

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Química



Dissertação

**Desenvolvimento de filmes híbridos à base de quitosana e
avaliação do potencial antifúngico**

Gabriela Xavier Giacomini

Pelotas, agosto de 2016.

Gabriela Xavier Giacomini

**Desenvolvimento de filmes híbridos à base de quitosana e
avaliação do potencial antifúngico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Química da Universidade Federal
de Pelotas, como requisito parcial à obtenção
do título de mestre em química.

Orientador: Prof^a Dr^a. Aline Joana Rolina Wohlmuth Alves dos Santos

Coorientador: Dr^a. Glaucia de Figueiredo Nachtigal

Pelotas, agosto de 2016.

Gabriela Xavier Giacomini

**Desenvolvimento de filmes híbridos à base de quitosana e
avaliação do potencial antifúngico**

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa:

Banca Examinadora:

.....

Prof^a Dr^a. Aline Joana Rolina Wohlmuth Alves dos Santos (Orientadora) - UFPel

.....

Dr. Carlos Roberto Martins – Embrapa Clima Temperado

.....

Prof^a Dr^a. – Adriane Medeiros Nunes - UFPel

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, presente em todos os momentos...

Aos meus pais, Milton e Maria Alice, meus incentivadores, pelo sacrifício para me dar uma vida digna e pelo apoio em todos os momentos da minha vida. Amo vocês.

À minha irmã Rafaela, que está sempre presente em minha vida, pela ajuda, incentivo e amizade de sempre.

Aos meus irmãos Rodrigo, Renato e Marcelo, pelo apoio em todos os momentos da minha vida.

Ao meu noivo Bruno, pelo companheirismo, compreensão, ajuda e estímulo constantes. Obrigada pelo amor e carinho em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis.

Ao meu cunhado Rafael. Agradeço pela amizade e ajuda em parte do trabalho.

Às minhas avós, em especial a Alicinha pelo incentivo constante.

À Gláucia, pela amizade, orientação, ensino e incentivo sempre presentes na minha formação. Minha inspiração como profissional, obrigada por todas as oportunidades que me deste.

A minha orientadora Aline, pelo apoio, incentivo e ajuda durante o desenvolvimento do trabalho. Obrigada pela oportunidade.

Agradeço ao Carlos pelos ensinamentos, ajuda constante e apoio no trabalho desenvolvido.

À equipe da Biofábrica da Embrapa Clima Temperado – EEC e, em especial ao Daniel, sempre presente, pela amizade, apoio e ensinamentos e a Yasmin pelo apoio, ajuda e incentivo em todos os momentos.

A todo o grupo LASIR pelo apoio e incentivo e, em especial, a Helen, pela ajuda e parceria de sempre.

As minhas amigas, em especial a Aline e a Bruna, que estiveram comigo durante toda minha trajetória, agradeço pelo incentivo, apoio, amizade e por terem me ouvido nos momentos difíceis.

Ao Gustavo. Agradeço por ceder o óleo essencial.

Ao Ricardo. Agradeço pela ajuda nas análises estatística.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante o período de realização deste trabalho.

Os resultados apresentados na presente dissertação contêm informações e dados considerados sensíveis, com potencial para proteção intelectual. Neste sentido, solicitamos sigilo absoluto acerca das informações contidas neste documento, a fim de resguardar uma futura e possível proteção de qualquer invento de produto/processo que possa ser desenvolvido pela Embrapa e UFPel no âmbito dos projetos "Transição Agroecológica: geração de conhecimentos e tecnologias para o redesenho dos agroecossistemas" e "Síntese, caracterização estrutural e aplicação de bioativos a base de quitosana" / "Biomateriais miméticos: Síntese, caracterização estrutural e estudo de aplicações químicas, físicas, biológicas e na ciência de materiais", respectivamente.

RESUMO

GIACOMINI, G. X. **Desenvolvimento de filmes híbridos à base de quitosana e avaliação do potencial antifúngico**. 2016. 90p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

A preocupação da sociedade com o ambiente e com a demanda crescente por alimentos livres de resíduos tem mostrado reflexos no setor agrícola. O principal desafio para a pesquisa tem sido a busca por produtos mais amigáveis e de menor impacto à saúde humana e animal, o que gera uma oportunidade para a inovação quanto a fitoproteção na agricultura brasileira. O uso de substâncias bioativas tais quais a quitosana para o manejo de doenças fúngicas tem se mostrado promissor. Sua atividade microbiana tem sido observada contra uma ampla gama de microrganismos incluindo fungos, algas e algumas bactérias. Assim, este trabalho objetiva a síntese, caracterização estrutural e avaliação de compostos híbridos inéditos à base de quitosana para aplicação antifúngica em goiabeiras, o que está de acordo com a demanda da Metade Sul do Rio Grande do Sul, onde observa-se o plantio de goiabeiras com baixo nível tecnológico ensejando oportunidades para a ocorrência de doenças fúngicas, das quais a antracnose, causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, é uma das principais. Este patógeno compromete tecidos jovens em desenvolvimento, podendo manter-se quiescente em frutos até o período de maturação, de modo a causar danos significativos tanto na fase vegetativa quanto em pós-colheita. A expressão de barreiras estruturais pelo tecido do hospedeiro após o tratamento com quitosana pode restringir a expansão do patógeno invasor, bem como atrasar a retomada do desenvolvimento de infecções quiescentes que se tornam ativas com o declínio do potencial biossintético do tecido em produzir compostos antimicrobianos. No presente trabalho foram desenvolvidos filmes à base de quitosana, com variações de concentração de óleo essencial *Tagetes minuta* Linn. e cloreto de cobre (II). Estes filmes foram caracterizados estruturalmente e morfológicamente, através de espectroscopia de infravermelho, análises térmicas, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva. Além disso, estes filmes foram avaliados quanto a sua ação fitotóxica em folhas de goiabeira e o potencial fungitóxico a *C. gloeosporioides*, expresso pela interferência no crescimento micelial e esporulação do patógeno. Esta avaliação evidenciou que todos os tratamentos contendo quitosana e óleo essencial de *T. minuta* em diferentes concentrações resultaram em menor crescimento micelial e esporulação, quando comparado à testemunha, inclusive com a adição de cloreto de cobre (II) 0,77% (p/v), na formação de um filme híbrido, a ação dos filmes foi potencializada.

Palavras-Chave: quitosana; óleo essencial; cobre (II); fitotoxicidade

ABSTRACT

GIACOMINI, G. X. **Development of hybrid films based on chitosan and evaluation of the antifungal potential**. 2016. 90p. Dissertation (Master's degree) – Post-Graduate Program in Chemistry. Federal University of Pelotas, Pelotas, 2016.

The concern of society with the environment and with the increasing demand for free food waste has shown reflected in the agricultural sector. The main challenge for the research has been the search for more friendly products and less impact to human and animal health, which creates an opportunity for innovation as phytoprotection in brazilian agriculture. The use of bioactive substances such chitosan for the management of fungal diseases have shown promise. Their microbial activity has been observed against a wide range of microorganisms including fungi, algae and some bacteria. Thus, this work aims at the synthesis, structural characterization and evaluation of novel hybrid compounds to chitosan base for antifungal use in guavas which is in line with the demand of the Southern half of Rio Grande do Sul, where planting is observed in guavas with low technological level entailing opportunities for the occurrence of fungal diseases, including anthracnose, caused by *Colletotrichum gloeosporioides*, is one of the main. This pathogen compromises young tissues developing, and may remain quiescent for fruit until the period of maturation, to cause significant damage both in vegetative phase or post-harvest. The expression of structural barriers by host tissue after treatment with chitosan can restrict the expansion of the invading pathogen and delay the resumption of development of quiescent infections that become active with the decline of the potential biosynthetic tissue to produce antimicrobial compounds. In this study chitosan based films were developed with essential oil concentration variations *Tagetes minuta* Linn. and chloride copper (II). These films were characterized structurally and morphologically through infrared spectroscopy, thermal analysis, scanning electron microscopy and energy dispersive spectroscopy. Moreover, these films were evaluated for phytotoxic action in guava leaves and the potential fungitoxic *C. gloeosporioides* expressed by interference on mycelial growth and sporulation of the pathogen. This assessment showed that all treatments containing chitosan and *T. minuta* essential oil at different concentrations resulted in lower mycelial growth and sporulation compared to the control, even with the addition of chloride copper (II) 0.77 % (w/v), the formation of a hybrid film, the action of the films was potentiated.

Key words: chitosan; essential oil; copper (II); phytotoxicity

SUMÁRIO

Introdução	16
Revisão da literatura	19
Quitosana e suas propriedades	19
Síntese de filmes de quitosana incorporando íons metálicos e caracterização estrutural	21
Atividade antimicrobiana de cobre	25
Antracnose em goiabeira	26
Atividade antifúngica de óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i>	27
Capítulo 1 Síntese e caracterização de filmes híbridos à base de quitosana com incorporação de óleo essencial e íons cobre (II).....	29
1.1 Introdução	29
1.2 Parte Experimental	30
1.2.1 Materiais e equipamentos	30
1.2.2 Métodos	31
1.2.2.1 Obtenção do óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i>	31
1.2.2.2 Síntese e caracterização de filmes híbridos a base de quitosana com incorporação de óleo essencial de <i>T. minuta</i> e cloreto de cobre (II) dihidratado ..	32
1.2.2.3 Metodologia para avaliação fitotóxica	35
1.3 Resultados e Discussão	38

1.3.1 Caracterização estrutural por espectroscopia na região do infravermelho (IV) de filmes híbridos a base de quitosana preparados em solução de ácido acético 3% (v/v).....	38
1.3.2 Avaliação da fitotoxicidade dos filmes a base de quitosana contendo diferentes concentrações de ácido acético	41
1.3.3 Caracterização estrutural por espectroscopia na região do infravermelho (IV) dos filmes híbridos de quitosana contendo diferentes concentrações de óleo essencial	42
1.3.4 Avaliação morfológica dos filmes utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	45
1.3.5 Avaliação qualitativa da composição química dos filmes utilizando espectrometria de energia dispersiva (EDS).....	48
1.3.6 Avaliações térmicas dos filmes utilizando termogravimetria (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	50
1.3 Conclusões	58
 Capítulo 2 Avaliação do potencial antifúngico de filmes híbridos a base de quitosana a <i>C. gloeosporioides</i>, agente etiológico da antracnose da goiabeira...	 60
2.1 Introdução	61
2.2 Parte Experimental	61
2.2.1 Materiais e equipamentos	61
2.2.2 Métodos	62
2.2.2.1 Origem e manutenção do isolado de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	62
2.2.2.2 Avaliação do potencial fungitóxico de filmes a base de quitosana no crescimento micelial e na esporulação de <i>C. gloeosporioides</i>	62

2.3 Resultados e discussão	65
2.3.1 Atividade antifúngica “ <i>in vitro</i> ” de filmes a base de quitosana no crescimento micelial de <i>C. gloeosporioides</i>	65
2.3.2 Atividade antifúngica “ <i>in vitro</i> ” de filmes a base de quitosana na esporulação de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	72
2.4 Conclusões	74
Conclusões Gerais	75
Perspectivas Futuras para o Doutorado	76
Referências	77
Anexo	90
Anexo 1	90

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura química da quitina e quitosana. Fonte: ASSIS; LEONI, 2003 19
- Figura 2.** Representação esquemática do modelo (a) Bridge model e (b) Pendant Model. Fonte: MEKAHLIA; BOUZID, (2009).....21
- Figura 3.** Processo de secagem da solução polimérica a base de quitosana em placa de Petri por 24 horas35
- Figura 4.** Processo de recobrimento de folhas de goiabeira cv. Paluma com filme de quitosana e acondicionamento em tubo Falcon para verificação da toxicidade36
- Figura 5.** Processo de recobrimento de folhas de goiabeira cv. Paluma com filme de quitosana a 0,25% (v/v) e acondicionamento em pote contendo espuma floral para verificação da toxicidade37
- Figura 6.** Filmes a base de quitosana em ácido acético 3% (v/v) com diferentes concentrações de óleo essencial e cloreto de cobre (II) (Tabela 1). (a) Filme 1 na ausência de óleo essencial e íon metálico. (b) Filme 2 com de óleo essencial de *T. minuta* 0,38% (v/v). (c) Filme 3 com de óleo essencial de *T. minuta* 0,77% (v/v). (d) Filme 4 com cloreto de cobre (II) 0,77% (p/v). (e) Filme 5 com óleo essencial de *T. minuta* 0,38% (v/v) e de cloreto de cobre (II) 0,77% (p/v). (f) Filme 6 com óleo essencial de *T. minuta* 0,77% (v/v) e de cloreto de cobre (II) 0,77% (p/v)39
- Figura 7.** Espectros na região do infravermelho para os filmes a base de quitosana na concentração de 3% (v/v) de ácido acético com incorporação de óleo essencial de *T. minuta* e cloreto de cobre (II). Absorbância (w.a.) x número de onda (cm^{-1}). (a) Filme 1; (b) Filme 4; (c) Filme 3; (d) Filme 6; (e) Óleo essencial de *T. mint*a 40
- Figura 8.** Folhas de goiabeira recobertas com soluções de quitosana a 1,3% (p/v) dissolvida em diferentes concentrações de ácido acético (a) 3% (v/v); (b) 1% (v/v); (c) 0,5% (v/v) e (d) 0,25% (v/v).....41

Figura 9. Espectro na região do infravermelho para filmes a base de quitosana na concentração de 0,25% (v/v) de ácido acético com incorporação de óleo essencial de *T. minuta* e cloreto de cobre (II) (Tabela 2). Absorbância (w.a.) x número de onda (cm^{-1}). (a) Filme 1a; (b) Filme 4a; (c) Filme 5a; (d) Filme 10a; (e) Filme 11a; (f) Filme 12a; (g) Filme 6a44

Figura 10. Espectro na região do infravermelho para filmes a base de quitosana na concentração de 0,25% (v/v) de ácido acético com incorporação de óleo essencial de *T. minuta* (Tabela 2). Absorbância (w.a.) x número de onda (cm^{-1}). (a) Filme 1a; (b) Filme 2a; (c) Filme 3a; (d) Filme 7a; (e) Filme 8a; (f) Filme 9a; (g) Óleo essencial *T. mint*a45

Figura 11. Micrografia eletrônica de varredura (5000 vezes, $5\mu\text{m}$) para os filmes de quitosana com ausência de íons Cu(II) . (a) Filme 1a na ausência de óleo essencial e íon cobre(II); (b) Filme 2a; (c) Filme 3a; (d) Filme 7a; (e) Filme 8a; (f) Filme 9a contendo óleo essencial de *T. minuta*46

Figura 12. Micrografia eletrônica de varredura (1500 vezes, $10\mu\text{m}$) para os filmes de quitosana (Tabela 2). (h) Filme 6a; (i) Filme 4a; (j) Filme 5a; (k) Filme 10a; (l) Filme 11a; (m) Filme 12a contendo óleo essencial *T. minuta* e cloreto de cobre (II) 47

Figura 13. Espectro EDS para filmes de quitosana (Tabela 2). (a) Filme 1a na ausência de óleo essencial e íon cobre (II); (b) Filme 2a; (c) Filme 3a; (d) Filme 7a; (e) Filme 8a; (f) Filme 9a contendo óleo essencial de *T. minuta*48

Figura 14. Espectro EDS para filmes de quitosana. (h) Filme 6a; (i) Filme 4a; (j) Filme 5a; (k) Filme 10a; (l) Filme 11a; (m) Filme 12a contendo óleo essencial *T. minuta* e cloreto de cobre (II).....49

Figura 15. Termograma de DSC para filme de quitosana na ausência de óleo essencial e íon metálico (Filme 1a)51

Figura 16. Termograma de DSC para quitosana incorporado com 1,92% de óleo essencial de *T. minuta* (Filme 9a)52

Figura 17. Termograma de DSC para quitosana incorporado com 1,53% de óleo essencial de <i>T. minuta</i> e adição de cloreto de cobre (II) (Filme 11a).....	54
Figura 18. Termograma de TGA para o filme de quitosana na ausência de óleo essencial e íon metálico (Filme 1a).....	56
Figura 19. Termograma de TGA para o filme de quitosana incorporado com 1,9% de óleo essencial de <i>T. minuta</i> (Filme 9a).....	57
Figura 20. Termograma de TGA para o filme de quitosana incorporado com 1,53% (v/v) de óleo essencial de <i>T. minuta</i> e 0,77% (p/v) de cloreto de cobre (II) (Filme 11a).....	57
Figura 21. Goiaba com sintomas típicos de infecção por <i>C. gloeosporioides</i> na maturação do fruto	62
Figura 22. IVCM do isolado de <i>C. gloeosporioides</i> na presença dos tratamentos em diferentes concentrações e diluições do óleo essencial de <i>T. minuta</i> (Tabela 2). (A) Testemunha, (B) filme 7a quitosana 1,15% (v/v) óleo essencial, (C) filme 8a quitosana 1,53% (v/v) óleo essencial, (D) filme 9a quitosana 1,92% (v/v) óleo essencial, (E) filme 10a quitosana 1,15% (v/v) óleo essencial com 0,77% (p/v) CuCl ₂ , (F) filme 11a quitosana 1,53% (v/v) óleo essencial com 0,77% (p/v) CuCl ₂ , (G) filme 12a quitosana 1,92% (v/v) óleo essencial com 0,77% (p/v) CuCl ₂ , (H) 1,15% (v/v) óleo essencial, (I) 1,53% (v/v) óleo essencial, (J) 1,92% (v/v).....	70
Figura 23. Efeito do filme à base de quitosana a <i>C. gloeosporioides</i> no quarto dia de avaliação com suas respectivas diluições de óleo essencial de <i>T. minuta</i> (direita), testemunha (esquerda), (a) filme 11a com adição de cloreto de cobre (II) à 0,77% (p/v) e 1,53% (v/v) de óleo essencial; (b) filme 12a com adição de cloreto de cobre (II) à 0,77% (p/v) e 1,92% (v/v) de óleo essencial; (c) filme 8a com adição de 1,53% (v/v) de óleo essencial e (d) filme 9a com adição de 1,92% (v/v) de óleo essencial (meio).....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Soluções poliméricas à base de quitosana	33
Tabela 2. Concentrações do óleo essencial de <i>T. minuta</i> na formação dos filmes à base de quitosana, utilizando ácido acético 0,25% (v/v)	34
Tabela 3. Quantificação de cobre por análise de EDS para filmes a base de quitosana incorporados com óleo essencial e cloreto de cobre (II).....	50
Tabela 4. Concentrações do óleo essencial de <i>T. minuta</i> na formação dos filmes a base de quitosana (Bioensaio 1)	63
Tabela 5. Concentrações do óleo essencial de <i>T. minuta</i> na formação dos filmes a base de quitosana (Bioensaio 2)	64
Tabela 6. Efeito de filmes a base de quitosana sobre o crescimento micelial <i>in vitro</i> de <i>C. gloeosporioides</i> (Bioensaio 1).....	69
Tabela 7. Efeito de filmes a base de quitosana sobre o crescimento micelial <i>in vitro</i> de <i>C. gloeosporioides</i> (Bioensaio 2).....	69
Tabela 8. Efeito de filmes a base de quitosana sobre a esporulação de <i>Colletotrichum gloeosporioide</i> com diluições do óleo essencial de <i>T. minuta</i> (Bioensaio 1)	73
Tabela 9. Efeito de filmes a base de quitosana sobre a esporulação de <i>Colletotrichum gloeosporioide</i> com diluições do óleo essencial de <i>T. minuta</i> (Bioensaio 2)	73
Tabela 10. Componentes do óleo essencial de <i>T. minuta</i>	90

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATR	Refletância total atenuada
BDA	Batata, dextrose e ágar
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
cv.	Cultivar
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
IK	Índice de Kovats
IV	Espectroscopia na região do Infravermelho
IVCM	Índice de velocidade de crescimento micelial
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
TGA	Análise térmica gravimétrica

Introdução

O cenário de preocupação da sociedade com o ambiente e com a demanda crescente por alimentos livres de resíduos tem mostrado reflexos no setor agrícola brasileiro, com endosso do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o qual intensificou a política de incentivo ao uso e ao registro de produtos naturais e biológicos para o combate às pragas. Especificamente no caso das doenças em plantas, há de se considerar o aumento significativo do uso de fungicidas sintéticos. O principal desafio para a pesquisa, neste contexto, tem sido a busca por produtos mais amigáveis e de menor impacto à saúde humana e animal, o que gera uma oportunidade para a inovação quanto à fitoproteção na agricultura brasileira.

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de goiaba (*Psidium guajava* L.) juntamente com a Índia, Paquistão, México, Egito e Venezuela. No Brasil, o cultivo em escala comercial da goiabeira é desenvolvido desde o Rio Grande do Sul até o Maranhão, com destaque para os estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro e, na região sul, para o Rio Grande do Sul e Paraná (PICCININ; PASCHOLATI, 2005).

Na Metade Sul do Rio Grande do Sul observa-se o plantio de goiabeiras com baixo nível tecnológico (NACHTIGAL; MIGLIORINI, 2011), ensejando oportunidades para a ocorrência de doenças das quais a antracnose, causada por *Colletotrichum gloeosporioides* é uma das principais (PICCININ; PASCHOLATI, 2005). Este patógeno compromete tecidos jovens em desenvolvimento, podendo manter-se quiescente em frutos até o período de maturação, de modo a causar danos significativos tanto na fase vegetativa quanto em pós-colheita.

O uso de substâncias bioativas tais como a quitosana para o manejo de doenças fúngicas tem se mostrado promissor. A quitosana pode exercer dupla função, interferindo diretamente no desenvolvimento do patógeno e ativando mecanismos de defesa no tecido vegetal (AGRAWAL et al., 2002). Quanto às propriedades fungistática e fungicida, contra patógenos de vários frutos e hortaliças, a quitosana possui diferentes mecanismos de ação que incluem o acúmulo de quitinase, síntese de inibidores de proteinase, lignificação, indução da síntese de calose (EL GHOUTH et al., 1994) e eliciação da produção de fitoalexinas e peróxido de hidrogênio (AGRAWAL et al., 2002). Ainda, a quitosana pode induzir a atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) (KHAN et al., 2003). A expressão de

barreiras estruturais pelo tecido do hospedeiro após o tratamento com quitosana pode restringir a expansão do patógeno invasor, bem como atrasar a retomada do desenvolvimento de infecções quiescentes, que se tornam ativas com o declínio do potencial biossintético do tecido em produzir compostos antimicrobianos (EL GHAOUTH et al., 1994).

Além da capacidade de formação de filmes permeáveis aos gases (BAI et al., 1988), a quitosana também atua como agente quelante que, seletivamente, liga-se a íons metálicos, o que pode inibir a produção de toxinas e o crescimento microbiano (CUERO et al., 1991). Neste contexto, íons Cu^{2+} têm mostrado efeito antifúngico e antibacteriano (elemento biostático) em baixas concentrações. A eficiência dos fungicidas cúpricos, particularmente eficientes como antifúngicos e antibacterianos, é causada pela desnaturação de proteínas de fungos e bactérias, com a conseqüente interrupção de suas funções (RUSJAN, 2012). Muito embora o cobre seja um metal de grande importância para o controle de doenças, há consciência dos riscos de seu uso permanente em relação ao acúmulo e poluição dos solos, assim como o aspecto residual em frutos e vegetais para consumo *in natura*, o que possibilita o desenvolvimento de veículos mais amigáveis sob o aspecto ambiental, a exemplo do complexo quitosana-cobre.

A exploração da bioatividade antimicrobiana e/ou elicitora de defesa utilizando compostos secundários presentes em óleos essenciais de plantas constitui-se em mais uma forma potencial para o manejo de doenças de plantas (CARVALHO et al., 2008). Os óleos essenciais são misturas principalmente de terpenóides, particularmente de monoterpenos (C10) e sesquiterpenos (C15) e uma variedade de fenóis aromáticos, óxidos, éteres, álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas, os quais determinam as características de aroma e odor da planta doadora. Na atualidade, os óleos essenciais vêm sendo explorados quanto ao potencial para o manejo de doenças (ABAD et al., 2006). Isto se deve, primariamente, pelo fato dos óleos essenciais serem facilmente extraídos, biodegradáveis e facilmente catabolisados no ambiente (ZYGLADO; GROSSO, 1995), não persistirem no solo e na água (ISMAN, 2000) e possuírem baixa ou nenhuma toxicidade contra peixes, pássaros e mamíferos (ENAN et al., 1998). Especificamente no caso do óleo essencial de *Tagetes minuta* L., há rápida volatilização no ambiente de modo a não persistir como os agrotóxicos sintéticos, o que limita seu potencial como fitoprotetor. A

incorporação de óleos essenciais com quitosana pode aumentar as propriedades antimicrobianas do composto (KYU KYU WIN et al., 2007) e estender a fitoproteção devido à liberação lenta na superfície do vegetal (OUATTARA et al., 2000).

Em virtude disso, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver filmes híbridos de quitosana com a incorporação de óleo essencial e íons cobre (II) e caracterizá-los estruturalmente e morfologicamente (Capítulo 1), bem como avaliar a atividade antifúngica destes filmes em relação a *C. gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose da goiabeira (Capítulo 2), com o intuito de desenvolver uma inovação na área de fitoprotetores, com potencialidade de patenteamento numa parceria entre UFPel e EMBRAPA Clima Temperado.

Revisão da literatura

Quitosana e suas propriedades

A quitosana é um polímero natural derivado do processo de desacetilação da quitina, que é o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza, sendo que o mais abundante é a celulose. Devido a suas características atóxicas e à facilidade de formação de géis, a quitosana tem sido considerada, há décadas, como um composto de interesse industrial e especialmente de uso farmacêutico (SINGLA; CHAWLA, 2001).

Sua estrutura é formada pela repetição de unidades beta (1-4) 2-amino-2-deoxi-D-glucose (ou D-glucosamina), apresentando uma cadeia polimérica similar à da quitina. Grupos hidroxilas (OH) estão presentes na estrutura geral desses biopolímeros, mas a principal diferença entre quitina e quitosana é a presença de grupos amino (NH_2) na sua estrutura (Figura 1). A fórmula molecular genérica pode ser expressa como $(\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N})_n$ (ASSIS; LEONI, 2003).

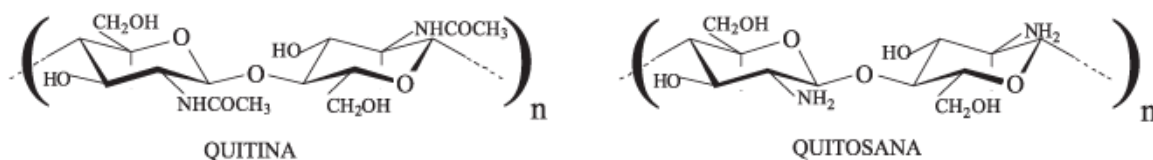


Figura 1. Estrutura química da quitina e quitosana. Fonte: ASSIS; LEONI, 2003.

A quitosana é um biopolímero solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, com a protonação do grupo amino gerando o íon NH_3^+ , que confere propriedades especiais diferenciadas em relação, por exemplo, às fibras vegetais (BERGER et al., 2004).

Como materiais funcionais, quitina e quitosana possuem um conjunto exclusivo de características: biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade, propriedades antibacterianas, quelação de íons metálicos e capacidade de formar filmes. (HOAGLAND; PARRIS, 1996).

Assim, devido a estas características, há um interesse constante em pesquisas que possibilitem a utilização e aplicação destes materiais, especialmente, em aplicações benéficas ao meio ambiente (KRAJEWSKA, 2003).

Devido as suas propriedades, a quitosana já vem sendo utilizada na preservação de alimentos, na indústria farmacêutica, no clareamento de sucos, na fabricação de embalagens, na biorremediação por adsorção de metais pesados, corantes e outros resíduos poluentes no meio ambiente (SHAHIDI, et al., 1999; FAI et al., 2008; HROMIS et al., 2016).

Na agricultura, a quitosana tem sido aplicada como biofilme na preservação de frutas, legumes e sementes contra a deteriorização por microrganismos, para estimular o sistema imune da planta, proteger a planta contra o ataque de patógenos e favorecer o seu crescimento (HERNANDÉZ-LAUZARDO et al. 2008). Sua atividade microbiana tem sido observada contra uma ampla gama de microrganismos incluindo fungos, algas e algumas bactérias (EUN et al., 2010; ALLAN; HADWINGER, 1979). Tem sido mostrado a inibição do crescimento de vários fungos, exceto aqueles contendo quitosana como constituintes da parede celular (EL GHAOUTH et al., 2000).

Os grupamentos aminos e hidroxilas da quitosana são bons ligantes de coordenação a íons metálicos (MEKAHLIA; BOUZID, 2009), dentre estes os íons de cobre, zinco e magnésio (CARDOSO et al. 2012).

Vários mecanismos de quelação que envolvem a quitosana e outros biopolímeros têm sido propostos na literatura, muitos deles baseados no íon cobre (II). Os mecanismos de absorção de cobre podem ser classificados em dois grupos, (Figura 2): “Bridge model” e “Pendant Model”, (AIROLDI, C.; LIMA, 2003). No “Bridge model” (modelo de ponte), íons metálicos estão ligados a diversos grupamentos amino e hidroxila de uma mesma cadeia ou cadeias diferentes, por meio de complexação inter ou intramolecular. Já no modelo “Pendant Model” (modelo de pingente) os grupamentos amino presentes na quitosana ligam-se aos íons metálicos formando um pingente, o qual sugere a formação de uma única ligação entre o íon cobre (II) e o grupamento amino, cuja esfera de coordenação do cobre é completada por ligantes aquo (GUIBAL, 2004).

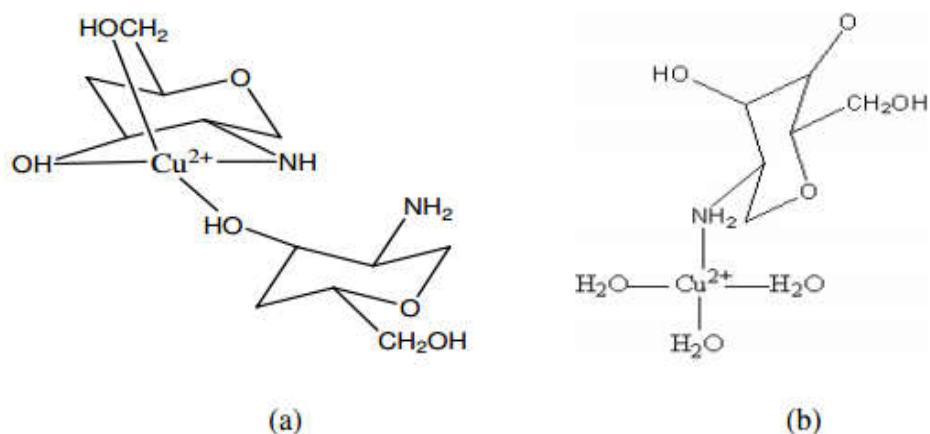


Figura 2. Representação esquemática do modelo (a) Bridge model e (b) Pendant Model.
Fonte: MEKAHLIA; BOUZID, (2009).

A incorporação de íons cobre ao polímero de quitosana com alto peso molecular, por um mecanismo de quelação, pode representar maior capacidade de efeito antibacteriano, o que torna muito favorável a formação de complexos de quitosana- $\text{Cu}(\text{II})$ para aplicações industriais, médicas e alimentares (MEKAHLIA; BOUZID, 2009).

Os filmes de quitosana possuem boa resistência mecânica com permeabilidade molecular seletiva ao vapor de água e esta é afetada pela espessura do mesmo, pelo grau de desacetilação e massa molar. A quitosana é facilmente solúvel em meio ácido e tem a capacidade de formar interações químicas com materiais hidrofóbicos e hidrofílicos (CHEN et al., 2002).

A inserção de moléculas ao polímero de quitosana pode vir a contribuir na síntese de materiais inéditos e na aplicação destes produtos para o controle de doenças causadas por fungos e bactérias.

Síntese de filmes de quitosana incorporando íons metálicos e caracterização estrutural

A quitosana vem atraindo atenção de pesquisadores devido a sua bioatividade antimicrobiana (KONG et al., 2008). Suas características físico-químicas resultam em propriedades como fácil formação de géis, capacidade filmogênica e boas propriedades mecânicas. Filmes de quitosana têm sido objeto de avaliações

práticas, nos quais a ausência ou não de poros e suas dimensões tornam-se fundamentais para a definição de aplicações (ASSIS; SILVA, 2003).

Um dos processos de preparação de filmes recorrente na literatura é o *casting*, que consiste no espalhamento de uma solução filmogênica (macromoléculas, solvente e plastificante) em um suporte, seguido de desidratação lenta a baixa temperatura (LOURDIN et al., 1995; DOLE et al., 2004; MÜLLER et al., 2008).

Existem diversos métodos para caracterizar filmes poliméricos. A escolha desses métodos depende das características químicas e físicas que se deseja estudar.

A espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) ou espectroscopia na região do infravermelho (IV) apresenta larga faixa de aplicações que vai desde a análise de moléculas pequenas até sistemas complexos como células e tecidos (BERTHOMIEU; HIENERWADEL, 2009). Ela é uma das espectroscopias vibracionais que adquiriu avanços, principalmente pela possibilidade de usar a amostra em estado sólido amorfo ou cristalino, soluções aquosas, solventes orgânicos, filmes, pastilhas e membranas (FORATO et al., 1997).

Análises térmicas também são utilizadas para a caracterização de materiais híbridos e não híbridos, sendo que a estabilidade térmica de materiais é definida como grupo de técnicas por meio das quais uma substância e/ou seus produtos de reação são avaliados em função da temperatura e/ou tempo (SILVA et al., 2007). Destaca-se a colorimetria exploratória diferencial (DSC), uma técnica termoanalítica nas quais as variações de entalpia da amostra são monitoradas em relação a um material inerte enquanto ambas são submetidas a um programa controlado de temperatura (FERRER et al., 2015) e a análise termogravimétrica (TGA) técnica que apresenta informações por meio da variação de massa em relação ao tempo e/ou temperatura.

O termograma de TGA apresenta informações de forma acessível, mostrando com clareza as temperaturas correspondentes ao início e final do processo térmico (ALBUQUERQUE, 2006; DANTAS, 2006). É comum realizá-la a partir da temperatura ambiente até alcançar em torno de 600-650 °C. A representação dos

seus resultados pode ser feita na forma de gráfico, relacionando a perda de massa (%) com a temperatura (°C) (SCHMIDT et al., 2005).

Outra técnica utilizada para a caracterização de materiais é a análise química por espectrometria de energia dispersiva (EDS), onde os sinais são gerados a partir da interação de um feixe de elétrons de alta energia com os elementos químicos da superfície da amostra. Nesse caso, de tal interação são produzidos fótons de raios-x cujos comprimentos de onda são característicos para cada elemento com o qual houve a interação. Os sinais gerados pela amostra são captados por detectores específicos e apresentados na forma de espectros de energia versus intensidade relativa dos picos. A grande vantagem da técnica está no fato de que a análise é realizada a partir de um volume muito pequeno de material (CHINAGLIA; CORREA, 1997).

A literatura traz materiais híbridos ou não híbridos sendo caracterizados com os métodos citados. Assim, Moura e colaboradores (2015) desenvolveram filmes de quitosana pelo método de *casting* e caracterizaram utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho (IV) e análises térmica TGA e DSC. Segundo os autores, os filmes produzidos apresentaram propriedades físico-mecânicas aceitáveis para utilização em embalagens de alimentos, evidenciado pelas caracterizações realizadas.

Já Vaseeharan e colaboradores (2015) caracterizaram compostos de quitosana com óxido de zinco utilizando as mesmas técnicas de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV), além de difração de raios-X. A análise de FTIR confirmou a formação de composto de quitosana-ZnO, onde os autores citam deformações e estiramentos referentes aos grupamentos OH, NH₂ e CH da quitosana. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) forneceu informações sobre as características morfológicas das microesferas, tais como a presença de fissuras e poros, permitindo uma análise rápida e direta da eficiência do processo de formação do filme (MUZZARELLI et al., 2004).

Propriedades biológicas dos materiais híbridos compostos por quitosana-metal também são relatados na literatura. Adewuyi e colaboradores investigaram o comportamento de quelatos de quitosana-metal com cobalto (II) e níquel (II) sobre ação antibacteriana de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os quelatos de

quitosana-metal foram preparados variando-se a proporção molar de íons metálicos a uma quantidade fixa de quitosana. As propriedades estruturais e morfologia dos quelatos foram, respectivamente, determinados utilizando FTIR e MEV. Os autores ainda relatam que deslocamentos nas bandas no FTIR estão relacionadas à interação de quitosana com os íons metálicos, sendo que o par de elétrons livres do nitrogênio permite uma ligação eficiente aos metais. A análise de MEV também indicou alteração na morfologias, com a formação de partículas irregulares.

Ghaffari e colaboradores (2007) sintetizaram e caracterizaram filmes a base de pectina/quitosana/Eudragit®RS (polímeros derivados de ácido acrílico e metacrílico) através de análises termogravimétricas. A quitosana evidencia dois estágios térmicos, sendo o primeiro em 56,7 °C, relacionado com a evaporação de água e outros compostos voláteis e o segundo entre 200 e 309 °C relacionado à degradação da quitosana. A pectina evidencia dois estágios térmicos, sendo o primeiro em 50-100°C, relacionado com a evaporação de água e o segundo entre 200 e 234 °C relacionado à despolimerização das cadeias de pectina. No caso do /Eudragit®RS, nenhum evento térmico foi observado até 300°C, o primeiro evento térmico ocorreu a uma taxa máxima de 354°C. O perfil de degradação do filme que contém a mistura de pectina/quitosana/Eudragit®RS consistiu dos eventos típicos para pectina e Eudragit®RS. Os autores relatam que o comportamento observado é devido à degradação de misturas poliméricas, que indica miscibilidade na mistura.

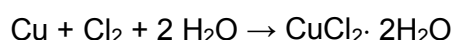
Tripathi e colaboradores (2010) desenvolveram e caracterizaram filmes ternários a base de quitosana/álcoolpolivinílico/pectina, para utilização como embalagens em alimentos, através de análises termogravimétricas. A quitosana evidencia dois estágios térmicos, sendo o primeiro em 50 a 150 °C, relacionado com a evaporação de água, o segundo entre 200 e 300 °C relacionado à degradação da quitosana. Os filmes ternários a base de quitosana/álcoolpolivinílico/pectina apresentaram três estágios térmicos, sendo o primeiro em 50 a 150 °C, relacionado com a evaporação de água, o segundo entre 250 e 350 °C relacionado à degradação da quitosana/álcoolpolivinílico/pectina, o terceiro entre 400 e 450 °C devido a co-produtos gerados pelo álcool polivinílico durante o processo de degradação térmico. Os autores descrevem que o estudo térmico foi razoável para aplicações de embalagens em alimentos, ao qual retrata perdas de massa em torno de 200-300° C resultante de filme ternário.

O método de *casting* é o mais utilizado para a síntese de filmes por não exigir equipamentos, como por exemplo, na técnica de *dip-coating* utilizadas para preparação de filmes finos a partir de precursores em fase líquida, cujo princípio de funcionamento consiste em mergulhar perpendicularmente o substrato dentro da solução contendo o precursor e depois retirá-lo da mesma. O processo de inserção e retirada do substrato na solução deve ser realizado com velocidade controlada e constante e sem nenhum tipo de vibração ou interferência externa, de modo a garantir a deposição de um filme homogêneo (OLIVEIRA; ZARBIN, 2005).

Além disso, os métodos de caracterização descritos neste trabalho apresentam-se como os mais utilizados, atualmente, para caracterização estrutural, morfológica e térmica dos filmes de quitosana, isto é, para os filmes de quitosana carreadores de moléculas orgânicas de interesse, bem como para os filmes contendo moléculas de interesse e íons metálicos.

Atividade antimicrobiana de cobre

Oxicloreto de cobre (II) hidróxido de cobre (II) e óxido cuproso, quando aplicados em goiabeiras, não causam abortamento de flores e queda de frutos, porém causam sintomas de fitotoxicidade em níveis severos em frutos de diâmetro entre 25 e 35 mm, reduzindo sua qualidade, podendo depreciá-los comercialmente (GOES et al. 2004). O cloreto de cobre (II) é um composto sólido apontado por Rusjan (2012) com atividade fungicida na agricultura, sendo preparado a partir da cloração de cobre metálico (Equação 1)



Equação 1

A natureza antibacteriana do cobre é dependente de vários fenômenos na interface metal-microrganismo. Acredita-se que a estrutura tri-dimensional de proteína do organismo é alterada pelo cobre de modo a prejudicar a sua função normal e, por conseguinte, há a inativação do microrganismo (STERRITT; LESTER, 1980). O mesmo ocorre com as enzimas do microorganismo patógeno, uma vez que íons cobre tendem a formar radicais (SAMUNI et al., 1983), como radicais superóxido (DOMEK et al., 1984) que degradam a estrutura das enzimas (MANZL et al., 2004). Já sua interação com lipídeos, tende a causar peroxidação, danificando a

membrana celular (DOMEK et al., 1987). No metabolismo celular microbiano, o cobre tende a danificar as reações na cadeia respiratória, que ocorrem na mitocrôndria (KUWAHARA et al., 1986).

O cobre tem sido utilizado como um fungicida e pode ser aplicado de várias formas para controlar doenças da goiabeira (MOSSLER; CRANE, 2003), como a antracnose causada pelo fungo *C. gloeosporioides*.

Antracnose em goiabeira

Embora a goiabeira seja considerada uma espécie bastante rústica, alguns patógenos que incitam doenças são considerados relevantes para a região Sul do Rio Grande do Sul e sua ocorrência deve ser monitorada.

A antracnose, causada pelo fungo *C. gloeosporioides*, é uma doença que ocorre tipicamente quando há condições de alta umidade e agrava-se nas fases de florescimento, maturação e pós-colheita em pomares mal conduzidos. Esta doença também tem sua importância em condições de produção em que os agricultores utilizam o ensacamento dos frutos, pois estes geram acúmulo de umidade, o que favorece a infecção e disseminação do patógeno (ZAMBOLIM, 1996).

No caso das doenças pós-colheita, a prevenção das infecções em campo torna-se uma estratégia interessante, uma vez que a infecção pode ocorrer ainda em frutos jovens, permanecendo em estado quiescente até a maturidade (FILHO, 2005).

O patógeno (*C. gloeosporioides*) pode afetar folhas em qualquer fase de desenvolvimento, ramos novos, flores e frutos. Em períodos de alta umidade, é possível observar o crestamento dos ramos novos, os quais adquirem coloração pardo-escura, tornando-se secos e quebradiços (SOARES et al., 2008). Os sintomas em folhas e frutos são caracterizados por áreas circulares de coloração escura. Em condição de alta umidade é possível observar coloração rosada que consiste em uma matriz mucilaginosa onde estão os esporos do patógeno (PERES et al., 2002).

Nos frutos, podem-se observar pequenas manchas circulares de coloração amarronzada que aumentam de tamanho e tornam-se reprimidas. Estas lesões podem coalescer, dando origem a uma mancha de tamanho irregular. Quando os frutos aumentam de tamanho, como a área afetada não acompanha esse crescimento, ocorre o rompimento da superfície da lesão. No caso de infecção

severa, os frutos tornam-se mumificados e pretos. Em frutos maduros, a infecção inicia-se após a colheita; pode ocorrer podridão mole e, assim como em frutos imaturos, sob condição de alta umidade, desenvolve-se uma massa de esporos sobre o centro da lesão (JUNQUEIRA, 2000).

O fungo sobrevive em ramos infectados na planta ou em restos vegetais contaminados deixados sobre o solo. O patógeno é disseminado a longa distância por meio de mudas ou partes vegetais de propagação e frutos contaminados. No pomar, os esporos são disseminados por respingos de água de chuva ou de irrigação, tratos culturais e por insetos (ZAMBOLIM, 1996).

Longos períodos de molhamento foliar, alta umidade relativa do ar e temperaturas não muito elevadas (22 a 25°C) são as principais condições favoráveis à infecção pelo patógeno (SOARES et al., 2008).

Atividade antifúngica de óleo essencial de *Tagetes minuta*

Tagetes minuta é uma planta nativa das Américas (CORNELIUS; WYCLIFFE, 2016) e é conhecida como chinchilho. Tem sido utilizada na medicina popular devido a sua atividade antimicrobiana, anti-helmíntica, diurética e anti-espasmódica (TERESCHUK et al., 1997).

Ela cresce naturalmente durante o ano, a partir da primavera, e praticamente desaparece com o início do inverno. Seu óleo essencial tem amplas aplicações como aromatizantes e em perfume. Além disso, é bem conhecido pelas suas propriedades biocidas.

Vários estudos sobre *T. minuta* relatam que há variações na composição do óleo essencial de acordo com o local de colheita, a fase de crescimento da planta e as diferentes partes da planta de onde é extraído (CHAMORRO et al., 2008).

O termo óleo essencial designa líquidos oleosos voláteis, dotados de aroma forte, quase sempre agradável, compostos por misturas de substâncias orgânicas imiscíveis em água e extraídos de plantas por processos específicos, sendo o mais simples por arraste de vapor d'água (CRAVEIRO, 1981).

Pesquisas vêm crescendo em relação ao estudo das potencialidades biológicas de óleos essenciais extraídos de plantas medicinais e aromáticas, pois são constituídos por uma mistura complexa de substâncias naturais, responsáveis

pelas funções de adaptação e defesa da planta no meio ambiente as quais têm indicado potencial de controle de fitopatógenos, atividade alelopática, atividade anestésica (BAKKALI et al., 2008), bem como ação antimicrobiana e antioxidante (BONILLA et al., 2012).

Desta maneira, os óleos essenciais são lipídios interessantes a serem incorporados nos filmes de quitosana, uma vez que estes extratos vegetais apresentam características que tendem a potencializar a ação inata da quitosana.

1. Síntese e caracterização de filmes híbridos à base de quitosana com incorporação de óleo essencial e íons cobre (II)

1.1 Introdução

A quitosana é um biopolímero que tem recebido grande atenção em uma variedade de aplicações, devido à sua biodegradabilidade e biocompatibilidade. Devido à sua excelente propriedade de formação de filmes, a quitosana pode ser usada eficazmente como um material formador de filmes para transportar ingredientes ativos, tais como minerais, vitaminas e óleos para aplicações na área de alimentos (NAYAK et al., 2012).

Vários estudos têm demonstrado que a incorporação de óleos essenciais em películas ou revestimentos de quitosana pode não só melhorar as propriedades antimicrobiana e antioxidante do filme, mas também reduzir a permeabilidade ao vapor de água e diminuir a oxidação lipídica do produto sobre o qual é aplicada a película (KANATT et al., 2008).

Recentemente, uma série de pesquisas têm sido publicadas caracterizando o uso da quitosana como revestimentos protetores e cobertura de alimentos, frutas e legumes (SHAHIDI et al., 1999). Essas pesquisas enfocam, principalmente, as propriedades antifúngicas e antibacterianas da quitosana, de acordo com No e colaboradores (2002).

Além disso, o cobre tem sido utilizado como fungicida e pode ser aplicado na forma de diferentes sais (MOSSLER; CRANE, 2003). O complexo quitosana-cobre tem sido estudado por Barnabas e colaboradores (2014), que afirmam o potencial antimicrobiano deste complexo quando quantidades suficientes de íons de cobre (II) estão presentes no polímero de quitosana.

Os filmes de quitosana comercial, descritos na literatura, são elaborados pelo método de *casting*, com diferentes concentrações de ácido acético e apresentam bandas observadas em análise de espectroscopia na região do infravermelho características da quitosana em pó, assim como as análises térmicas que

apresentam termogramas semelhantes de decomposição tanto para os filmes quanto para o pó (FRÁGUAS et al., 2015).

O objetivo do presente capítulo foi desenvolver filmes híbridos de quitosana com a incorporação de óleo essencial e íons cobre (II), através do método de *casting*, e caracterizá-los através de métodos estruturais, morfológicos e térmicos.

1.2 Parte Experimental

O trabalho experimental relatado no Capítulo 1 foi realizado no Laboratório de Sólidos Inorgânicos (LASIR) da Universidade Federal de Pelotas - Campus Universitário Capão do Leão, Pelotas, excetuando-se a parte experimental do item 1.2.2.3, que foi realizada na EMBRAPA – Clima Temperado.

1.2.1 Materiais e equipamentos

- ✓ Quitosana de médio peso molecular na forma de pó fornecida pela Sigma Aldrich com massa molecular $106.10^4 \text{ g.mol}^{-1}$ e grau de desacetilação 95%;
- ✓ Cloreto de cobre II dihidratado P.A. (Cloreto de cobre (II) $2\text{H}_2\text{O}$) fornecido pela Vetec Química fina;
- ✓ Ácido acético glacial P.A., fornecido pela Vetec Química fina;
- ✓ Óleo essencial de *Tagetes minuta* fornecido pelo Dr. Gustavo Schiedeck, Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental da Cascata. (Anexo 1);
- ✓ Tween 80 (P.S) (Polissorbato 80) fornecido pela Vetec Química fina.

As caracterizações estruturais, morfológicas e térmicas foram realizadas na UFPel ou em Instituições colaboradoras.

Para a análise de espectroscopia na região do infravermelho foi usado um espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier FTIR-ATR Shimadzu, modelo IRAffinity-1, foram retirados fragmentos de aproximadamente 3 mm de diâmetro de cada filme, após secagem em estufa a 50°C por 24 horas. A análise foi realizada na região de $400 \text{ a } 4000 \text{ cm}^{-1}$.

As curvas DSC, dos filmes, foram obtidas em um Calorímetro Exploratório Diferencial da SHIMADZU modelo DSC-60. A técnica de (DSC) foi empregada para

examinar possíveis interações entre a matriz polimérica e a água. Para obtenção da análise, pesaram-se cerca de 3 mg dos filmes em cadinhos de alumínio herméticos e para referência foi utilizado apenas o cadinho de alumínio hermético vazio (sem amostra). A programação utilizada para todas as análises foi uma rampa de aquecimento de 30 até 350 °C; razão de 10 °C/min sob atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.

As curvas TGA, dos filmes, foram obtidas em termogravimetria derivada da SHIMADZU modelo DTG-60. A técnica de (TGA) foi empregada para examinar a porcentagem da perda de massa dos filmes e temperatura de decomposição dos filmes. Para a análise, pesaram-se cerca de 2 a 3 mg dos filmes depositados em cadinho de platina e para referência foi utilizado apenas o cadinho de platina vazio (sem amostra). A programação utilizada para todas as análises foi uma rampa de aquecimento de 30 até 500 °C; razão de 10 °C/min, sob atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL/min.

As micrografias de varredura foram obtidas num microscópio eletrônico de varredura (MEV), modelo Jeol, JSM – 6610, equipado com detector de espectroscopia de energia dispersiva (EDS), modelo thermo scientific. Para esta análise foram retirados fragmentos de aproximadamente 1 mm de diâmetro de cada filme, as imagens da superfície dos filmes foram obtidas com resoluções de 1500 e 5000 vezes e velocidade de 10 KeV. Os filmes foram montados em “stubs” utilizando fita dupla face e recobrimento metálico de ouro. Estas análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica do Sul (CEME-SUL) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

1.2.2 Métodos

1.2.2.1 Obtenção do óleo essencial de *Tagetes minuta*

O material botânico de *T. minuta* foi oriundo de áreas cultivadas com restos culturais de fumo, nas coordenadas 31° 38' 57,6" na latitude sul e 53° 03' 20,6" na longitude oeste, no município de Arroio do Padre, RS.

Para a obtenção do óleo essencial foram utilizadas aproximadamente 13 Kg de folhas e flores recém colhidas, a extração foi realizada pelo método de

hidrodestilação por arraste com vapor d'água em equipamento semi industrial, de inox, marca Linax.

O material vegetal, previamente fragmentado e limpo, foi depositado sobre uma tela, fixado acima do depósito de água, que se encontra no fundo do equipamento, a fim de evitar o contato direto entre o material vegetal e a água. Por meio de aquecimento, a água no estado de vapor, permeou-se no material vegetal arrastando os componentes voláteis até o condensador, que promoveu o resfriamento para obtenção do estado líquido do óleo e do hidrolato.

Ao final do processo de extração, procedeu-se à centrifugação para separação dos líquidos imiscíveis e obtenção de óleo essencial, que foi armazenado em recipiente de vidro âmbar e conservado em freezer à -19 °C até a sua utilização.

1.2.2.2 Síntese e caracterização de filmes híbridos a base de quitosana com incorporação de óleo essencial de *T. minuta* e cloreto de cobre (II) dihidratado

Para o preparo dos filmes utilizou-se como base a quitosana em pó, através do método proposto por Wladymyr e colaboradores (2013), onde solução de quitosana foi preparada pela técnica de evaporação do solvente, chamada de *casting*.

Inicialmente, a quitosana foi dissolvida a 1,3% (p/v) em uma solução de ácido acético a 3% (v/v). A fim de se obter uma melhor emulsificação dos filmes foram adicionados 0,046% (v/v) de Tween 80 (ALI et al., 2015).

O sistema foi mantido sob agitação constante durante 10min, a 100 rpm, por meio de agitador magnético. A essa solução polimérica matricial foi adicionado, gota-a-gota, óleo essencial de *T. minuta* suficiente para a obtenção de concentrações de 0,38 e 0,77% (v/v) com base na metodologia descrita por Ali e colaboradores (2015). Em seguida, foi adicionado cloreto de cobre (II) na concentração 0,77% (p/v). No total foram obtidas seis soluções poliméricas diferenciadas (Tabela 1).

A escolha da concentração de 0,77% (p/v) de cloreto de cobre (II) foi feita mediante a constatação de homogeneidade dos filmes obtidos.

Já as concentrações iniciais de óleo essencial da *T. minuta*, dos filmes 1 a 6 (Tabela 1), foram as escolhidas com base na metodologia descrita por Ali e colaboradores (2015) e homogeneidade visual do filme.

Primeiramente, foram feitas avaliações estruturais através de espectroscopia de (IV) e avaliações de fitotoxicidade em folhas de goiabeira para os filmes contendo ácido acético 3% (v/v) (Tabela 1), no entanto esta concentração mostrou-se fitotóxica (vide item 1.2.2.3), então as avaliações foram refeitas para outras concentrações de ácido acético, destacando-se 0,25 % (v/v).

A essa solução polimérica matricial contendo ácido acético na concentração de 0,25 % (v/v), foram adicionados, gota-a-gota, óleo essencial de *T. minuta* com o intuito de obter diferentes soluções com concentrações de 0,38, 0,77, 1,15, 1,53 ou 1,92% (v/v) para avaliações comparativas com potencial antigúngico (Capítulo 2). Após esta etapa, foi adicionado cloreto de cobre (II) 0,77% (p/v). No total foram preparadas 12 soluções com concentrações diferenciadas de óleo essencial (Tabela 2).

Tabela 1. Soluções à base de quitosana em ácido acético 3%

Soluções	Solução à base de quitosana	Óleo essencial de <i>T. minuta</i>	Cloreto de cobre (II)
1	1,3% (p/v)	-	-
2	1,3% (p/v)	0,38% (v/v)	-
3	1,3% (p/v)	0,77% (v/v)	-
4	1,3% (p/v)	-	0,77% (v/v)
5	1,3% (p/v)	0,38% (v/v)	0,77% (v/v)
6	1,3% (p/v)	0,77% (v/v)	0,77% (v/v)

Os filmes da Tabela 2 foram preparados com a mesma metodologia descrita para a síntese dos Filmes 1-6 (Tabela 1), sendo que, utilizando-se uma solução 0,25% (v/v) de ácido acético, foram preparadas 12 soluções (Filmes 1a-12a). As caracterizações estruturais, morfológicas e térmicas para estes filmes (Tabela 2) são descritas neste trabalho.

Tabela 2. Concentrações do óleo essencial de *T. minuta* na formação dos filmes à base de quitosana, utilizando ácido acético 0,25% (v/v)

Soluções	Solução a base de quitosana	Óleo essencial de <i>T. minuta</i>	Cloreto de cobre (II)
1a	1,3% (p/v)	-	-
2a	1,3% (p/v)	0,38% (v/v)	-
3a	1,3% (p/v)	0,77% (v/v)	-
4a	1,3% (p/v)	0,38% (v/v)	0,77% (v/v)
5a	1,3% (p/v)	0,77% (v/v)	0,77% (v/v)
6a	1,3% (p/v)	-	0,77% (v/v)
7a	1,3% (p/v)	1,15% (v/v)	-
8a	1,3% (p/v)	1,53% (v/v)	-
9a	1,3% (p/v)	1,92% (v/v)	-
10a	1,3% (p/v)	1,15% (v/v)	0,77% (v/v)
11a	1,3% (p/v)	1,53% (v/v)	0,77% (v/v)
12a	1,3% (p/v)	1,92% (v/v)	0,77% (v/v)

As soluções dos filmes (1-6 e 1a-12a) foram vertidas em placas de Petri com diâmetro de 9 cm (Figura 3) e acondicionadas em estufa a 50 °C, por 24 horas, para evaporação completa do solvente e obtenção dos filmes.

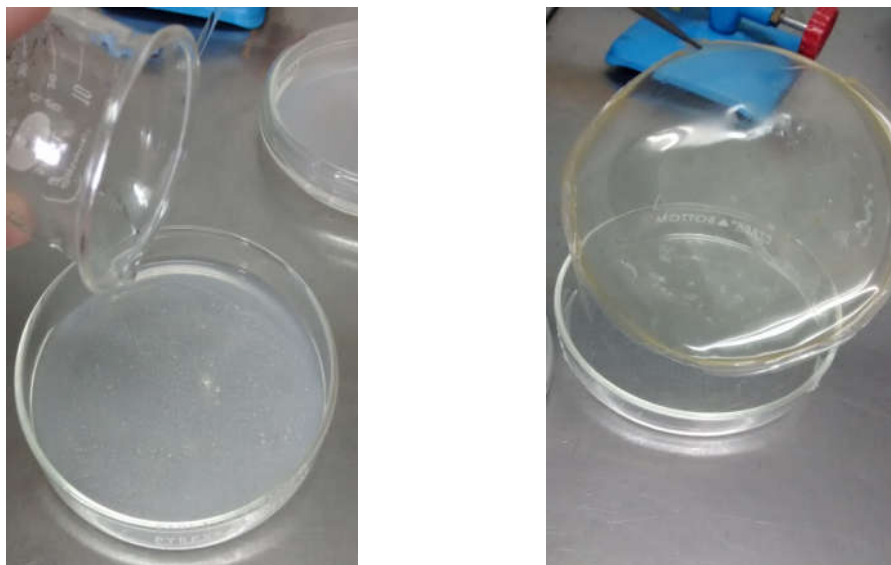


Figura 3: Processo de secagem da solução polimérica a base de quitosana em placa de Petri por 24 horas.

Após a formação dos filmes 1-6 e 1a-12a, estes foram caracterizados visualmente quanto à coloração e homogeneidade, bem como através de espectroscopia na região do infravermelho para verificação da incorporação do óleo essencial e/ou cloreto de cobre (II), de acordo com metodologia descrita por Costa e Mansur (2008).

Por último, a partir da definição das melhores condições de síntese, como sendo os filmes 1a – 12a, estes foram caracterizados também por espectroscopia na região do infravermelho (IV), por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e por espectrometria de energia dispersiva (EDS). Apenas os filmes 1a, 9a e 11a foram caracterizados através de análises térmicas por termogravimetria (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC), pois foram os que melhor evidenciaram resultados nos ensaios realizados no Capítulo 2

1.2.2.3 Metodologia para avaliação fitotóxica

Para esta avaliação, utilizou-se a solução base dos filmes (somente quitosana e solução de ácido acético) em folhas de goiabeira da cultivar Paluma. Esta avaliação foi necessária para a definição das condições de síntese dos melhores filmes, para posterior caracterização estrutural, morfológica e térmica

destes filmes. A partir desta avaliação, foi definida que os melhores filmes são os descritos na tabela 2.

Assim, foram preparadas as soluções para os bioensaios fitotóxicos mantendo-se as concentrações de 1,3% (p/v) quitosana, Tween 80 a 0,046% (v/v) e 0,38% ou 0,77% (v/v) de óleo essencial. Como de início a concentração de ácido acético 3% (v/v) mostrou-se fitotóxica, outras concentrações foram testadas além de 3%, sendo 1; 0,5 e 0,25% (v/v).

O potencial fitotóxico foi avaliado em folhas destacadas de goiabeira da cv. Paluma, obtidas do terceiro par de folhas e consideradas da base para o ápice da planta. O pecíolo das folhas foi envolto em algodão umedecido, anteriormente ao acondicionamento em tubo Falcon com capacidade de 50 mL de acordo com metodologia de Belasque e Jesus, (2006). O recobrimento das folhas destacadas de goiabeira com os filmes obtidos pelas variações nas concentrações de ácido acético ocorreu com auxílio de um borrifador de tubo de ensaio e pincel fino (numero 16), conforme demonstrado na (Figura 4).

A incubação ocorreu em BOD (demanda bioquímica de oxigênio), a 25°C e fotoperíodo de 12h. As avaliações tiveram início após 24h de incubação, considerando a ocorrência de necrose e/ou clorose ao longo do período de 11 dias. As testemunhas consistiram da atomização de água estéril. Foram empregadas três repetições por tratamento.



Figura 4: Processo de recobrimento de folhas de goiabeira cv. Paluma com filme de quitosana e acondicionamento em tubo Falcon para verificação da toxicidade

A avaliação da fitotoxicidade obtida no experimento anterior foi comprovada para a melhor concentração de ácido acético (0,25% (v/v), por meio de outro bioensaio em folhas destacadas. Assim, folhas, obtidas conforme o bioensaio anterior foram dispostas em pote plástico com capacidade de 50 mL, contendo espuma floral embebida em de água estéril, (Figura 5). Após o recobrimento das folhas com o filme, as mesmas foram armazenadas em BOD com umidade controlada de 90%, temperatura de 22°C, por 48h. As testemunhas consistiram da atomização de água estéril. Foram empregadas seis repetições por tratamento (BELASQUE; JESUS, 2006).



Figura 5: Processo de recobrimento de folhas de goiabeira cv. Paluma com filme de quitosana a 0,25% (v/v) e acondicionamento em pote contendo espuma floral para verificação da toxicidade

Assim, a partir desta avaliação, a melhor concentração de ácido acético foi definida como 0,25% (v/v), sendo que esta concentração foi empregada nos filmes avaliados no Capítulo 2, através de ensaios biológicos. Os filmes preparados na base polimérica de quitosana e ácido acético 0,25% (v/v) estão descritos na tabela 2, filmes 1a – 12a.

1.3 Resultados e Discussão

1.3.1 Caracterização estrutural por espectroscopia na região do infravermelho (IV) de filmes híbridos a base de quitosana contendo ácido acético 3% (v/v)

A síntese dos filmes 1 – 6 (Tabela 1) foi realizada com o intuito de caracterizar de maneira preliminar os materiais inéditos obtidos. Esta caracterização foi realizada por meio de IV e também através da observação visual de sua homogeneidade. A partir daí, houve a adequação das concentrações dos constituintes até a obtenção dos filmes ideais (1a – 12a na Tabela 2) para as avaliações do Capítulo 2. A formação dos filmes a base de quitosana elaborados com ácido acético na concentração de 3% (v/v) é demonstrada na figura 6, onde é possível observar sua homogeneidade. No entanto, verificou-se diferença na coloração com a intensificação na concentração de óleo essencial e cloreto de cobre (II). Em adição detectou-se aroma característico quando os filmes foram elaborados com mistura de óleo essencial e cloreto de cobre (II). O óleo essencial apresenta aroma agradável e característico, sendo possível sentir seu aroma quando o mesmo é incorporado nos filmes.

O filme de quitosana na ausência de óleo essencial e íon metálico (Figura 6a) apresentou-se uniforme e transparente, praticamente incolor.

Os filmes de quitosana incorporados com óleo essencial de *T. minuta* (Figuras 6b e 6c), nas concentrações de 0,38 e 0,77% (v/v), respectivamente, apresentaram uma aparência idêntica entre si, com coloração amarelo claro.

Já nos filmes de quitosana elaborados com mistura de óleo essencial e cloreto de cobre (II), (Figuras 6e e 6f), nota-se uma intensificação da coloração amarela/verde em comparação com os demais filmes.

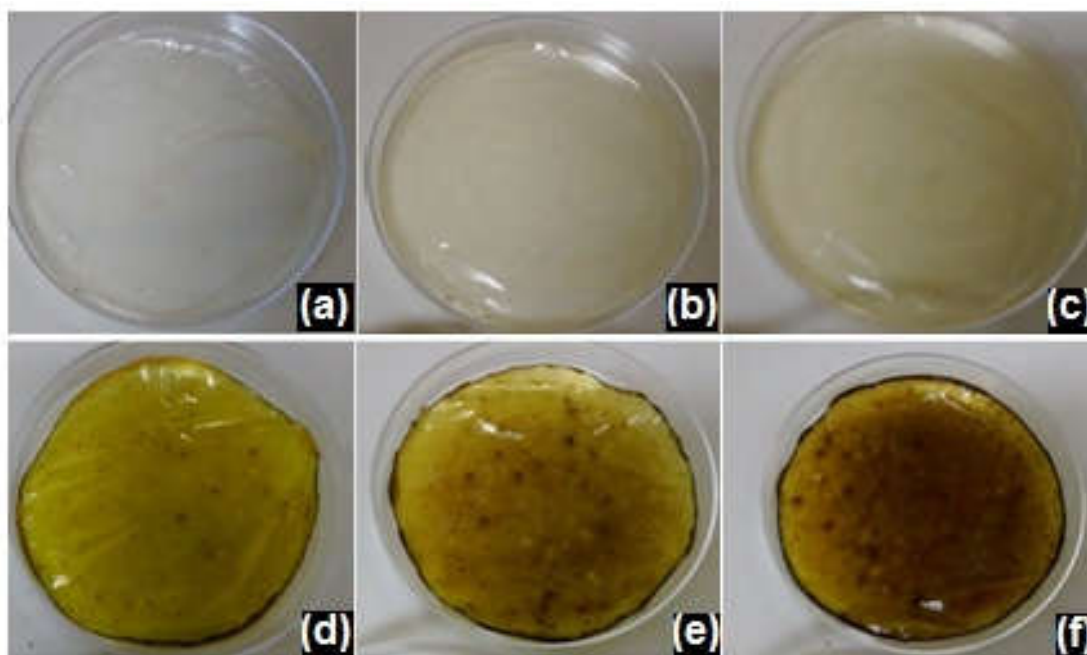


Figura 6. Filmes a base de quitosana em ácido acético 3% (v/v) com diferentes concentrações de óleo essencial e cloreto de cobre (II) (Tabela 1). (a) Filme1 na ausência de óleo essencial e íon metálico. (b) Filme 2 com de óleo essencial de *T. minuta* 0,38% (v/v). (c) Filme 3 com de óleo essencial de *T. minuta* 0,77% (v/v). (d) Filme 4 com cloreto de cobre (II) 0,77% (p/v). (e) Filme 5 com óleo essencial de *T. minuta* 0,38% (v/v) e de cloreto de cobre (II) 0,77% (p/v). (f) Filme 6 com óleo essencial de *T. minuta* 0,77% (v/v) e de cloreto de cobre (II) 0,77% (p/v)

Os filmes a base de quitosana oriundos da concentração de 3% (v/v) de ácido acético apresentaram bandas características e específicas dos grupamentos presentes na quitosana (SILVERSTEIN et al., 2007) e já descritos na literatura por Costa; Mansur (2008) para uma amostra de quitosana. Tais bandas são evidenciadas como: 3426 a 3100 cm^{-1} [$\nu(\text{O-H})$]; 3257 cm^{-1} [$\nu(\text{N-H})$]; 2895 cm^{-1} [$\nu(\text{C-H})$]; 1646 cm^{-1} [$\nu(\text{C=O})$] (amida I); 1550 cm^{-1} [$\delta(\text{N-H})$] (amida II); 1310 cm^{-1} [$\nu(\text{C-N})$]; 1026 cm^{-1} [$\nu(\text{C-O})$] (Figura 7a).

A presença de grupos, tais como amino (NH_2) e hidroxila (OH) na estrutura da quitosana, possibilita modificações químicas através da inserção de ramificações ou reticulantes, promovendo alterações na estrutura e propriedades físico-químicas do polímero (GONSALVES et al. 2009).

Desta forma, modificações das bandas nos espectros podem ser observada nas figuras 7b-7e. No filme incorporado com 0,77% (v/v) de óleo essencial de *T. minuta* (Figura 7d), ocorreu a formação de uma terceira banda em aproximadamente 2954 a 2850 cm^{-1} [$\nu(\text{C-H})$], evidenciando a incorporação do óleo ao polímero de

quitosana. No filme contendo 0,77% (p/v) de cloreto de cobre (II) (Figura 7b) ocorreu um deslocamento da banda no sentido do maior número de onda, sendo que esta banda é visualizada em 1705 cm^{-1} [$\nu(\text{C}=\text{O})$] (amida I).

No filme contendo a mistura de 0,77% (v/v) de óleo essencial de *T. minuta* e 0,77% (p/v) de cloreto de cobre (II) (Figuras 7c), ocorreu um deslocamento da banda no sentido do maior número de onda, sendo que esta banda é visualizada em 1705 cm^{-1} [$\nu(\text{C}=\text{O})$] (amida I) evidenciando a inserção do cátion Cu(II) e formação de uma terceira banda em aproximadamente 2954 a 2850 cm^{-1} [$\nu(\text{C}-\text{H})$], evidenciando a incorporação do óleo ao polímero de quitosana.

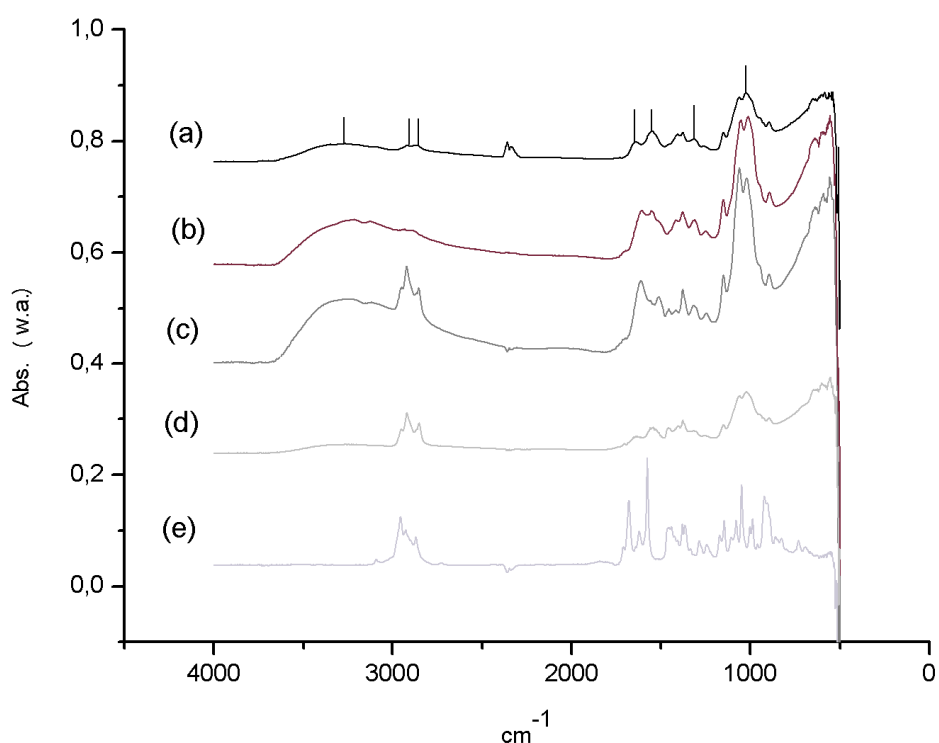


Figura 7. Espectros na região do infravermelho para os filmes a base de quitosana na concentração de 3% (v/v) de ácido acético com incorporação de óleo essencial de *T. minuta* e cloreto de cobre (II). Absorbância (w.a.) x número de onda (cm^{-1}). (a) Filme 1; (b) Filme 4; (c) Filme 3; (d) Filme 6; (e) Óleo essencial de *T. mint*a

A literatura descreve a homogeneidade de filmes de quitosana produzidos a partir de concentração 0,5% (v/v) de ácido acético. Além disso, estes filmes, na concentração relatada, também são descritos como finos, transparentes e flexíveis

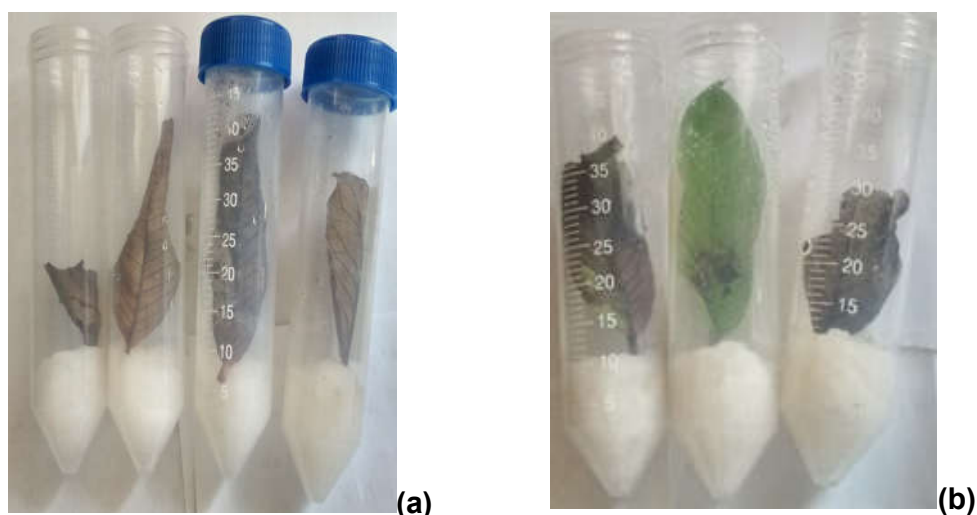
(FRÁGUAS et al., 2015). Por este motivo, concentrações variáveis de ácido acético de 3 a 0,25% (v/v) foram avaliadas neste trabalho.

Outro estímulo para a avaliação de outras concentrações de ácido acético foram os resultados obtidos nos bioensaios de fitotoxicidade, cuja metodologia está descrita no item 1.2.2.3 e os resultados descritos no item abaixo.

1.3.2 Avaliação da fitotoxicidade dos filmes a base de quitosana contendo diferentes concentrações de ácido acético

Como descrito no tópico 1.2 Parte Experimental, foram realizados bioensaios em folhas destacadas de goiabeira com as soluções base dos filmes, isto é, filmes contendo somente quitosana e diferentes concentrações de ácido acético (3%, 1%, 0,5% e 0,25%).

Assim, os filmes de quitosana oriundos da utilização de concentrações 3 e 1% (v/v) de ácido acético comprometeram as folhas de goiabeira, deixando-as com sintomas de necrose ou clorose do limbo foliar após 72h de armazenamento. Já as concentrações dos filmes de quitosana a 0,5 e 0,25% (v/v) de ácido acético não comprometeram as folhas (Figura 8).



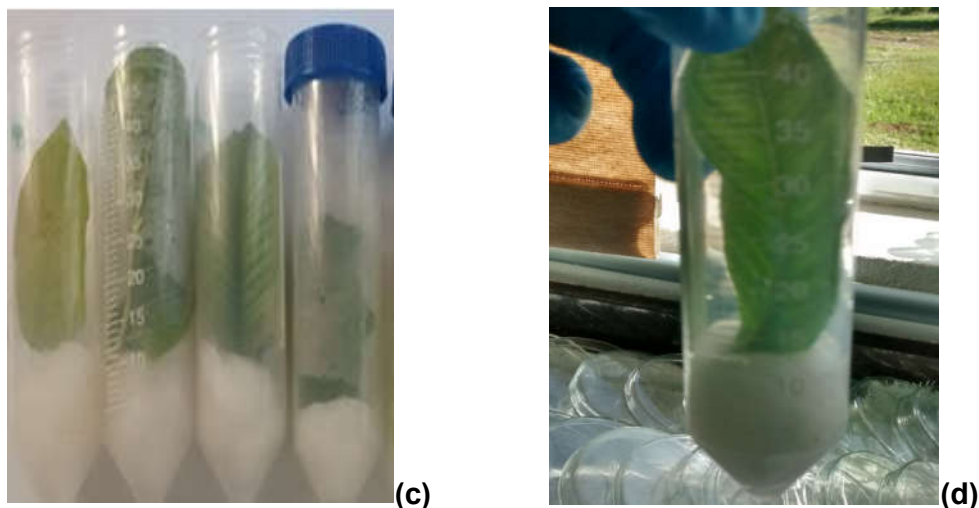


Figura 8: Folhas de goiabeira recobertas com soluções de quitosana a 1,3% (p/v) dissolvida em diferentes concentrações de ácido acético (a) 3% (v/v); (b) 1% (v/v); (c) 0,5% (v/v) e (d) 0,25% (v/v)

Sendo assim, a concentração 0,25% (v/v) foi selecionada para posterior formulação dos filmes à base de quitosana para as avaliações biológicas do Capítulo 2, bem como para os filmes 1a-12a, caracterizados estruturalmente, morfologicamente e termicamente no Capítulo 1.

1.3.3 Caracterização estrutural por espectroscopia na região do infravermelho (IV) dos filmes híbridos de quitosana contendo diferentes concentrações de óleo essencial

Filmes híbridos com concentrações variáveis de óleo essencial foram sintetizados para amostras contendo 3% (v/v) e 0,25% (v/v) de ácido acético. As análises de IV com a concentração 3% de ácido acético (Filmes 1-6) já foram discutidas no item 1.3.1. Como a concentração de 0,25% mostrou-se a mais adequada por não ser fitotóxica, optou-se por discutir, neste item 1.3.3, apenas os espectros de IV obtidos para os filmes 1a – 12a (Tabela 2), já que é esta a concentração de ácido acético adequada para os bioensaios descritos no Capítulo 2.

Os espectros dos filmes 1a-12a, contendo ácido acético 0,25% (v/v) e diferentes concentrações de óleo essencial podem ser observados nas figuras 9 e 10.

Estes filmes à base de quitosana apresentam bandas características e específicas dos grupamentos presentes na quitosana, como descreve Costa; Mansur (2008) e Silverstein et al. (2007).

Como descrito anteriormente por Gonsalves *et al.* (2009), a presença de grupos amino e hidroxila na estrutura da quitosana, possibilita modificações químicas, promovendo diversas alterações na estrutura do polímero (GONSALVES et al. 2009). Desta forma a modificação nas bandas nos espectros pode ser observada para os filmes quando há a incorporação de óleo essencial de *T. minuta* e cloreto de cobre (II).

Nos filmes contendo a mistura de 0,77% (p/v) de cloreto de cobre (II) e óleo essencial de *T. minuta*, independente da concentração (Figuras 9 b, c, d, f), ocorre um deslocamento no sentido do maior número de onda, sendo que esta banda é visualizada em 1709 cm^{-1} [$\nu(\text{C}=\text{O})$] (amida I), ao qual evidencia a inserção do cátion Cu (II) em comparação com o filme contendo apenas quitosana (Figura 9 a), onde evidencia-se 1643 cm^{-1} [$\nu(\text{C}=\text{O})$].

Além disso, quando há a presença de óleo essencial na amostra, há também a formação nítida de uma terceira banda em aproximadamente $2957\text{ a }2870\text{ cm}^{-1}$ [$\nu(\text{C}-\text{H})$]; evidenciando a incorporação do óleo essencial de *T. minuta* ao polímero de quitosana (Figuras 9 c, d, e, f).

Nos filmes incorporados com de óleo essencial de *T. minuta* (Figuras 10 c, d, e, f), a partir da concentração de 0,77 (v/v), ocorreu a formação de uma terceira banda em aproximadamente $2957\text{ a }2868\text{ cm}^{-1}$ [$\nu(\text{C}-\text{H})$], evidenciando a incorporação do óleo ao polímero de quitosana.

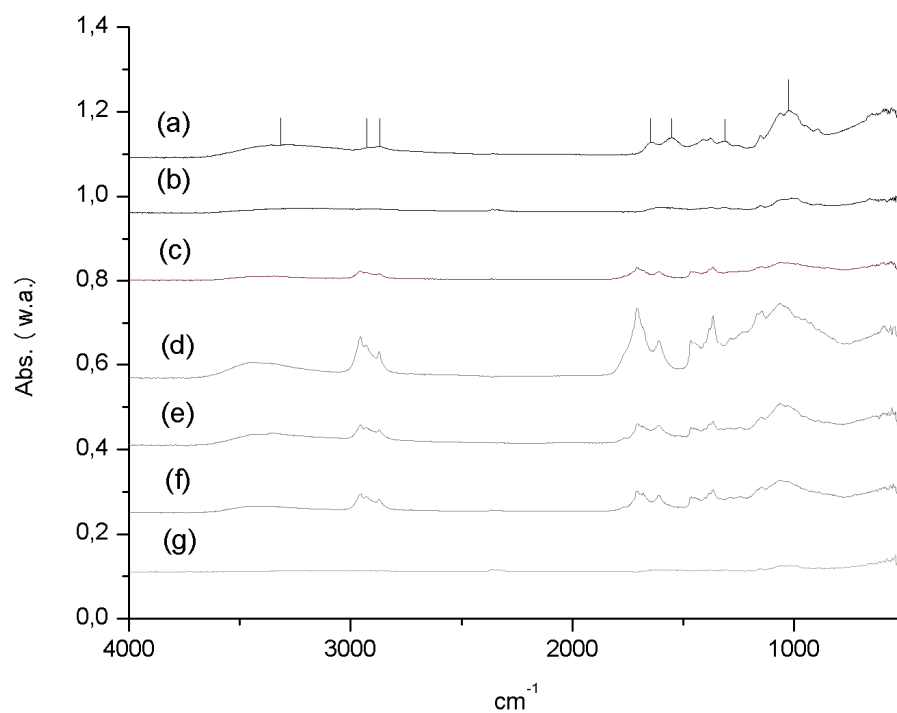


Figura 9. Espectro na região do infravermelho para filmes a base de quitosana na concentração de 0,25% (v/v) com incorporação de óleo essencial de *T. minuta* e cloreto de cobre (II) (Tabela 2). Absorbância (w.a.) x número de onda (cm^{-1}). (a) Filme 1a; (b) Filme 4a; (c) Filme 5a; (d) Filme 10a; (e) Filme 11a; (f) Filme 12a; (g) Filme 6a.

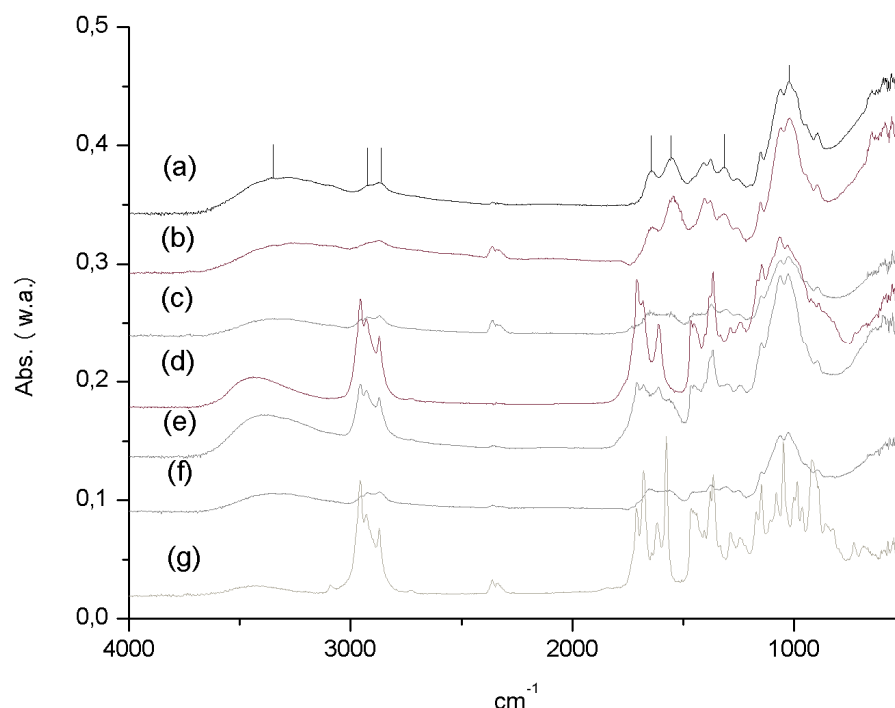


Figura 10. Espectro na região do infravermelho para filmes a base de quitosana na concentração de 0,25% (v/v) com incorporação de óleo essencial de *T. minuta* (Tabela 2). Absorbância (w.a.) x número de onda (cm^{-1}): (a) Filme 1a; (b) Filme 2a; (c) Filme 3a; (d) Filme 7a; (e) Filme 8a; (f) Filme 9a; (g) Óleo essencial *T. minuta*

1.3.4 Avaliação morfológica dos filmes utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias, com magnitude de 5000 vezes, 5 μm , dos filmes a base de quitosana (1a, 2a, 3a, 7a, 8a e 9a) (Tabela 2) incorporados com óleo essencial de *T. minuta* são observados na figura 11.

No filme 1a, contendo apenas quitosana, (Figura 11a), pequenas fissuras são observadas, sem porosidade aparente. Muzzarelli e colaboradores (2004) relatam que a presença de fissuras e rachaduras na superfície das microesferas pode, em alguns casos, comprometer a proteção desejada.

Ao analisar a morfologia dos filmes de quitosana com a incorporação de óleo essencial de *T. minuta* a partir da concentração 1,15% (v/v) observa-se uma superfície com caráter estável, uniforme e sem presença de partículas, conforme mostra a figura 11c-f. Em oposição a este resultado, o filme à base de quitosana contendo 0,38% (v/v) de óleo essencial de *T. minuta*, (Figura 11b) apresenta

pequenas partículas referente a possíveis impurezas da solução polimérica de quitosana.

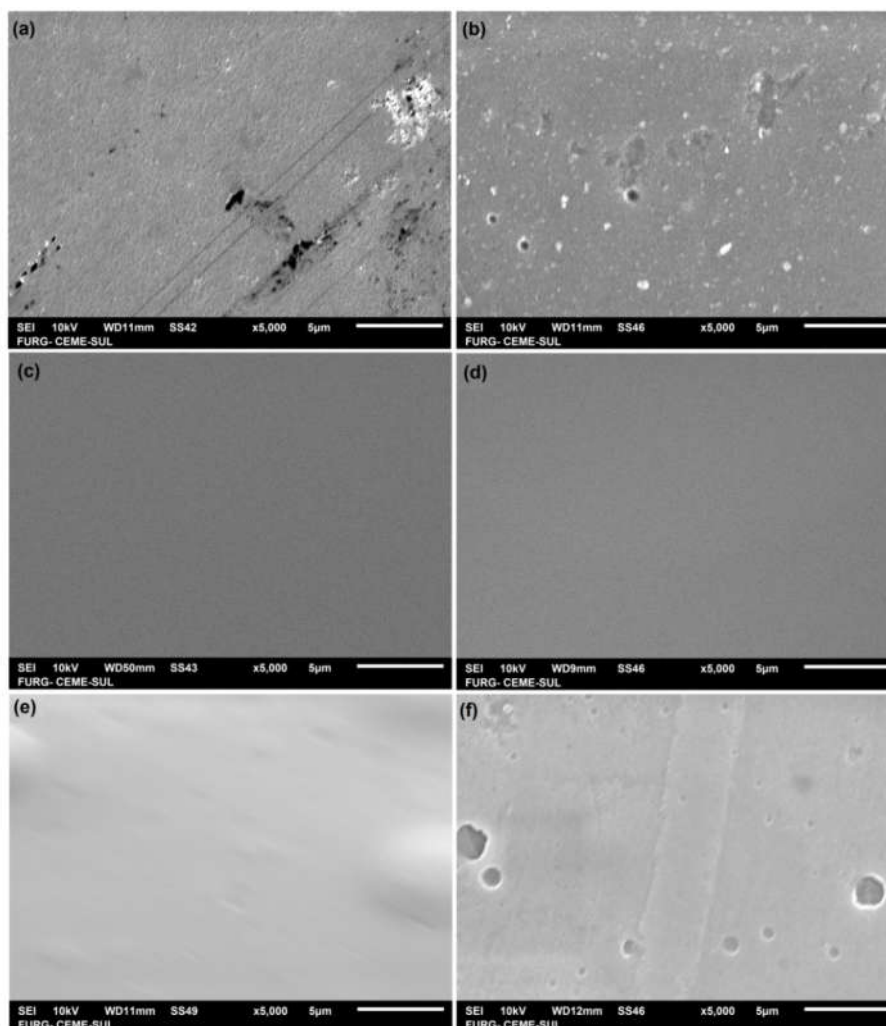


Figura 11: Micrografia eletrônica de varredura (5000 vezes, 5µm) para os filmes de quitosana com ausência de íons Cu (II). (a). Filme 1a na ausência de óleo essencial e íon cobre (II), (b). Filme 2a, (c). Filme 3a, (d). Filme 7a, (e). Filme 8a, (f). Filme 9a, contendo óleo essencial de *T. minuta*

As micrografias, com magnitude de 1500 vezes, 10 µm, dos filmes a base de quitosana (4a, 5a, 6a, 10a, 11a e 12a) (Tabela 2) incorporados com óleo essencial de *T. minuta* e cloreto de cobre (II), são observados na figura 12, onde pequenos aglomerados e impurezas referentes aos grânulos de cloreto de cobre (II), que não foram totalmente dissolvidos na solução polimérica e não foram adsorvidos para o interior da estrutura, acarretam na formação de superfície irregular.

As imagens de MEV para os filmes à base de quitosana com a incorporação de óleo essencial e cloreto de cobre (II) (filmes 4a, 5a, 6a, 10a, 11a e 12a) (Figura 12) apresentam uma superfície irregular quando comparados aos filmes à base de quitosana com incorporação apenas de óleo essencial de *T. minuta* (filmes 2a, 3a, 7a, 8a e 9a) (Figura 11), provavelmente devido à presença dos íons Cu (II) adicionados.

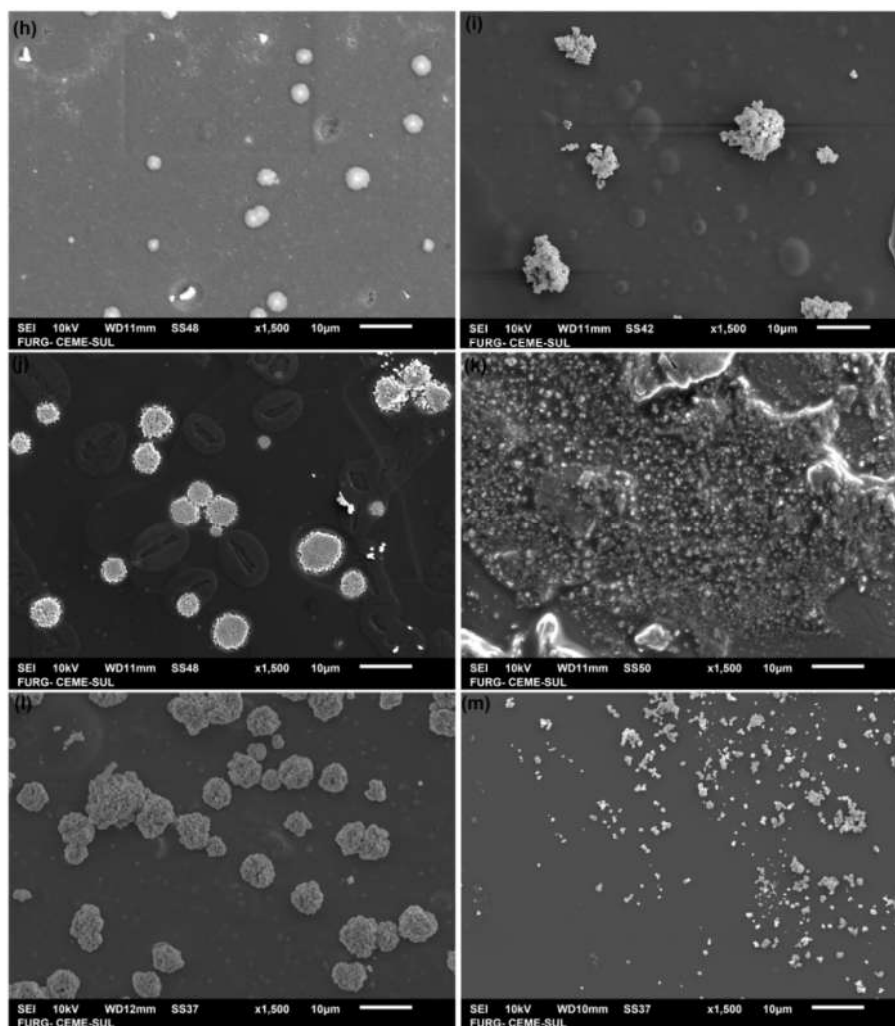


Figura 12: Micrografia eletrônica de varredura (1500 vezes, 10 µm) para os filmes de quitosana (Tabela 2) (h). Filme 6a, (i). Filme 4a, (j). Filme 5a, (k). Filme 10a, (l). Filme 11a, (m). Filme 12a, contendo óleo essencial *T. minuta* e cloreto de cobre (II).

1.3.5 Avaliação qualitativa da composição química dos filmes utilizando espectrometria de energia dispersiva (EDS)

No espectro de EDS para filme 1a, contendo apenas quitosana, (Figura 13a) nota-se a presença dos elementos carbono, oxigênio e nitrogênio, referente à estrutura química da quitosana. Este resultado está de acordo com o relatado por Assis e Leoni, (2003), que expressam a fórmula molecular genérica da quitosana como $(C_6H_{11}O_4N)_n$, confirmando os elementos químicos presentes no filme observado pela análise por EDS.

Os espectros de EDS para os filmes 2a, 3a, 7a, 8a e 9a (Tabela 2) contendo óleo essencial de *T. minuta* (Figura 13b-f) indicam a presença dos mesmos elementos, carbono, oxigênio e nitrogênio, sendo estes, os mesmo constituintes do óleo essencial de *T. minuta* (Anexo 1).

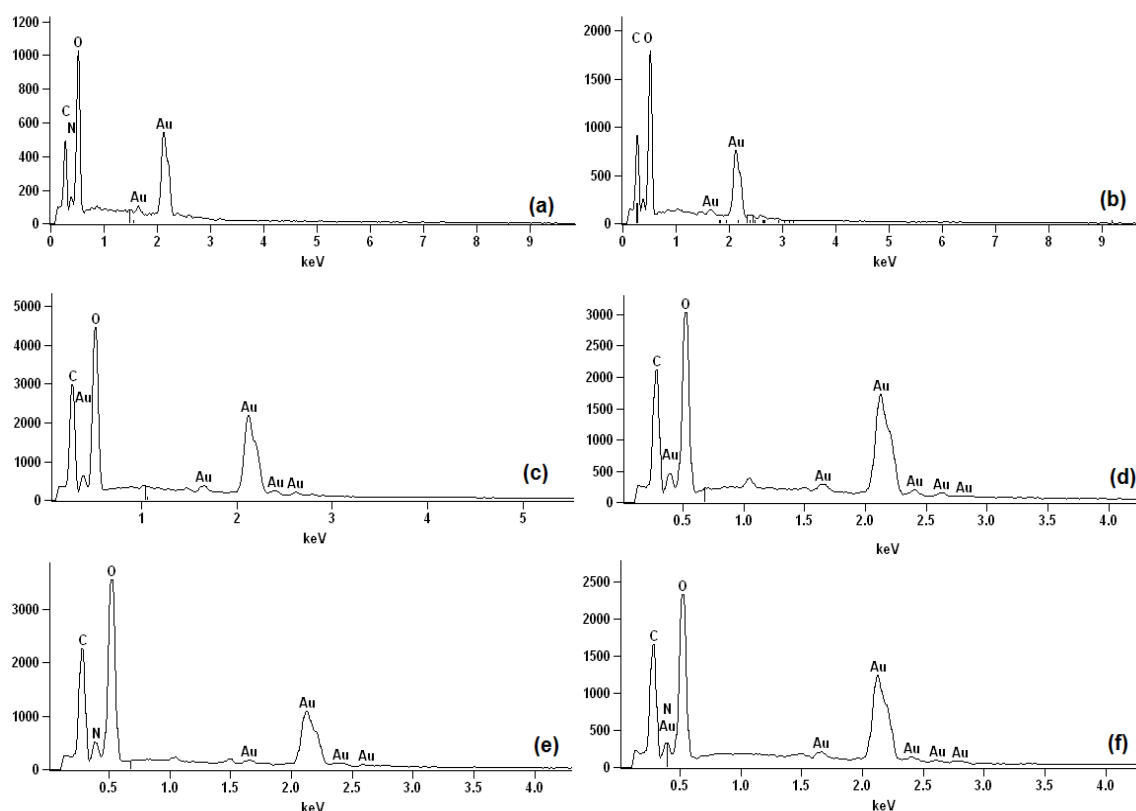


Figura 13. Espectro EDS para filmes de quitosana (Tabela 2).(a). Filme 1a na ausência de óleo essencial e íon cobre (II), (b) Filme 2a, (c) Filme 3a, (d) Filme 7a, (e) Filme 8a, (f) Filme 9a, contendo óleo essencial de *T. minuta*

A análise por EDS apontou a presença de cobre (filmes 4a, 5a, 6a, 10a, 11a e 12a) (Tabela 2), em comparação com os filmes contendo apenas óleo essencial de *T. minuta* (2a, 3a, 7a, 8a e 9a) (Tabela 2), como pode ser observado na (Figura 14), comprovando a inserção do cobre (II) aos filmes de quitosana.

Nos espectros de EDS da figura 14, além da presença de cobre, há a presença dos elementos carbono, oxigênio e nitrogênio constituintes orgânicos da amostra e cloro presente no cloreto de cobre (II) adicionado. A porcentagem atômica do cobre em cada filme é representada pela tabela 3.

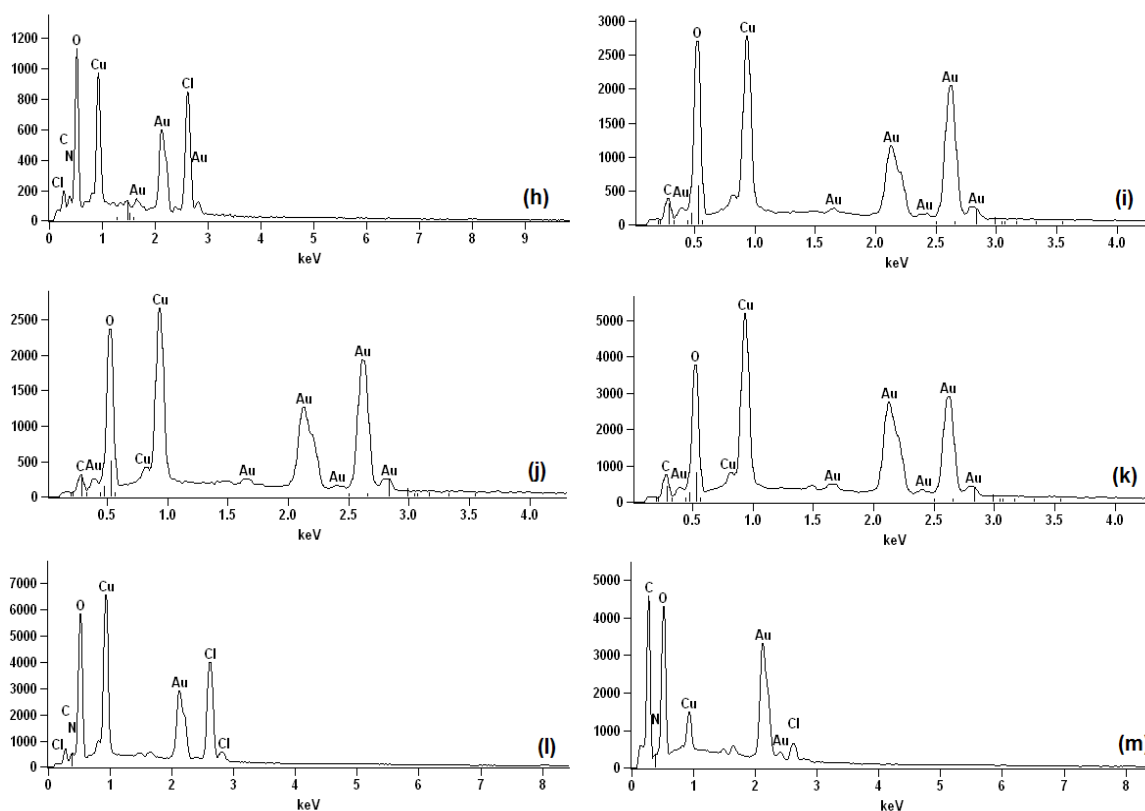


Figura 14. Espectro EDS para filmes de quitosana (Tabela 2). (h). Filme 6a, (i). Filme 4a, (j). Filme 5a, (k). Filme 10a, (l). Filme 11a, (m). Filme 12a, contendo óleo essencial *T. minuta* e cloreto de cobre (II).

Pela tabela 3 é possível observar que quando há a presença de óleo essencial, a incorporação de cobre é maior no material, sendo que as maiores concentrações de cobre aparecem quando as concentrações de óleo essencial são de 0,38%, 0,77% e 1,15% (v/v). Assim, o óleo também pode atuar como um agente

quelante de cobre, além da própria quitosana. No entanto, concentrações maiores de óleo dificultam a incorporação de cobre ao material, o que pode estar relacionado com a ocupação dos sítios de quelantes da quitosana pelas moléculas de óleo.

Tabela 3: Quantificação de cobre por análise de EDS para filmes à base de quitosana incorporados com óleo essencial e cloreto de cobre (II) (Tabela 2).

Filmes à base de quitosana	(%) atômica
0,77% cloreto de cobre (II) (Filme 6a)	13,20
0,38% de óleo essencial de <i>T. minuta</i> e 0,77% cloreto de cobre (II) (Filme 4a)	28,86
0,77% de óleo essencial de <i>T. minuta</i> e 0,77% cloreto de cobre (II) (Filme 5a)	30,92
1,15% de óleo essencial de <i>T. minuta</i> e 0,77% cloreto de cobre (II) (Filme 10a)	32,45
1,53% de óleo essencial de <i>T. minuta</i> e 0,77% cloreto de cobre (II) (Filme 11a)	19,31
1,92% de óleo essencial de <i>T. minuta</i> e 0,77% cloreto de cobre (II) (Filme 12a)	4,69

1.3.6 Avaliações térmicas dos filmes utilizando termogravimetria (TGA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Os filmes 9a e 11a (Tabela 2) incorporados com 1,92% (v/v) de óleo essencial de *T. minuta* e incorporados com 1,53% (v/v) de óleo essencial de *T. minuta* e 0,77% (p/v) de cloreto de cobre (II), respectivamente, foram escolhidos para a realização de análises de DSC e TGA, pois foram os que melhor evidenciaram resultados nos ensaios realizados no Capítulo 2. Estes melhores resultados podem estar relacionados com o equilíbrio adequado entre as concentrações de óleo essencial e íons Cu (II) nos sítios da quitosana, o que foi evidenciado na Tabela 3.

As análises térmicas de DSC foram realizadas para os filmes à base de quitosana, na ausência de óleo essencial e íon metálico (filme 1a) com massa inicial de 2,497 mg, incorporados com 1,92% (v/v) de óleo essencial de *T. minuta* (filme 9a), com massa inicial de 1,590 mg e incorporados com 1,53% (v/v) de óleo essencial de *T. minuta* e 0,77% (p/v) de cloreto de cobre (II) (filme 11a), com massa inicial de 1,551 mg.

A figura 15 mostra os termogramas de DSC para o filme 1a, onde observou-se dois picos, sendo o primeiro endotérmico em 122,75 °C referente à perda de água adsorvida e outros compostos voláteis, com $\Delta H = 224,11$ J/g. O segundo pico ocorre entre 270 °C a 340°C, sendo o máximo do pico exotérmico em 303,38°C e refere-se à degradação da matéria orgânica, com $\Delta H = -161,57$ J/g, (Figura 15). Os resultados para os termogramas de DSC estão de acordo com o observado por Santos e colaboradores (2003), que descrevem para amostras de quitosana comerciais dois picos, o primeiro, endotérmico variando de (75 a 100°C), correspondente ao processo de desidratação da quitosana, cuja área depende do histórico de secagem da amostra e o segundo, exotérmico em 310°C, corresponde ao processo de decomposição da quitosana. Além disso, Sreenivasan (1996) também descreve dois eventos térmicos, (endotérmico e exotérmico), para amostras de quitosana, em curvas DSC.

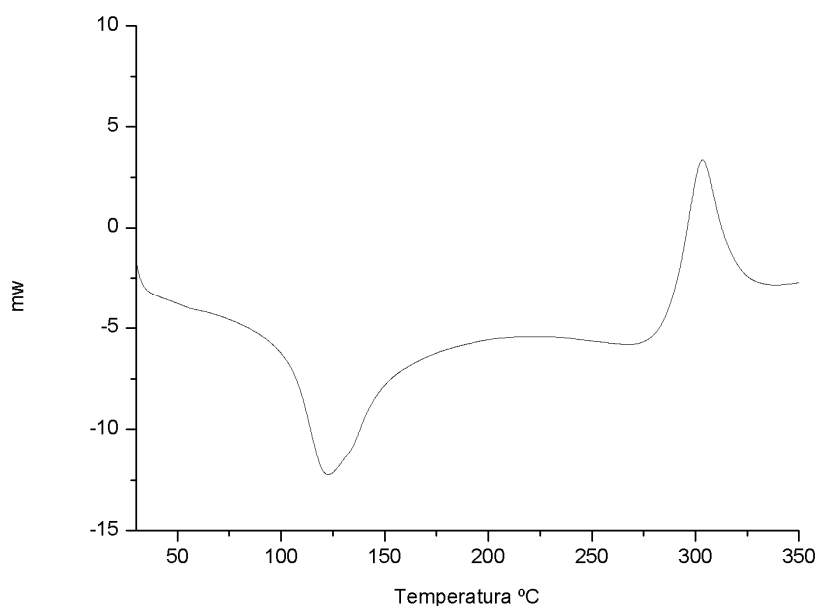


Figura 15. Termograma de DSC para filmede quitosana na ausência de óleo essencial e íon metálico (filme 1a).

Já o termograma de DSC (Figura 16) para o filme de quitosana com 1,92% (v/v) de óleo essencial de *T. minuta* (filme 9a) apresenta, também, dois picos, sendo um endotérmico, com temperatura de pico máximo em 120,61°C, referente à perda

de água adsorvida e outros compostos voláteis, com $\Delta H = 207,53 \text{ J/g}$ e o segundo exotérmico com temperatura máxima de $301,45^\circ\text{C}$, referente ao processo de degradação da quitosana, com $\Delta H = -21,53 \text{ J/g}$. Os resultados observados estão de acordo aos relatados por Sreenivasan (1996), e também aos observados por Santos e colaboradores (2003).

A curva DSC para o filme de quitosana (filme 1a) na ausência de óleo essencial e íon metálico (Figura 15) quando comparada com a curva para o filme de quitosana incorporado com 1,92% (v/v) de óleo essencial (filme 9a) (Figura 16), não apresenta alteração significativa referente ao padrão de comportamento térmico, este fato pode ser explicado pela concentração do óleo essencial inserido ser baixa. No entanto, apenas pôde ser evidenciado, pequena diminuição na temperatura de degradação térmica da parte orgânica com a incorporação de moléculas orgânicas de óleo, uma vez que o óleo essencial é volátil.

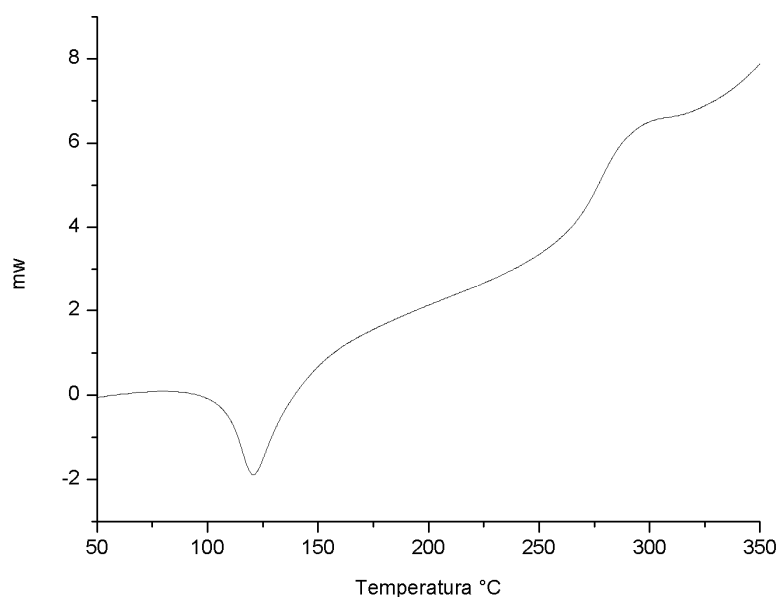


Figura 16. Termograma de DSC para quitosana incorporado com 1,92% de óleo essencial de *T. Minuta* (filme 9a)

O termograma de DSC, (Figura 17), para o filme de quitosana com 1,53% (v/v) de óleo essencial de *T. minuta* e 0,77% (p/v) de cloreto de cobre (II) (filme 11a) apresenta três estágios exotérmicos, o primeiro com temperatura máxima de

152,43°C refere-se à degradação do cobre (II), com $\Delta H = -349,80 \text{ J/g}$, o segundo pico com temperatura de 173,38°C refere-se à degradação do cloreto, com $\Delta H = -38,53 \text{ J/g}$, e o terceiro pico, com uma temperatura de 322,60°C refere-se à degradação da quitosana, com $\Delta H = -8,04 \text{ J/g}$. A literatura relaciona a presença de picos exotérmicos à presença de cloreto de Cu (II), (CHIRIAC et al., 2013). Além disso, picos exotérmicos devido à inserção de cátions metálicos também estão relacionados à homogeneidade do material, bem como ao aumento da estabilidade térmica do material em altas temperaturas (RYKOWSKA et al, 1999).

Chiriac e colaboradores (2013) investigaram a estabilidade do cloreto de cobre (II) com NH_3BH_3 (borazano). As curvas de DSC mostram três fases de decomposição em temperaturas que variavam de 25-85 °C, 85-120 °C e 120-200 °C, atribuídas a decomposições, devido à presença do cloreto de cobre (II), caracterizada por elevado pico exotérmico, o que está de acordo com a análise de DSC obtida na figura 16, que evidencia dois picos exotérmicos até 200 °C.

A curva DSC para o filme de quitosana com 1,53% (v/v) de óleo essencial de *T. minuta* e 0,77% (p/v) de cloreto de cobre (II) (filme 11a) (Figura 17) quando comparada com a curva obtida para o filme de quitosana incorporado com 1,92% (v/v) de óleo essencial (filme 9a) (Figura 16) e com a curva obtida para filme de quitosana (filme 1a) na ausência de óleo essencial e íon metálico (Figura 15), apresenta alteração significativa referente ao padrão de comportamento térmico até 200 °C, este fato pode ser explicado pela inserção de cloreto de cobre (II) no material.

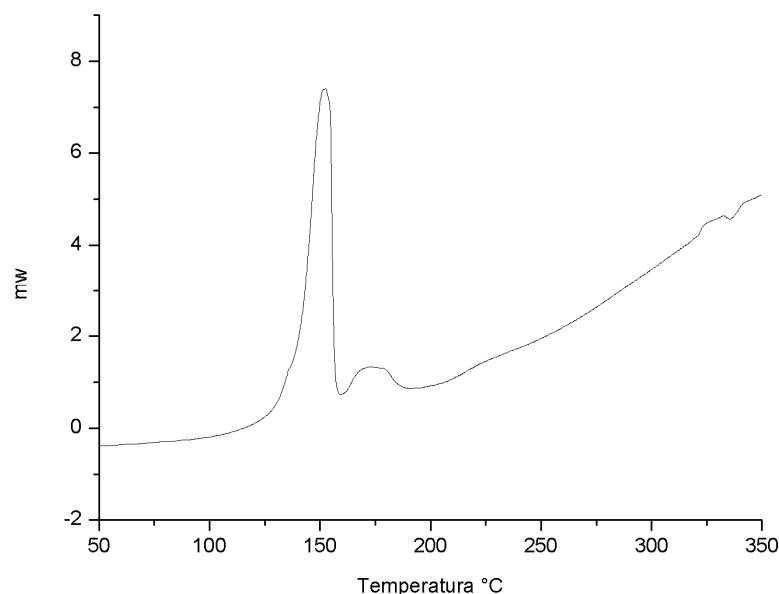


Figura 17. Termograma de DSC para quitosana incorporado com 1,53% de óleo essencial de *T. minuta* e adição de cloreto de cobre (II) (filme 11a)

As análises térmicas de (TGA), bem como as análises de DSC, foram realizadas para os filmes à base de quitosana, na ausência de óleo essencial e íon metálico (filme 1a), incorporado com 1,92% (v/v) de óleo essencial de *T. minuta* (filme 9a) e incorporado com 1,53% (v/v) de óleo essencial de *T. minuta* e 0,77% (p/v) de cloreto de cobre (II) (filme 11a).

O termograma de TGA para o filme a base de quitosana na ausência de óleo essencial e íon metálico (filme 1a) (Figura 18) apresenta dois estágios térmicos, o primeiro estágio apresenta pequena perda de massa compreendido entre 50 e 100°C e é atribuído, principalmente, a perda de massa de 1,7% de água e outros compostos voláteis. O segundo estágio com temperatura compreendido entre 230 a 320°C refere-se a perda de massa de 28% e relaciona-se à decomposição térmica da quitosana. Estes resultados estão de acordo com os observados por Santos e colaboradores (2003), que relatam dois estágios térmicos para amostras de quitosana comerciais, o primeiro referente ao processo de desidratação seguido da decomposição do polímero.

Outro estudo referente aos termogramas de TGA para quitosana é descrito por Brito e Campana (2007), que apresentam três possibilidades de estágios

térmicos para o polímero, sendo o primeiro estágio compreendido entre 25 e 120°C, corresponde à evaporação da água adsorvida. O segundo estágio, entre as temperaturas de 200 e 400°C, referente à decomposição térmica gerada, principalmente, por desidratação dos compostos, e o terceiro estágio, em temperaturas maiores que 400°C, atribuído a degradações correspondentes aos resíduos de matéria orgânica. Por outro lado, o termograma de TGA para quitosana sintetizada realizado por Hong e colaboradores (2007), sugere apenas um estágio térmico com pico suave relacionado à degradação térmica da quitosana na temperatura compreendida entre 250 a 450°C.

O termograma de TGA para o filme a base de quitosana incorporado com 1,92% (v/v) óleo essencial de *T. minuta* (filme9a) (Figura 19), mostra dois estágios térmicos, o primeiro estágio, compreendido entre 50 e 200°C, refere-se à perda de massa que é atribuída a perda de água e outros compostos voláteis na ordem de 1,3%. Já o segundo estágio, com intervalo de temperatura entre 260 a 350°C, corresponde a perda de massa na ordem de 31%.

Os termogramas de TGA para o filme a base de quitosana incorporados com 1,53% (v/v) óleo essencial de *T. minuta* e 0,77% (p/v) de cloreto de cobre (II) (filme 11a), (Figura 20), apresenta dois estágios de degradação, o primeiro estágio está compreendido entre 140 e 260°C e refere-se à perda de massa na ordem de 25%, principalmente devido à perda de água e outros compostos voláteis. Já o segundo estágio está compreendido entre 260 a 420°C e, refere-se à decomposição térmica, com perda de massa na ordem de 17%.

Pereira (2016) investigou a estabilidade térmica do composto quitosana-CuCl₂ e relata que a presença do cobre interfere na estabilidade térmica do polímero de quitosana. O termograma de TGA relatado pelo autor apresenta estágio de decomposição do composto em torno de 248 °C, com perda de massa de 43%.

A curva TGA para o filme de quitosana com 1,53% (v/v) de óleo essencial de *T. minuta* e 0,77% (p/v) de cloreto de cobre (II) (filme 11a) (Figura 20) quando comparada com a curva para o filme de quitosana incorporado com 1,92% (v/v) de óleo essencial (filme 9a) (Figura 19) e com filme de quitosana (filme 1a) na ausência de óleo essencial e íon metálico (Figura 18), evidencia melhora crescente na estabilidade térmica na seguinte ordem: filme 1a, filme 9a, filme 11a. Ao mesmo

tempo em que o filme mais estável termicamente, o filme 11a, evidencia um aumento discreto no número de estágios térmicos.

A massa inicial e porcentagem residual para o filmes (1a, 9a e 11a), após 450°C é, respectivamente, 1,390 mg e 52,17%; 1,550 mg e 49,24%; 1,381mg e 49,23%.

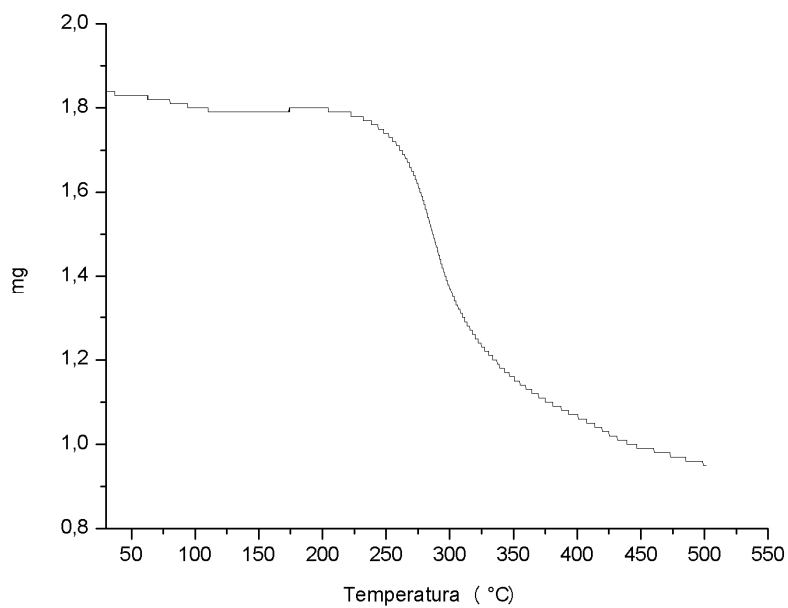


Figura 18. Termograma de TGA para o filme de quitosana na ausência de óleo essencial e íon metálico (filme 1a).

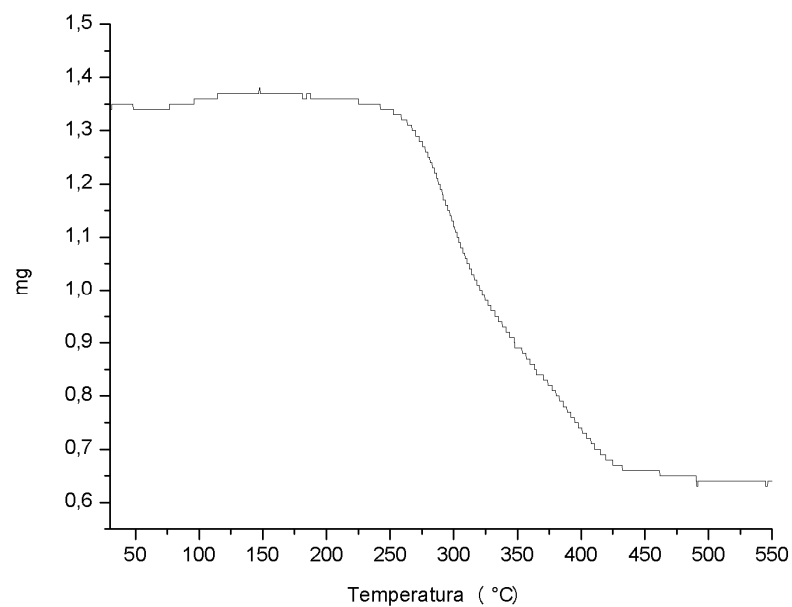


Figura 19. Termograma de TGA para o filme de quitosana incorporado com 1,9% de óleo essencial de *T. minuta*(filme 9a).

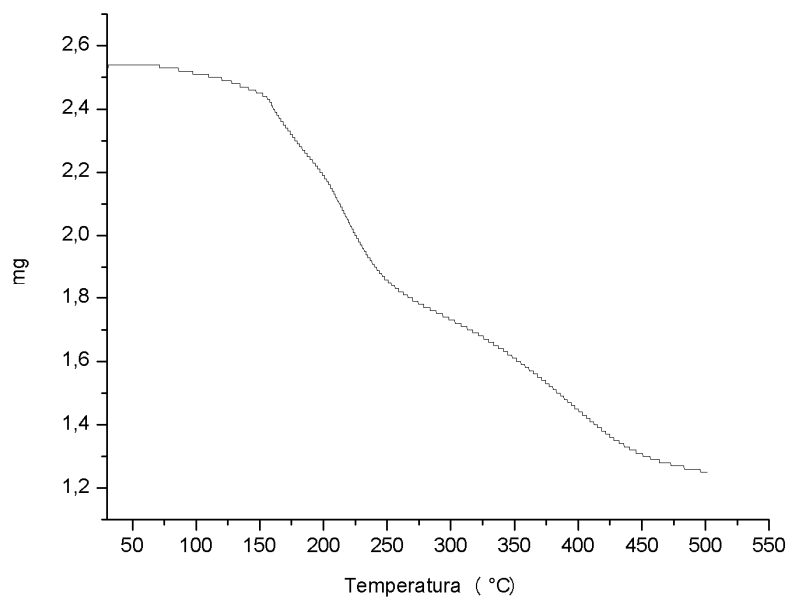


Figura 20. Termograma de TGA para o filme de quitosana incorporado com 1,53% (v/v) de óleo essencial de *T. minuta* e 0,77% (p/v) de cloreto de cobre (II) (filme 11a).

1.4 Conclusões

Materiais inéditos foram sintetizados e caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho (IV) com sucesso neste trabalho (filmes 1 a 6). No entanto a concentração de ácido acético 3% (v/v) mostrou-se fitotóxica. Assim, a concentração de 0,25% (v/v) de ácido acético mostrou-se como a ideal para os filmes, a partir de bioensaios realizados em folhas de goiabeira. Assim, a partir disso, os filmes inéditos (1a -12a) com concentração de 0,25% (v/v) de ácido acético também foram sintetizados e caracterizados.

Além de caracterizar por IV, os filmes de 1a – 12a também foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de dispersão eletrônica (EDS). No entanto, somente os filmes 9a e 11a, que evidenciaram melhores resultados nos bioensaios realizados no Capítulo 2, foram caracterizados por calorimetria diferencial de varredura (DSC) e termogravimetria (TGA).

As análises de IV evidenciaram para os filmes contendo a mistura de 0,77% (p/v) de cloreto de cobre (II) e óleo essencial de *T. minuta* (Filmes 4a, 5a, 10a, 11a, 12a), um deslocamento no sentido do maior número de onda em comparação com o filme contendo apenas quitosana (filme 1a), sendo que este deslocamento foi evidenciado em 1643 cm^{-1} [$\nu(\text{C}=\text{O})$] para 1709 cm^{-1} [$\nu(\text{C}=\text{O})$], referente a banda de amida I presente na quitosana. Além disso, quando há a presença de óleo essencial na amostra, há também a formação nítida de uma banda entre $2957\text{ a }2870\text{ cm}^{-1}$ [$\nu(\text{C}-\text{H})$]; confirmando a incorporação de anéis aromáticos do óleo essencial de *T. minuta* ao polímero de quitosana.

As micrografias obtidas por MEV evidenciaram para os filmes a base de quitosana com incorporação do óleo essencial de *T. minuta* (filmes 2a, 3a, 7a, 8a e 9a), um padrão regular, com superfície aparentemente lisa, caracterizando os filmes como homogêneos, quando comparado com as imagens de MEV para os filmes a base de quitosana com a incorporação de cloreto de cobre (II) (filmes 4a, 5a, 6a, 10a, 11a e 12a), pois nestas amostras são observados pequenos aglomerados e impurezas referentes aos grânulos de cloreto de cobre (II) que não foram totalmente dissolvidos na solução polimérica e não foram adsorvidos para o interior da estrutura.

Já as análises por EDS comprovaram a diferença na constituição atômica dos filmes incorporados com cloreto de cobre (II) (filmes 4a, 5a, 6a, 10a, 11a e 12a), em comparação com os filmes contendo somente constituintes orgânicos (filmes 1a, 2a, 3a, 7a, 8a e 9a), ao mesmo tempo em que foi evidenciado que a variação na concentração de óleo essencial influencia na quantidade de íons Cu(II) incorporados.

Já a análise térmica por DSC evidenciou para o filme de quitosana com incorporação de 1,53% (v/v) de óleo essencial de *T. minuta* e 0,77% (p/v) de cloreto de cobre (II) (filme 11a) alteração significativa referente ao padrão de comportamento térmico evidenciado pelos filmes 1a e 9a. Este fato pode ser explicado pela incorporação de cloreto de cobre (II) à estrutura.

O termograma de TGA evidenciaram para o filme de quitosana com incorporação de 1,53% (v/v) de óleo essencial de *T. minuta* e 0,77% (p/v) de cloreto de cobre (II) (filme 11a) maior estabilidade térmica, quando comparada com os filmes (1a e 9a), além do aparecimento de outros estágios térmicos.

Assim, de acordo com o que foi exposto, os resultados obtidos são passíveis de patenteamento numa colaboração UFPEI-EMBRAPA, uma vez que são inéditos, estão em sigilo e evidenciaram aplicações biológicas antifúngicas promissoras, que serão discutidas detalhadamente no Capítulo 2.

Avaliação do potencial antifúngico de filmes híbridos a base de quitosana a *C. gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose da goiabeira

2.1 Introdução

A antracnose causada pelo fungo *C. gloeosporioides* é considerada uma das principais doenças da cultura da goiabeira. Em condições de umidade elevada, os danos são significativos tanto na fase vegetativa quanto na reprodutiva (MORAES; TANAKA; JÚNIOR, 2013). Em frutos, a infecção pode manter-se quiescente e somente se expressar quando o fruto atinge o ponto de maturação, comprometendo o período de pós-colheita.

Apesar de o controle químico vir contribuindo há vários anos para a viabilidade econômica e eficiência no controle desta doença, há muita preocupação quanto aos efeitos ambientais, à saúde dos consumidores e mesmo quanto ao desenvolvimento de resistência em função do uso repetido dos compostos sintéticos (SOBRINHO et al., 2005; TRIPATHI et al., 2008).

Visando a busca de controle alternativo, a quitosana vem sendo pesquisada, pois pode exercer dupla função, interferindo diretamente no desenvolvimento de patógenos e ativando várias respostas de defesa no tecido vegetal (AGRAWAL et al., 2002).

Quanto às propriedades fungistática e fungicida contra patógenos, a quitosana possui diferentes mecanismos de ação que incluem o acúmulo de quitinase, síntese de inibidores de proteinase, lignificação, indução da síntese de calose e eliciação da produção de fitoalexinas e peróxido de hidrogênio (EL GHAOUTH et al., 1994).

A expressão de barreiras estruturais pelo tecido do hospedeiro após o tratamento com quitosana pode restringir a expansão do patógeno invasor, bem como atrasar a retomada do desenvolvimento de infecções quiescentes que se tornam ativas com o declínio do potencial biossintético do tecido em produzir compostos antimicrobianos (EL GHAOUTH et al., 1992).

Anteriormente, óleo essencial de *T. minuta* apresentou forte atividade fungitóxica a *Colletotrichum gloeosporioides*, equivalente a proporcionada pelo princípio ativo registrado para o controle do patógeno em maracujá (GIACOMINI et al, 2013).

A exploração da bioatividade antimicrobiana e/ou elicitadora de defesa utilizando compostos secundários presentes em óleos essenciais de plantas e em íons metálicos complexados à quitosana constituem-se em mais uma forma para o incremento da atividade antimicrobiana do complexo (KYU KYU WIN et al., 2007), com a possibilidade de extensão da fitoproteção devido à liberação lenta na superfície do vegetal (OUATTARA et al., 2000).

O objetivo do presente capítulo foi avaliar filmes de quitosana, incorporados ou não com óleo essencial e/ou cobre (II) (Capítulo I) quanto ao potencial fungitóxico a *C. gloeosporioides*, expresso pela interferência no crescimento micelial e esporulação do patógeno.

2.2 Parte Experimental

O trabalho experimental relatado no Capítulo 2 foi realizado na Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata, Pelotas.

2.2.1 Materiais e equipamentos

- ✓ Quitosana de médio peso molecular na forma de pó fornecida pela Sigma Aldrich com massa molecular $106.10^4 \text{ g.mol}^{-1}$ e grau de desacetilação 95%;
- ✓ Cloreto de cobre II dihidratado P.A. (Cloreto de cobre (II) $_2.2\text{H}_2\text{O}$) fornecido pela Vetec Química fina;
- ✓ Ácido acético glacial P.A., fornecido pela Vetec Química fina;
- ✓ Óleo essencial de *Tagetes minuta* fornecido pelo Dr. Gustavo Schiedeck, Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental da Cascata;
- ✓ Tween 80 (P.S) (Polissorbato 80) fornecido pela Vetec Química fina;
- ✓ Estufa para secagem ou esterilização Odonto Brás, modelo EL 1.3;
- ✓ Estufa com controle de umidade termoperíodo e fotoperíodo Eletrolab[®], modelo EL 212/4

- ✓ Câmara de germinação tipo B.O.D Marconi, modelo MA 404/1.

2.2.2 Métodos

2.2.2.1 Origem e manutenção do isolado de *Colletotrichum gloeosporioides*

O isolado *C. gloeosporioides*, empregado neste trabalho (CPACT#651), é proveniente do isolamento a partir de frutos de goiabeira, oriundos da região sul, com sintomas típicos de antracnose (Figura 21). O isolado foi preservado e depositado na Coleção de Trabalho de Microrganismos de Interesse ao Controle Biológico (CMIBIO) mantido na Embrapa Clima Temperado - Estação Experimental Cascata. O respectivo código de identificação é referente ao número de acesso na citada coleção.

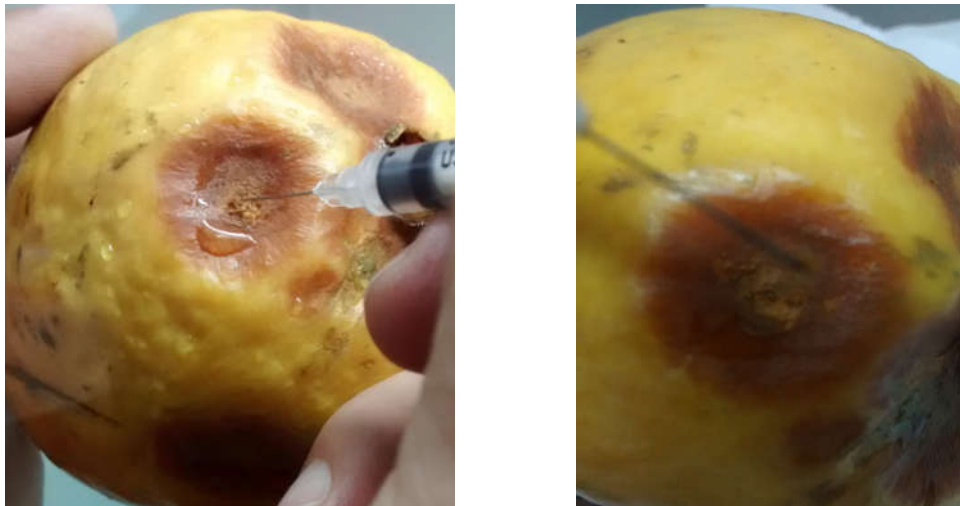


Figura 21. Goiaba com sintomas típicos de infecção por *C. gloeosporioides* na maturação do fruto.

2.2.2.2 Avaliação do potencial fungitóxico de filmes a base de quitosana no crescimento micelial e na esporulação de *C. gloeosporioides*

O potencial de toxicidade de filmes à base de quitosana a estruturas vegetativas do patógeno foi determinado com base em dois bioensaios conduzidos *in vitro* para análise do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* em presença dos filmes. O primeiro teste (Bioensaio 1) foi realizado para pré selecionar as melhores combinações do composto quitosana/óleo essencial/cobre, tendo por base a ação fungitóxica ao patógeno (Tabela 4). Uma vez selecionado as melhores combinações

procurou-se otimizar a concentração do óleo essencial de *T. minuta* buscando determinar o efeito fungitóxico direto sobre o patógeno (Bioensaio 2).

Óleo essencial de *T. minuta* nas concentrações de 1,15; 1,53 e 1,92% (v/v), (Tabela 5), foi obtido por meio de diluição aquosa, isoladamente ou incorporado em filmes a base de quitosana, elaborado com 0,25% (v/v) de ácido acético e 0,77% (p/v) de cloreto de cobre (II). A fim de se obter uma melhor emulsificação dos filmes foram adicionados 0,046% (v/v) de Tween 80, sob agitação constante de aproximadamente 100 rpm, por meio de agitador magnético durante 5 minutos.

Inicialmente, procedeu-se à deposição de alíquotas de 100µL de cada tratamento na superfície de meio de cultura solidificado (BDA) em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, com posterior distribuição uniforme com o auxílio de uma alça de Drigalsk (SEIXAS et al., 2011). Água estéril foi utilizada como testemunha para comparação com os demais tratamentos.

Tabela 4. Concentrações do óleo essencial de *T. minuta* na formação dos filmes a base de quitosana (Bioensaio 1).

Tratamentos	Solução polimérica a base de quitosana	Óleo essencial de <i>T. minuta</i>	Cloreto de cobre (II)
1a	1,3% (p/v)	-	-
2a	1,3% (p/v)	0,38% (v/v)	-
3a	1,3% (p/v)	0,77% (v/v)	-
4a	1,3% (p/v)	0,38% (v/v)	0,77% (v/v)
5a	1,3% (p/v)	0,77% (v/v)	0,77% (v/v)
6a	1,3% (p/v)	-	0,77% (v/v)
7a	1,3% (p/v)	1,15% (v/v)	-
10a	1,3% (p/v)	1,15% (v/v)	0,77% (v/v)
16	-	100% (v/v)	-

Tabela 5. Concentrações do óleo essencial de *T. minuta* na formação dos filmes a base de quitosana (Bioensaio 2)

Tratamentos	Solução polimérica a base de quitosana	Óleo essencial de <i>T. minuta</i>	Cloreto de cobre (II)
7a	1,3% (p/v)	1,15% (v/v)	-
8a	1,3% (p/v)	1,53% (v/v)	-
9a	1,3% (p/v)	1,92% (v/v)	-
10a	1,3% (p/v)	1,15% (v/v)	0,77% (v/v)
11a	1,3% (p/v)	1,53% (v/v)	0,77% (v/v)
12a	1,3% (p/v)	1,92% (v/v)	0,77% (v/v)
13	-	1,15% (v/v)	-
14	-	1,53% (v/v)	-
15	-	1,92% (v/v)	-

Após secagem dos filmes foi depositado um disco de micélio (5mm de diâmetro) de *C. gloeosporioides* na porção central da placa de Petri e as mesmas foram vedadas com Parafilm® e mantidas a 25°C, sob fotoperíodo diário de 12 horas.

As avaliações foram realizadas por meio de medições diárias do diâmetro das colônias em dois eixos ortogonais (média das duas medidas diametralmente opostas), iniciadas após 48 horas de incubação, e perduraram até o momento em que as colônias fúngicas do tratamento testemunha atingiram 2/3 da superfície total do meio de cultivo.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, constituído de cinco repetições, sendo cada parcela representada por uma placa de Petri. Os dados foram comparados com a testemunha. Adicionalmente, os dados diários de crescimento micelial foram empregados para avaliação do Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM), conforme metodologia descrita por Labanca (2002), utilizando-se da seguinte fórmula:

$$IVCM = \sum(D - D_a)/N \text{ onde:}$$

IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial

D= diâmetro médio atual da colônia

Da= diâmetro médio da colônia do dia anterior

N= número de dias após a inoculação

A avaliação da produção de esporos de *C. gloeosporioides* foi realizada no 18º dia de incubação. Aleatoriamente, escolheram-se cinco placas de Petri (repetições) de cada tratamento. Da região periférica de cada colônia retiraram-se, com auxílio de um furador metálico, três discos de micélio (5 mm de diâmetro). Os discos foram transferidos para tubos de penicilina contendo 9 mL de água estéril. Após vigorosa agitação em vortex, a concentração de esporos foi estimada em câmara de Neubauer.

De maneira a avaliar estatisticamente o experimento, levando em consideração os períodos de avaliação, a metodologia adotada foi de ajustar um modelo linear para representar o crescimento esperado de cada repetição de cada tratamento. Assim obteve-se uma reta para representar a taxa de crescimento no período de cada um dos tratamentos avaliados. E para efeito de comparação entre eles, comparou-se o coeficiente angular de cada reta obtida por mínimos quadrados.

Na sequência, as mesmas, foram avaliadas pela ANOVA (análise de variância) e nos casos onde o valor de F foi significativo, utilizou-se o teste de Tukey na comparação dos tratamentos (95% de confiança).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Atividade antifúngica “*in vitro*” de filmes a base de quitosana no crescimento micelial de *C. gloeosporioides*

O crescimento micelial fúngico atingiu o bordo da placa aos quatro dias de incubação no tratamento testemunha e não diferiu significativamente dos tratamentos com óleo essencial de *T. minuta*, empregado isoladamente, independentemente da concentração utilizada (Tabela 7). Os tratamentos (10a, 11a, 12a) contendo quitosana, óleo essencial de *T. minuta* em diferentes concentrações e cloreto de cobre (II) à concentração de 0,77% (p/v) resultaram em menor crescimento micelial quando comparado à testemunha (Tabela 7). Diferentemente, nenhum efeito significativo na redução do crescimento micelial do patógeno foi verificado para o filme contendo apenas quitosana (1a) (Tabela 6).

Placas contendo quitosana, cloreto de cobre (II) e concentração de óleo essencial a partir de 1,53% (v/v) (11a, 12a) mostraram ausência de crescimento micelial do patógeno no período de quatro dias de avaliação.

O tratamento quitosana/cobre(II)/óleo essencial (10a, 11a, 12a) apresentou menores índices de velocidade de crescimento micelial em comparação à testemunha, sendo nulo a partir da incorporação de óleo essencial a 1,53% (11a, 12a) (Figura 22).

Depreende-se destes resultados a possível ocorrência de efeito sinérgico no composto formado por óleo essencial/quitosana, bem como no composto quitosana/óleoessencial/cobre(II). Esta premissa é passível de confirmação posterior a fim de verificar se o efeito das substâncias combinadas é maior do que a soma de os efeitos individuais (BURT, 2004). Por outro lado, a encapsulação do óleo essencial e do cobre na quitosana possibilitam reter os compostos ativos e, por conseguinte, os efeitos benéficos de fitoproteção *in vivo*, pois tem sido relatado que, especialmente para os óleos essenciais, ocorre o requerimento de altas concentrações devido às interações não-específicas com a planta (ABD-ALLA et al., 2011). No caso do óleo essencial de *T. minuta*, a alta volatilidade de seus componentes, que se constitui em obstáculo para seu uso, poderia ser aliviada através da incorporação na quitosana.

O uso e aplicação do óleo essencial de *T. minuta* tem por base a diversidade de metabólitos secundários úteis encontrados em proporções adequadas que se manifestam em várias propriedades biológicas (SADIA et al., 2013). *T. minuta* contém vários metabólitos secundários tais como monoterpenos, sesquiterpenos, flavonoides e tiofenos (SOULE, 1996) e a variação no conteúdo de metabólitos secundários é um aspecto importante, uma vez que a composição química do óleo de *Tagetes* tem sido atribuído a vários parâmetros tais como localização geográfica das plantas (SINGH et al., 2003), estágio de crescimento das plantas e partes colhidas (CHALCHAT et al., 1995), tipo de solo e estatus de nutrientes (SINGH et al., 2003), natureza dos quimiotipos (GIL et al., 2000), quantia de exposição à luz do sol e oscilações de temperatura (CHAMORRO et al., 2008; MESHKATASADAT et al., 2010; MOGHADDAM; OMIDBIAGI, 2007).

A atividade antimicrobiana do óleo essencial é atribuída principalmente aos seus componentes majoritários. A análise do óleo essencial empregado neste

trabalho (Anexo 1) indicou a presença de *trans*-tagetona, di-hidrotagetona e *cis*-beta-ocimeno, contribuindo para mais de 88% da composição total identificada, em conformidade com dados apresentados por Senatore et al. (2004) para óleo essencial desta espécie coletado na África do Sul. Na Argentina, di-hidrotagetona, α -felandreno, limoneno, ocimeno, bem como os isômeros β -ocimeno, tagetona e tagetenona foram os constituintes majoritários (GIL et al., 2000). Na Arábia Saudita a análise de cromatografia gasosa confirmou a presença de tagetona (11,52%), 2,7-dimetil-5-4-octanona (11,52%), propanodinitrilo, como principais componentes e com quantidades menores de 1-acetoxi-3-*p*-mentano (0,17%) e (Z)-9-octacenamida (0,48%) (EL-DEEB et al., 2004).

Na Índia, o óleo *T. minuta*, apresentou ocimeno (54,97%) e di-hidrotagetona (32,58%) como principais constituintes majoritários (SINGH et al., 2003), enquanto que em outros estudos, (Z)-tagetona, (Z)- β -ocimeno, di-hidrotagetona, (Z)- e (E)-ocimenona foram encontradas como principais constituintes (CHALCHAT et al., 1995). No Egito, os principais componentes do óleo essencial de *T. minuta* foram monoterpenos dos quais *trans* e *cis*- tagetona estavam presentes em (52,3 - 64,2%) (MOHAMED et al., 2002).

No Irã, a análise de cromatografia gasosa revelou como principais componentes α -terpineol (20,8%), (Z)- β -ocimeno (17,7%), di-hidrotagetona (13,7%), (E)-ocimenona (13,3%), (Z)-tagetona (8,4%), e (Z)-ocimenona (6,1%) (MOGHADDAM et al., 2007). Em Madagáscar, os principais componentes do óleo essencial de *T. minuta* foram limoneno (3,6 - 11%), (Z)- β -ocimeno (1,0 - 17,1%), (E)- β -ocimeno (0,5 - 14,6%), *p*-cimeno (0,3 - 20,4%), β -cariofileno (1,1 - 12,7%), (Z)-tagetenona (26,7%), (E)-tagetenona (31,3%), α -muuroleno (36,5%), e verbenona (1,4 - 15,4%) (WANZALA; OGOMA, 2013). No Quênia, a caracterização do óleo essencial mostrou que o óleo de *T. minuta* é composto principalmente *cis*-ocimeno (43,78%), di-hidrotagetona (16,71%), piperitona (10,15%), *trans*-tagetona (8,67%), β -ocimeno (3,25%) e *cis*-tagetona (1,95%) (Wanzala; Ogoma, 2013). Em outros estudos para 104 componentes químicos, os principais constituintes do óleo essencial de *T. minuta* foram tagetona, E/Z-ocimenona, E/Z-ocimeno, limoneno e di-hidrotagetona.

Há de se considerar, contudo, a possibilidade de efeito sinérgico proporcionado por componentes presentes em porcentagens menores na mistura (DAFERERA et al., 2003).

Os dados apresentados não permitem concluir se a fungitoxicidade apresentada pelo composto cobre(II)/quitosana/óleo essencial (11a, 12a) a partir de 1,53% (v/v) é devido à efeito fungistático ou fungicida.

À nível prático, a incorporação de óleo essencial a partir de 1,53% (v/v) no filme, para garantir a fungitoxicidade ao patógeno, pode ser impeditiva ao considerar-se o volume de plantas a serem cultivadas e empregadas para a extração do óleo essencial. Por outro lado, o filme de quitosana também interpõe uma barreira impeditiva à germinação dos conídios (Tabela 9) do patógeno, considerada a principal via de disseminação na área cultivada. O estabelecimento da concentração mínima necessária de cobre, quitosana e óleo essencial para este fim é passível de determinação posterior, como perspectivas futuras.

A incorporação de óleo essencial de *T. minuta* proporcionou um incremento na atividade antimicrobiana a *C. gloeosporioides* (Figura 23). Este resultado vai ao encontro daquele apresentado por Ali e colaboradores (2015) que constataram, por meio de testes conduzidos “*in vivo*”, que a incorporação do óleo essencial de capim limão ao polímero de quitosana mostrou-se eficaz em aumentar o potencial antimicrobiano a antracnose de pimentão.

A incorporação de cobre (II) à quitosana, por outro lado, não resultou, conforme esperado, em efeito antifúngico significativo (Tabela 6). Estes dados não corroboram àqueles obtidos por Barnabas e colaboradores (2014), que avaliaram a atividade microbiana por diferentes métodos e constataram que o cobre (II) em fibras de quitosana pode potencialmente aumentar ainda mais sua atividade antimicrobiana.

Tabela 6 - Efeito de filmes a base de quitosana sobre o crescimento micelial *in vitro* de *C. gloeosporioides* (Bioensaio 1)

Tratamentos	Crescimento micelial médio (cm) ¹
Testemunha	1,6657 ± 0,0264 a
Filme quitosana (1a)	1,6213 ± 0,0186 ab
Filme quitosana/óleo essencial 0,38% (v/v) (2a)	1,3580 ± 0,0277 cd
Filme quitosana/óleo essencial 0,77% (v/v) (3a)	1,0947 ± 0,0526 ef
Filme quitosana/cloreto de cobre (II)/óleo essencial 0,38% (v/v) (4a)	1,3857 ± 0,0436 bcd
Filme quitosana/cloreto de cobre (II)/óleo essencial 0,77% (v/v) (5a)	1,1720 ± 0,0132 de
Filme quitosana/cloreto de cobre (II) (6a)	1,5003 ± 0,0481 abc
Filme quitosana/óleo essencial 1,15% (v/v) (7a)	0,9000 ± 0,0655 fg
Filme quitosana/cloreto de cobre (II)/óleo essencial 1,15% (v/v) (10a)	0,1970 ± 0,1297 h
Óleo essencial 100% (v/v) (16)	0,0000 ± 0,0000 h

¹ Dados de crescimento micelial (cm) apresentados como média ± erro padrão das cinco repetições. Dados obtidos por avaliações diárias do crescimento ortogonal durante quatro dias de cultivo a 25°C, fotoperíodo diário de 12 horas. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 7 - Efeito de filmes a base de quitosana sobre o crescimento micelial *in vitro* de *C. gloeosporioides* (Bioensaio 2)

Tratamentos	Crescimento micelial médio (cm) ¹
Testemunha	1,7317 ± 0,0255 a
Filme quitosana/óleo essencial 1,15% (v/v) (7a)	1,1890 ± 0,0367 bc
Filme quitosana/óleo essencial 1,53% (v/v) (8a)	1,0690 ± 0,0624 c
Filme quitosana/óleo essencial 1,92% (v/v) (9a)	0,5120 ± 0,0847 d
Filme quitosana/cloreto de cobre (II)/ óleo essencial 1,15% (v/v) (10a)	0,6937 ± 0,0395 d
Filme quitosana/cloreto de cobre (II)/ óleo essencial 1,53% (v/v) (11a)	0,0000 ± 0,0000 e
Filme quitosana/cloreto de cobre (II)/ óleo essencial 1,92% (v/v) (12a)	0,0000 ± 0,0000 e
Óleo essencial 1,15% (v/v) (13)	1,7527 ± 0,0137 a
Óleo essencial 1,53% (v/v) (14)	1,7693 ± 0,0236 a
Óleo essencial 1,92% (v/v) (15)	1,7033 ± 0,0217 a

¹ Dados de crescimento micelial (cm) apresentados como média ± erro padrão das cinco repetições. Dados obtidos por avaliações diárias do crescimento ortogonal durante quatro dias

de cultivo a 25°C, fotoperíodo diário de 12 horas. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

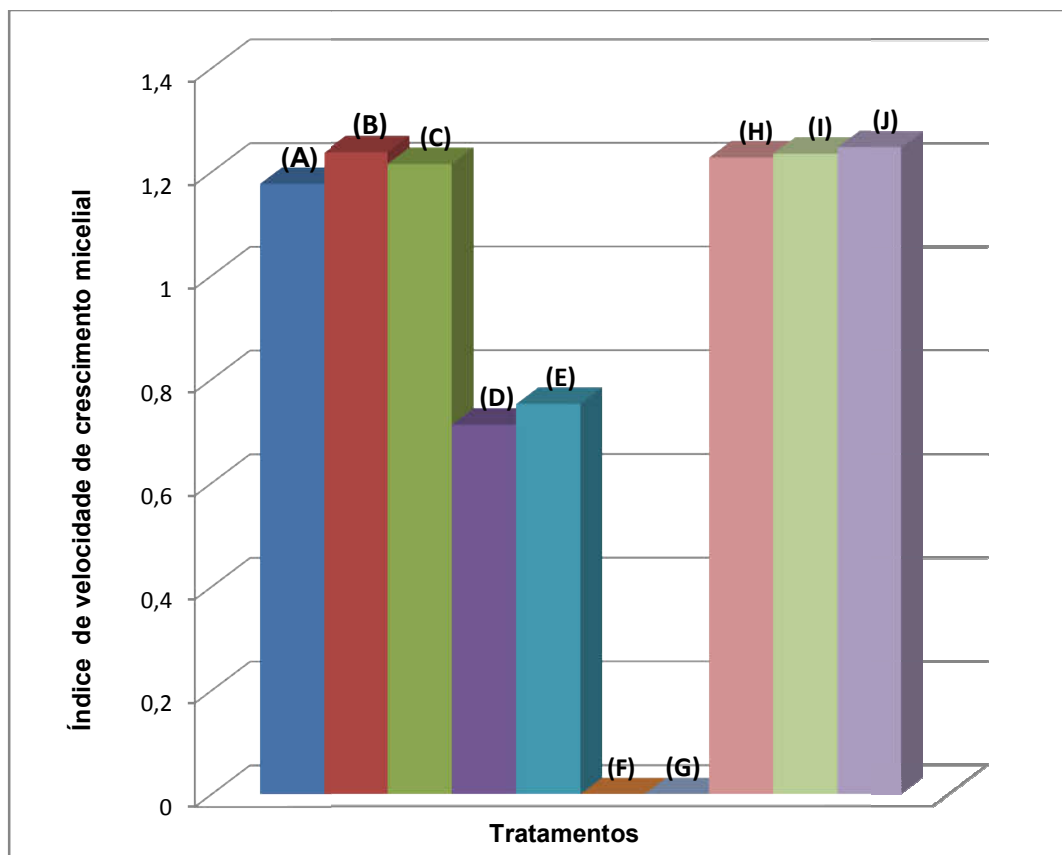


Figura 22. IVCM do isolado de *C. gloeosporioides* na presença dos tratamentos em diferentes concentrações e diluições do óleo essencial de *T. minuta* (Tabela 2). (A) Testemunha, (B) filme 7a quitosana 1,15% (v/v) óleo essencial, (C) filme 8a quitosana 1,53% (v/v) óleo essencial, (D) filme 9a quitosana 1,92% (v/v) óleo essencial, (E) filme 10a quitosana 1,15% (v/v) óleo essencial com 0,77% (p/v) CuCl_2 , (F) filme 11a quitosana 1,53% (v/v) óleo essencial com 0,77% (p/v) CuCl_2 , (G) filme 12a quitosana 1,92% (v/v) óleo essencial com 0,77% (p/v) CuCl_2 , (H) 1,15% (v/v) óleo essencial, (I) 1,53% (v/v) óleo essencial, (J) 1,92% (v/v) óleo essencial.

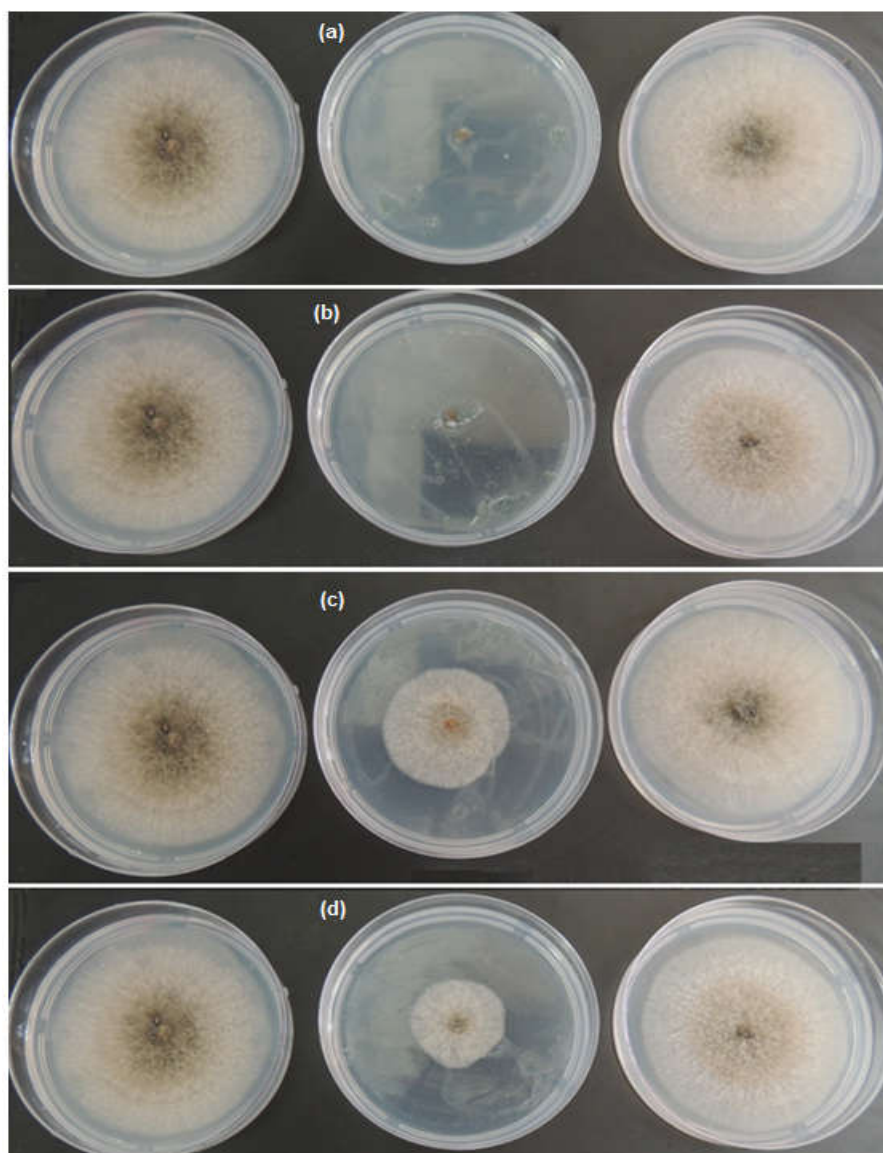


Figura 23: Efeito do filme à base de quitosana a *C. gloeosporioides* no quarto dia de avaliação com suas respectivas diluições de óleo essencial de *T. minuta* (direita), testemunha (esquerda), (a) filme 11a com adição de cloreto de cobre (II) à 0,77% (p/v) e 1,53% (v/v) de óleo essencial; (b) filme 12a com adição de cloreto de cobre (II) à 0,77% (p/v) e 1,92% (v/v) de óleo essencial; (c) filme 8a com adição de 1,53% (v/v) de óleo essencial e (d) filme 9a com adição de 1,92% (v/v) de óleo essencial (meio).

2.3.2 Atividade antifúngica “*in vitro*” de filmes a base de quitosana na esporulação de *Colletotrichum gloeosporioides*

O melhor desempenho sobre a esporulação do patógeno foi imposto pelos filmes de quitosana com adição de cloreto de cobre (II) à 0,77% (p/v) e incorporação a partir de 1,53% (v/v) de óleo essencial de *T. minuta* (11a, 12a), (Tabela 9), para o qual se verificou ausência total de esporulação do patógeno.

Comportamento semelhante foi verificado pelo óleo essencial de *T. minuta* na dose de 100% (Tabela 8).

Diferentemente, nenhum efeito significativo na redução da esporulação de *C. gloeosporioides* foi verificado para o filme contendo apenas quitosana (Filme 1a), (Tabela 8).

Resultados significativos foram observados para os filmes (7a, 8a, 9a) de quitosana incorporados com 1,15; 1,53 e 1,92% (v/v) de óleo essencial de *T. minuta*, respectivamente, (Tabela 9), para os quais se verificou diminuição relevante do número de esporos em comparação com a testemunha, da ordem de 64, 69 e 87%, respectivamente. Por outro lado, o filme de quitosana com adição de cloreto de cobre (II) à 0,77% (p/v) (6a) induziu a produção de esporos, com aumento de 29% em comparação com a testemunha (Tabela 8).

Mekahlia e Bouzid (2009) verificaram, por meio de ensaios, que os complexos de quitosana com Cu (II) possuíam propriedades antibacterianas, tendo como possíveis mecanismos o fato da quitosana na superfície da célula poder formar uma membrana de polímero, que impediria a entrada de nutrientes na célula e, adicionalmente, que a quitosana de peso molecular inferior difundiria-se para dentro da célula através de impregnação, resultando na adsorção de substâncias eletronegativas na célula, que acabariam perturbando as atividades fisiológicas normais das bactérias.

Bom desempenho na contenção da esporulação para *C. gloeosporioides*, da ordem de 61%, foi imposto, também, pelo filme de quitosana com cloreto de cobre (II) e 1,15% óleo de *T. minuta* (10a) (Tabela 9).

Tabela 8 - Efeito de filmes a base de quitosana sobre a esporulação de *C. gloeosporioides* (Bioensaio 1)

Tratamentos	Esporulação (cm) ¹
Testemunha	69,000 ±8,295 b
Filme quitosana (1a)	51,200 ±7,638 cd
Filme quitosana/óleo essencial 0,38% (v/v) (2a)	60,200 ±9,178 bc
Filme quitosana/óleo essencial 0,77% (v/v) (3a)	54,400 ± 14,313 cd
Filme quitosana/cloreto de cobre (II)/óleo essencial 0,38% (v/v) (4a)	58,800 ±5,580 c
Filme quitosana/cloreto de cobre (II)/óleo essencial 0,77% (v/v) (5a)	67,200 ± 13,861 bc
Filme quitosana/cloreto de cobre (II) (6a)	89,200 ± 17,200 a
Filme quitosana/óleo essencial 1,15% (v/v) (7a)	59,400 ±8,600 bc
Filme quitosana/cloreto de cobre (II)/óleo essencial 1,15% (v/v) (10a)	48,400 ±4,665 d
Óleo essencial 100% (v/v) (16)	0,000 ±0,000 e

¹ Dados de esporulação (cm) apresentados como média ± erro padrão da cinco repetições. Dados obtidos por avaliações diárias do crescimento ortogonal durante quatro dias de cultivo a 25°C, fotoperíodo diário de 12 horas. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 9 - Efeito de filmes a base de quitosana sobre a esporulação de *C. gloeosporioides* (Bioensaio 2)

Tratamentos	Esporulação (cm) ¹
Testemunha	105,400 ± 16,786 a
Filme quitosana/óleo essencial 1,15% (v/v) (7a)	38,400 ±7,871 e
Filme quitosana/óleo essencial 1,53% (v/v) (8a)	32,800 ±5,257 e
Filme quitosana/óleo essencial 1,92% (v/v) (9a)	13,800 ±2,289 f
Filme quitosana/cloreto de cobre (II)/óleo essencial 1,15% (v/v) (10a)	40,800 ±5,911 de
Filme quitosana/cloreto de cobre (II)/óleo essencial 1,53% (v/v) (11a)	0,000 ±0,000 g
Filme quitosana/cloreto de cobre (II)/óleo essencial 1,92% (v/v) (12a)	0,000 ±0,000 g
Óleo essencial 1,15% (v/v) (13)	46,400 ±5,335 de
Óleo essencial 1,53% (v/v) (14)	59,600 ±8,140 c
Óleo essencial 1,92% (v/v) (15)	36,800 ±7,297 e

¹ Dados de esporulação (cm) apresentados como média $\pm$ erro padrão da cinco repetições. Dados obtidos por avaliações diárias do crescimento ortogonal durante quatro dias de cultivo a 25°C, fotoperíodo diário de 12 horas. Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.4 Conclusões

Óleo essencial de *T. minuta* é um tratamento efetivo para o controle da antracnose da goiabeira *in vitro* devido à presença de numerosos compostos secundários. Sua associação com quitosana traz benefícios pela potencialização da atividade antimicrobiana e liberação mais lenta.

O composto cobre (II)/quitosana (filme 6a) não mostrou-se eficiente para o controle da antracnose da goiabeira. Efeito fungitóxico direto a *C. gloeosporioides* é proporcionado pelo filme de quitosana com óleo essencial, expresso pela contenção no crescimento micelial e esporulação do patógeno, respectivamente, a partir de concentrações 1,53% (v/v) (filmes 9 e 10 a) e 1,15% (v/v) (filmes 7, 8 e 9 a).

O filme híbrido (filme 11a) contendo 0,77% (v/v) de cobre (II) e 1,53% (v/v) de óleo essencial a 0,25% (v/v) de ácido acético foi o mais eficiente na contenção do crescimento micelial e esporulação do patógeno (*C. gloeosporioides*).

Conclusões Gerais

Considerando-se os objetivos propostos para a realização deste trabalho e analisando os resultados obtidos nos Capítulos 1 e 2, pode-se evidenciar que as condições experimentais para a elaboração, caracterização e aplicação dos filmes à base de quitosana foram realizadas de maneira satisfatória.

Materiais inéditos foram sintetizados e caracterizados com sucesso neste trabalho. A concentração de 0,25% (v/v) de ácido acético mostrou-se como a ideal para os filmes, a partir de bioensaios realizados em folhas de goiabeira.

O filme híbrido (filme 11a) contendo 0,77% (v/v) de cobre (II) e 1,53% (v/v) de óleo essencial a 0,25% (v/v) de ácido acético foi o mais eficiente na contenção do crescimento micelial e esporulação do patógeno (*C. gloeosporioides*).

Perspectivas Futuras para Doutorado

Em etapa posterior a este trabalho de mestrado será realizada a inserção de outras moléculas orgânicas e inorgânicas e óleos ao polímero de quitosana, para a obtenção de compostos inéditos com possibilidade de aplicação no controle de patógenos e passíveis de patenteamento.

Outros métodos de caracterização serão utilizados para os materiais inéditos obtidos, além disso, a metodologia de síntese dos compostos será aprimorada.

Referências

ABAD, M. J. et al. Active antifungal substances from natural sources. **ARKIVOC: Journal and Online Education in Chemistry**, v. 2007, n.7, p. 116-145, 2006.

ABD-ALLA, M. A. et al. Evaluation of lemongrass, thyme and peracetic acid against gray mold of strawberry fruits. **Journal of Agricultural Technology**, v. 7, p. 1775-1787, 2011.

ADEWUYI, S. et al. Chitosan–cobalt(II) and nickel(II) chelates as antibacterial agents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, p. 301–303, 2011.

AGRAWAL, G. K. et al. Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, n. 12, p. 1061-1069, 2002.

ALLAN, C. R.; HADWIGER, L. A. The Fungicidal Effect of Chitosan on Fungi of Varying Cell Wall Composition. **Experimental Mycology**, v. 3, p. 285-287 1979.

ALI, A. et al. Antimicrobial activity of chitosan enriched with lemongrass oil against anthracnose of bell pepper. **Food Packaging and Shelflife** 3, p. 56-61, 2015.

AIROLDI, C.; LIMA, I. S. Interaction of copper with chitosan and succinic anhydride derivative-a factorial design evaluation of the chemisorption process. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 229, p. 129–136, 2003.

ASSIS, O, B. G.; LEONI; A. M. Filmes Comestíveis de Quitosana. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Ed. 30, p. 33-38, 2003.

ASSIS, O, B. G.; SILVA; V. L. Caracterização Estrutural e da Capacidade de Absorção de Água em Filmes Finos de Quitosana Processados em Diversas Concentrações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, p. 223-228, 2003.

ALBUQUERQUE, G. A. Obtenção e caracterização físico-química do biodiesel de canola (*brassica napus*). Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, **Dissertação de Mestrado**, 2006.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARNABAS, J. et al. Evaluating the antibacterial properties of chitosan fibres embedded with copper ions for wound dressing applications. **Journal of Industrial Textiles**, v. 44, p. 232–244, 2014.

BELASQUE JR, J.; JESUS JR, W. C. Concentração de inoculo e método de inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Laranja**, v. 27, p. 263-272, 2006.

BERGER, J. et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 19-34, 2004.

BERTHOMIEU, C.; HIENERWADEL, R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. **Photosynthesis Research**, v. 101, n. 2-3, p. 157-170, 2009.

BONILLA, J. et al. Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 26, p. 9-16, 2012.

BRITO, D.; CAMPANA F.; Kinetics of the thermal degradation of chitosan. **Thermochimica Acta**. v. 465, p. 73- 82, 2007.

BURT, S. Essential oils: Their antimicrobial properties and potential applications in foods: A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004.

CARDOSO, M. J. B. et al. Ensaios Físico-Químicos e Mecânicos de Membranas de Quitosana com Cobre, Zinco e Magnésio. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v.7, p. 1-6, 2012.

CARVALHO, J. B. et al. Fungitoxicidade de *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon martinii* a *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de pimentão. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.10, n.1, p.88-93, 2008.

CHAMORRO, E. R., et al. Chemical composition of essential oil from *tagetes minuta* L. leaves and flowers. **Journal of the Argentine Chemical Society**, v. 96, p. 80-86, 2008.

CHALCHAT, J. C. et al. Essential oil of *Tagetes minuta* from Rwanda and France: chemical composition according to harvesting, location, growth stage and part of plant extracted. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, p. 375-386, 1995.

CHEN, X. et al. Molecular Affinity and Permeability of Different Molecular Weight Chitosan Membranes. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 50, p. 5915-5918, 2002.

CHINAGLIA, C. R.; CORREA, C. A. Análise de Falhas em Materiais Através de Técnicas Avançadas de Microscopia. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Paulo, v. 97, p. 19-23, 1997.

CHIRIAC, R. et al. Instability of the $\text{CuCl}_2\text{--NH}_3\text{BH}_3$ mixture followed by TGA and DSC. **Thermochimica Acta**, v. 567, p. 100–106, 2013.

COSTA Jr, E. A.; MANSUR, H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli (álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**, v. 31, p. 1460-1466, 2008.

CORNELIUS, W. W.; WYCLIFFE, W. Tagetes (*Tagetes minuta*) oils. In: Preedy, V. R. (Ed.) **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**, First Edition, p. 791 - 802, 2016.

CRAVEIRO, A. A. et al. Óleos essenciais de plantas do Nordeste. **Edições UFC**, Fortaleza, p. 210, 1981.

DANTAS, M. B. Obtenção, caracterização e estudo termoanalítico de biodiesel de milho (*Zea mays* L.). Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, **Dissertação de Mestrado**, 2006.

DOMEK, M. J. et al. Evidence for the role of copper in the injury process of coliform bacteria in drinking water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 289–293, 1984.

DOMEK, M. J. et al. Metabolism of *Escherichia coli* injured by copper. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 57-62, 1987.

DOLE, P. et al. Gas transport properties of starch based films. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, p. 335-343, 2004.

EL-DEEB, S. K. et al. Chemical composition of the essential oil of *Tagetes minuta* growing in Saudi Arabia. **Journal Saudi Pharmaceutical**, v. 12, p. 51 –53, 2004.

EL GHOUTH, A. et al. Ultrastructural and cytochemical aspects of the effect of chitosan on decay of bell pepper fruit. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 44, n. 6, p. 417-432, 1994.

EL GHOUTH, A. et al. Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycochitosan for control of postharvest decay of apple and citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 19, p.103-110, 2000.

ENAN, E. et al. Insecticidal action of terpenes and phenols to cockroaches: effect on octopamine receptors. **In Proceedings of the International Symposium on Plant Protection**, Gent, Belgium, 1998.

EUN, J. J. et al. Antibacterial activity of chitosans with different degrees of deacetylation and viscosities. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, p. 676–682, 2010.

FAI, A. E. C. et al. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 9, p. 435-451 2008.

FERRER, G. et al. Review on the methodology used in thermal stability characterization of phase change materials. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 665-685, 2015.

FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds.). Manual De Fitopatologia. Vol. 2. Doenças das plantas cultivadas. **4ª Ed., São Paulo: Ceres**, p. 401- 405, 2005.

FORATO, L. A. et al. Estudo de métodos de aumento de resolução de FTIR para análise de estruturas secundárias de proteínas. **Química Nova**, v. 21, p. 136-141, 1997.

FRÁGUAS, R. M. et al. Preparo e caracterização de filmes comestíveis de quitosana. **Polímeros**, v. 25, p. 48-53, 2015.

GHAFFARI, A. et al. Preparation and characterization of free mixed-film of pectin/chitosan/Eudragit intended for sigmoidal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, p. 175–186, 2007.

GIL, A. et al. Essential oil yield and composition of *Tagetes minuta* accessions from Argentina. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, p. 261 – 274, 2000.

GUIBAL, E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. **Separation and Purification Technology**, v.38, p. 43–74, 2004.

GIACOMINI, G. et al. Atividade fitotóxica de extratos aquosos e óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.& Sacc. **Cadernos de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 8, p. 1-5, 2013.

GOES, A. et al. Efeito de fungicidas cúpricos, aplicados isoladamente ou em combinação com mancozeb, na expressão de sintomas de fitotoxicidade e controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em goiabeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 26, n. 2, p. 237-240, 2004.

GONSALVES, J. K. M. C. et al. Microencapsulação do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L) Osbeck pelo método da coacervação simples. **Scientia Plena**, v. 5, n. 11, 2009.

HERNANDÉZ-LAUZARDO, A. N., et al. Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on *in vitro* development of *Rhizopus stolonifer*. **Carbohydrate Polymers**, v.73, p. 541-547, 2008.

HOAGLAND, P. D.; PARRIS, N. Chitosan/Pectin Laminated Films, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1915–1919, 1996.

HONG, P. Z. et al. Thermogravimetric Analysis of Chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 105, p. 547–551, 2007.

HROMIS, N. et al. Investigation of a product-specific active packaging material based on chitosan biofilm with spice oleoresins. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 55, p. 78–88, 2016.

ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v. 19, p. 603-608, 2000.

JUNQUEIRA, N. T. V. Doenças e Pragas. In: Manica, I. (Ed). **Fruticultura Tropical 6: Goiaba**. Porto Alegre. Cinco Continentes, p. 225-270, 2000.

KANATT, S. R. et al. Chitosan and mint mixture: A new preservative for meat and meat products. **Food Chemistry**, v. 107, p. 845–852, 2008.

KHAN, W.; et al. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 859-863, 2003.

KONG, M. et al. Antibacterial mechanism of chitosan microspheres in a solid dispersing system against *E. coli*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 65, p. 197–202, 2008.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 126–139, 2003.

KUWAHARA, J. et al. Photosensitive DNA cleavage and phage inactivation by copper(II) - camptothecin. **Biochemistry**, v. 25, p. 1216-1221, 1986.

KYU KYU WIN, N. et al. Effects cinnamon extract, chitosan. Effects of cinnamon extract, chitosan coating, hot water treatment and their combinations on crown rot disease and quality of banana fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, p. 333-340, 2007.

LABANCA, E. R. G. Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*, atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletrotichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*). **Teste de Doutorado**. USP, 2002.

LOURDIN, D. et al. Influence of amylose content on starch films and foams. **Carbohydrate Polymers**, v. 27, p. 261-270, 1995.

MANZL, C. et al. Copper-induced formation of reactive oxygen species causes cell death and disruption of calcium homeostasis in trout hepatocytes. **Toxicology**, v. 196, p. 57–64, 2004.

MEKAHLIA, S.; BOUZID, B. Chitosan-Copper (II) complex as antibacterial agent: synthesis, characterization and coordinating bond- activity correlation study. **Physics Procedia**, v. 2, p. 1045–1053, 2009.

MESHKATALSADAT, M. H. et al. Chemical characterization of volatile components of *Tagetes minuta* L. cultivated in south west of iran by nano scale injection. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 5, p. 101 -106, 2010.

MOGHADDAM, M.; OMIDBIAGI, R. Chemical composition of the essential oil of *Tagetes minuta* L. **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, p. 3 – 4, 2007.

MOHAMED, M. A. H. et al. Effect of drought stress on the yield and composition of volatile oils of droughttolerant and non-drought-tolerant clones of *Tagetes minuta*. **Planta Medica**, v. 68, p. 472–474, 2002.

MORAES, S. R. G.; TANAKA, F. A. O.; JÚNIOR, N. S. M. Histopathology of *Colletotrichum gloeosporioides* on guava fruits (*Psidium guajava* L.). **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 35, n. 2, p. 657-664 junho 2013.

MOSSLER, M. A.; CRANE, J. Florida Crop/Pest Management Profile: Guava and Wax Jambu. **Cooperative Extension Service**, University of Florida, p. 1-5, 2003.

MOURA, M. J. et al. Preparation of Chitosan with Different Characteristics and Its Application for Biofilms Production. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 23, p. 470–477, 2015.

MÜLLER, C.; et al. Evaluation of effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, p. 82-87, 2008.

MUZZARELLI, C. et al. Spray-drying of solutions containing chitosan together with polyuronans and charecterisation of the microspheres, **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 73-82, 2004.

NACHTIGAL, J. C.; MIGLIORINI, L. C. Recomendações para o Cultivo da Goiabeira no Rio Grande do Sul. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento circular técnica, **Circular Técnica Embrapa**, Pelotas, v. 110, 2011.

NAYAK, P. L. et al. Synthesis and Characterization of Chitosan/Cloisite 30B Film for Controlled Release of Ofloxacin. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 123, p. 2588-2594, 2012.

NO, H. K. et al. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 65-72, 2002.

OLIVEIRA, A. R. M; ZARBIN, A. J. G. Um procedimento simples e barato para a construção de um equipamento “dip-coating” para deposição de filmes em laboratório. **Química Nova**, v. 28, p. 141-144, 2005.

OUATARRA, B. et al. Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films. **Journal of Food Science**, v. 65, p. 768–773, 2000.

PEREIRA, F. S. Estudos de biopolímeros a base de quitina e quitosana quimicamente transformados para quelação de metais e para a captura e fixação de dióxido de carbono. Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, (POSMAT), **Tese de Doutorado**, 2016.

PERES, N. A. R. et al. Identification and characterization of *Colletotrichum spp.* affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal Phytopathology**, v.150, p.128-134, 2002.

PICCININ, E.; PASCHOLATI, S. F. Doenças da goiabeira. IN: KIMATI, H. et al. (Eds.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**, 4 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p.401-406, 2005.

RUSCHEI, C. F. C. et al. Análise exploratória aplicada a espectros de reflexão total atenuada no infravermelho com transformada de fourier (ATR-FTIR) de blendas de biodiesel/diesel. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 810-815, 2014.

RUSJAN, D. et al. Copper in Horticulture, Fungicides for Plant and Animal Diseases. **Biotechnical Faculty**, University of Ljubljana Slovenia, Europa, p. 257-278, 2012.

RYKOWSKA, I. et al. Chemically bonded chelates as selective complexing sorbents for gas chromatography VII. N-[3-(Trimethoxysilyl)propyl]diethylenetriamine complexes with CuCl_2 and CrCl_3 . **Journal of Chromatographi A**, v. 844, p. 239 – 248, 1999.

SADIA, S. et al. *Tagetes minuta* L., a useful underutilized plant of family Asteraceae: a review. **Pakistan Journal of Weed Sciences Research**, v.19 p. 179-189, 2013.

SAMUNI, A. et al. On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions. A site-specific Fenton mechanism. **European Journal of Biochemistry**, v. 137, p. 119-124, 1983.

SANTOS, J. E. et al. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos - SP, v. 13, p. 242-249, 2003.

SCHMIDT, V. et al. Thermal stability of films formed by soy protein isolate-sodium dodecyl sulfate. **Polymer Degradation and Stability**, v. 87, n. 1, p. 25-31, 2005.

SENATORE, F. et al. Antibacterial activity of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) essential oil with different chemical composition. **Journal Flavour and Fragrance**, v. 19, p. 574–578, 2004.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science & Technology**, London, v. 10, n. 2, p. 37-51, 1999.

SILVA, E. C. D. et al. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 347-356, 2007.

SINGH, V. et al. Domestication of wild marigold (*Tagetes minuta* L.) as a potential economic crop in western Himalaya and North Indian plains. **Economic Botany**, v. 57, p. 535–544, 2003.

SEIXAS, P. T. L.; CASTRO, H.C.; SANTOS, G.R.; CARDOSO, D.P. Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto citronelal. **Revista Brasileira Planta Medicinal**, v. 13, p. 523-526, 2011.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 7°. ed. **LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora S.A.**, Rio de Janeiro, 2007.

SINGLA, A. K.; CHAWLA, M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects – an update. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p. 1047–1067, 2001.

SOARES, A. R. et al. Infecção de goiabas por *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* sob diferentes temperaturas e períodos de molhamento. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 4, p. 265-272, 2008.

SOBRINHO, C. A. et al. Indução abióticos. In: CAVALCANTI, L.S.; et al. Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. **Piracicaba: ed. FEALQ**, v. 13, p. 51-80, 2005.

SOULE, J. A. Infrageneric systematics of *Tagetes*. In: HIND, D. J. N., BEENTJE, H. J. (Eds.), *Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference, 1994*. **Botanic Kew**, London, p. 435 - 443, 1996.

SREENIVASAN, K. Thermal stability studies of some chitosanmetal ion complexes using differential scanning calorimetry. **Polymer Degradation and Stability**, v. 52, p.85-87, 1996.

STERRITT, R. M.; LESTER, J. N. Interactions of heavy metals with bacteria. **Science of the Total Environment**, v. 14, p. 5-17, 1980.

TERESCHUK, M. L. et al. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, p. 227-232,, 1997.

TRIPATHI, P. et al. Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 24, p. 39-46, 2008.

TRIPATHI, S. et al. Preparation and physicochemical evaluation of chitosan/poly(vinyl alcohol)/pectin ternary film for food-packaging applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p.711–716, 2010.

VASEEHARAN, B. et al. Synthesis and characterization of chitosan - ZnO composite and its antibiofilm activity against aquatic bacteria. **Journal of Composite Materials**, v. 49, p. 177–184, 2015.

WANZALA, W.; OGOMA, S. B. Chemical composition and mosquito repellency of essential oil of *Tagetes minuta* from the southern slopes of Mount Elgon in western Kenya. **Journal of essential oil bearing plants**, v. 16, p. 216 – 332, 2013.

WLADYMYR, J. B. S. et al. Desenvolvimento de compósitos a base de quitosana/fosfato de cálcio. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 8, p. 136-140, 2013.

ZAMBOLIM, L.; OLIVEIRA, R. R. Manejo Integrado das Doenças da Goiabeira.
Revista Brasileira de Fruticultura, p.1-16, 1996.

ZYGADLO, J. A.; GROW, N. R. Comparative study of the antifungal activity of essential oils from aromatic plants growing wild in the central region of Argentina.
Journal of Flavour and Fragrance, v, 10, p. 113–118, 1995.

Anexo

Anexo 1. Caracterização química do óleo essencial de *Tagetes minuta* por cromatografia gasosa com detector por Ionização de chama, CG-FID Shimadzu

Os componentes do óleo essencial de *T. minuta* foram identificados por cromatografia gasosa com detector por Ionização de chama, CG-FID Shimadzu, usando o índice de Kováts (IK), sendo identificado um total de 15 compostos demonstrados, abaixo, na Tabela 10.

As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais, Embrapa Agroindústria Tropical, no período de dezembro de 2015, e o óleo utilizado neste trabalho foi fornecido pelo Drº Gustavo Schiedeck, pesquisador na Embrapa clima temperado.

Os constituintes majoritários do óleo essencial de *T. minuta* são trans-tagetona (43,02%), cis-beta-ocimeno (34,61%) e di-hidrotagetona (11,28%) demonstrados na tabela 10, com concentrações que oscilam entre 43 a 11% em comparação aos demais componentes presentes na amostra.

Tabela 10. Componentes do óleo essencial de *T. minuta*

Componente	IK _{lit}	Área	Área (%)	Fórmula molecular
ethyl 2-methylbutyrate	842	904	0,02	C ₇ H ₁₄ O ₂
sabineno	975	22805	0,54	C ₁₀ H ₁₆
octanal	998	11041	0,26	C ₁₀ H ₁₆
alfa-felandreno	1002	11626	0,27	C ₈ H ₁₆ O
limoneno	1029	171668	4,04	C ₁₀ H ₁₆
cis-beta-ocimeno	1037	1469182	34,61	C ₁₀ H ₁₆
trans-beta-ocimeno	1050	16057	0,38	C ₁₀ H ₁₆
dihydro-tagetone	1052	479009	11,28	C ₁₀ H ₁₈ O
cis-tagetone	1144	164988	3,89	C ₁₀ H ₁₆ O
trans-tagetone	1152	1825976	43,02	C ₁₀ H ₁₆ O
trans-ocimenone	1238	8770	0,21	C ₁₀ H ₁₄ O
7-epi-silphiperfol-5-ene	1348	10863	0,26	C ₁₅ H ₂₄
beta-cariofileno	1419	15371	0,36	C ₁₅ H ₂₄
alfa-cariofileno	1454	13628	0,32	C ₁₅ H ₂₄
biciclogermacreno	1500	22972	0,54	C ₁₅ H ₂₄