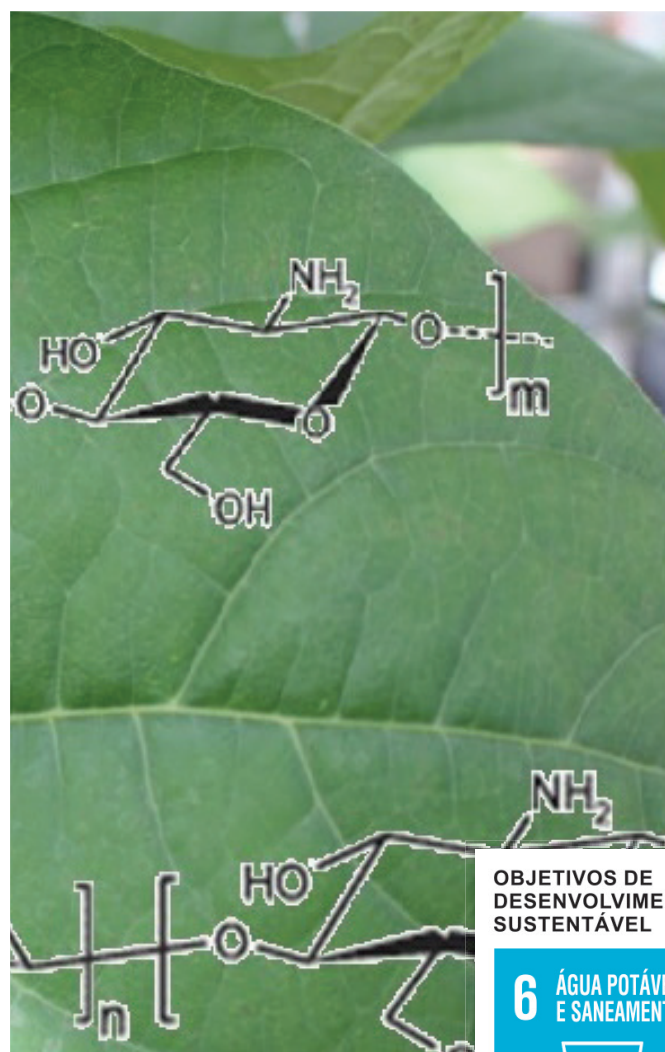
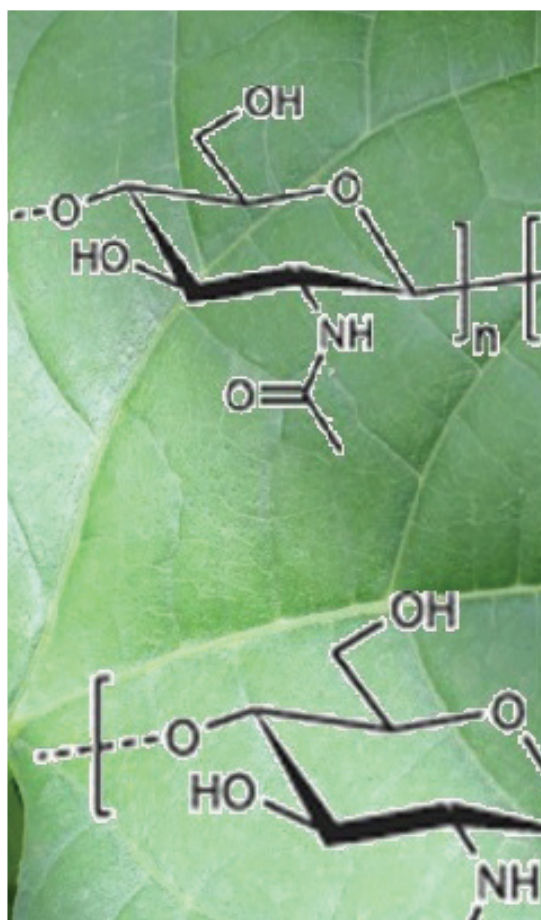


Caracterização Físico-química do Filme de Quitosana Diluída em Ácido Acético para Pulverização em Plantas



OBJETIVOS DE
DESENVOLVIMENTO
SUSTENTÁVEL

6 ÁGUA POTÁVEL
E SANEAMENTO



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Clima Temperado
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
333**

**Caracterização Físico-química do Filme
de Quitosana Diluída em Ácido Acético
para Pulverização em Plantas**

*Fabiane Grecco da Silva Porto
Ângela Diniz Campos
Irajá Ferreira Antunes
Irene Teresinha Santos Garcia*

Embrapa Clima Temperado
*Pelotas, RS
2020*

Embrapa Clima Temperado
BR 392 km 78 - Caixa Postal 403
CEP 96010-971, Pelotas, RS
Fone: (53) 3275-8100
www.embrapa.br/clima-temperado
www.embrapa.br/fale-conosco

Comitê Local de Publicações

Presidente
Luis Antônio Suíta de Castro

Vice-Presidente
Walkyria Bueno Scivittaro

Secretário-Executivo
Bárbara Chevallier Cosenza

Membros
*Ana Luiza B. Viegas, Fernando Jackson,
Marilaine Schaun Pelufê, Sonia Desimon*

Revisão de texto
Bárbara Chevallier Cosenza

Normalização bibliográfica
Marilaine Schaun Pelufê

Editoração eletrônica
Fernando Jackson

Foto da capa
Fabiane Porto

1ª edição
Obra digitalizada (2020)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Clima Temperado

C257 Caracterização físico-química do filme de quitosana
diluída em ácido acético para pulverização em plantas /
Fabiane Grecco da Silva Porto... [et al.]. – Pelotas:
Embrapa Clima Temperado, 2020.
19 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento /
Embrapa Clima Temperado, ISSN 1678-2518 ; 333)

1. Quitosana. 2. Pulverização. 3. Radiação solar.
I. Porto, Fabiane Grecco da Silva. II. Série.

CDD 631.5

Sumário

Introdução.....	7
Materiais e métodos	8
Resultados e discussões.....	9
Conclusões.....	17
Agradecimentos.....	17
Referências	17

Caracterização Físico-química do Filme de Quitosana Diluída em Ácido Acético para Pulverização em Plantas

Fabiane Grecco da Silva Porto¹

Ângela Diniz Campos²

Irajá Ferreira Antunes³

Irene Teresinha Santos Garcia⁴

Resumo - Filmes de quitosana diluída em ácido acético autossuportados foram avaliados quanto às suas propriedades de fotoproteção, permeação ao vapor d'água e resistência à água e à degradação térmica. Soluções aquosas contendo 10,0; 3,0; 1,0 e 0,5 g L⁻¹ de quitosana, pulverizadas sobre a superfície foliar de feijão, produziram bom recobrimento. Os filmes apresentaram estrutura semicristalina, estabilidade em água até sete dias após imersão, grau de inchamento de 400% em massa e permeabilidade ao vapor d'água de 12 g m⁻¹ h⁻¹. Os filmes foram termicamente estáveis até 300 °C e capazes de bloquear parcialmente as radiações UVC e UVB. A absorvidade molar em função do comprimento de onda permite a formulação dos filmes com diferentes espessuras e concentrações, de acordo com o bloqueio de radiação ultravioleta desejada.

Termos para indexação: *Phaseolus vulgaris*, radiação ultravioleta; revestimento fitoprotetor.

¹ Bacharel em Química, mestre em Química, Convênio Embrapa/Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

² Engenheira-agrônoma, doutora em Fisiologia Vegetal, pesquisadora da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

³ Engenheiro-agrônomo, doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

⁴ Química industrial, doutora em Ciência dos Materiais, professora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

Physical-chemical Characterization of Chitosan and Acetic Acid Films for Spraying in Plants

Abstract - Auto-supported films of chitosan diluted in acetic acid diluted were evaluated according to their photo protection properties, water vapor permeability, and water and thermal degradation resistance. Aqueous solutions containing 10.0; 3.0; 1.0 and 0.5 g L⁻¹ chitosan, sprayed on the leaves of common bean, produced good coating. The films present a semicrystalline structure, are stable under immersion for up to seven days with swelling degree of 400% in weight and water vapor permeability of 12 g m⁻¹ h⁻¹. Films are thermally stable up to 300 °C and able to block almost completely UVB and UVC radiation (from 200 to 320 nm). The molar absorptivity as a function of wavelength allows the formulation of films with different thicknesses and concentrations, according to the desired radiation protection.

Index terms: *Phaseolus vulgaris*, ultraviolet radiation; phyto-protective coating.

Introdução

A quitosana é um polissacarídeo linear formado por unidades repetidas de β -(1,4)-2-amino-2-deoxi-D-glucose e β -(1,4)-2-acetamida-2-deoxi-D-glucose, biodegradável, biocompatível e não tóxica. É obtida através do processo de desacetilação da quitina, um biopolímero natural abundante, extraído principalmente do exoesqueleto de diversos crustáceos (Mikhailov et al., 2014; Anaya et al., 2013).

As moléculas de quitosana, dependendo do meio em que se encontram, podem adotar diferentes arranjos espaciais e interagir com espécies aniônicas. As interações da quitosana e suas propriedades em solução são dependentes da sua massa molar e do seu grau de desacetilação, que, juntamente com o pH do meio, determinam sua carga global (Lee et al., 2013; Babak et al., 2007).

A quitosana e seus derivados têm encontrado grande número de aplicações em diferentes áreas, devido a suas propriedades físicas, químicas e biológicas e sua versatilidade (Cordero et al., 2014). Na farmacologia e na medicina, têm sido desenvolvidos entregadores de drogas, fibras, nanoesferas e tecidos à base de quitosana (Kulish et al., 2015; Rong et al., 2016). Kimura et al. (2013) prepararam filmes de quitosana contendo óleo de andiroba, com propriedades anti-inflamatórias e antibióticas. Biocompostos baseados em quitosana foram obtidos por Pereira et al. (2014) e Hurt et al. (2015).

Nanocompósitos contendo quitosana também têm sido utilizados para remoção de metais pesados e compostos orgânicos no tratamento de efluentes (Amiri et al., 2015; Mahaninia; Wilson, 2016).

Na agricultura, produtos à base de quitosana têm encontrado aplicações como agentes antimicrobianos, antioxidantes, na conservação pós-colheita, no desenvolvimento de embalagens para alimentos (Liu et al., 2013; Suresh et al., 2015; Kara et al., 2016; Assis; Pessoa, 2004) e também como estimulantes de respostas de defesa em frutos e plantas (Berger et al., 2011; Badawy; Rabea, 2009; Mazaro et al., 2009; Lorencetti et al., 2015; Di Piero; Garda, 2008).

Assis e Pessoa (2004) produziram filmes de quitosana para recobrimento de maçãs cortadas. Filmes comestíveis à base de quitosana, com possível aplicação para recobrimento de frutos, também foram obtidos por Fráguas et al. (2015).

A quitosana é solúvel em solução aquosa de ácido acético, ascórbico, cítrico, glicólico, maleico, oxálico, tartárico e láctico (Li et al., 2013; Cadogan et al., 2014). Freddo et al. (2014) estudaram o efeito fungistático de diferentes concentrações de soluções de quitosana em ácido acético, no controle do patógeno *Rhizoctonia solani*, demonstrando que a quitosana reduz o crescimento micelial desse fungo in vitro. Esses autores sugerem que o emprego da quitosana na agricultura se torna importante por sua atividade microbiana sobre vários patógenos.

Outro aspecto importante a ser considerado na agricultura, além das doenças, são os efeitos do aumento da radiação ultravioleta sobre as plantas como consequência da redução da camada de ozônio. Estudos mostram que o aumento da radiação ultravioleta, em particular na região até 320 nm, pode afetar a estrutura do DNA, de proteínas e de membranas, produzindo significativas alterações fisiológicas nas plantas (alterações na transpiração, fotossíntese e desenvolvimento) (Gu et al., 2010; Legarrea et al., 2010; Cechin et al., 2012). A redução observada na acumulação de biomassa com o aumento da exposição à radiação ultravioleta torna interessante o desenvolvimento de um revestimento fotoprotetor para vegetais.

Estudos recentes estão focados em diferentes materiais para proteção contra radiação ultravioleta (UV). Nanocompósitos de grafeno e quitosana e óxido de grafeno foram obtidos para utilização como revestimento de tecidos de algodão (Tian et al., 2015; Pandiyarasan et al., 2017).

O presente estudo teve como objetivo realizar a caracterização físico-química de filmes de quitosana diluída em ácido acético para a utilização em pulverização de plantas, e se constitui em um dos temas abordados na dissertação intitulada "Caracterização de quitosana em ácido pirolenhoso destilado com potencial uso como coberturas protetoras" apresentada por Porto, F. G. S., em 21 de março de 2011 à Universidade Federal de Pelotas, RS.

Materiais e métodos

Os estudos foram realizados em projeto de parceria entre a Embrapa Clima Temperado (Laboratório de Fisiologia Vegetal), Universidade Federal de Pelotas e Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Foram avaliadas as características básicas dos sistemas aquosos precursores e dos filmes de quitosana diluída em ácido acético.

A quitosana utilizada neste trabalho foi adquirida da Nutrifarm™ e o ácido acético 99,9 % da Synth™. As soluções foram preparadas em água deionizada (condutividade menor que 0,05 $\mu\text{S cm}^{-1}$).

O grau de desacetilação da quitosana foi caracterizado pela técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H , em $\text{D}_2\text{O}/\text{F}_3\text{CCOOH}$ 1%, em um equipamento Varian, modelo Innovate 300 MHz.

A caracterização estrutural do sistema precursor, composto de quitosana, ácido acético e água, foi obtida através de espalhamento de luz estático, permitindo determinar a massa molar do polímero. A quitosana em pó e o sistema solvente foram agitados por 2 horas em temperatura ambiente. O sistema solvente utilizado foi solução aquosa de ácido acético 2% (v/v). Soluções com concentração de quitosana na faixa de 0,05 a 10 g L^{-1} foram usadas para as medidas. A análise transcorreu em equipamento de espalhamento de luz com um goniômetro Brookhaven Instruments, com um laser He-Ne Spectra-Physics de 632,8 nm. O método de Zimm (Brown, 1994) foi utilizado e o espalhamento de luz foi medido em diferentes ângulos, variando de 35 ° a 145 °, em intervalos de 5 graus.

Para a preparação e caracterização dos filmes de quitosana, uma solução estoque contendo 10 g L^{-1} de quitosana foi preparada por dissolução do polímero em solução de ácido acético 2 % (v/v) sob agitação constante por 2 horas. Soluções de quitosana contendo 0,5; 1,0 e 3,0 g L^{-1} foram preparadas por diluição da solução estoque. Filmes autossuportados, com diferentes espessuras, foram obtidos vertendo-se 20 mL de solução em um suporte de polietileno com 24 cm^2 de área. Os hidrogéis foram secos durante três dias a 50 °C. A espessura escolhida foi a que permitiu avaliar a absorvância com ótima resposta linear na região do ultravioleta/visível do espectro eletromagnético. A espessura dos filmes foi determinada com um micrômetro.

A análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier do filme de quitosana diluída em ácido acético foi obtida no modo transmitância, com acumulação de 32 varreduras, entre 4.000 e 500 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} .

Os padrões de difração de raios-X foram obtidos em um difratômetro Siemens, modelo D500 com geometria θ - 2θ , contendo ânodo de Cu ($\text{Cu-K}\alpha$, $\lambda = 1.541 \text{ \AA}$). As varreduras foram realizadas variando 2θ de 2 a 50 °, com taxa de varredura de 0,2° min^{-1} .

A morfologia da superfície dos filmes foi observada por microscopia eletrônica de varredura em um equipamento Evo Carl Zeiss, modelo MA 10. Os filmes foram recobertos com 50 nm de ouro.

O espectro ultravioleta/visível dos filmes foi obtido no modo transmitância, de 200 a 800 nm, com um espectrofotômetro Shimadzu (modelo UV-1601 PC).

A estabilidade térmica foi determinada através de análise termogravimétrica. As medidas ocorreram em um equipamento modelo TGA50H, na faixa de temperatura entre 10 °C e 500 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} , sob fluxo de N_2 de 50 mL min^{-1} .

O comportamento em água, aspecto importante para se avaliar a aplicação do filme como cobertura para tecidos vegetais, foi avaliado em filmes com áreas e espessuras similares; esses filmes foram pesados em balança ATI CAHN C-35 com 0,1 μg de precisão e foram imersos em água destilada. Em seguida, após diferentes tempos de imersão de 5, 10, 15, 20, 25, 65, 325, 1.165, 1.465 minutos, os filmes foram secos e pesados. Os resultados para cada imersão são os valores médios de cinco determinações. Os filmes foram deixados por sete dias imersos para observação visual.

A permeabilidade ao vapor de água dos filmes de quitosana diluída em ácido acético foi determinada por adaptação do método gravimétrico padrão E96-95 da Sociedade Americana para Testes e Materiais (ASTM, 1995). Foram colocados 10 g de sílica gel seca (Synth), em vidros de 50 mL, que foram selados com os filmes.

Os sistemas foram colocados dentro de um dessecador contendo 200 mL de solução de cloreto de cálcio 10% (m/v), a 25 °C. Durante cinco dias, uma vez por dia, as amostras foram retiradas e pesadas. O experimento foi realizado em triplicata.

Os experimentos envolvendo a aplicação do filme quitosana diluída em ácido acético sobre uma superfície foliar foram conduzidos em casa de vegetação, com três repetições. Trinta e três dias após o plantio, as plantas foram pulverizadas com as soluções de quitosana até o ponto de molhamento. No tratamento controle, utilizou-se água deionizada. Quatro horas após a aplicação, amostras foram coletadas para serem observadas em uma lupa Leica modelo S8APO.

As folhas com o filme de quitosana diluída em ácido acético foram também observadas em microscópio óptico Leica modelo DM1000. As amostras foram colocadas em fixador de Karnovsky (Karnovsky, 1965) e em seguida banhadas com a solução de cacodilato de sódio 0,2 mol L⁻¹, pH 7,2, e fixadas novamente com solução de tetróxido de ósmio a 1%. A seguir, foram lavadas em água destilada e sucessivamente desidratadas em soluções de etanol 30, 50, 70, 90, 95% e etanol absoluto, e posteriormente imersas em acetona. Finalmente, as amostras foram impregnadas na resina SPURR™. Os blocos de resina com a amostra foram secos a 60 °C durante cinco dias e foram cortados em um ultramicrótomo Leica modelo Ultracut UCT. Os cortes foram fixados em uma lâmina de vidro e corados com solução de azul de metileno 1 % + bórax 1 %.

Na casa de vegetação, as plantas foram observadas e as folhas fotografadas 24 horas após a aplicação do filme e, a cada 7 dias, por um período de 30 dias, para constatação de aparecimento de sintomas de fitotoxidez.

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) foi a planta utilizada como padrão nos testes, por ser uma cultura de fácil manejo e crescimento rápido, em que foi observada a adesão do filme à folha e resposta quanto à fitotoxidez para um possível uso para fitoproteção.

Resultados e discussões

A estrutura da quitosana está apresentada na Figura 1, onde m é o número de anéis glucosamina e n é o número de acetamidas substituintes nos anéis. O grau de desacetilação (GD) foi obtido a partir da análise de ressonância magnética nuclear de ¹H, segundo a equação (1): (Lee et al., 2013; Santos et al., 2003)

$$GD = 100 \times \left[1 - \frac{(I_g/3)}{(I_{b-f}/6)} \right] \quad (1)$$

onde I_g corresponde ao valor da integral devido aos hidrogênios do grupo acetamida (CH₃), em 2,1 ppm, e I_{b-f} é a soma das integrais dos picos na região de 3,3 a 3,9 ppm, correspondendo aos hidrogênios do anel glucosamina (ligados aos carbonos b-f) (Figura 1). O grau de desacetilação calculado para a quitosana utilizada neste trabalho foi de 97%.

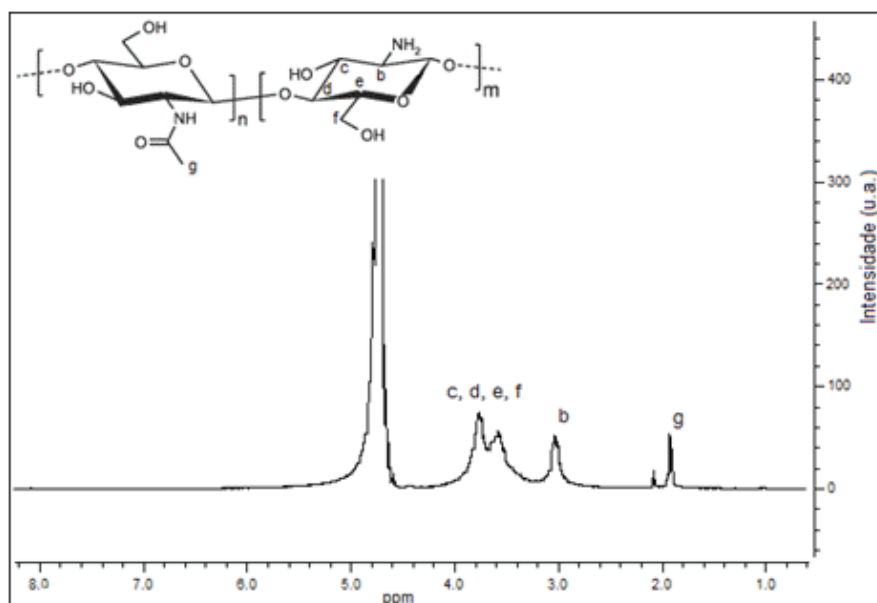


Figura 1. Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H e estrutura da quitosana (Porto, 2011).

As medidas de espalhamento de luz estático (Tabela 1) foram tratadas conforme o método de Zimm (Brown, 1994), onde a intensidade do espalhamento de luz é relacionada com a massa molar média, M_w , o segundo coeficiente virial, A_2 , e o raio de giro, R_g , de uma macromolécula através da relação padrão (2):

$$\frac{KC}{R(\theta, C)} = \frac{1}{M_w} \left[1 + \frac{q^2 R_g^2}{3} \right] + 2A_2 C \quad (2)$$

onde $R(\theta, C)$ é a intensidade do espalhamento de luz (razão de Rayleigh), C é a concentração do polímero, q é o vetor espalhamento, θ o ângulo de espalhamento, λ é o comprimento de onda da radiação no vácuo e K a constante óptica (Equação 3):

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2 \left(\frac{dn}{dC} \right)^2}{\lambda^4 N_A} \quad (3)$$

onde N_A é a constante de Avogadro e dn/dC é o incremento no índice de refração, que foi de $1,660 \times 10^{-1} \pm 1,1 \times 10^{-5} \text{ L g}^{-1}$ neste trabalho.

Tabela 1. Resultados do espalhamento de luz para as soluções de quitosana em solução aquosa de ácido acético 2% (v/v) (Porto, 2011).

Propriedade	Valor
Massa molar	$(1,00 \pm 0,12) \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$
Segundo coeficiente de virial	$-5,9 \times 10^{-5} \text{ cm}^3 \text{ mol g}^{-2}$
R_g	$119 \pm 11 \text{ nm}$

O R_g (raio de giro) é definido como a média dos raios da estrutura da macromolécula até seu centro de massa. O segundo coeficiente de virial (A_2), quando assume um valor muito próximo de zero, como neste caso, indica que a entropia da mistura compensa as forças repulsivas entre o polímero e o solvente, e as forças atrativas entre as moléculas do polímero. Por outro lado, o valor negativo de A_2 demonstra que as interações polímero-polímero estão sendo favorecidas, o que indica que a afinidade das partículas do polímero pelo solvente está diminuída nesta solução (Pohlmann et al., 2008).

A análise por espalhamento de luz estático é aplicável quando o polímero encontra-se em uma solução diluída. A concentração crítica de uma solução polimérica (C^*) é que define a concentração na qual o sistema

passa do regime diluído para o semidiluído, ou seja, quando começam a ocorrer interações entre os novelos poliméricos, e pode ser obtida através da Equação 4 (Brown, 1994):

$$C^* = \frac{1}{M_w A_2} \quad (4)$$

O resultado obtido para este estudo com quitosana em solução de ácido acético foi de $C^* = 16 \text{ g L}^{-1}$, em temperatura ambiente. Portanto, os sistemas estudados (concentrações na faixa de 0,05 a 10 g L^{-1}) estavam no domínio diluído e as aproximações utilizadas na técnica de espalhamento de luz estático para obtenção dos valores apresentados na Tabela 1 são válidas (Nicolau, 2009; Lindner; Zemb, 1991).

Os grupos amino presentes na estrutura da quitosana apresentam uma banda de absorção característica na região de 3.300–3.500 cm^{-1} (Figura 2), que está sobreposta à banda de absorção larga do grupo OH. Em 2.932 e 2.890 cm^{-1} , respectivamente, observa-se a deformação axial simétrica e antissimétrica de C-H alifático; em 1.600 cm^{-1} aparece a banda de deformação angular da ligação N-H, e em 1.417 cm^{-1} e 1.380 cm^{-1} , a banda de deformação angular do grupo C-N. As deformações das ligações C-O são observadas em 1.100 cm^{-1} . Essas bandas estão de acordo com os valores encontrados por Sionkowska (2006), quando testou o efeito da radiação solar sobre a estrutura de filmes de colágeno e de quitosana, obtidos por *casting*, após dissolução desses polímeros em ácido acético.

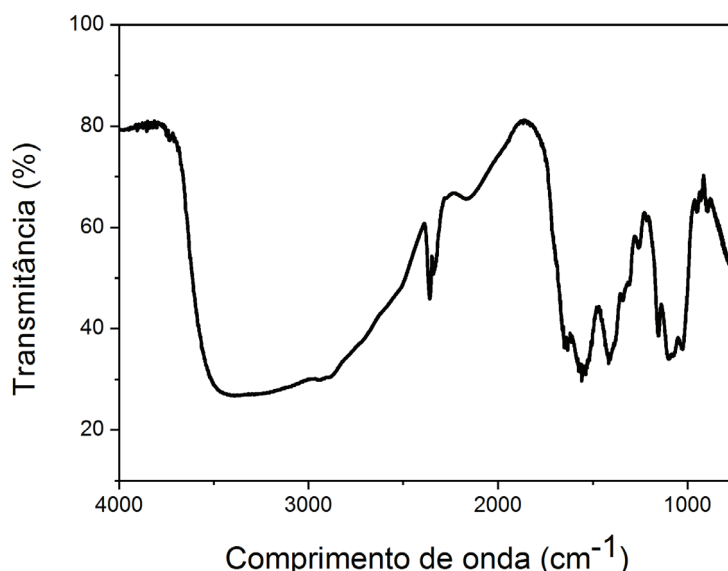


Figura 2. Espectro de infravermelho do filme de quitosana diluída em ácido acético (Porto, 2011).

O difratograma de raios X do filme de quitosana diluída em ácido acético (Figura 3) é característico de filmes semicristalinos, o que é evidenciado por picos de difração que se sobrepõem a um halo característico de materiais amorfos. São observados três picos em 2θ : 8,45°; 11,33°; 17,47°, e uma banda larga com máximo em 23,3°. Hengquan et al. (2010) encontraram picos em 2θ em 10° e 20° quando estudaram filmes de quitosana em solução de acetato de sódio, que são coincidentes com os valores relatados por Yen et al. (2009) para quitosana obtida a partir de conchas de caranguejo. Porém, Kucukgulmez et al. (2011) encontraram picos em 20° e 22° para quitosana obtida a partir de conchas de *Metapenaeus stebbingi*, e sugeriram que o motivo desses diferentes picos de difração de raios X observados para a quitosana pode estar na fonte de quitina utilizada para sua obtenção. Além disso, o alto grau de desacetilação da quitosana usada neste experimento, associada ao tempo de deposição, podem promover a coordenação entre a quitosana e o ácido acético, permitindo a estruturação dos filmes e a formação da estrutura semicristalina observada.

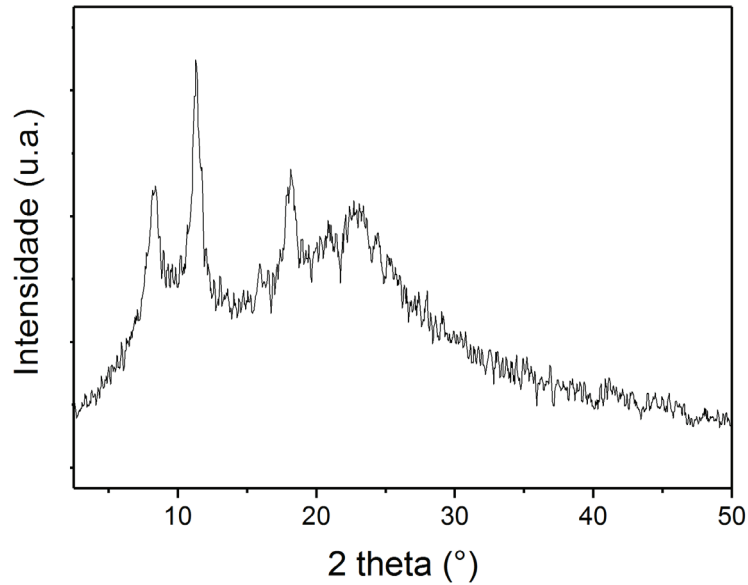


Figura 3. Difratoograma de raio X para filme de quitosana diluída em ácido acético, $\lambda=0,1542$ nm (Porto, 2011).

Os filmes de quitosana diluída em ácido acético autossuportados, obtidos nas diferentes concentrações de quitosana, foram uniformes (Figura 4). Esses dados são semelhantes aos observados por Assis e Silva (2003), quando estudaram filmes de quitosana (em ácido clorídrico) na faixa de concentração de 3 a 50 g L⁻¹. Foi observado que os filmes obtidos com as baixas concentrações de quitosana (Figura 4a) apresentaram uma superfície mais áspera do que os filmes obtidos com 10 g L⁻¹ de quitosana (Figura 4b). Observou-se também que apenas o filme obtido com 10 g L⁻¹ de quitosana apresentou estrutura frágil. López-Mata (2015) encontrou em seu trabalho uma superfície sem poros e com pequenas dobras para filmes de quitosana utilizando ácido acético como solvente. Esse autor afirma que a característica da superfície dos filmes depende da natureza da quitosana (grau de desacetilação e massa molar).

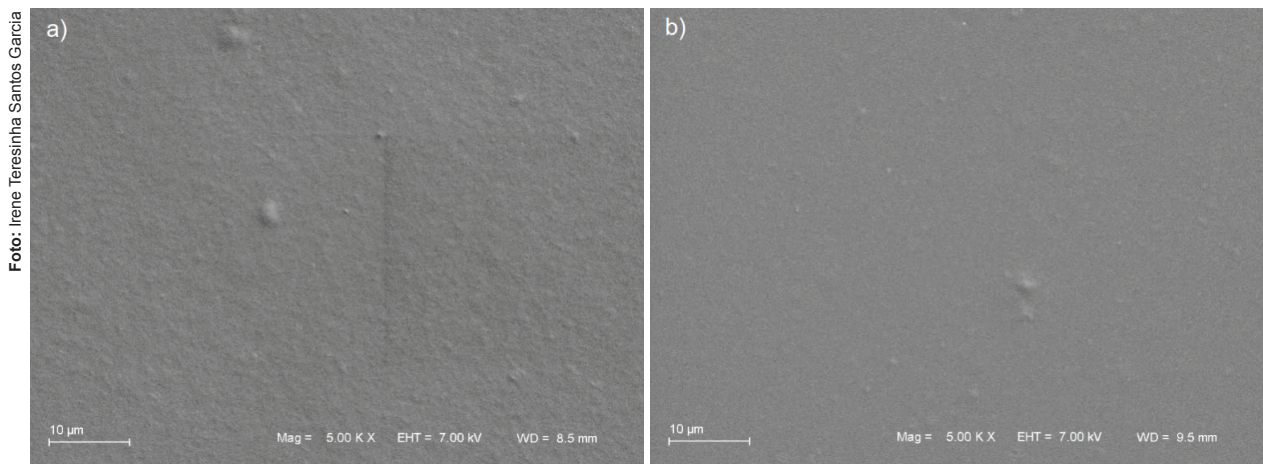


Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura dos filmes de quitosana diluída em ácido acético, obtidos com: a) 1,0 gL⁻¹; b) 10 gL⁻¹ de quitosana. UFRGS, Porto Alegre – RS, 2017.

O filme pode atuar como bloqueador solar na região ultravioleta do espectro eletromagnético (regiões UVC e UVB), devido à baixa transmitância apresentada na região de 200 a 320 nm (Figura 5a). A absorvidade molar foi calculada para os diferentes comprimentos de onda, para o filme com espessura conhecida, através da equação de Lambert-Beer adaptada para filmes autossuportados (Equação 5):

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda)bc$$

(5)

Onde $A(\lambda)$ é a absorvância e $\varepsilon(\lambda)$ é a absorvidade molar do filme como função do comprimento de onda (λ), respectivamente; b é a espessura do filme e c é a concentração de quitosana. A espessura do filme, 20

μm , foi determinada com uso de paquímetro. A absorvidade molar como função do comprimento de onda está apresentada na Figura 5b e pode ser ajustada através da equação (6):

$$\varepsilon(\lambda) = 6.17 \times 10^9 e^{-(\lambda/94)} + 1.07 \times 10^8 \quad (6)$$

A diminuição da absorvidade com o comprimento de onda permite formular filmes com diferentes espessuras e concentrações, de acordo com o efeito de bloqueador desejado. Aliado ao fato de que filmes de quitosana em ácido acético obtidos por Sionkowska (2006) não demonstraram alterações significativas na sua estrutura quando expostos à radiação solar, isso pode permitir o uso desse filme para bloquear radiação ultravioleta nas faixas UVC e UVB.

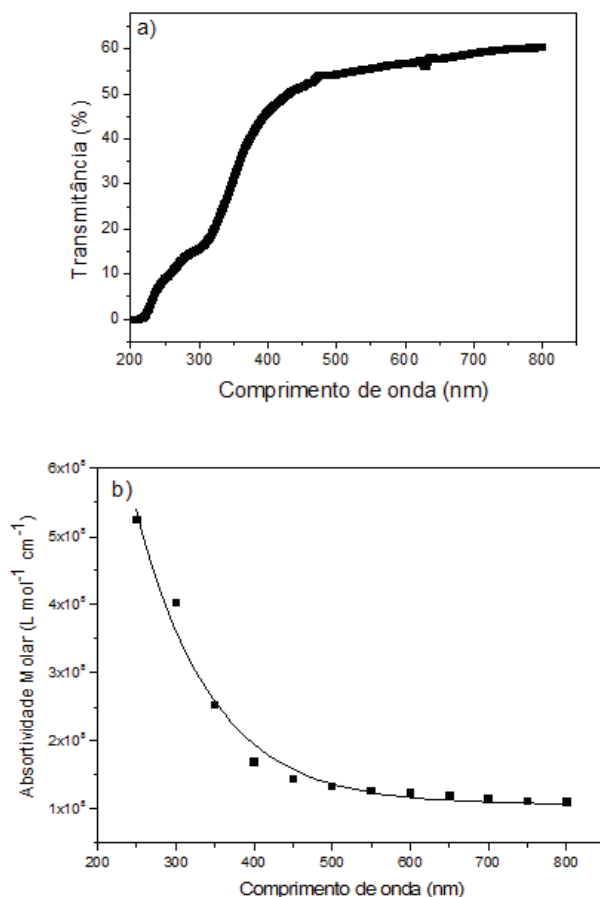


Figura 5. a) Transmittância em função do comprimento de onda para o filme de quitosana diluída em ácido acético com $20\mu\text{m}$ (10 g L^{-1}); b) absorvidade molar em função do comprimento de onda do filmes de quitosana diluída em ácido acético a $25\text{ }^\circ\text{C}$ (Porto, 2011).

O filme de quitosana diluída em ácido acético esteve estável até $63,8\text{ }^\circ\text{C}$, quando perdeu cerca de 20% da sua massa, o que é atribuído à liberação de água presa na estrutura do filme (Figura 6). Somente a $300\text{ }^\circ\text{C}$ o filme começou a se degradar sob o fluxo de N_2 . A pirólise produziu cerca de 40% em massa de carbono amorfo. Dados semelhantes foram obtidos por Fráguas et al. (2015), quando estudaram o preparo e caracterização de filmes comestíveis à base de quitosana.

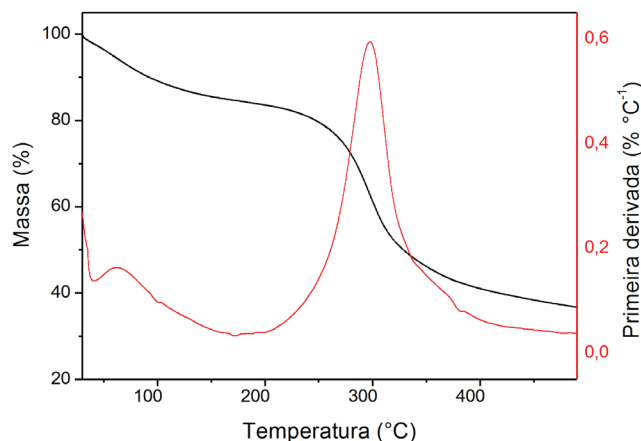


Figura 6. Curva de análise termogravimétrica (TGA) e termogravimétrica derivada (DTG) do filme de quitosana diluída em ácido acético (Porto, 2011).

O comportamento dos filmes, quando imersos em água, fornece informações sobre a resistência do revestimento, bem como o seu grau de inchamento. Os graus inchamento ocorreram função do tempo de imersão, obtidos através da expressão (7):

$$\Delta m = \left(\frac{m_i - m_0}{m_0} \right) * 100 \quad (7)$$

onde Δm é o aumento de massa relativo, m_0 é a massa inicial do filme e m_i é a massa do filme no tempo de imersão i (Figura 7). O filme de quitosana diluída em ácido acético obtido neste estudo é capaz de absorver em torno de 400% do seu peso em água, e verificou-se que os filmes permaneceram estáveis, quando imersos em água, por até sete dias. A baixa taxa de dissolução observada para os filmes, apesar de sua superfície apresentar boa afinidade com a água, pode ser devida a sua cristalinidade. Esse comportamento está de acordo com a baixa solubilidade da quitosana em água, relatada por Assis e Pessoa (2004), quando estudaram filmes finos de quitosana para uso como revestimento comestível e inibidor de crescimento de fungos sobre frutas fatiadas. Ainda segundo López-Mata (2015), não existe um valor padronizado para solubilidade de filmes de quitosana, pois as propriedades desse polímero variam de acordo com sua fonte, grau de desacetilação e peso molecular.

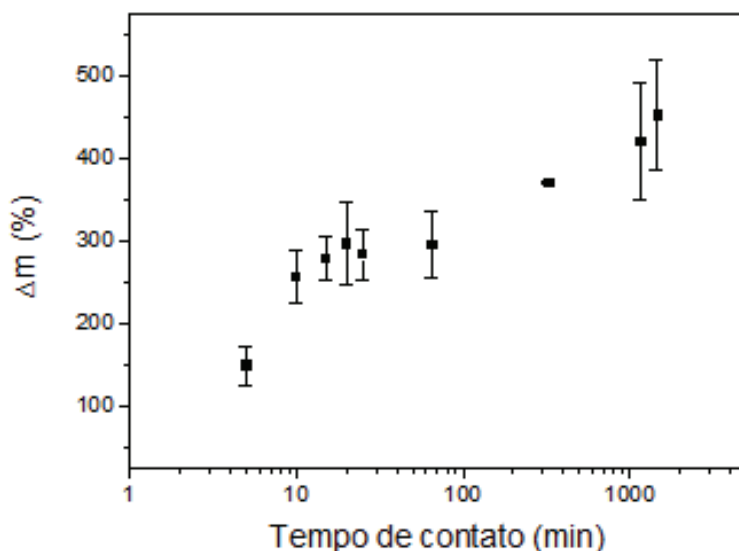


Figura 7. Grau de absorção de água do filme de quitosana diluída em ácido acético, em função do tempo de imersão, a 25 °C (Porto, 2011).

Para os testes de permeabilidade ao vapor de água, os filmes obtidos a partir de soluções com 10 g L⁻¹ de quitosana apresentaram-se rígidos e não puderam ser adequadamente fixados no suporte de teste. Esses

filmes foram descartados. Os filmes de quitosana diluída em ácido acéticos são permeáveis ao vapor d'água (Figura 8). Esses resultados são similares aos obtidos por Fráguas et al.(2015). Não se observou efeito significativo da espessura do filme na permeabilidade ao vapor d'água, para a amplitude da espessura estudada. O alto grau de inchamento em água, associado à baixa solubilidade (resistência à água) e à permeabilidade ao vapor d'água, pode favorecer a utilização desse filme como cobertura para plantas, podendo ainda ser agregados ao filme minerais ou outros produtos para aplicação foliar.

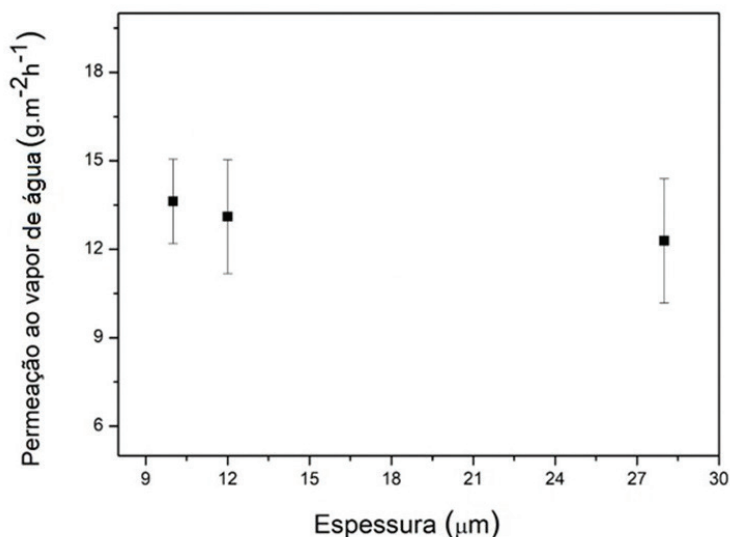


Figura 8. Permeabilidade ao vapor d'água de filmes de quitosana diluída em ácido acético, obtidos a partir de soluções de quitosana com 0,5, 1 e 3 gL⁻¹. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2017.

As soluções de quitosana diluída em ácido acético apresentaram baixos valores de pH (Tabela 2). De acordo com Assis e Pessoa (2004), o meio ácido das soluções precursoras favorece a formação de filmes homogêneos de quitosana, que fornecem revestimentos uniformes. Nas aplicações das soluções em feijoeiro, nas condições deste estudo, não se observou fitotoxidez nas plantas em concentrações até 3 g L⁻¹ de quitosana. Soluções com pH baixo podem ser aplicadas em plantas, de acordo com Wójcik (2004), que afirma que os valores ótimos de pH das soluções foliares para o reabastecimento de nutrientes minerais em plantas são de 3,0 a 5,5. Outro exemplo é a absorção de cálcio pelas folhas de macieiras, que ocorre em valores de pH que variam de 3,3 a 5,2 (Nachtigall, 2011).

Tabela 2. Avaliação do pH das soluções de quitosana. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2016.

Código	Concentração de quitosana (g L ⁻¹)	pH
D0	10	3,53
D1	3,0	3,63
D2	1,0	3,70
D3	0,5	3,77

Foi possível observar os filmes de quitosana diluída em ácido acético depositados na superfície das folhas a partir das soluções com 10, 3,0 e 1,0 g L⁻¹ (Figuras 9a, 9b e 9c). Não foi possível observar o filme depositado a partir da solução 0,5 g L⁻¹ (Figura 9d).

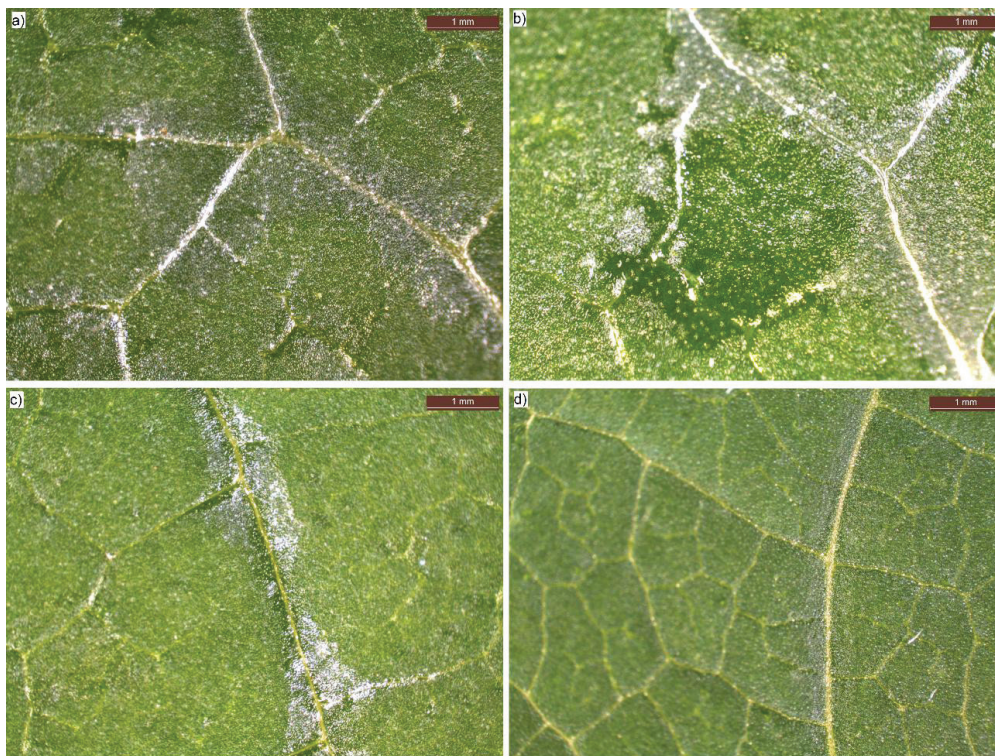


Figure 9. Folhas de feijoeiro, quatro horas após a aplicação de quitosana diluída em ácido acético, observadas na lupa com aumento de 10 vezes: a) tratamento 10 g L⁻¹; b) tratamento 3,0 g L⁻¹; c) tratamento 1,0 g L⁻¹; d) tratamento 0,5 g L⁻¹. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2016.

A micrografia óptica de parte da folha, tratada com a solução de quitosana 3,0 g L⁻¹, após a fixação em lâmina de vidro, pode ser observada na Figura 10. Essa solução formou um filme sobre a folha. A espessura média do filme obtida com o programa LAScore foi de 20,86 µm (Figura 10a). Na Figura 10b observa-se a micrografia da folha do tratamento com água, para comparação.

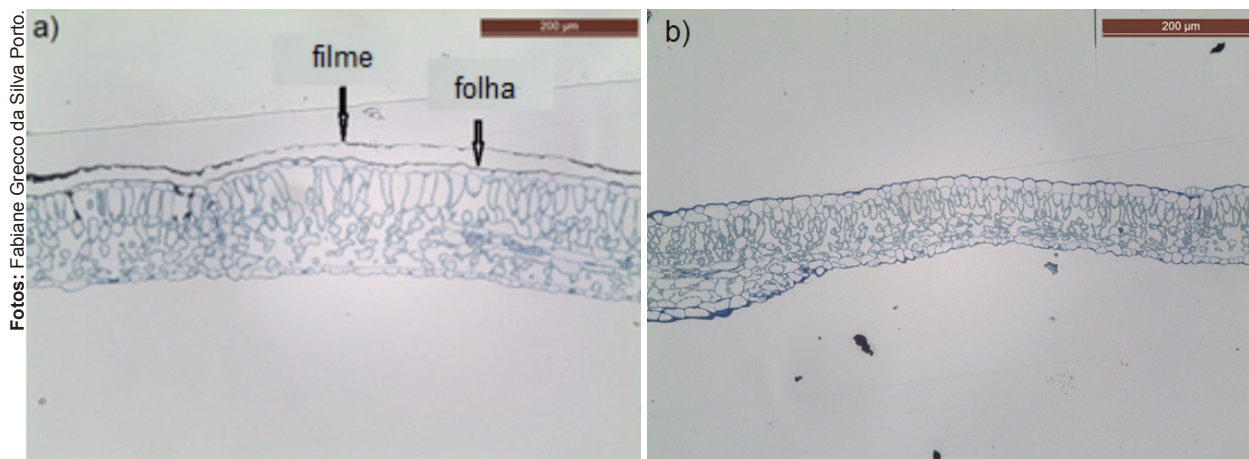


Figura 10. Micrografia óptica das folhas fixadas, com aumento de 100 vezes: a) após tratamento com a solução 3,0 g L⁻¹ de quitosana; b) após tratamento controle (água deionizada). Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2016.

A Figura 11a mostra as plantas trinta dias após o tratamento com quitosana, já em fase reprodutiva. Todas as plantas apresentaram desenvolvimento normal, em comparação com o tratamento de controle. Apenas a solução 10 g L⁻¹ de quitosana causou sintomas de fitotoxicidade em algumas folhas das plantas de feijão (Figura 11b). A fitotoxicidade é responsável por danos na membrana celular e, conseqüentemente, afeta o processo de fotossíntese (Chang; Oosterhuis, 1995). Sendo assim, nas condições deste estudo, soluções de quitosana diluída em ácido acético até 3 g L⁻¹ de quitosana podem ser utilizadas em feijoeiros. O filme pode ainda ter efeito fitoprotetor com a indução de resistência sistêmica, visto que a quitosana é um estimulante do mecanismo de defesa das plantas. Dousseaul et al. (2016) pulverizaram soluções de quitosana, diluídas em solução de ácido clorídrico, nas concentrações de 2,5; 5 e 10 g L⁻¹ em mudas de jaborandi e observaram ativação eficiente do sistema antioxidante nas folhas das plantas.



Fotos: Fabiane Grecco da Silva Porto.

Figura 11. a) Plantas de feijoeiro trinta dias após a aplicação dos tratamentos, cada vaso na imagem corresponde a um tratamento, da esquerda para a direita: controle, 0,5 g L⁻¹, 1,0 g L⁻¹, 3,0 g L⁻¹ e 10 g L⁻¹; b) detalhe da folha pulverizada com 10 g L⁻¹ de quitosana apresentando sintomas de fitotoxicidade. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2016.

Conclusões

Filmes de quitosana, obtidos através da deposição por *casting* de quitosana (com massa molar de 10⁶ g mol⁻¹ e 97% de grau de desacetilação), em solução aquosa de ácido acético 2% (v/v), apresentam estrutura semicristalina. Filmes obtidos com espessura de 20 µm, na concentração de 1,0 g L⁻¹, são capazes de bloquear cerca de 80% da radiação UVB e UVC incidente. A absorvidade molar decresce exponencialmente com o aumento do comprimento de onda. Os filmes obtidos são termicamente estáveis, resistentes à água e permeáveis ao vapor de água. As soluções precursoras formam filmes bem definidos na faixa de concentração de 1,0 a 3,0 g L⁻¹, sendo possível sua deposição em folhas de feijoeiros sem provocar fitotoxicidade nas plantas.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo auxílio financeiro na realização deste trabalho. A Mario Renê Pereira, funcionário do Laboratório de Fisiologia Vegetal da Embrapa Clima Temperado; a Nara Eliane Moreira Rocha, do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Embrapa Clima Temperado; e ao colega Cristiano Belle, pelo auxílio nas fotografias de microscopia.

Referências

- AMIRI, A.; GHORBANI, M.; JAHANGIRI, M. A novel chitosan/polyrhodanine nanocomposite: preparation, characterisation and application for Ni(II) ions removal from aqueous solution. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 10, n. 18, p. 1374-1386, 2015.
- ANAYA, P.; CÁRDENAS, G.; LAVAYEN, V.; GARCÍA, A.; O'DWYER, C. Chitosan Gel Film Bandages: Correlating Structure, Composition, and Antimicrobial Properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 128, n. 6, p. 3939-3948, 2013.
- ASSIS, O. B. G.; PESSOA, J. D. C. Preparation of Thin Films of Chitosan for use as Edible Coatings to Inhibit Fungal Growth on Sliced Fruits. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 7, n. 1, p. 17-22, 2004.
- 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, n. 4, p. 223-228, 2003.
- ASTM (American Society for Testing and Materials). **ASTM standard test methods for determining gas permeability characteristics of plastic film and sheeting**. Philadelphia: ASTM, 1995.
- BABAK, V. G.; AUZELY, R.; RINAUDO, M. Effect of Electrolyte Concentration on the Dynamic Surface Tension and Dilational Viscoelasticity of Adsorption Layers of Chitosan and Dodecyl Chitosan. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 32, p. 9519-9529, 2007.
- DOUSSEAU, S.; RODRIGUES, A. C.; LIRAIL, J. M. S.; JÚNIOR, P. M. R.; PACHECO, F. V.; ALVARENGAII, A. A.; RESENDE, M. L. V.; PAULA, A. C. F. F. Aplicação exógena de quitosana no sistema antioxidante de jaborandi. **Ciência Rural**, v. 46, n. 1, p. 191-197, 2016.

- BADAWY, M. E. I.; RABEA, E. I. Potencial of the biopolymer with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 51, n. 1, p. 110-117, 2009.
- BERGER, L. R. R.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N. P. Perspectivas para o Uso de Quitosana na Agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 12, n. 4, p. 195-215, 2011.
- BROWN, W. **Light scattering: principals and development**. Oxford: Clarendon Press, 1994.
- CADOGAN, E. I.; LEE, C. H.; POPURI, S. R.; LIN, H. Y. Effect of Solvent on Physico-Chemical Properties and Antibacterial Activity of Chitosan Membranes. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 63, n. 14, p. 708-715, 2014.
- CECHIN, I.; ROCHA, V. J.; FUMIS, T. F. Sensitivity of yellow passion fruit to ultraviolet-B radiation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 10, p. 1422-1427, 2012.
- CHANG, M. A.; OOSTERHIUS, D. M. Cotton Response to Foliar Application of Potassium Compounds at Different pH Levels. **Better Crops**, v. 79, n. 2, p. 20-22, 1995.
- CORDERO, A. P.; SIERRA, J. R.; RUIZ, J. R.; ÁLVAREZ, I. A.; ÁLVAREZ, Y. A.; CARRASCAL, A. R. Antibacterial Activity of Chitosan Acid Solutions Obtained from Shrimp Exoskeleton. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 16, n. 1, p. 104-110, 2014.
- DI PIERO, R. M.; GARDA, M. V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 9, p. 1121-1128, 2008.
- FRÁGUAS, R. M.; SIMÃO, A. A.; FARIA, P. V.; QUEIROZ, E. R.; OLIVEIRA JUNIOR, E. N.; ABREU, C. M. P. Preapration and Characterization Chitosan Edible Films. **Polímeros**, v. 25, número especial, p. 48-53, 2015.
- FREDDO, A. R.; MAZARO, S. M.; BRUN, E. J.; WAGNER JUNIOR, A. Chitosan as Fungistatic Mycelial Growth of *Rhizoctonia solani* Kuhn. **Ciência Rural**, v. 44, n. 1, p. 1-4, 2014.
- GU, X. D.; SUN, M. Y.; ZHANG, L.; FU, H. W.; CUI, L.; CHEN, R. Z.; ZHANG, D. W.; TIAN, J. K. UV-B induced changes in the secondary metabolites of *Morus alba* L. leaves. **Molecules**, v. 15, n. 5, p. 2980-2993, 2010.
- HENGQUAN, L.; NAN, H.; YONGXIANG, L.; HAILIANG, Y.; LE, L.; KEZHOU, L. Inhibition of bacterial adherence on the surface of biliary stent materials modified with chitosan. **Journal of Wuhan University of Technology-Materials Science Edition**, v. 25, n. 5, p. 795-798, 2010.
- HURT, A. P.; KOTHA, A. K.; TRIVEDI, V.; COLEMAN, N. J. Bioactivity, biocompatibility and antimicrobial properties of a chitosan-mineral composite for periodontal tissue regeneration. **Polímeros**, v. 25, n. 3, p. 311-316, 2015.
- KARA, H. H.; XIAO, F. G.; SARKER, M.; JIN, T. Z.; SOUSA, A. M. M.; LIU, C. K.; TOMASULA, P. M.; LIU, L. S. Antibacterial poly(lactic acid) (PLA) films grafted with electrospun PLA/allyl isothiocyanate fibers for food packaging. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 2, 42475, 2016.
- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.
- KIMURA, V. T.; MIYASATO, C. S.; GENESI, B. P.; LOPES, P. S.; YOSHIDA, C. M. P.; SILVA, C. F. The effect of andiroba oil and chitosan concentration on the physical properties of chitosan emulsion film. **Polímeros**, v. 26, n. 2, p. 168-175, 2016.
- KUCUKGULMEZ, A.; CELIK, M.; YANAR, Y.; SEN, D.; POLA, T. H.; KADAK, A. E. Physicochemical characterization of chitosan extracted from *Metapenaeus stebbingi* shells. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1144-1148, 2011.
- KULISH, E. I.; SHURSHINA, A. S.; CHERNOVA, V. V.; ZAKHAROV, V. P. The Role of Low-Molecular-Mass Electrolyte Drug Substances in the Modification of the Chitosan Matrix. **Polymers Science Series B**, v. 57, n. 3, p. 244-251, 2015.
- LEE, D. W.; LIM, C.; ISRAELACCHVILI, J. N.; HWANG, D. S. Strong Adhesion and Cohesion of Chitosan in Aqueous Solutions. **Langmuir**, v. 29, n. 46, p. 14222-14229, 2013.
- LEGARREA, S.; KARNIELI, A.; FERERES, A.; WEINTRAUB, P. G. Comparison of UV-absorbing nets in pepper crops: spectral properties, effects on plants and pest control. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, n. 2, p. 324-330, 2010.
- LI, M.; WANG, W.; FANG, W. H.; LI, Y. B. Inhibitory Effects of Chitosan Coating Combined with Organic Acids on *Listeria monocytogenes* in Refrigerated Ready-to-Eat Shrimps. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 8, p. 1377-1383, 2013. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-516
- LINDNER, P.; ZEMB, Th. **Neutron, x-ray and light scattering: introduction to an investigative tool colloidal and polymeric systems**. North-Holland: Elsevier Science Publishers, 1991. 375 p.
- LIU, M.; ZHOU, Y.; ZHANG, Y.; YU, C.; CAO, S. Preparation and Structural Analysis of Chitosan Films with and without Sorbitol. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 2, p. 186-191, 2013.
- LÓPEZ-MATA, M. A.; RUIZ-CRUZ, S.; SILVA-BELTRÁN, N. P.; ORNELAS-PAZ, J. J.; OCAÑO-HIGUERA, V. M.; RODRÍGUEZ-FÉLIZ, F.; CIRA-CHÁVEZ, L. A.; DEL-TORO-SÁNCHEZ, C. L.; SHIRAI, K. Physicochemical and antioxidant properties of chitosan films incorporated with cinnamon oil. **International Journal Of Polymer Science**, v. 2015, p. 1-8, 2015.
- LORENCETTI, G. A. T.; MAZARO, S. M.; POTRICH, M.; LOZANO, E. R.; BARBOSA, L. R.; LUCKMANN, D.; DALLACORT, S. Produtos alternativos para controle de *Thamastocoris peregrinus* e indução de resistência em plantas. **Floresta e Ambiente**, v. 22, n. 4, p. 541-548, 2015.
- MAHANINIA, M. H.; WILSON, L. D. Cross-linked chitosan beads for phosphate removal from aqueous solution. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 5, p. 42949, 2016.
- MAZARO, S. M.; WAGNER JUNIOR, A.; SANTOS, I.; CITADIN, I.; POSSENTI, J. C.; GOUVÊA, A. Control of Beet and Tomato Damping-off by Seed Treatment with Chitosan. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 11, p. 1424-1430, 2009.
- MIKHALOV, G. P.; TUCHKOV, S. V.; LAZAREV, V. V.; KULISH, E. I. Complexation of Chitosan with Acetic Acid According to Fourier Transform Raman Spectroscopy Data. **Physical Chemistry of Solutions**, v. 88, n. 6, p. 936-941, 2014.

NACHTIGALL, G. R. **Inovações tecnológicas para o setor da maçã**: relatório técnico. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2011. 338 p.

NICOLAU, A. **Polímeros obtidos a partir do ácido oléico: obtenção e caracterização físico-química no estado sólido e em solução**. 2009. 130 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

PANDIYARASAN, V.; ARCHANA, J.; PAVITHRA, A.; ASHWIN, V.; NAVANEETHAN, M.; HAYAKAWA, Y.; IKEDA, H. Hydrothermal growth of reduced graphene oxide on cotton fabric for enhanced ultraviolet protection applications. **Materials Letters**, v. 188, p. 123-126, Feb. 2017.

PEREIRA, M. R.; MARQUES, J. S.; FONSECA, J. L. C. Biocomposites based on chitosan and carnauba straw powder. **Polímeros**, v. 24, n. 4, p. 446-452, 2014.

POHLMANN, A. R.; PETTER, C. O.; BALZARETTI, N. M.; GUTERRES, S. S. **Tópicos em Nanociência e Nanotecnologia: II Mostra CNANO UFRGS/2008**. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2008. 244 p.

RONG, Q.; FENG, F.; MA, Z. Metal ions doped chitosan-poly(acrylic acid) nanospheres: Synthesis and their application in simultaneously electrochemical detection of four markers of pancreatic cancer. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 75, p. 148-154, 2016.

SANTOS, J. E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, E. R.; FILHO, S. P. C.; CAVALHEIRO, E. T. G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SIONKOWSKA, A. Effects of solar radiation on collagen and chitosan films. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 82, n. 1, p. 9-15, 2006.

SURESH, P. V.; RAJ, K. R.; NIDHEESH, T.; PAL, G. K.; SAKHARE, P. Z. Application of chitosan for improvement of quality and shelf life of table eggs under tropical room conditions. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 10, p. 6345-6354, 2015.

TIAN, M.; TANG, X.; QU, L.; ZHU, S.; GUO, X.; HAN, G. Robust ultraviolet blocking cotton fabric modified with chitosan/graphene nanocomposites. **Materials Letters**, v. 145, p. 340-343, 2015.

WÓJCIK, P. Uptake of mineral nutrients from foliar fertilization (review). **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**, v. 12, número especial, p. 201-218, 2004.

YEN, M. T.; YANG, J. H.; MAUC, J. L. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 1, p. 15-21, 2009.

Embrapa

Clima Temperado

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL