posteriormente, verte-se hidróxido de sódio (50% em massa) à solução sob agitação, em atmosfera de nitrogênio, aquecimento a aproximadamente 100 °C e refluxo. Após 1 hora e 30 minutos, a reação é interrompida e a suspensão é transferida para um béquer contendo água deionizada a 70 °C, sob agitação.

O precipitado obtido é então decantado e lavado com água deionizada até que a água de lavagem atinja pH neutro. Em seguida, o mesmo é isolado por filtração a vácuo e o

procedimento de desacetilação é repetido.

Após a filtração realizada no segundo procedimento de desacetilação, a quitosana é lavada com acetona e seca em estufa a 40 °C por 72 horas, sendo o polímero macerado até
5 que se torne pó. O rendimento percentual obtido é de 65%.

O grau de desacetilação (GD) da quitosana (CH) é determinado por meio das técnicas de potenciometria e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton (RMN-H), como mostrado nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

10 Parte da quitosana desacetilada obtida é degradada para a obtenção de amostras de baixa massa molecular (CHD), utilizando-se nitrito de sódio 99% (0,18 mol L⁻¹) em meio ácido (6 mL ácido acético glacial 2%).

As massas moleculares das quitosanas CH e CHD foram
15 determinadas por viscosimetria e os valores obtidos se encontram na faixa que varia de 20 kDa a 400 Da, sendo que as massas viscosimétricas dos polímeros CH e CHD são 15,2 kDa e 611,0 Da, respectivamente.

Obtenção dos derivados de quitosana contendo o grupo
20 dietiletilamina (DEAE):

Os derivados foram obtidos pela reação das quitosanas CH e CHD com cloreto de 2-cloro-N,N-dietiletilamina (DEAE). Os graus de substituição (GS) de grupos DEAE de CH e CHD foram determinados utilizando-se RMN-H (conforme mostrado
25 na Figura 5) e os valores obtidos variaram de 30 a 43%, respectivamente.

As quitosanas obtidas (CH30DEAE e CHD43DEAE) foram alquiladas com dodecil aldeído seguido pela redução com borociano hidreto de sódio, obtendo-se derivados com
30 diferentes graus de substituição.

O grau de substituição pelos grupos dodecil (G_{Dod}) variaram de 2,7 a 19% para o derivado de quitosana com 30% de DEAE e de 5 a 39% para o derivado de quitosana contendo 43% de DEAE.

5 O comportamento associativo dos derivados hidrofóbicos foi estudado utilizando espectroscopia de fluorescência. Os resultados mostraram que, em baixas concentrações, os derivados anfifílicos se auto-associam para formar domínios hidrofóbicos.

10 Portanto, a quantidade de grupos amino terciários (DEAE) e o conteúdo hidrofóbico foram variados com duas séries de quitosanas e, dessa forma, permitiram determinar composições específicas, na quais a massa molecular e os conteúdos foram ajustados para maximizar a atividade
15 antimicrobiana.

Preparação dos derivados com atividade biofungicida a partir da quitosana modificada com DEAE:

A alquilação dos derivados de quitosana associados ao DEAE consistiu em duas etapas: primeiramente a reação dos
20 grupos amino da quitosana com dodecil aldeído para formação da base de Schiff e, em seguida, uma reação de redução com borociano hidreto de sódio.

A reação foi realizada a 25 °C, pressão de 1 atm, pH 8, permanecendo sob agitação por 24 horas.

25 A partir deste processo, foram sintetizados derivados apresentando a estrutura mostrada na Figura 6A. Os graus de substituição (G_{Dod}) dos derivados de quitosana foram determinados por RMN-H, tal como demonstrado na Figura 7A e 7B.

30 Purificação dos derivados alquilados:

A purificação dos derivados alquilados é realizada por meio de diálise contra água deionizada por 3 dias, no qual a água de diálise é trocada 3 vezes ao dia.

Em seguida, a fim de remover qualquer quantidade de aldeído não reagido, é feita uma extração em sistema soxhlet durante 48 horas a 60 °C, utilizando-se clorofórmio como solvente.

Exemplo específico da invenção:

Para a preparação dos derivados de quitosana contendo grupos DEAE, 2,7 g da quitosana apresentando massa molecular 500-10000 Daltons foi solubilizada em 112,5 mL de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹.

Em seguida, 1,4 g de DEAE foram adicionados à solução de quitosana e o pH foi ajustado para 8,0 com adição de NaOH 2 mol L⁻¹.

A reação foi realizada sob agitação a 70 °C e o pH foi ajustado continuamente pela adição de NaOH. O produto foi purificado por diálise contra NaOH 0,05 mol L⁻¹, por 24 horas e contra água deionizada por 3 dias utilizando-se uma membrana de 3000 Da.

O produto obtido foi recuperado por liofilização e o GS foi determinado por RMN-H.

Para a alquilação dos derivados de quitosana contendo grupos DEAE, uma massa de 0,8 g de quitosana associada ao DEAE foi solubilizada em 91,7 mL de ácido acético 2% e 63,1 mL de etanol.

O pH da solução foi ajustado para 5,1 e, em seguida, adicionaram-se 0,12 mL de dodecil aldeído. Após 1 hora sob agitação constante, adicionou-se borociano hidreto de sódio na razão 3:1 (NaCNBH₃ : NH₂). A mistura foi mantida sob

agitação por 24 horas a temperatura ambiente.

A purificação dos derivados alquilados CH30DEAE2,7DD, CH30DEAE10DD, CH30DEAE19DD, CHD43DEAE5DD, CHD43DEAE28DD e CHD43DEAE39DD foi realizada por meio de diálise contra água deionizada por 3 dias, trocando a água de diálise 3 vezes ao dia.

Em seguida fez-se a remoção do possível aldeído não reagido, por extração em sistema soxhlet durante 48 horas a 60°C, utilizando-se 250 mL de clorofórmio como solvente.

Os derivados obtidos estão descritos na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2 - Valores de grau de substituição pelos grupos dodecil (G_{Dod}) para os derivados anfifílicos de quitosana.

Quitosana	$G_{Dod}\%$
CH30DEAE2,7DD	2,7
CH30DEAE10DD	10
CH30DEAE19DD	19
CHD43DEAE5DD	5
CHD43DEAE28DD	28
CHD43DEAE39DD	39

Avaliação da atividade biofungicida sobre *Aspergillus flavus*:

- Inibição do crescimento fúngico:

A inibição do crescimento do fungo pelos diferentes polímeros foi determinada na placa de Petri contendo o meio de cultura (BDA).

Com o auxílio de um paquímetro milimetrado, mediu-se o crescimento radial da colônia nos terceiro, quinto e sétimo dias de incubação. Os resultados obtidos no sétimo dia de

incubação foram utilizados para fins comparativos.

Os ensaios foram realizados em quadruplicata para cada concentração estudada, e, assim, as medidas foram feitas também em quadruplicata.

- 5 Para análise da eficiência de inibição do crescimento fúngico pela quitosana, calculou-se o índice de inibição de conforme a equação abaixo:

$$\text{Índice de inibição (\%)}: (1 - D_a / D_b) \times 100$$

Onde: D_a é o diâmetro da colônia das placas contendo
10 quitosana;

D_b é o diâmetro das placas controle.

Os resultados obtidos nos ensaios microbiológicos estão descritos na Tabela 2 e demonstram a baixa capacidade antifúngica natural da quitosana comercial (CC) para testes
15 *in vitro*. O processo de desacetilação potencializa essa capacidade, deixando mais monômeros com grupamentos amino livres.

Tabela 3 - Índice de inibição do crescimento do fungo *Aspergillus flavus* (em %)

Polímero	Concentração do Polímero			
	0,05 g L ⁻¹	0,1 g L ⁻¹	0,5 g L ⁻¹	1,0 g L ⁻¹
CC	-	5,1 ± 0,8	5 ± 2,4	5,1 ± 0,4
CH	-	6,3 ± 0,6	6,1 ± 0,6	9,14 ± 0,2
CHD	7,0 ± 1,8	- 7,5 ± 5,0	1,3 ± 1,5	7,4 ± 3,4
CH30DEAE	- 4,8 ± 3,7	- 0,5 ± 2,9	-	1,8 ± 1,3
CH30DEAE2,7DD	7,4 ± 2,6	14,8 ± 2,8	51,7 ± 5,6	94,5 ± 4,4
CH30DEAE10DD	13,7 ± 1,8	15,2 ± 3,2	27,6 ± 0,4	79,4 ± 7,5
CH30DEAE19DD	2,8 ± 2,7	13,1 ± 4,1	12,8 ± 2,1	26,5 ± 2,3
CHD43DEAE	1,4 ± 2,2	- 0,5 ± 1,6	-	8,0 ± 1,5
CHD43DEAE5DD	14,4 ± 3,2	- 4,1 ± 4,3	- 27,0 ± 1,9	97,9 ± 1,7

CHD43DEAE28DD	7,9 ± 4,5	15,1 ± 3,1	59,2 ± 4,9	100,0 ± 0,0
CHD43DEAE39DD	6,9 ± 3,6	6,2 ± 2,2	48,1 ± 8,0	100,0 ± 0,0

O tracejado (-) indica que o ensaio não foi realizado naquela concentração.

- Efeito da variação da concentração dos polímeros na inibição do crescimento fúngico:

5 Com a finalidade de observar o efeito da variação da concentração dos polímeros na inibição do crescimento do fungo, foram testadas três concentrações crescentes para quitosana comercial (CC), para a quitosana desacetilada (CH) e para as quitosanas substituídas CH30DEAE e
10 CHD43DEAE.

Para as quitosanas degradada (CHD de $M_v = 611,00$ Da) e substituídas (CH30DEAE2,7DD, CH30DEAE10DD, CH30DEAE19DD, CHD43DEAE5DD, CHD43DEAE28DD e CHD43DEAE39DD) foram testadas quatro concentrações crescentes.

15 Os resultados obtidos estão demonstrados nas Figuras 8A e 8B, em que os índices de inibição dos derivados de quitosana são comparados com o fungicida comercialmente disponível Vitavax®-Thiram 200 SC. O Thiram é um fungicida para tratamento de sementes composto por 2 ingredientes
20 ativos distintos: um fungicida sistêmico (carboxina) e um fungicida de contato (tiram), que proporcionam uma proteção completa para a semente, por dentro e por fora.

Como é possível observar, a concentração de quitosana não modificada, bem como aquelas modificadas somente com
25 DEAE (ou seja, as quitosanas CC, CH, CHD, CH30DEAE e CHD43DEAE) não interferiram de forma significativa no crescimento do fungo.

Os demais derivados apresentaram inibição crescente

com o aumento da concentração do polímero. Esse aumento significativo do índice de inibição do fungo com o aumento da concentração dos derivados anfifílicos de quitosana está relacionado à presença crescente de grupos hidrofóbicos ligados a cadeia de quitosana, permitindo uma maior interação com a parede celular do fungo.

A presença de grupamento hidrofóbico na estrutura da quitosana aumenta ainda mais a capacidade de inibição do *A. flavus* podendo, em alguns casos, inibir 100% do crescimento do fungo.

Nos derivados de quitosana não degradada ($M_v = 15,2$ kDa) contendo 30% de grupamentos DEAE (CH30DEAE), observa-se que não há inibição do fungo, quando comparado com aqueles que apresentam uma porção hidrofóbica. O aumento do índice de inibição com o aumento da concentração de um mesmo polímero é evidente, indicando que a concentração do biopolímero é um fator determinante na inibição do *A. flavus*.

No que diz respeito aos ensaios envolvendo derivados de quitosana degradada (CHD de $M_v = 611,0$ Da), foram realizados ensaios com a CHD para avaliar o efeito da massa molecular do polímero sobre a capacidade de inibição do fungo.

Os resultados obtidos não mostram um aumento significativo do índice de inibição quando comparado à inibição da quitosana comercial (CC) e desacetilada (CH).

Ainda, A Figura 4 mostra claramente que para os ensaios com derivados CH30DEAE (0,05 e 0,1 g L⁻¹), CHD (0,1 g L⁻¹), CHD43DEAE (0,1 g L⁻¹) e CHD43DEAE5DD (0,1 g L⁻¹), apresentaram índice de inibição negativo, sugerindo que

nessas concentrações o *A. flavus* pode usar os derivados de quitosana como nutrientes.

- Efeito da presença do grupamento DEAE na quitosana:

A análise do efeito da presença do grupamento DEAE na
5 quitosana degradada foi realizada com o derivado CHD43DEAE.

Os índices de inibição obtidos indicaram que o grupamento DEAE como única unidade ligada à cadeia não interfere significativamente na inibição do fungo.

Em relação aos ensaios realizados com os demais
10 derivados (CHD43DEAE5DD, CHD43DEAE28DD e CHD43DEAE39DD), é possível observar um aumento considerável do índice de inibição do micro-organismo, chegando a 100% para dos derivados CHD43DEAE28DD e CHD43DEAE39DD na concentração de 1 g L⁻¹ (vide Tabela 3 e Figura 8).

15 Esse fato pode ser explicado considerando o tamanho do oligômero, dímero ou talvez trímero, que pode fazer com que a formação dos agregados não se dê de forma efetiva, permitindo assim a interação da cadeia hidrofóbica com a membrana celular do micro-organismo.

20 Dessa forma, as quitosanas oligoméricas apresentaram um melhor efeito antifúngico em relação aos outros polímeros.

Os resultados obtidos permitem concluir que o procedimento de síntese utilizado é viável para obtenção de
25 derivados de quitosana, tanto com o DEAE quanto com dodecil aldeído, com diferentes graus de substituição e com alto rendimento.

O pH é um parâmetro importante que deve ser controlado para maximizar o rendimento da reação. Além disso, os graus
30 de substituição podem ser determinados com boa precisão

utilizando-se a técnica de RMN-H.

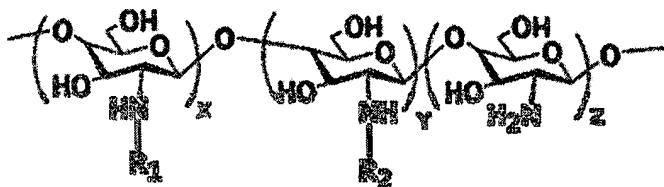
Os estudos em solução mostraram que em baixas concentrações os derivados anfifílicos se auto-associam para formar domínios hidrofóbicos. A Concentração de
5 Agregação Crítica (CAC) depende do grau de substituição dos grupos hidrofóbicos presentes na estrutura polimérica e independe da massa molecular do polímero e do pH da solução.

Os resultados dos ensaios contra o fungo *A. flavus*
10 demonstraram a eficiência dos derivados de quitosana como biofungicidas, sendo a concentração do polímero e o grau de substituição por grupos dodecil fatores determinantes na inibição do micro-organismo.

Embora a versão preferida da invenção tenha sido
15 ilustrada e descrita, deve ser compreendido que a invenção não é limitada. Diversas modificações, mudanças, variações, substituições e equivalentes poderão ocorrer, sem desviar do escopo da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

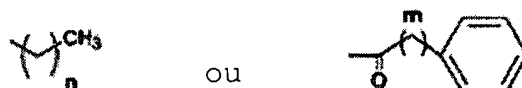
1. Biofungicida a base de derivados anfifílicos catiônicos de quitosana **caracterizado** por apresentar a estrutura:



em que:

R1 corresponde a dietilaminoetilamina e

R2 corresponde a grupos alquílicos de natureza hidrofóbica, aromático ou alifático, selecionados dentre



em que n é igual a 4, 5, 7, 9 ou 11 e

m é igual a 1, 2, 3, 4 ou 5, sendo que os grupamentos R1 e R2 estão associados às glucosaminas da quitosana.

2. Biofungicida, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a quitosana utilizada é desacetilada e apresenta um grau de desacetilação superior a 90%.

3. Biofungicida, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que os grupos alquílicos hidrofóbicos são grupos alquílicos hidrofóbicos variáveis do tipo n-dodecil.

4. Biofungicida, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que os grupos alquílicos hidrofóbicos do tipo n-dodecil são proveniente da reação dos grupos amino da quitosana com dodecil aldeído.

5. Biofungicida, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de que o grupo dietilaminoetilamina

é proveniente do cloreto de 2-cloro-*N,N*-dietiletilamina.

6. Método de obtenção do biofungicida conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** por compreender as etapas de:

- a) Desacetilação da quitosana;
- b) Obtenção dos derivados de quitosana; e
- c) Purificação dos derivados alquilados.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que, na etapa (a), a quitosana é desacetilada e parte da mesma é degradada para a obtenção de quitosana desacetilada de baixa massa molecular.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que as quitosanas desacetiladas apresentam massas moleculares que variam na faixa de 20 kDa a 400 Da.

9. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que, na etapa (b), as quitosanas reagem com o cloreto de 2-cloro-*N,N*-dietiletilamina.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que as quitosanas obtidas apresentam graus de substituição que variam entre 30 e 43%.

11. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que as quitosanas são então alquiladas com dodecil aldeído seguido pela redução com borociano hidreto de sódio.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que as quitosanas alquiladas apresentam grau de substituição pelos grupos dodecil que variam de 2,7 a 39%.

13. Método, de acordo com a reivindicação 6,

caracterizado pelo fato de que a purificação dos derivados alquilados é realizada por meio de diálise contra água deionizada por 3 dias seguida de extração em sistema soxhlet durante 48 horas a 60 °C, utilizando-se clorofórmio como solvente.

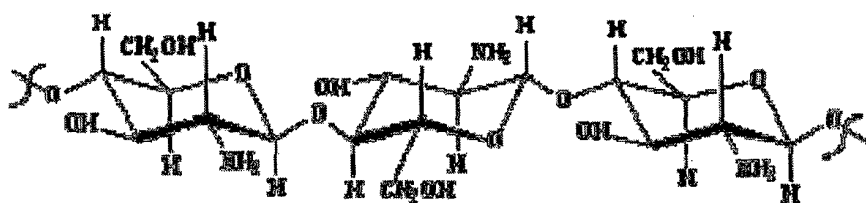


FIGURA 1A

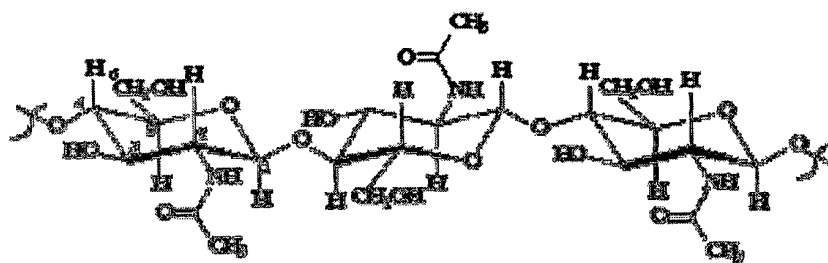


FIGURA 1B

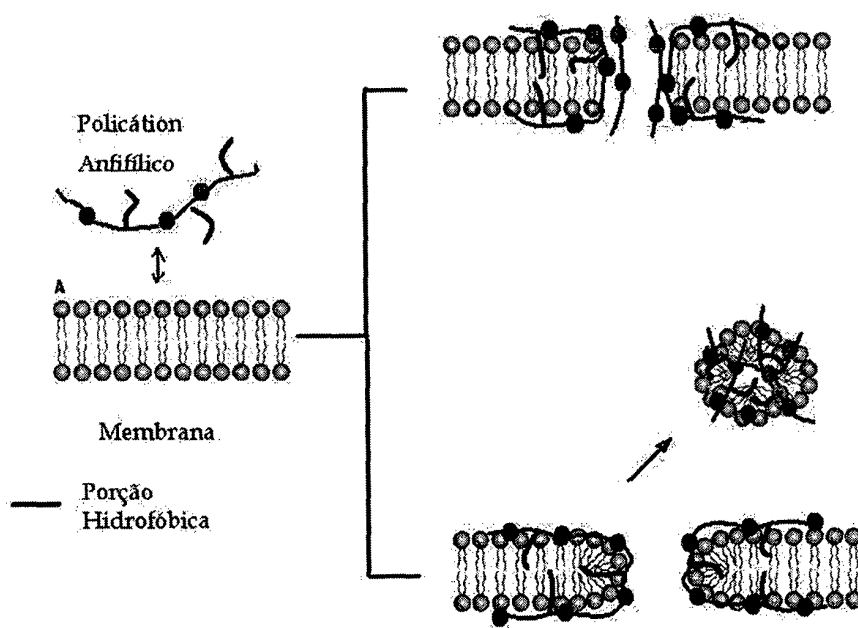


FIGURA 2

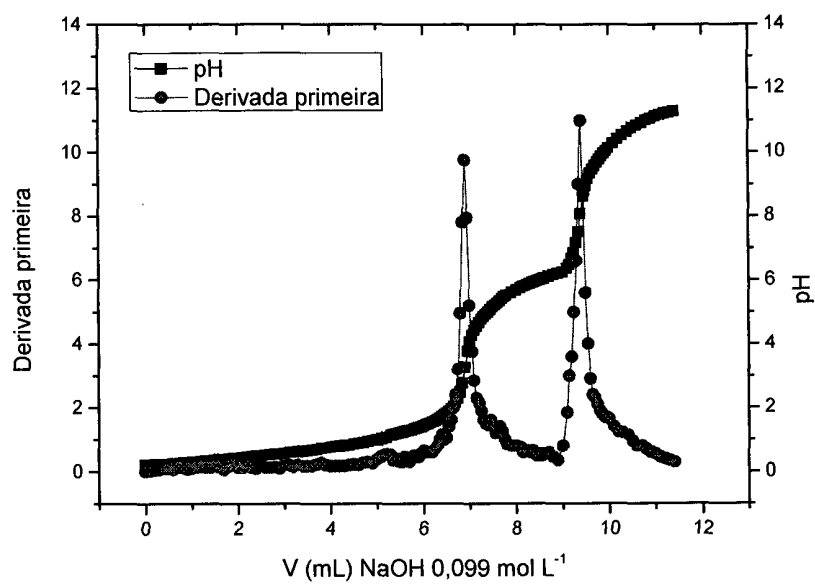


FIGURA 3

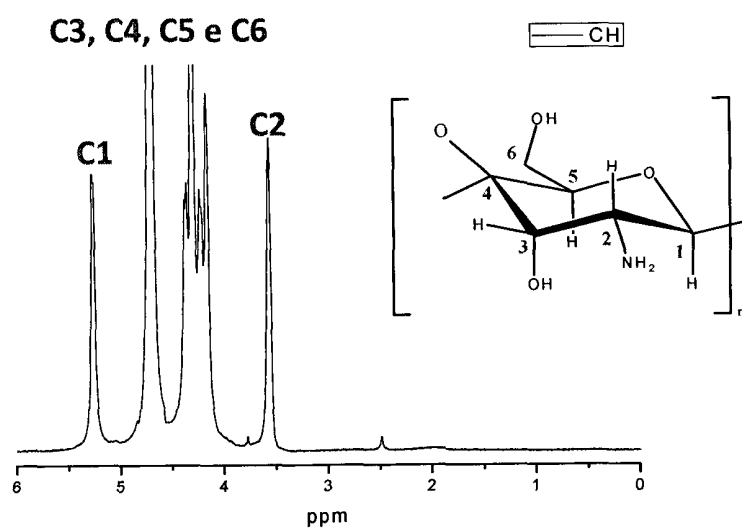


FIGURA 4

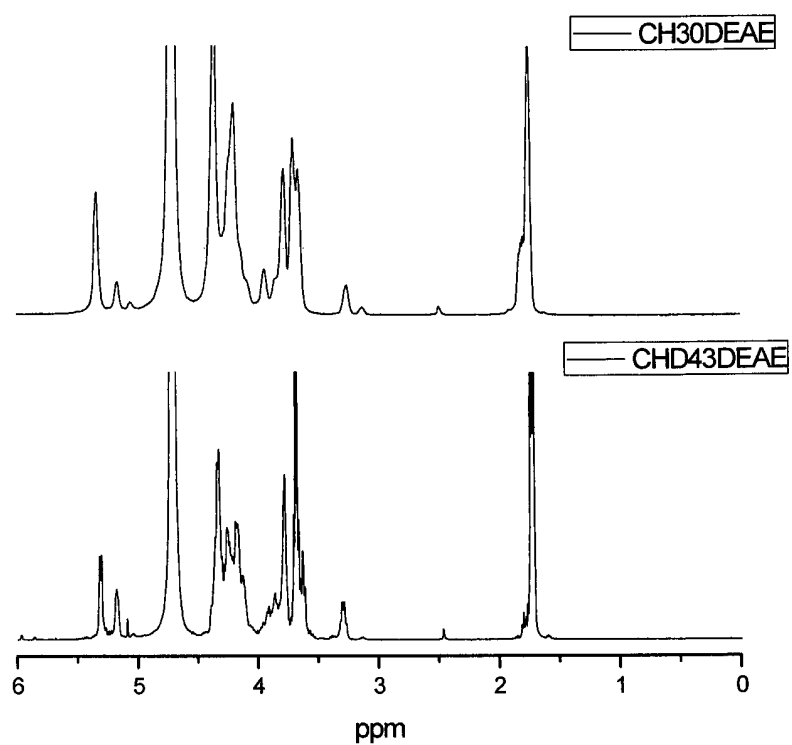


FIGURA 5

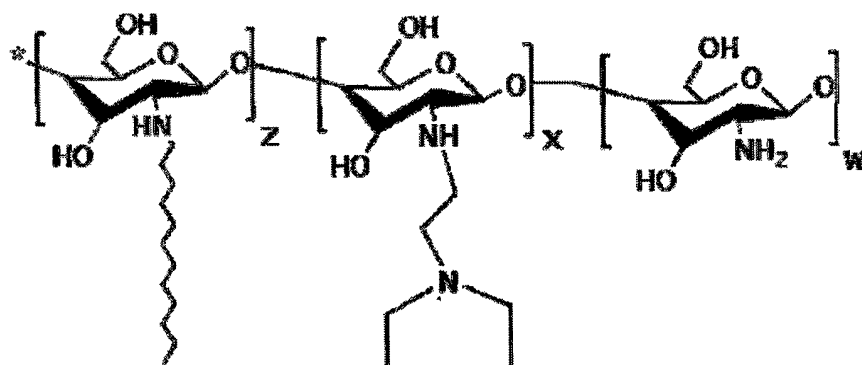


FIGURA 6A

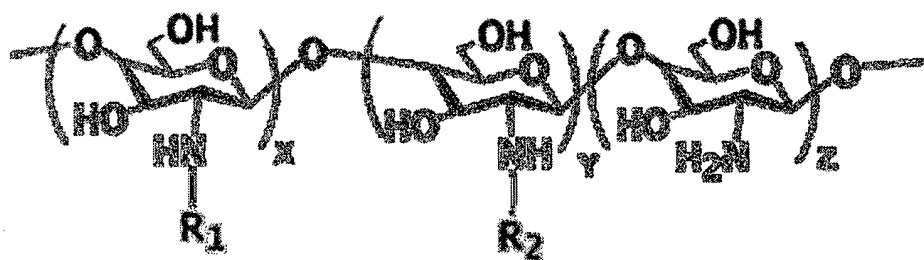


FIGURA 6B

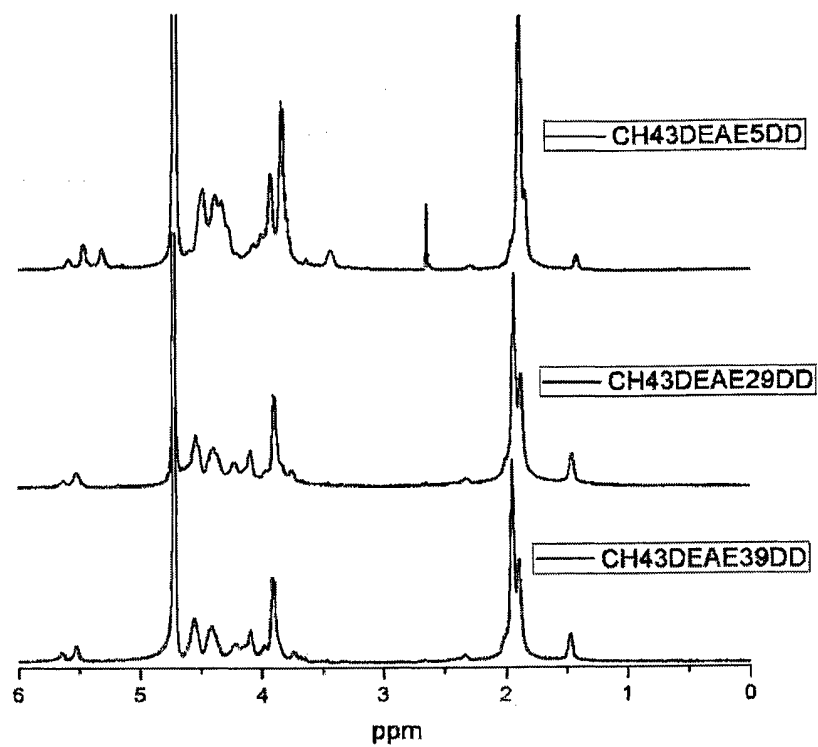


FIGURA 7A

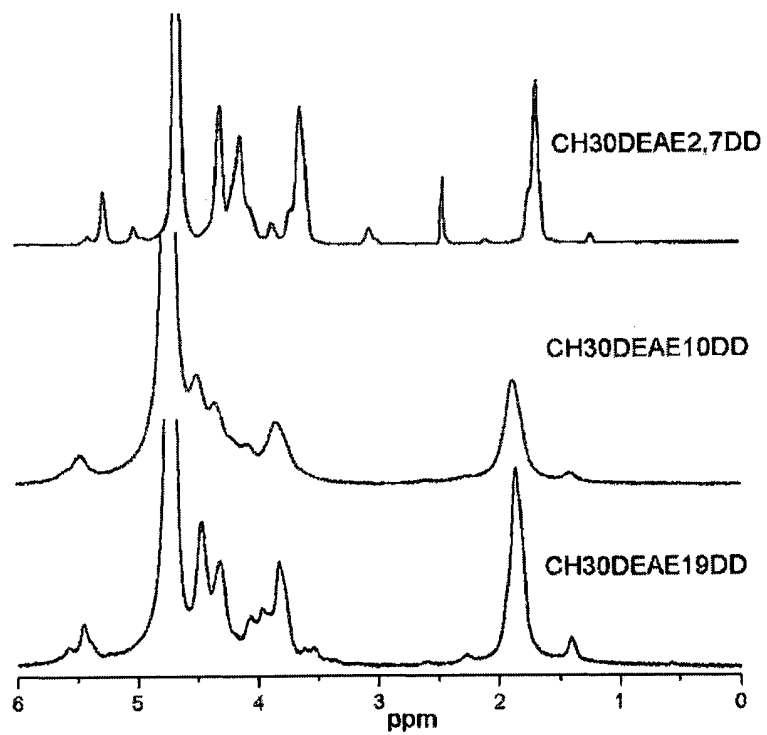


FIGURA 7B

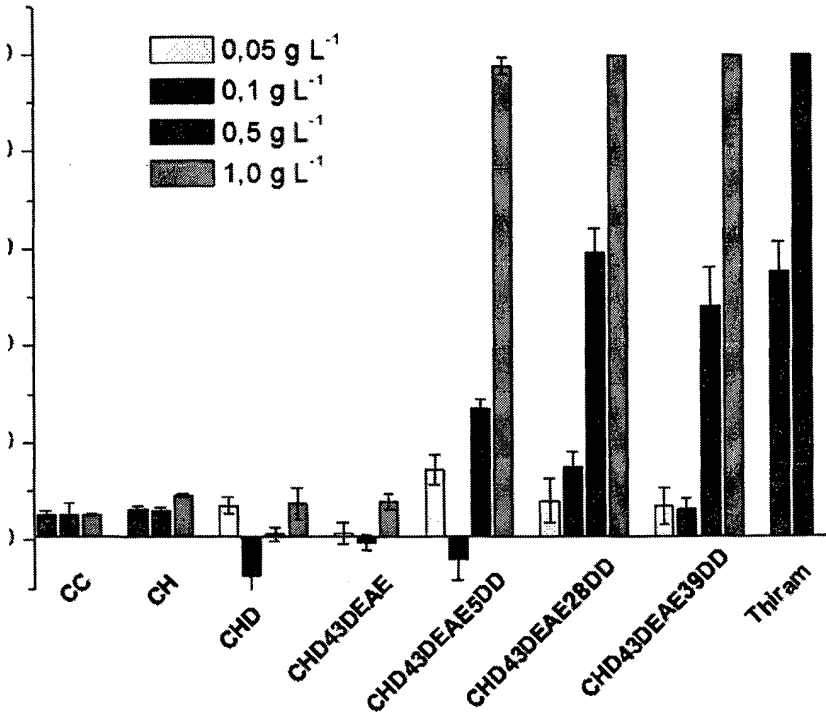


FIGURA 8A

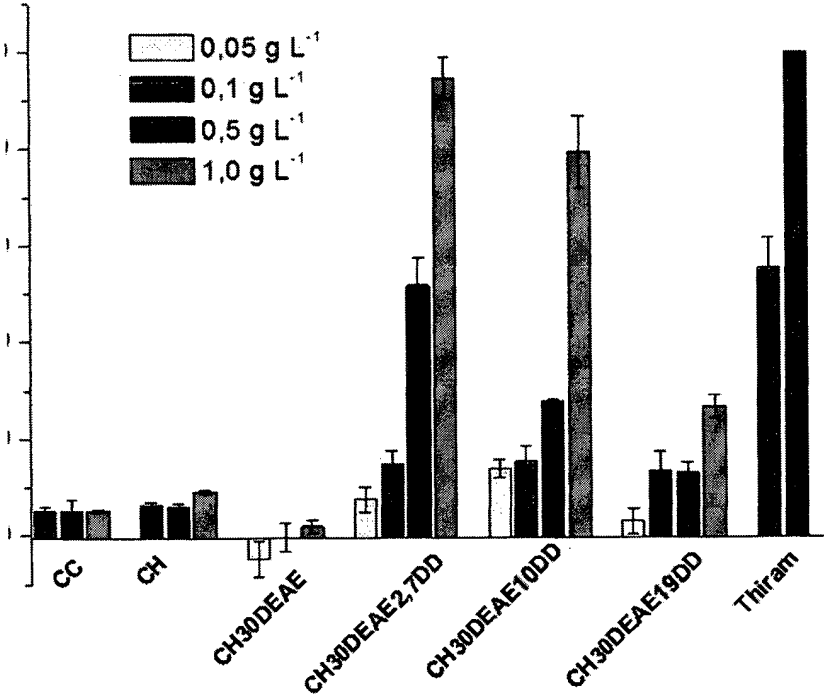


FIGURA 8B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2013/000356

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01N 31/06 (2006.01), A01N 31/14 (2006.01), A01N 33/02 (2006.01), A01N 33/04 (2006.01), A01N 33/08 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, GOOGLE PATENTS, ESPACENET, SCIENCE DIRECT

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2012108540 A1 (CAMLIN FINE SCIENCES LTD [IN]) 03 May 2012 (2012-05-03) See abstract and page 04, paragraph 28, lines 3 and 4.	1 to 5
X	TIERA, M. J. <i>et al.</i> , "Synthesis and characterization of phosphorylcholine-substituted chitosans soluble in physiological pH conditions". <i>Biomacromolecules</i> , 2006, vol. 7, issue 11, pp. 3151-3156, ISSN 1525-7797. See page 02.	6 to 13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07/10/2013

Date of mailing of the international search report

181013

Name and mailing address of the ISA/ BR

INSTITUTO NACIONAL DA
PROPRIEDADE INDUSTRIAL

Rua Sao Bento nº 1, 17º andar

cep. 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ

+55 21 3037-3663

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/BR2013/000356

US 2012108540 A1	2012-05-03	CO 6612176 A2	2013-02-01
		CR 20120082 A	2012-09-04
		EP 2451845 A2	2012-05-16
		MX 2012000378 A	2012-05-23
		PE 16602012 A1	2012-12-15
		WO 2011004398 A2	2011-01-13
-----	-----	-----	-----

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Depósito internacional Nº

PCT/BR2013/000356

A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO

A01N 31/06 (2006.01), A01N 31/14 (2006.01), A01N 33/02 (2006.01), A01N 33/04 (2006.01), A01N 33/08 (2006.01)

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC

B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA

Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)

A01N

Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados

Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)

EPODOC, GOOGLE PATENTS, ESPACENET, SCIENCE DIRECT

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
X	US 2012108540 A1 (CAMLIN FINE SCIENCES LTD [IN]) 03 maio 2012 (2012-05-03) Ver resumo e página 04, parágrafo 28, linhas 3 e 4.	1 a 5
X	TIERA, M. J. <i>et al.</i> , "Synthesis and characterization of phosphorylcholine-substituted chitosans soluble in physiological pH conditions". Biomacromolecules, 2006, vol. 7, issue 11, pp. 3151-3156, ISSN 1525-7797. Ver página 02.	6 a 13

☐ Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C☒ Ver o anexo de famílias das patentes

* Categorias especiais dos documentos citados:

"A" documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância

"E" pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional

"L" documento que pode lançar dúvida (as) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial

"O" documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.

"P" documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada.

"T" documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita como depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção.

"X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.

"Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado com outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.

"&" documento membro da mesma família de patentes.

Data da conclusão da pesquisa internacional

07/10/2013

Data do envio do relatório de pesquisa internacional:

181013

Nome e endereço postal da ISA/BR



INSTITUTO NACIONAL DA
PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Rua São Bento nº 1, 17º andar
cep. 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ
+55 21 3037-3663

Nº de fax:

Funcionário autorizado

Paula Salles de Oliveira Martins

Nº de telefone:

+55 21 3037-3493/3742

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Informação relativa a membros da família de patentes

Deposito internacional N°

PCT/BR2013/000356

Documentos de patente citados no relatório de pesquisa	Data de publicação	Membro(s) da família de patentes	Data de publicação
US 2012108540 A1	2012-05-03	CO 6612176 A2	2013-02-01
		CR 20120082 A	2012-09-04
		EP 2451845 A2	2012-05-16
		MX 2012000378 A	2012-05-23
		PE 16602012 A1	2012-12-15
		WO 2011004398 A2	2011-01-13
-----	-----	-----	-----